



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

(21) **PI0707272-4 A2**

(22) Data de Depósito: 23/01/2007
(43) Data da Publicação: 26/04/2011
(RPI 2103)



★ B R P I 0 7 0 7 2 7 2 A 2 ★

(51) Int.Cl.:
C12N 15/54
C12Q 1/68
C12N 9/12
G01N 33/50

(54) Título: **USO DE UM FRAGMENTO DE ÁCIDO NUCLEICO DE SEQ ID NO: 1 OU 2, OU DE UMA VARIANTE DE SEQ ID NO: 1 OU 2, FRAGMENTO DE ÁCIDO NUCLEICO DE SENSO E/OU ANTI-SENSO DE SEQ ID NO: 1 OU 2, OU DE UMA VARIANTE DE SEQ ID NO: 1 OU 2, COMPOSIÇÃO, PROTEÍNA, MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR CÂNCERES DE ORIGEM NEUROECTODERMAL, E, KIT DIAGNÓSTICO**

(57) Resumo: USO DE UM FRAGMENTO DE ÁCIDO NUCLEICO DE SEQ ID NO: 1 OU 2, OU DE UMA VARIANTE DE SEQ ID NO: 1 OU 2, FRAGMENTO DE ÁCIDO NUCLEICO DE SENSO E/OU ANTI-SENSO DE SEQ ID NO: 1 OU 2, OU DE UMA VARIANTE DE SEQ ID NO: 1 OU 2, COMPOSIÇÃO, PROTEÍNA, MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR CÂNCERES DE ORIGEM NEUROECTODERMAL, E, KIT DIAGNÓSTICOA presente invenção refere-se às novas moléculas de ácido nucleico e de proteína e ao seu uso em diagnose e terapia de câncer.

(30) Prioridade Unionista: 25/01/2006 EP 06075152.6

(73) Titular(es): Prosensa B.V.

(72) Inventor(es): Erno Vreugdenhil, Platenburg, Gerard Johannes, Van Kuik-romeijn, Petra

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT NL2007050025 de 23/01/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/086738 de 02/08/2007



“USO DE UM FRAGMENTO DE ÁCIDO NUCLEICO DE SEQ ID NO: 1
OU 2, OU DE UMA VARIANTE DE SEQ ID NO: 1 OU 2, FRAGMENTO
DE ÁCIDO NUCLEICO DE SENSO E/OU ANTI-SENSO DE SEQ ID NO:
1 OU 2, OU DE UMA VARIANTE DE SEQ ID NO: 1 OU 2,
5 COMPOSIÇÃO, PROTEÍNA, MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR
CÂNCERES DE ORIGEM NEUROECTODERMAL, E, KIT
DIAGNÓSTICO”

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a uma nova proteína tipo cortina
10 dupla (DCL) e a uma nova variante de mRNA de união codificadora da
mesma. São proporcionadas seqüências de ácido nucleico (RNA e DNA) de
camundongo e de humano codificadoras da nova proteína DCL, bem como a
própria proteína de camundongo e de humano e vários fragmentos de ácido
nucleico e variantes adequados para aplicações diagnósticas e terapêuticas. A
15 invenção adicionalmente refere-se aos métodos para modular níveis de
proteína DCL em terapia de câncer, especialmente terapia de neuroblastoma,
e aos métodos de diagnose e aos kits de diagnose.

Fundamentos da invenção

Como o tumor sólido mais comum em crianças, neuroblastoma
20 é responsável por 8 - 10% de todos os cânceres em crianças (para uma revisão
veja Lee *et al.*, 2003, Urol. Clin. N. Am. 30, 881890). Incidência anual varia
de 10 a 15 por 100.000 infantes, de acordo com a triagem baseada em
população conduzida em Canadá, Alemanha e Japão. Neuroblastoma é uma
doença heterogênea, com 40% diagnosticado em crianças abaixo de 1 ano de
25 idade que possuem um prognóstico muito bom, e o restante em crianças mais
velhas e adultos jovens que possuem prognóstico insatisfatório a despeito da
manejo médico e cirúrgico avançado. Um tratamento comum para pacientes
sob risco alto e imediata é quimioterapia seguida por resseção cirúrgica.
Contudo, erradicação completa de células de neuroblastoma é raramente

realizada. Conseqüentemente, a maior parte dos pacientes sofre recidiva, que é muitas vezes resistente ao tratamento convencional e rapidamente devastadora. Assim, após indução da remissão aparente por terapia de primeira linha, novas estratégias terapêuticas são necessárias para
 5 completamente erradicar o número pequeno de células sobreviventes, para prevenir a recidiva (Lee *et al.*, 2003, *supra*).

Desenvolvimento do cérebro requer a configuração precisa e coordenada de divisão, migração e diferenciação celulares de neuroblastos (Noctor *et al.*, 2001, *Nature* 409, 714-720; Noctor *et al.*, 2004, *Nat.*
 10 *Neuroscience* 7, 136-144). Um evento chave em ambos estes processos é a (re)organização e (des)estabilização do citoesqueleto, que é compreendido de microtúbulos e de proteínas microtúbulo-associadas (MAPS). Uma interação cuidadosamente orquestrada de microtúbulos com várias MAPS é requerida antes de poder ocorrer a migração neuronal (revisto em Feng e Walsh, 2001,
 15 *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 408-416). Embora os fatores envolvidos em migração neuronal estejam bem estabelecidos, relativamente pouco é sabido sobre os genes que controlam os processos iniciais, como mitose e proliferação de neuroblasto. Tais fatores muito provavelmente também envolvem regulação dinâmica dos elementos microtubulares e citoesqueletais (Haydar *et al.*, 2003,
 20 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 2890-2895; Kaltschmidt *et al.*, 2000, *Nat. Cell Biol.* 2, 7-12; Knoblich, 2001, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 11-20).

Recentemente, vários genes envolvidos em reorganização de citoesqueleto têm sido identificados os quais, quando interrompidos ou mutados, causam distúrbios de migração neuronal (revisto em Feng e Walsh,
 25 2001, *supra*). Um destes genes é cortina dupla (*DCX*) que codifica uma proteína de 365 AA crítica para migração de neurônios corticais de recém-nascidos (veja WO99/27089).

No genoma de humano e de roedor, um gene relacionado, chamado de quinase tipo de cortina dupla (*DCLK*), está presente o qual possui

uma identidade de sequência substancial com o gene *DCX*. O gene *DCLK* de humano abarca mais do que 250 kb e é sujeito à união alternativa extensiva, gerando múltiplos transcritos codificadores de proteínas diferentes (Matsumoto *et al.*, 1999, *Genomics* 56, 179-183). Um dos transcritos principais, DCLK-long, codifica um domínio de DCX fusionado em um domínio de quinase-semelhante que possui homologia de aminoácidos com a família de proteínas dependentes de Ca^{++} /Calmodulina (CaMK). Outro transcrito, DCLK-short, é principalmente expressado em cérebro de adulto, falta o domínio de DCX e codifica uma quinase com propriedades de CaMK-semelhante (Engels *et al.*, 1999, *Brain Res.* 835, 365368; Engels *et al.*, 2004, *Brain Res.* 120, 103-114; Omori *et al.*, 1998, *J. Hum. Genet.* 43, 169-177; Vreugdenhil *et al.*, 2001, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 94, 67-74).

Estudos recentes sugerem papéis importantes para o gene *DCLK* em neurodegeneração e plasticidade neuronais dependentes de cálcio (Burgess and Reiner, 2001, *J. Biol. Chem.* 276, 36397-36403; Kruidering *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276, 38417-38425). DCLK-long é expressado durante o desenvolvimento inicial (Omori *et al.*, 1998, *supra*) e como DCX, é capaz de polimerização de microtúbulo (Lin *et al.*, 2000, *J. Neurosci.* 20, 9152-9161). Contudo, o papel preciso do gene DCLK no desenvolvimento do sistema nervoso é desconhecido.

Várias variantes de união alternativas de DCLK têm sido descritas e tem sido verificado que duas destas são diferentemente expressadas e possuem atividades de quinase diferentes (Burgess e Reiner 2002, *J Biol. Chem.* 277, 17696-17705). Os presentes inventores clonaram e funcionalmente caracterizaram uma nova variante de união do gene DCLK, referido aqui como tipo cortina dupla (DCL), e têm mostrado que DCL é um gene de citoesqueleto que está associado com fusos mitóticos de neuroblastos se dividindo. Em adição, os presentes inventores têm planejado novos métodos para diagnose e terapia de câncer, especialmente para diagnose e

terapia de neuroblastoma.

Recentemente, novas abordagens para tratamento de neuroblastoma têm sido publicadas, envolvendo o uso de oligonucleotídeos de anti-senso de alvejamento de dois oncogenes diferentes (Pagnan *et al.*, 2000, J. Natl. Cancer Inst. Vol 92, 253-261; Brignole *et al.* 2003, Cancer Lett. 197, 231-235; Burkhardt *et al.*, 2003, J. Natl. Cancer Inst. 95, 1394-1403). A primeira abordagem foi direcionada contra o oncogene c-Myb (Pagnan *et al.*, 2000, supra). Expressão de gene c-Myb tem sido relatada em vários tumores sólidos de origens embriônicas diferentes, incluindo neuroblastoma, onde está ligado em diferenciação e proliferação celulares. Foi mostrado que um fosforotioato oligodesoxinucleotídeo complementar aos códons 2 - 9 de c-Myb mRNA de humano inibiu o crescimento de células de *in vitro*. Seu efeito inibitório foi mais alto quando foi liberado em células em lipossomos estericamente estabilizados revestidos com um anticorpo monoclonal (mAb) específico para antígeno de neuroectoderma disialogangliosídeo GD₂ (Pagnan *et al.*, 2000, supra). Embora estudos farmacocinéticos e de biodistribuição após injeção intravenosa de lipossomos anti-GD₂-alvejados tenham sido realizados (Brignole *et al.*, 2003, supra), o efeito em um modelo de neuroblastoma *in vivo* não tem sido mostrado até agora. Efeitos colaterais tóxicos potenciais de um oligonucleotídeo de anti-senso c-Myb também devem ser considerados, porque a proteína c-Myb desempenha um papel fundamental na proliferação de células normais e já tem sido mostrado que um oligonucleotídeo de anti-senso c-Myb inibe a hematopoiese de humano normal *in vitro* (Gewirtz e Calabretta, 1988, Science 242, 1303-1306).

Outra abordagem de anti-senso foi direcionada contra o oncogene MYCN (N-myc) (Burkhardt *et al.*, 2003, supra). Amplificação do gene MYCN ocorre apenas em 25 a 30% dos neuroblastomas, mas está associada com uma doença de estado avançado, progressão rápida de tumor e uma taxa de sobrevivência de menor do que 15%. O efeito de um

fosforotioato oligodesoxinucleotídeo complementar aos cinco primeiros códons de MYCN mRNA de humano foi testada *in vivo* em um modelo murino de neuroblastoma. Foi mostrado que liberação contínua do oligonucleotídeo por 6 semanas via uma bomba microosmótica subcutaneamente implantada pôde diminuir a incidência de tumor e a massa de tumor no sítio da bomba implantada (Burkhart *et al.*, 2003, *supra*). Conduto esta abordagem é muito local, e permanece para ser estabelecido um efeito sistêmico do oligonucleotídeo sobre metástases para sítios de órgão distantes, em adição aos efeitos colaterais tóxicos potenciais sobre células normais após liberação sistêmica. Também, o efeito do oligonucleotídeo sobre um tumor já estabelecido não tem sido mostrado.

A escolha do gene alvo é crucial para o desenvolvimento de um diagnóstico e de uma terapia de neuroblastoma efetivos. Como mencionado acima, os presentes inventores têm clonado uma nova variante de união de mRNA do gene DCLK, codificadora de nova proteína DCL, e têm funcionalmente caracterizado esta variante de união. Foi surpreendentemente verificado que esta variante de união é exclusivamente expressada em neuroblastomas, enquanto que não é detectável em tecido e linhagens celulares saudáveis testados. Esta descoberta foi usada para planejar novos métodos diagnósticos e terapêuticos.

Definições

“Silenciamento de gene” refere-se aqui a uma redução (infra-regulação) ou abolição completa de produção de proteína alvo em uma célula. Silenciamento de gene pode ser o resultado de uma redução de transcrição e/ou tradução do gene alvo. O(s) “gene(s) alvo(s)” é/são o(s) gene(s) que é/são para ser(em) silenciado(s). O gene alvo é normalmente um gene endógeno, mas pode em certas circunstâncias ser um transgene. Como métodos que podem ser usados para silenciar todos ou vários membros de uma família de genes, o termo “gene alvo” também pode ser referir a uma

família de genes que é para ser silenciada.

O termo “gene” refere-se à sequência de ácido nucleico que é transcrita em uma molécula de mRNA (“região transcrita”), operacionalmente ligada em vários elementos de sequência necessários para transcrição, tais como uma sequência regulatória de transcrição, intensificadores, sequência líder-5’, região codificadora e sequência 3’-não-traduzida. Um gene endógeno é um gene naturalmente encontrado dentro de uma célula.

“Senso” refere-se à fita codificadora de uma molécula de ácido nucleico, tal como a fita codificadora de uma molécula de DNA duplex ou de uma molécula de transcrito de mRNA. “Anti-senso” refere-se à fita complementar inversa da fita de senso. Uma molécula de anti-senso pode ser um DNA de anti-senso ou um RNA de anti-senso, i.e. possuindo uma sequência de ácido nucleico idêntica a do DNA de anti-senso, com a diferença de que T (timina) é substituída por U (uracila).

O termo “compreendendo” é para ser interpretado como especificando a presença de partes, etapas ou componentes enunciados, mas não exclui a presença de uma ou mais partes, etapas ou componentes adicionais. Uma sequência de ácido nucleico compreendendo a região X, pode portanto compreender regiões adicionais, i.e. região X pode estar embebida em uma região de ácido nucleico maior.

Os termos “substancialmente idêntico(a)”, “identidade substancial” ou “essencialmente similar” ou “similaridade essencial” significam que dois peptídeos ou duas sequências de nucleotídeos, quando otimamente alinhados, tal como pelos programas GAP ou BESTFIT usando parâmetros pré-estabelecidos, compartilham pelo menos cerca de 75%, preferivelmente pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência, preferivelmente pelo menos cerca de 85 ou 90% de identidade de sequência, mais preferivelmente pelo menos 95%, 97%, 98% de identidade de sequência ou mais (e.g., 99%, de identidade de sequência). GAP usa o algoritmo de

alinhamento global de Needleman e Wunsch para alinhar duas seqüências sobre o comprimento inteiro delas, maximizando o número de combinações e minimizando o número de lacunas. Geralmente, os parâmetros pré-estabelecidos de GAP são usados, com uma penalidade de criação de lacuna = 50 (nucleotídeos) / 8 (proteínas) e penalidade de extensão de gap = 3 (nucleotídeos) / 2 (proteínas). Para nucleotídeos a matriz de escore pré-estabelecida usada é nwsgapdna e para proteínas a matriz de escore pré-estabelecida é Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Science 89, 915-919). Está claro que quando é citado que seqüências de RNA são essencialmente similares ou possuem um certo grau de identidade de seqüência com seqüências de DNA, timina (T) na seqüência de DNA é considerada igual à uracila (U) na seqüência de RNA. Seqüências “idênticas” possui identidade de seqüência de aminoácidos ou de ácido nucleico de 100% quando alinhadas. Também neste caso uma seqüência de RNA é 100% a uma seqüência de DNA se a única diferença entre as seqüências é que a seqüência de RNA compreende U em vez de T em posições idênticas. Alinhamentos de seqüências e escores para identidade de seqüência percentual podem ser determinados usando programas de computador, tal como o GCG Wisconsin Package, Version 10.3, disponível na Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 USA. Alternativamente identidade ou similaridade percentual pode ser determinada pela pesquisa contra banco de dados tais como FASTA, BLAST, etc.

Quando for feita aqui referência às “seqüências” ou aos “fragmentos de seqüência”, é para ser entendido que se refere às moléculas com uma certa seqüência de nucleotídeos (DNA ou RNA) ou de aminoácidos.

“Condições de hibridização estridentes” também podem ser usadas para identificar seqüências de nucleotídeos, que são substancialmente idênticas a uma dada seqüência de nucleotídeos. Condições estridentes são

dependentes de seqüência e serão diferentes em circunstâncias distintas. Geralmente, condições estringentes são selecionadas para serem cerca de 5°C abaixo do ponto de fusão térmico (T_m) para as seqüências específicas em uma força iônica e pH definidos. O T_m é a temperatura (sob pH e força iônica definidos) na qual 50% da seqüência alvo hibridiza em uma sonda perfeitamente combinada. Condições tipicamente estringentes serão escolhidas nas quais a concentração de sal é cerca de 0,02 molar em pH 7 e a temperatura é pelo menos 60°C. Abaixamento da concentração de sal e/ou aumento da temperatura aumenta a estringência. Condições estringentes para hibridizações de RNA-DNA (Northern blots usando uma sonda de e.g. 100nt) são por exemplo aquelas que incluem pelo menos uma lavagem em 0,2X SSC a 63°C por 20 min, ou condições equivalentes. Condições estringentes para hibridização de DNA-DNA (Southern blots usando uma sonda de e.g. 100nt) são por exemplo aquelas que incluem pelo menos uma lavagem (normalmente 2) em 0,2X SSC em uma temperatura de pelo menos 50°C, normalmente cerca de 55°C, por 20 min, ou condições equivalentes.

Um “indivíduo” refere-se aqui a um indivíduo mamífero, especialmente um indivíduo animal ou humano.

“Célula(s) alvo” refere-se aqui às células nas quais os níveis de proteína DCL são para serem modificados (especialmente reduzidos) e incluem quaisquer células de câncer nas quais a proteína DCL é normalmente produzida, em particular as células de câncer de origem neuroectodermal, especialmente células de neuroblastoma. A presença de DCL em células alvo pode ser determinada como descrito aqui alhures. Abaixo apenas diagnose e terapia de neuroblastoma são referidos, mas é entendido que qualquer referência a células de neuroblastoma pode ser aplicada analogamente a outros tipos de células alvo de câncer, em particular células alvo de câncer de origem neuroectodermal, e que tais métodos, usos e kits são aqui incluídos.

Descrição detalhada da invenção

A presente invenção proporciona novas seqüências de proteína e de ácido nucleico para uso em métodos diagnósticos e terapêuticos de neuroblastoma. Foi verificado que a proteína DCL é expressada especificamente em célula em todas as linhagens de célula de neuroblastoma testadas até agora (linhagens de célula de camundongo e de humano). Foi verificado que DCL polimeriza e estabiliza microtúbulos e a co-localização de DCL endógena com fusos mitóticos em células de neuroblastoma se dividindo indica um papel de DCL em formação correta do fuso mitótico em células se dividindo. Silenciamento de gene DCL em linhagens de célula de neuroblastoma resultou em deformação dramática ou até mesmo ausência do fuso mitótico e desmontagem de microtúbulo.

Células de neuroblastoma são de origem neuroectodermal. Em vertebrados, as células-tronco multipotentes de tubo neural embriônico (neuroectoderma) produzem os principais tipos de célula do sistema nervoso central (CNS) e do sistema nervoso periférico (PNS). Tais tipos de célula são definidos como células derivadas de neuroectoderma ou em outras palavras de origem neuroectodermal. Tumores de origem neuroectodermal incluem todos os neoplasmas dos CNS e PNS, tais como neuroblastoma, meduloblastoma, glioblastoma, oligodendroglioma, oligoastrocitoma, astrocitoma, neurofibroma, ependimoma, MPNST (tumores malignos de bainha de nervo periférico), ganglioneuroma ou Schwannoma. Também de origem neuroectodermal são os tumores tais como rabdomiossarcoma, retinoblastoma, carcinoma pulmonar de célula pequena, feocromocitoma adrenal, PNET primitivo (tumor neuroectodermal periférico), sarcoma de Ewing e melanoma. Visto que todos estes tumores compartilham uma origem embriônica comum com células de neuroblastoma, DCL será um alvo para diagnose e tratamento nestes casos.

Seqüências de ácido nucleico e seqüências de aminoácidos de acordo com a invenção

A presente invenção proporciona novas seqüências de molécula de ácido nucleico, SEQ ID NO: 1 (*dcl* mRNA e cDNA de camundongo) e SEQ ID NO: 2 (*dcl* mRNA e cDNA de humano), que codificam as proteínas SEQ ID NO: 3 (DCL de camundongo) e SEQ ID NO: 4 (DCL de humano). As seqüências de *dcl* mRNA de SEQ ID NO: 1 e 2 são novas variantes de união do gene DCLK de camundongo e de humano. As variantes de união compreendem exon 1 ao exon 8 (parcialmente, até um códon de parada) no qual o exon 1 é não-codificador. Em ambas as seqüências, exon 6 do gene DCLK está ausente. Na seqüência de mRNA de camundongo, o códon de início de tradução é encontrado em nucleotídeos 189-191, enquanto que o códon de parada de tradução é encontrado em nucleotídeos 1275-1277. Exon 2 inicia em nt 169, exon 3 inicia em nt 565, exon 4 inicia em nt 912, exon 5 inicia em nt 1012, exon 7 inicia em nt 1129 e exon 8 inicia em nt 1224. Na seqüência de mRNA de humano mRNA, o códon de início de tradução é encontrado em nucleotídeos 213-215, enquanto que o códon de parada de tradução é encontrado em nucleotídeos 1302-1304. Exon 2 inicia em nt 194, exon 3 inicia em nt 589, exon 4 inicia em nt 936, exon 5 inicia em nt 1036, exon 7 inicia em nt 1153 e exon 8 inicia em nt 1248. As proteínas DCL de camundongo e de humano são muito similares em suas seqüências de aminoácidos e ambas possuem um peso molecular de cerca de 40 kDa. A proteína DCL de camundongo compreende 362 aminoácidos, enquanto que a proteína DCL de humano compreende 363 aminoácidos. Identidade de seqüência de aminoácidos é cerca de 98%, as apenas 4 diferenças de aminoácido estão presentes. Estas estão no aminoácido 172, que é G na seqüência de camundongo e S na seqüência de humano, na posição 290 (A na seqüência de camundongo vs. S na seqüência de humano), na posição 294 (G na seqüência de camundongo vs. S na seqüência de humano) e a V na posição 359 da seqüência de humano está ausente na seqüência de camundongo. Devido à similaridade de seqüência alta também,

em nível de cDNA/mRNA (que é cerca de 90% para a região codificadora), qualquer sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO: 1 ou 2), ou seus fragmentos ou suas variantes, podem ser usadas nas abordagens de silenciamento de gene de células alvo, especialmente de células de câncer de humano de origem neuroectodermal. É entendido que quando referência for feita aqui a uma molécula de RNA ou mRNA, embora a listagem de seqüências mostre uma seqüência de DNA, a molécula de RNA é idêntica à seqüência de DNA com a diferença de que T (timina) é substituída por U (uracila).

À parte das seqüência de ácido nucleico completas de *dcl* (SEQ ID NO: 1 e 2), também são proporcionados fragmentos de senso e/ou de anti-senso de SEQ ID NO: 1 e 2, que são adequados para uso em métodos de silenciamento de gene possuindo *dcl* como gene alvo. O(s) fragmento(s) têm que ser funcionais quando usados em qualquer um dos métodos de silenciamento de gene descritos abaixo, e em particular causam uma redução significativa da produção da proteína DCL de SEQ ID NO: 3 ou 4 quando presente em células de câncer de origem neuroectodermal. Uma “redução significativa na produção de SEQ ID NO: 3 ou 4” refere-se a uma redução da proteína-DCL de pelo menos 50%, 60%, 70%, preferivelmente pelo menos 80%, 90% ou 100% em células de câncer de origem neuroectodermal compreendendo o fragmento de senso e/ou de anti-senso de SEQ ID NO: 1 e/ou 2, comparado com o nível de proteína-DCL encontrado em células de câncer de origem neuroectodermal nas quais fragmentos de senso e/ou de anti-senso de SEQ ID NO: 1 e/ou 2 não foram introduzidos. Em adição, a introdução do fragmento de senso e/ou de anti-senso de SEQ ID NO: 1 e/ou 2 causa, por redução ou abolição significativa da produção de proteína-DCL na célula, uma mudança fenotípica na célula. Em particular, resultam deformação e desmontagem de microtúbulo do fuso mitótico e é significativamente reduzida a proliferação de células de câncer de origem

neuroectodermal, e.g. células de neuroblastoma. A “redução significativa de proliferação de células de câncer de origem neuroectodermal, e.g. proliferação de células de neuroblastoma” refere-se a uma redução ou inibição completa em crescimento (divisão celular) e por exemplo células de neuroblastoma compreendendo os fragmentos de senso e/ou de anti-senso de SEQ ID NO: 1 e/ou 2. Uma pessoa experiente pode facilmente testar, usando os métodos aqui descritos, se um fragmento de senso e/ou de anti-senso de SEQ ID NO: 1 e/ou 2 possui a capacidade para causar o efeito desejado. O método mais fácil para testar isto é introduzir os fragmentos de senso e/ou de anti-senso em e.g. linhagens de células de neuroblastoma cultivadas *in vitro* e analisar níveis de proteína-DCL e/ou de *dcl* mRNA e/ou mudanças fenotípicas e/ou proliferação de células de neuroblastoma naquelas células, comparado com as células de controle. O efeito *in vitro* reflete a adequabilidade dos fragmentos de senso e/ou de anti-senso a serem usados para preparar uma composição para o tratamento de por exemplo neuroblastoma.

Em princípio, um fragmento (senso e/ou anti-senso) de SEQ ID NO: 1 e/ou 2 pode ser qualquer parte de SEQ ID NO: 1 ou 2 compreendendo pelo menos 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 25, 30, 50, 100, 200, 500, 1000 ou mais nucleotídeos consecutivos de SEQ ID NO: 1 ou 2, ou seu complemento ou seu complemento inverso. O fragmento de senso e/ou de anti-senso pode ser um fragmento de RNA ou um fragmento de DNA. Ademais, o fragmento pode ser de fita única ou de fita dupla (duplex). O fragmento de ácido nucleico também pode ser 100% idêntico à parte da região não-codificadora de SEQ ID NO: 1 ou 2 (e.g. a uma região de nucleotídeos 1188 de SEQ ID NO: 1 ou nucleotídeos 1-212 de SEQ ID NO: 2), ou à parte da região codificadora (nucleotídeos 189 a 1274 de SEQ ID NO: 1 ou nucleotídeos 213 a 1301 de SEQ ID NO: 2) ou a uma região que é parcialmente não-codificadora e parcialmente codificadora (tais como limites de intron-exon ou exon 1). Um fragmento de ácido nucleico pode ser feito *de*

novo por síntese química, usando por exemplo um sintetizador de oligonucleotídeo como fornecido e.g. por Applied Biosystems Inc. (Fosters, CA, USA), ou pode ser clonado usando métodos de biologia molecular padrão, tais como descritos em Sambrook *et al.* (1989) e Sambrook e Russell (2001). Os fragmentos de ácido nucleico de acordo com a invenção podem ser usados para vários propósitos, tais como: como iniciadores de PCR, como sondas para hibridização de ácido nucleico, como oligonucleotídeos de DNA ou RNA a serem liberados para as células alvo ou como siRNAs (RNAs interferentes pequenos) a serem liberados para ou a serem expressados em células alvo. Devido ao fato de os métodos de silenciamento de gene fazerem uso de fragmentos de ácido nucleico de senso e/ou anti-senso diferentes, estes serão descritos em detalhe abaixo, sem limitação do escopo da presente invenção.

Em adição, variantes de SEQ ID NO: 1 e 2, seu complemento ou seu complemento inverso, como descrito acima, são proporcionados. “Variantes” não são 100% idênticas em sequência de ácido nucleico à SEQ ID NO: 1 ou 2 (ou seu complemento ou complemento inverso), mas são “essencialmente similares” em sua sequência de ácido nucleico. “Variantes de SEQ ID NO: 1 ou 2” incluem sequências de ácido nucleico que, devido à degeneração do código genético, também codificam os aminoácidos de SEQ ID NO: 3 ou 4, ou seus fragmentos. Variantes de SEQ ID NO: 1 ou 2, seu complemento, complemento inverso incluem também SEQ ID NO: 1 ou 2 que difere de SEQ ID NO: 1 ou 2 através de substituições, deleções e/ou reposição de um ou mais nucleotídeos. “Variantes de SEQ ID NO: 1 e 2” também incluem sequências compreendendo ou consistindo de miméticos de nucleotídeos tais como PNA's (Ácido Peptídeo-Nucleico), LNA's (Ácido Nucleico Bloqueado) e semelhantes ou compreendendo morfolino, 2'-O-metil-RNA ou 2'-O-alil-RNA.

Sequências de ácido nucleico variante podem, por exemplo,

ser preparadas *de novo* por síntese química, geradas por mutagênese ou métodos de embaralhamento de gene ou isoladas de fontes naturais, usando por exemplo tecnologia de PCR ou hibridização de ácido nucleico. Uma variante de SEQ ID NO: 1 ou 2 também pode ser definida como uma
5 seqüência de ácido nucleico que é “essencialmente similar” (como definido acima) à SEQ ID NO: 1 ou 2, seu complemento ou complemento inverso. Especialmente, variantes que possuem pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou mais de identidade de seqüência com SEQ ID NO: 1 ou 2 sobre o comprimento inteiro das seqüências são aqui incluídas. Em uma modalidade
10 da invenção fragmentos de senso e/ou de anti-senso de seqüências de ácido nucleico que são essencialmente similares à SEQ ID NO: 1 ou 2 são proporcionados. Como descrito para os fragmentos de SEQ ID NO: 1 ou 2, os fragmentos de variantes de SEQ ID NO: 1 ou 2 possuem a capacidade de significativamente reduzir os níveis celulares da proteína-DCL quando
15 introduzidos em quantidades adequadas em células de câncer de origem neuroectodermal, e.g. células de neuroblastoma. Funcionalmente, estes fragmentos variante portanto têm que ser equivalentes aos fragmentos de senso e/ou de anti-senso descritos, e uma pessoa experiente pode testar a funcionalidade de tais fragmentos em alguma maneira como descrito.

20 Também são proporcionadas proteínas isoladas de SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4, bem como seus fragmentos e variantes. As proteínas DCL (ou seus fragmentos ou variantes) de acordo com a invenção podem ser por exemplo usadas para produzir anticorpos, tais como anticorpos monoclonais ou policlonais, que podem ser então usados em vários métodos
25 de detecção de DCL, métodos diagnósticos ou terapêuticos, ou kits. Alternativamente, epítomos, que geram uma resposta imune podem ser identificados dentro das proteínas. As proteínas DCL, seus fragmentos ou variantes podem ser sinteticamente preparadas, podem ser purificadas das fontes naturais ou podem ser expressadas em células recombinantes ou

culturas de células. Um fragmento de proteína DCL pode ser qualquer fragmento de SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4 compreendendo 20, 50, 100, 200, ou mais de aminoácidos consecutivos idênticos ou essencialmente similares à parte correspondente de SEQ ID NO: 3 ou 4. Variantes de proteína DCL incluem seqüências de aminoácido que possuem identidade de seqüência substancial à SEQ ID NO: 3 ou 4, por exemplo seqüências de aminoácido que diferem de SEQ ID NO: 3 ou 4 em 1, 2, 3, 4, 5 ou mais de substituições, deleções ou inserções de aminoácido. Variantes também incluem proteínas compreendendo modificações de estrutura principal de peptídeo ou miméticos de aminoácido, tais como aminoácidos de não-proteína (e.g. β -, γ -, δ -aminoácidos, β -, γ -, δ -iminoácidos) ou derivados de L- α -aminoácidos. São conhecidos pelo técnico experiente numerosos miméticos de aminoácido, incluem ciclo-hexil-alanina, ácido 3-ciclo-hexil-propionico, L-adamantil-alanina, ácido adamantil-acético e semelhantes. Miméticos de peptídeo adequados para peptídeos da presente invenção são discutidos por Morgan e Gainor, (1989) Ann. Repts. Med. Chem. 24:243-252.

Métodos de acordo com a invenção

Em uma modalidade, a invenção proporciona métodos para silenciar gene(s) *dcl* em tecidos ou células alvo, em particular em células de câncer de origem neuroectodermal, especialmente células de neuroblastoma. Estes métodos possuem em comum o fato de que um ou mais fragmentos de ácido nucleico de senso e/ou anti-senso de SEQ ID NO: 1 ou 2 ou fragmentos de variantes de SEQ ID NO: 1 ou 2 (como descrito acima) é/são liberado(s) para a(s) célula(s) alvo (células de neuroblastoma) e é/são introduzido(s) na(s) célula(s) alvo, deste modo a introdução em célula(s) alvo(s) resulta em silenciamento do(s) gene(s) *dcl* endógeno(s) (o gene alvo), e em particular resulta em uma redução significativa de proteína-DCL e proliferação de células de câncer de origem neuroectodermal, e.g. proliferação de células de neuroblastoma.

Vários métodos de silenciamento de gene são conhecidos na técnica. Geralmente, RNA ou DNA com homologia de sequência a um gene alvo endógeno é introduzido em uma célula com o objetivo de interferir com a transcrição e/ou tradução do gene alvo endógeno. Produção da proteína alvo é deste modo significativamente reduzida ou preferivelmente completamente abolida. Métodos de silenciamento de gene conhecidos incluem expressão de RNA de anti-senso RNA (veja e.g. EP140308B1), co-supressão (expressão de RNA de senso, veja e.g. EPO465572B1), liberação ou expressão de RNAs interferentes pequenos (siRNA) em células (veja WO03/070969, Fire *et al.* 1998, Nature 391, 806-811, WO03/099298, EP1068311, Zamore *et al.* 2000, Cell 101: 25-33, Elbashir *et al.* 2001, Genes and Development 15:188-200; Sioud 2004, Trends Pharmacol. Sci. 25:22-28) e liberação de oligonucleotídeo de anti-senso em células (veja e.g. WO03/008543, Pagnan *et al.* 2000 *supra*, Burkhard *et al.* 2003, *supra*). Veja também Yen e Gerwitz (2000, Stem Cells 18:307-319) para uma revisão de abordagens de silenciamento de gene.

Em adição, há vários métodos para liberação de moléculas de ácido nucleico nas células alvo, que podem ser aqui usados, tais como liberação de lipossomo (catiônico) (Pagnan *et al.* 2000, *supra*), porfirinas catiônicas, peptídeos fusogênicos (Gait, 2003, Cell. Mol. Life Sci. 60: 844-853) ou virossomos artificiais (para revisão veja Lysik e Wu-Pong, 2003, J. Pharm. Sci. 92:1559-1573; Seksek e Bolard, 2004, Methods Mol. Biol. 252: 545-568).

A clonagem e a caracterização das variantes de união de DCL de camundongo e de humano permitem o uso de qualquer um dos métodos de silenciamento de gene conhecidos para significativamente reduzir o nível de proteína DCL (ou para completamente abolir a produção de proteína DCL) em células de câncer de camundongo ou de humano de células de origem neuroectodermal *in vitro* (em cultura de células ou de tecido) ou *in vivo*. Especialmente, o efeito fenotípico de silenciamento de DCL é visto como

uma deformação do fuso mitótico em células de câncer de origem neuroectodermal se dividindo, e.g. células de neuroblastoma e/ou uma redução significativa ou inibição completa de proliferação de células de câncer de origem neuroectodermal, e.g. células de neuroblastoma *in vivo* ou *in vitro*.

Em uma modalidade é proporcionado o uso de fragmentos de ácido nucleico de senso e/ou anti-senso de SEQ ID NO: 1 ou 2, ou fragmentos de variantes de SEQ ID NO: 1 ou 2, para a preparação de uma composição para a redução significativa de níveis de proteína DCL em células de câncer de origem neuroectodermal, e para o tratamento de neuroblastoma, meduloblastoma, glioblastoma, oligodendroglioma, oligoastrocitoma, astrocitoma, neurofibroma, ependimoma, MPNST (tumores malignos de bainha de nervo periférico), ganglioneuroma, Schwannoma, rabdomiosarcoma, retinoblastoma, carcinoma pulmonar de célula pequena, feocromocitoma adrenal, PNET primitivo (tumor neuroectodermal periférico), sarcoma de Ewing e melanoma. em particular, administração da composição em quantidades adequadas e em intervalos de tempo apropriados resulta em uma redução ou inibição completa de proliferação células de câncer de origem neuroectodermal.

Em outra modalidade é proporcionado um método para tratamento *in vitro* de células de câncer de origem neuroectodermal. Este método pode ser usado para testar a funcionalidade de fragmentos de ácido nucleico e de composições compreendendo estes. O método compreende a) estabelecimento de culturas celulares de linhagens de células de câncer de origem neuroectodermal, b) o tratamento das células com fragmentos de ácido nucleico ou composições compreendendo os fragmentos de ácido nucleico de acordo com a invenção e c) as análises de mudanças fenotípicas das células de câncer de origem neuroectodermal comparadas com células de controle (proliferação celular, desmontagem de microtúbulo, etc., usando avaliação

visual, microscopia, etc.) e/ou a análise molecular das células (analisando níveis de transcrito *dcl*, níveis de proteína DCL, etc., usando e.g. métodos de PCR, hibridização, métodos de detecção quimioluminescente, etc.).

Exemplos não limitantes de moléculas de DNA ou RNA de senso e/ou anti-senso com identidade de sequência ou similaridade de sequência essencial à SEQ ID NO: 1 e/ou 2, adequadas para silenciamento de gene *dcl*, são os seguintes:

1) RNAs interferentes pequenos (siRNA)

RNAs interferentes pequenos consistem de RNA de fita dupla (dsRNA) de 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, ou mais nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 1 ou 2. Tais moléculas de dsRNA podem ser preparadas sinteticamente por oligonucleotídeos de RNA simples curto da sequência desejada e anelamento destes subsequente (veja Exemplos). Preferivelmente um, dois ou três nucleotídeos adicionais estão presentes como projeções-3', mais preferivelmente dois nucleotídeos de timidina ou desoxinucleotídeos de timidina (TT extremidade-3'). Estes dsRNAs compreendem ambos RNA de senso e anti-senso. Exemplos não limitantes são os seguintes:

(siDCL-2)

5'- CAAGAAGACGGCUCACUCCTT -3' (SEQ ID NO: 5)

3'- TTGUUCUUCUGCCGAGUGAGG -5' (SEQ ID NO: 6)

(hu-siDCL-2)

5'- CAAGAAAACGGCUCAUUCCTT -3' (SEQ ID NO: 7)

3'- TTGUUCUUUUGCCGAGUAAGG -5' (SEQ ID NO: 8)

(siDCL-3)

5'- GAAAGCCAAGAAGGUUCGATT -3' (SEQ ID NO: 9)

3'- TTCUUUCGGUUCUCCAAGCT -5' (SEQ ID NO: 10)

(hu-siDCL-3)

5'- GAAGGCCAAGAAAGUUCGUTT -3' (SEQ ID NO: 11)

3'- TTCUUCCGGUUCUUUCAAGCA -5' (SEQ ID NO: 12)

Como mencionado acima, qualquer outro fragmento de SEQ ID NO: 1 ou 2, ou de uma variante de SEQ ID NO: 1 ou 2, pode ser adequadamente usado para construir siRNAs. Moléculas de siRNA também podem compreender marcadores, tais como marcadores fluorescentes ou radioativos, para monitoração e detecção.

Convenientemente, siRNAs também podem ser expressados de um vetor de DNA. Tais vetores de DNA podem compreender nucleotídeos adicionais entre o fragmento de senso e anti-senso, resultando em uma estrutura de tronco-alça, seguindo dobramento do transcrito de RNA. Em vez de liberação e introdução das moléculas de siRNA em células de neuroblastoma tais vetores de DNA podem ser transiente ou estavelmente introduzidos nas células alvo, de modo que o siRNA seja transcrito dentro das células alvo. Por exemplo, vetores para liberação de gene, tais como aqueles desenvolvidos para terapia de gene, podem ser usados para liberar DNA em células de neuroblastoma, do qual fragmentos de senso e/ou de anti-senso de SEQ ID NO: 1 ou 2 de variantes de SEQ ID NO: 1 ou 2 são transcritos. Exemplos são vetores virais adeno-associados (AAV), como descritos em Hirata *et al.*, 2000 (J. of Virology 74:4612-4620), Pan *et al.* (J. of Virology 1999, Vol 73, 4: 3410-3417), Ghivizzani *et al.* (2000, Drug Discov. Today 6:259-267) ou WO99/61601.

Uma pessoa experiente pode facilmente testar se uma molécula de siRNA é adequada, para, e efetiva em, silenciamento de gene *dcl*, por exemplo por liberação da molécula em linhagens de células de neuroblastoma e subsequente avaliação dos níveis de *dcl* mRNA e/ou proteína DCL produzidos pelas células compreendendo a(s) molécula(s) de siRNA, usando métodos conhecidos, tais como RT-PCR, Northern Blotting, ensaios de proteção de nuclease, Western Blotting, ensaios ELISA e semelhantes. Linhagens de células de neuroblastoma adequadas são por exemplo SHSY5

de humano, N1E115 de camundongo, NS20Y de camundongo ou linhagens NG108 híbridas de glioma de rato / neuroblastoma de camundongo, ou outras. Alternativamente, efeitos fenotípicos de silenciamento de gene *dcl*, tal como deformação de fuso mitótico, podem ser avaliados, como descrito nos Exemplos usando, por exemplo imunofluorescência ou coloração imunocitoquímica. Anticorpos anti-DCL podem ser gerados por uma pessoa experiente, e.g. como descrito nos Exemplos, ou um anticorpo existente (Kruidering *et al.* 2001, *supra*), que como aqui verificado possui uma especificidade alta para DCL, pode ser usado.

Níveis de proteína DCL são preferivelmente reduzidos em pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% após introdução de moléculas de siRNA em células de neuroblastoma, comparadas com células sem as moléculas de siRNA ou comparadas com células compreendendo moléculas de siRNA de controle negativo, tal como siDCL-1 descrito nos Exemplos.

2) Oligonucleotídeos de RNA de anti-senso

Oligonucleotídeos de RNA de anti-senso consistem de cerca de 12, 14, 16, 18, 20, 22, 25, 30, ou mais nucleotídeos contíguos da sequência de complemento inverso de SEQ ID NO: 1 ou 2. Tais oligonucleotídeos de RNA podem ser facilmente sintetizados ou transcritos de um vetor de DNA.

Modificações de estrutura principal, tal como o uso de fosforotioato, podem ser utilizadas para aumentar a estabilidade de oligonucleotídeo. Outras modificações, tal como no grupo 2'-açúcar, e.g. com O-metila, fluoro, O-propila, O-alila ou outros grupos também podem melhorar a estabilidade..

Exemplos não limitantes de oligonucleotídeos de RNA de anti-senso RNA são:

(DCLex2C) (2'O-metil RNA fosforotioato)

5'- GCUGGGCAGGCCAUUCACAC -3' (SEQ ID NO: 13)

(hu-DCLex2C) (2'O-metil RNA fosforotioato)

5'- GCUCGGCAGGCCGUUCACCC -3' (SEQ ID NO: 14)

(DCLex2D) (2'O-metil RNA fosforotioato)

5'- CUUCUCGGAGCUGAGUGUCU -3' (SEQ ID NO: 15)

(hu-DCLex2D) (2'O-metil RNA fosforotioato)

5'- CUUCUCGGAGCUGAGCGUCU -3' (SEQ ID NO: 16)

Como para as moléculas de siRNA, uma pessoa experiente pode facilmente preparar outros oligonucleotídeos de RNA de anti-senso RNA adequados e testar sua eficácia de silenciamento de gene *dcl* como descrito acima. Em vez do uso de segmentos contínuos, que combinam com o
 5 complemento inverso SEQ ID NO: 1 ou 2 em 100%, seqüências que são essencialmente similares ao complemento inverso de SEQ ID NO: 1 ou 2 podem ser usadas, por exemplo por adição, substituição ou deleção de 1, 2 ou 3 nucleotídeos.

São incluídas também moléculas de DNA, em particular
 10 vetores de DNA capazes de produzirem oligonucleotídeos de RNA de anti-senso como transcritos de RNA ou como parte de um transcrito. Tais vetores podem ser usados para produzir os oligonucleotídeos de RNA de anti-senso quando o vetor está presente em linhagens celulares adequadas. Vetores de DNA (e.g. vetores AAV, veja acima) também podem ser liberados em células
 15 de neuroblastoma *in vivo* com o objetivo de silenciar expressão de gene *dcl* endógeno. Assim, em vez da liberação de oligonucleotídeos de RNA de anti-senso, vetores de DNA podem ser liberados para as células de neuroblastoma e prevenir ou reduzir a proliferação de células de neuroblastoma.

Níveis de proteína DCL são preferivelmente reduzidos em
 20 pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% após introdução de oligonucleotídeos de RNA de anti-senso em células de neuroblastoma, comparadas com células sem os oligonucleotídeos de RNA de anti-senso ou comparadas com células compreendendo oligonucleotídeos de RNA de anti-

senso de controle negativo (i.e. sem efeito sobre níveis de proteína DCL).

3) Oligonucleotídeos de DNA de anti-senso

Oligonucleotídeos de DNA de anti-senso consistem de cerca de 12, 14, 16, 18, 20, 22, 25, 30, ou mais oligonucleotídeos contíguos do complemento inverso de SEQ ID NO: 1 ou 2. Tais oligonucleotídeos de DNA podem ser facilmente sinteticamente preparados.

Modificações de estrutura principal, tal como o uso de fosforotioato oligodesoxinucleotídeos, podem ser utilizadas para aumentar a estabilidade de oligonucleotídeo. Outras modificações, tais como no grupo 2'-açúcar, e.g. com, O-metila, fluoro, O-propila, O-alila ou outros grupos também podem melhorar a estabilidade.

Exemplos não limitantes de oligonucleotídeos de DNA de anti-senso adequados são:

(DCLex2A) (DNA fosforotioato)

5'- GCTGGGCAGGCCATTCACAC -3' (SEQ ID NO: 17)

(hu-DCLex2A) (DNA fosforotioato)

5'- GCTCGGCAGGCCGTTACCCC -3' (SEQ ID NO: 18)

(DCLex2B) (DNA fosforotioato)

5'- CTTCTCGGAGCTGAGTGTCT -3' (SEQ ID NO: 19)

(hu-DCLex2B) (DNA fosforotioato)

5'- CTTCTCGGAGCTGAGCGTCT -3' (SEQ ID NO: 20)

Como para as moléculas de siRNA e os oligonucleotídeos de RNA de anti-senso, uma pessoa experiente pode facilmente preparar outros oligonucleotídeos de DNA de anti-senso adequados e testar sua eficácia de silenciamento de gene *dcl* como descrito acima.

Em vez do uso de segmentos contíguos, que combinam com o complemento inverso de SEQ ID NO: 1 ou 2 em 100%, seqüências que são essencialmente similares ao complemento inverso de SEQ ID NO: 1 ou 2 podem ser usadas, por exemplo por adição, substituição ou deleção de 1, 2 ou

3 nucleotídeos.

Níveis de proteína DCL são preferivelmente reduzidos em pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% após introdução de oligonucleotídeos de DNA de anti-senso em células de neuroblastoma, comparadas com células sem os oligonucleotídeos de DNA de anti-senso ou comparadas com células compreendendo oligonucleotídeos de DNA de anti-senso de controle negativo (i.e. sem efeito sobre níveis de proteína DCL).

É entendido, que liberação de misturas de moléculas de siRNA, oligonucleotídeos de RNA de anti-senso e/ou oligonucleotídeos de DNA de anti-senso também pode ser usada para silenciamento específico de *dcl*.

As composições de acordo com a invenção assim compreendem uma quantidade adequada de um fragmento de senso e/ou de anti-senso de SEQ ID NO: 1 ou 2 ou de uma seqüência que é essencialmente similar à SEQ ID NO: 1 ou 2 e um a veículo fisiologicamente aceitável. Quando as composições são usadas para introdução em culturas de células de neuroblastoma *in vitro*, a composição também pode compreender um composto de alvejamento, embora a presença de um composto de alvejamento não seja requerida, porque as moléculas podem ser introduzidas simplesmente por transfecção usando por exemplo kits de transfecção disponíveis (e.g. Superfect, Qiagen, Velancia, CA), eletroporação, transfecção mediada por lipossomo, e semelhantes. Um “composto de alvejamento” refere-se a um composto ou a uma molécula que é capaz de transportar os fragmentos de ácido nucleico *in vivo* para as células de neuroblastoma alvo, i.e. possui capacidades de seleção de célula.

Uma “quantidade adequada” ou uma “quantidade terapeuticamente adequada” refere-se a uma quantidade que, quando presente em uma célula de neuroblastoma, é capaz de fazer com que os níveis de proteína DCL sejam significativamente reduzidos ou abolidos e de fazer com

que a proliferação de células de neuroblastoma seja significativamente reduzida ou inibida completamente. Uma quantidade adequada pode ser facilmente determinada por uma pessoa experiente sem experimentação indevida, como descrito. Quantidades adequadas das moléculas de senso e/ou anti-senso (siRNA, oligonucleotídeos de DNA ou de RNA de anti-senso) variam por exemplo de 0,05 μmol a 5 μmol por mL e são infundadas a de 1 a 100 mL por kg de peso corporal.

Composições que são para serem administradas a um indivíduo, em vez de às culturas de célula de neuroblastoma, compreendem uma quantidade terapeuticamente adequada das moléculas de ácido nucleico da invenção e em adição um ou mais compostos de alveamento. Tais compostos de alveamento podem, por exemplo, ser imunolipossomos, tais como descritos por Pagnan *et al.* (2000, *supra*) ou por Patorino *et al.* (Clin Cancer Res. 2003, 9(12):4595-605). Imunolipossomos compreendem anticorpos superfície-direcionados sobre o exterior deles. Por exemplo, anticorpos monoclonais produzidos contra antígenos de células de neuroblastoma, tal como o antígeno disialogangliosídeo GD₂, podem ser usados para alvejar os lipossomos para células de neuroblastoma. Claramente, outros antígenos de célula de neuroblastoma podem ser usados para produzir anticorpos específicos para célula. As moléculas de ácido nucleico são encapsuladas nos imunolipossomos usando métodos conhecidos e os anticorpos monoclonais são covalentemente copulados no exterior dos lipossomos (veja e.g. p254 de Pagnan *et al.* 2000, *supra*). A ligação dos lipossomos em células de neuroblastoma e a captação das moléculas de ácido nucleico pelas células de neuroblastoma podem ser avaliadas *in vitro* usando métodos conhecidos, como descrito em Pagnan *et al.* (2000). Similarmente, efeitos fenotípicos e/ou efeitos moleculares da presença intracelular dos ácidos nucleicos podem ser avaliados.

Outros compostos de alveamento podem ser anticorpos tais

como, por exemplo anticorpos monoclonais produzidos contra um antígeno de superfície de célula de neuroblastoma conjugado em moléculas de ácido nucleico. Por exemplo um anticorpo anti-receptor de transferrina pode ser usado, tal como o anticorpo monoclonal quimérico de rato/camundongo ch17217 que, como tem sido mostrado, alveja citocinas em células de tumor de neuroblastoma em camundongos (Dreier *et al.*, 1998, Bioconj. Chem. 9: 482-489). Tais métodos são bem conhecidos na técnica, veja e.g. Guillemard e Saragovi (Oncogene, Advanced online publication, published 22 March 2004, “Prodrug chemotherapeutics bypass p-glycoprotein resistance and kill tumors *in vivo* with high efficacy and target-dependent selectivity”).

Similarmente, as moléculas de ácido nucleico de acordo com a invenção podem ser conjugadas em ligantes naturais ou sintéticos, ou miméticos ligantes, que se ligam nos receptores de superfície de célula alvo (e.g. receptores de superfície de célula de neuroblastoma) e que resulta na endocitose das moléculas de ácido nucleico. Um exemplo de um tal ligante é por exemplo transferrina. Tem sido mostrado que injeção intravenosa de complexos de transferrina-PEG-PEI / DNA resultou em transferência de gene para tumores de neuroblastoma Neuro2a subcutâneos em camundongos (Ogris *et al.*, 2003, J. Controlled Release 91: 173-181).

A composição terapêutica pode adicionalmente compreender vários outros componentes, tais como mas não são limitados a água, solução salina, glicerol ou etanol. Substâncias auxiliares farmacêuticamente aceitáveis adicionais podem estar presentes, tais como emulsificadores, agentes umectantes, tampões, agentes ajustadores de tonicidade, estabilizadores e semelhantes, por exemplo, acetato de sódio, lactato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, monolaurato de sorbitana, e oleato de trietanol-amina. Outras moléculas biologicamente ativas podem estar presentes, tais como moléculas de nucleotídeo que silenciam outros alvos gene (e.g. c-Myb), marcadores ou genes marcadores (e.g. luciferase), ligantes,

anticorpos, drogas, etc.

As composições terapêuticas podem ser administradas localmente, e.g. por injeção, preferivelmente para dentro do tecido alvo, ou sistemicamente, e.g. pr infusão em gotas de um fluido parenteral ou um dispositivo de liberação subcutânea lenta.

Sistemas de liberação injetáveis incluem soluções, suspensões, geles, microesferas e injetáveis poliméricos, e podem compreender excipientes tais como agentes alteradores de solubilidade (e.g. etanol, propileno-glicol e sacarose) e polímeros (e.g. policaprilactonas, e PLGA's).

Orientação adicional relacionada às formulações que são adequadas para vários tipos de administração pode ser encontrada em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985).

Em uma modalidade as composições de acordo com a invenção são usadas para complementar outras terapias de neuroblastoma, tais como quimioterapia, terapia de radiação, cirurgia e/ou transplantação de medula óssea. Assim, quer antes, ao mesmo tempo e/ou imediatamente após um ou mais tratamentos convencionais, as composições são administradas ao indivíduo, preferivelmente semanalmente, com maior preferência mensalmente, em quantidades efetivas. Quaisquer células de neuroblastoma, que não são efetivamente removidas ou erradicadas por outra terapia são portanto impedidas de se proliferarem por silenciamento de *dcl*. Este tratamento reduz o risco de disseminação de células de neuroblastoma para outras partes do corpo (formação de metástase) e previne ou pelo menos retarda relapsos, i.e. recorrência do neuroblastoma (primário). Silenciamento de DCL tem como vantagem sobre quimioterapia ou cirurgia o fato de apresentar toxicidade baixa para o tecido normal e uma especificidade alta para células de neuroblastoma. Portanto é provável que efeitos colaterais indesejáveis estejam ausentes ou sejam mínimos.

Em outra modalidade um método para o tratamento de um indivíduo é proporcionado, por meio do qual não são realizadas nenhuma(s) outras terapias de neuroblastoma (e.g. quimioterapia, cirurgia, etc.). O método compreende a) estabelecer um diagnóstico de neuroblastoma, e b) administrar uma quantidade adequada de uma composição de acordo com a invenção, e c) monitorar em vários intervalos de (tratamento de acompanhamento médico).

Etapa a), diagnose, pode, por exemplo, ser estabelecida usando o método diagnóstico e kits diagnósticos descritos abaixo. Alternativamente, diagnose de neuroblastoma pode ser estabelecida usando métodos convencionais, tais como varreduras CT ou CAT, varreduras MRI, varredura mIBG scan (meta-iodo-benzil-guanidina), raios-X, biopsias ou anise de catecol-aminas ou seus metabólitos em amostras de urina ou de plasma de sangue (e.g. dopamina, ácido homovanílico, ácido vanilil-mandélico). Etapa b) é descrita aqui alhures. Etapa c) pode envolver testes de acompanhamento médico, tais como o teste diagnóstico descrito abaixo, testes de sangue ou de urina, varreduras CT, varredura MRI, etc. O propósito da monitoração do acompanhamento médico é garantir que as células de tumor estão completamente erradicadas e não retornarão. Se este não for o caso, tratamento novo necessita ser iniciado.

Em uma outra modalidade são proporcionados métodos diagnósticos e kits diagnósticos que são úteis para triagem seletiva de ocorrência de neuroblastoma no estágio inicial em indivíduos. Indivíduos podem já ter sido testados positivos em um ou outros testes de neuroblastoma, em cujo caso o presente teste pode confirmar a diagnose inicial. Alternativamente, podem não ter sido ainda diagnosticados com neuroblastoma, mas podem mostrar sintomas que poderiam ser causados por neuroblastoma. Dependendo da localização do tumor, sintomas podem variar enormemente, tais como perda de apetite, cansaço, dificuldades de respirar e de engolir, abdômen inchado, constipação, fraqueza/instabilidade nas pernas,

etc. Alternativamente, indivíduos de risco alto não mostrando quaisquer sintomas ainda podem ser profilaticamente testados em intervalos regulares usando o método diagnóstico de acordo com a invenção para garantir diagnose inicial, que sobremaneira aumenta as chances de erradicação das células de neuroblastoma. Os métodos diagnósticos *ex vivo* compreendem retirar uma amostra de sangue de um indivíduo e detectar a presença ou ausência de células de neuroblastoma livres no soro. Alternativamente, o método diagnóstico *ex vivo* pode ser realizado em uma amostra de biopsia do (presumido) tecido de tumor. Como a proteína DCL e o *dcl* mRNA são específicos para células de neuroblastoma, a presença das células pode ser detectada, e opcionalmente quantificada, por análise da presença de *dcl* mRNA e/ou de proteína DCL na amostra. Isto pode ser feito usando métodos conhecidos na técnica, tais como RT-PCR (quantitativa) usando iniciadores *dcl*-específicos ou degenerados, outros métodos de PCR, tais como por exemplo amplificação específica de regiões do gene *dcl*, arranjos de DNA, sondas de DNA para hibridização, ou métodos que testam a proteína DCL, tais como ensaios imunoabsorventes ligados à enzimas (ELISA) ou Western blotting usando anticorpos específicos para DCL (e.g. anticorpos monoclonais ou policlonais). Em uma modalidade o método e kit diagnósticos de acordo com a invenção compreendem o anticorpo monoclonal anti-DCLK (também referido como antiCaMLK em Kruidering *et al.* 2001, *supra*), que reconhece e se liga em proteína DCL de camundongo e/ou de humano (detectável como possuindo um peso molecular de cerca de 40 kDa) de acordo com a invenção. Embora anti-DCLK também reconheça outras variantes de união, tais como DCLK-short (i.e. cpgl6) e CARP, a separação espaço-temporal de expressão de DCL, de cpgl6 e de CARP, e as diferenças em peso molecular, podem ser usadas para facilmente minimizar/evitar falsos positivos. Claramente, outros anticorpos monoclonais específicos para DCL podem ser gerados e usados.

Também, iniciadores ou sondas específicos para exon 8 RNA

(presente em DCL RNA mas ausente em DCLK-short RNA) podem ser usados em métodos de detecção de RNA. Como controles, por exemplo iniciadores ou sondas que se ligam em (hibridizam com) exon 6 RNA de DCLK-short (i.e. cpg16) e CARP, ou em exon 9 a 20 de DCLK podem ser empregados, que estão ausentes em DCL RNA.

Sondas, antibióticos e pares de iniciadores que especificamente detectam (e.g. por amplificação específica de seqüência, por hibridização específica de seqüência ou por ligação específica) o RNA ou DNA de SEQ ID NO: 2 ou a proteína de SEQ ID NO: 4 podem ser preparados por uma pessoa experiente usando métodos de biologia molecular, como encontrados em referências aos livros-texto padrão abaixo. Sondas e pares de iniciadores podem ser preparados tendo por base a SEQ ID NO: 2.

Anticorpos monoclonais ou policlonais específicos para proteína-DCL podem ser produzidos como conhecido na técnica.

O método diagnóstico compreende as etapas de a) analisar uma amostra de sangue de um indivíduo para a presença ou ausência de SEQ ID NO: 2 RNA ou DNA e/ou para a presença ou ausência de proteína DCL de SEQ ID NO: 4 e b) opcionalmente quantificar a quantidade de SEQ ID NO: 2 e/ou SEQ ID NO: 4 presente. Uma quantificação pode permitir uma correlação direta com o número de células de neuroblastoma presentes, que por sua vez indica a severidade do desenvolvimento e do espalhamento de neuroblastoma.

Também são proporcionados kits diagnósticos *ex vivo* para realizar o método acima. Um kit diagnóstico pode, portanto, compreender, iniciadores, sondas e/ou anticorpos, e outros reagentes (tampões, marcadores, etc.), adequados para detecção de gene *dcl*, *dcl* mRNA e/ou proteína DCL e opcionalmente quantificação. Em adição, kits compreendem instruções e protocolos de como usar os reagentes (e.g. reagentes imunodetecção) e amostras de controle, por exemplo proteína-DCL ou *dcl* DNA isolado.

Os seguintes exemplos não limitantes ilustram a identificação, o isolamento e a caracterização da nova variante de união de DCL. A não ser que seja enunciado de outro modo, a prática da invenção empregará métodos convencionais padrão de biologia molecular, virologia, microbiologia ou bioquímica. Tais técnicas são descritas em Sambrook e Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, em Volumes 1 e 2 de Ausubel *et al.* (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, *Current Protocols*, USA e em Volumes I e II de Brown (1998) *Molecular Biology LabFax*, Second Edition, Academic Press (UK), *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait editor), *Nucleic Acid Hybridization* (Hames and Higgins, eds.), “*Enzyme immunohistochemistry*” em *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, P. Tijssen (Elsevier 1985). Métodos e materiais padrão para PCR podem ser encontrados em Dieffenbach e Dveksler (1995) *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, e em McPherson *et al.* (2000) *PCR Basics: From Background to Bench*, first edition, Springer Verlag Germany. Métodos para preparar anticorpos monoclonais ou policlonais são por exemplo descritos em Harlow e Lane, *Using Antibodies: A laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998, e em Leddell e Cryer “*A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*”, Wiley and Sons 1991. Todas as referências acima são aqui incorporadas como referências.

Em toda a descrição e nos Exemplos é feita referência às seguintes seqüências:

- SEQ ID NO 1: seqüência de cDNA de DCL de camundongo
- SEQ ID NO 2: seqüência de cDNA de DCL de humano
- SEQ ID NO 3: seqüência de aminoácidos de DCL de camundongo
- SEQ ID NO 4: seqüência de aminoácidos de DCL de humano
- SEQ ID NO 5: oligonucleotídeo siDCL-2 senso RNA (fita de siRNA)

SEQ ID NO 6: oligonucleotídeo siDCL-2 anti-senso RNA (fita de siRNA)

SEQ ID NO 7: oligonucleotídeo hu-siDCL-2 senso RNA (fita de siRNA)

5 SEQ ID NO 8: oligonucleotídeo hu-siDCL-2 anti-senso RNA (fita de siRNA)

SEQ ID NO 9: oligonucleotídeo siDCL-3 senso RNA (fita de siRNA)

10 SEQ ID NO 10: oligonucleotídeo siDCL-3 anti-senso RNA (fita de siRNA)

SEQ ID NO 11: oligonucleotídeo hu-siDCL-3 senso RNA (fita de siRNA)

SEQ ID NO 12: oligonucleotídeo hu-siDCL-3 anti-senso RNA (fita de siRNA)

15 SEQ ID NO 13: oligonucleotídeo DCLex2C anti-senso RNA

SEQ ID NO 14: oligonucleotídeo hu-DCLex2C anti-senso RNA

SEQ ID NO 15: oligonucleotídeo DCLex2D anti-senso RNA

SEQ ID NO 16: oligonucleotídeo hu-DCLex2D anti-senso RNA

SEQ ID NO 17: oligonucleotídeo DCLex2A anti-senso DNA

20 SEQ ID NO 18: oligonucleotídeo hu-DCLex2A anti-senso DNA

SEQ ID NO 19: oligonucleotídeo DCLex2B anti-senso DNA

SEQ ID NO 20: oligonucleotídeo hu-DCLex2B anti-senso DNA

Legendas das figuras

Figura 1. - Organização Genômica de DCL e Alinhamento com DCX

25 (A): Organização genômica do gene DCLK e a estratégia de clonagem do DCL cDNA. Apenas a estrutura de exon-intron da parte DCL é indicada incluindo o exon 8 recentemente identificado codificador da extremidade 3' comum de CARP e DCL (Vreugdenhil *et al.*, 2001, *supra*). Exons são representados por retângulos e indicados por números arábicos;

introns são linhas sólidas. O transcrito de DCL é indicado abaixo (DCL) a estrutura genômica. A ORF é representada por um retângulo, seqüências não traduzidas por linhas. A localização dos iniciadores, usados para clonar DCL, são indicadas por setas.

- 5 (B): Alinhamento da proteína DCL e DCX. Resíduos idênticos são cinza escuro e substituições conservadas são cinza claro. Os dois domínios DCX e o domínio rico em serina/prolina (SP) são indicados por setas.

Figura 2. - DCL é uma M.A.P. e Estabiliza Microtúbulos

10 Painel I:

(A-C) Sobreexpressão de DCL em células COS-1.

(D-F) Sobreexpressão de DCL em células COS-1 tratadas com colchicina.

- 15 Verde representa DCL; vermelho representa α -tubulina e amarelo indica co-localização de DCL com α -tubulina. Azul representa DNA (núcleo). Setas indicam feixes de microtúbulos associados com DCL, que são resistentes ao tratamento com colchicina. Também notar a associação clara com um centróssomo em A e B. Barra de escala é de 10 μ m.

Painel II. Polimerização de microtúbulos *in vitro* por DCL.

- 20 Concentrações diferentes de proteína recombinante DCL foram incubadas com tubulina purificada e a turbidez da mistura de DCL/tubulina foi monitorada a 340 nm por 30 min. Taxol foi usado como um controle positivo e água como um controle negativo. O gráfico mostrado é um exemplo típico de experimentos múltiplos (N=4) com resultados similares.

25 Figura 3. - Expressão de DCL é Desenvolvementalmente Regulada

Reatividade cruzada de anticorpos reconhecedores de DCX e de DCLK. Análise de Western de lisados de células COS-1 sobreexpressando DCL (pista 4-6) ou duas variantes diferentes de DCX (pistas 2 e 3) com anti-DCX (painel superior) ou anti-DCLK (painel inferior). Anti-DCLK

fortemente reconhece DCL (pista 4-6).

Início de proteína DCL e DCX durante embriogênese. Immunoblots de frações cerebrais embriônicas de idade ED8 a ED18 e de adulto são corados com antiDCLK e anti-DCX. Como um controle positivo para o anticorpo CARP/DCL, foi usado um extrato de células COS-1 sobreexpressando DCL.

(C): Análise de Western blot de DCL e DCX em várias regiões cerebrais de adulto. 1: cabeça ED12 (controle positivo), M: Marcador de peso molecular 2: cerebelo, 3: tronco cerebral, 4: hipotálamo, 5: córtex cerebral, 6: hipocampo 7: bulbo olfativo.

Figura 4. - Localização e Ontogenia de Expressão de DCL em Cérebro Embriônico

I.: Hibridização *in situ* de uma seção cerebral transversal do dia embriônico (ED) 8 (painel A); e seções sagitais em ED10 e ED12 (painéis B e C, respectivamente). Em ED8 e ED10, o sinal foi baixo mas aumentou consideravelmente em ED12. Abreviações: di -diencéfalo, lv - ventrículo lateral, me - mesencéfalo; mo -medula oblongata, mt - metencéfalo, mv-vesícula mesencefálica, nc - córtex neopalial, ne - neuroepitélio, rh - rombencéfalo, te - telencéfalo, tv - vesícula telencefálica, IV v - 4º ventrículo. Barra de escala: 1 mm; tempo de exposição: 14 dias).

II: Distribuição de proteína DCL no neuroepitélio de camundongo prematuro.

A: Distribuição de proteína DCL em ED 11 (seção sagital). Coloração é restringida às regiões proliferativas (telencéfalo e diencéfalo à esquerda e à direita, respectivamente) e encontrada nas camadas externas próximas da pia bem como na zona ventricular interna (cabeças de seta; veja também magnificações maiores abaixo), enquanto que tecido não-neuronal como o componente mandibular do primeiro arco branquial (M) está destituído de qualquer sinal. IV; quarto ventrículo. Barra representa 150 µm.

B + C: Seções adjacentes transversais (coronais) de neuroepitélio prematuro em ED 9 imunocorado para DCX (B) e DCL (C). Não é observada coloração de DCX (cabeças de seta em B), enquanto que DCL já é expressada tanto na região endodimal (2 setas superiores) bem como região marginal, externa (seta inferior). Barra representa 25 µm.

D: Seção sagital do neuroepitélio do tubo neural em ED11, mostrando expressão abundante na borda luminal (cabeças de seta), enquanto que em tecido neuronal desenvolvnte, células se dividindo isoladas também são imunopositivas (setas). L indica o lúmen neural do tubo neural. Barra representa 70 µm.

E: Detalhe de uma célula mitótica DCL-imunopositiva no neuroepitélio. Os cromossomos (cabeça de seta) orientados no plano de clivagem de linha do meio são óbvios. Barra representa 3 µm.

F: Visão geral do neuroepitélio do telencéfalo em ED10, mostrando expressão de DCL na camada ventricular (ependimal) (cabeça de seta à esquerda) bem como na zona de placa marginal/cortical (cabeça de seta à direita). 2 Dubletos imunopositivos de células se dividindo na zona intermediária também são visíveis (setas). Barra representa 15 µm.

G + H: Seções transversais de neuroepitélio cortical, ilustrando as distribuições diferenciais, parcialmente sobrepostas, de DCX e DCL. DCX não é expressada até ED11 (G), e principalmente na parte mais superior da região de placa cortical e de placa marginal/cortical (seta) do neuroepitélio cortical. DCL, em contraste, já é expressada em ED9 (H) em níveis particularmente altos na camada ventricular (ependimal) (cabeça de seta à esquerda) com níveis menores nas zonas intermediária e marginal (cabeça de seta à direita). Notar que a camada ventricular (asterisco em G) está destituída de sinal de DCX. Barra representa 5 µm.

I: Detalhe da camada endodimal da zona ventricular em ED9 mostrando expressão de DCL em fibras se estendendo do neuroepitélio para

dentro da zona intermediária (cabeças de seta). Barra representa 12 μm .

J: Detalhe da camada endodimal mostrando imunorreatividade clara em células neuroepiteliais se dividindo adjacentes ao lúmen, que estão em; telófase (esquerda), anáfase (meio), enquanto também uma célula positiva para DCL na prófase média está visível que aparece verticalmente dividida (cabeças de seta) enquanto migrando para longe do lúmen (direita). Barra representa 8 μm .

K: Imunorreatividade de DCL na camada endodimal em ED11, em células em prófase e telófase (cabeças de seta) bem como em uma célula blast-semelhante em metáfase /anáfase (seta). Barra representa 10 μm .

L: Duas células mitóticas imunopositivas para DCL na camada endodimal exibindo imunorreatividade também nas estrutura centrossomo-semelhantes (setas inferiores). Barra representa 1,5 μm .

M + N: Exemplos de 2 células imunopositivas para DCL, se dividindo em anáfase II / telófase II (M) e em metáfase / anáfase I, com os cromossomos claramente visíveis (seta), enquanto que também alguma coloração microtubular é observada (cabeças de seta). Barras representam 1 μm .

Figura 5. - Expressão de DCL em Células de neuroblastoma.

20 PaineI I:

A: DCL é endogenamente expressada em várias linhagens de célula de neuroblastoma. Triagem por análise de Western Blot para as linhagens celulares positivas para DCL. Pista 1: células COS-1, pista 2: células Hela, pista 3: células NG108-15, pista 4: células NS20Y, pista 5: células N1E-115, pista 6: marcador de peso molecular, pista 7: células SHSY5. Notar que DCL é expressada em linhagens de células de neuroblastoma (pista 3, 4, 5 e 7) mas não em linhagens de célula de origem não-neuronal (pista 1 e 2).

B: DCL é uma fosfoproteína. Lisados de NG108-15 corados

com anti-DCL. Pista 1: lisado não tratado, pista 2: lisado incubado a 37°C sem fosfatase, pista 3: lisado incubado a 37°C com fosfatase. Pistas 4-6 são similares às 1-3 mas com sobreexpressão de DCL. Notar que DCL endógena co-migra com DCL sobreexpressada em pistas 4-6.

5 Painel II:

Análise de Western blot de expressão de DCL em células N1E-115 com (1 a 3) e sem (4) tratamento de siRNA realizado em duplo. Fora usadas três moléculas de siRNA diferentes de alvejamento de DCL: siDCL-1 (pista 1), siDCL-2 (pista 2) e siDCL-3 (pista 3). Notar que siDCL-2 e 3 acarretam uma expressão reduzida “knock-down” enquanto que siDCL-1 falhou em fazê-lo. Como uma referência, a mesma membrana foi re-corada com α -tubulina.

Painel III.

Expressão reduzida “knock-down” de DCL acarreta a relaxação do citoesqueleto de microtúbulo em interfase. Coloração com anti-DCLK (verde) dá um padrão *spickled*, que é mais proeminente próximo do núcleo (A) em células não tratadas (A-C). Este padrão não é afetado por siDCL-1 (D) mas coloração com anti-DCLK está quase ausente por expressão reduzida “knock-down” efetiva de DCL por siDCL-3 (G). O citoesqueleto, como indicado por coloração de α -tubulina (B, E e H), possui uma estrutura de labirinto fina em células não tratadas (B) e em células tratadas com siDCL-1 (E) mas é sobremaneira relaxado por siDCL-3. Ilustrações unidas de coloração de α -tubulina e DCL mostram células não tratadas (C), células transfectadas com siDCL-1 (F) e células transfectadas com siDCL-3 (I). Verde = DCL, Vermelho = α -tubulina, Amarelo = co-localização de DCL e α -tubulina. Barra de escala é 10 μ m.

Painel IV:

Expressão reduzida “knock-down” de DCL não afeta a estrutura de centrossomo. Coloração de anti-DCLK *spickled* (A, D, G) está

elevadamente concentrada (A, D) ao redor de centrossomos como indicado por coloração de anti- γ -tubulina (B, E and H) e expressão reduzida “knock-down” efetiva de DCL (G) não acarretou mudanças óbvias na estrutura ou forma de centrossomos (I). São mostradas ilustrações unidas de coloração α -tubulina e DCL de células não tratadas (C), células transfectadas com siDCL-1 (F) e células transfectadas com siDCL-3 (I). Verde = DCL, Vermelho = γ -tubulina, Amarelo = co-localização de DCL e γ -tubulina. Barra de escala é 10 μ m.

Figura 6. - Expressão reduzida “knock-down” de DCL acarreta deformação de fusos mitóticos. Em células não tratadas (A-C) DCL (A) largamente colocaliza com α -tubulina (B). A imagem unida (C) indica presença de DCL no cinetocore (seta). Transfecção com siDCL-1 (D-F) não acarretou uma expressão reduzida “knockdown” de DCL (D) e também não mudou a formação de fusos mitóticos como indicado por coloração de α -tubulina (E). Expressão reduzida “knock-down” efetiva de DCL por siDCL-2 (G-I) ou siDCL-3 (J-L) acarreta um desaparecimento de DCL (G, J) e desaparecimento (H) e deformação (K) de fusos mitóticos como indicado por coloração de α -tubulina. Verde = DCL, Vermelho = α -tubulina, Amarelo = co-localização de DCL e α -tubulina. Barra de escala é 10 μ m.

Figura 7 - Sobreexpressão de DCL em células COS-1 se dividindo.

A-C: Análise imunocitoquímica de sobreexpressão de DCL. Uma célula COS-1 normal se dividindo corada com α -tubulina é mostrada como referência (ref). Sobreexpressão de DCL (Verde, A) acarreta alongamento dos fusos mitóticos como indicado por co-coloração com α -tubulina (B). Notas a diferença em comprimento de fuso mitótico, indicado por setas, de células transfectadas versus não-transfectadas. DNA é corado como DAPI (azul).

D-I: Microscopia confocal de sobreexpressão de DCL em células COS-1 durante divisão celular. Um fenótipo parece similar (D-F) às

células COS-1 de tipo selvagem nas quais DCL (D) largamente co-localiza com α -tubulina (E). Similar à localização endógena de DCL em células N1E-115 se dividindo, DCL também está localizada no cinetocore. Localização de DCL é mostrada em verde, que recobre com fusos mitóticos como indicado por coloração de α -tubulina (vermelho). O outro fenótipo observado acarreta alongamento e orientação alterada dos fusos mitóticos (G-I). Verde = DCL (A, D, G), Vermelho = α -tubulina (B,E,H), Amarelo = co-localização de DCL e α -tubulina (C, F, I). Barra de escala é 10 μ m.

Exemplos

10 Exemplo 1 - Clonagem de DCL de camundongo e de humano

Análise de sequência de DNA de um clone de DCL cDNA de camundongo (SEQ ID NO: 1) revelou uma matriz de leitura aberta de 362 aminoácidos (SEQ ID NO: 3) com massa molecular predita de 40 kDa (Figura 1B) e 73% de identidade de aminoácido (similaridade de 81%) com DCX de camundongo sobre o comprimento inteiro de ambas as proteínas. Alinhamento das duas repetições preditas de DCX (Taylor *et al.*, 2000, supra) com DCX de camundongo revelou uma identidade de aminoácido ainda maior de 81% (89% de similaridade) para domínio I de DCX e 90% de identidade de aminoácido (99% de similaridade) para domínio II de DCX, fortemente sugerindo que este último domínio possui uma função similar em ambas as proteínas. A terminação-C rica em serina/prolina (SP), que corresponde largamente com CARP (Vreugdenhil *et al.*, 1999, Neurobiology 39, 41-50), exibe uma identidade de aminoácido menor de 63% (78% de similaridade). Este domínio rico em SP está presente em ambas DCX e DCL.

25 Tais domínios ricos em SP são motivos de MAP quinase potenciais (Sturgill *et al.*, 1988, Nature 334, 715-718), sugerindo que a terminação-C é um substrato de MAP quinase. O interessante é que tem sido mostrado que o motivo YLPL nesta região de DCX interage com AP-1 e AP-2 e tem estado implicado na seleção de proteína e no tráfego de vesícula (Friocourt *et al.*,

2001, Mol. Cell Neurosc. 18, 307-319). Em DCL, contudo, o motivo correspondente é YRPL no qual uma leucina hidrofóbica é substituída por um resíduo de arginina básico, indicando que DCL provavelmente não interage com AP-1 e AP-2.

5 As seqüências de *dcl* cDNA/mRNA (SEQ ID NO: 2) e de proteína (SEQ ID NO: 4) de humano foram obtidas de uma linhagem de célula de neuroblastoma de humano (SHSY5) usando as seqüências de camundongo e foi verificado que são muito similares às seqüências murinas, como descrito aqui alhures.

10 Exemplo 2 - DCL é uma MAP (proteína associada a microtúbulo) e estabiliza o citoesqueleto

Tem sido mostrado que os dois domínios de DCX de ambas DCX e DCLK-long interagem com e estabilizam estruturas de microtúbulo (Francis *et al.*, 1999, *supra*; Gleeson *et al.*, 1999 *supra*; Kim *et al.*, 2003, Struct. Biol. 10, 324-333; Lin *et al.*, 2000, *supra*). Como DCL contém domínios de DCX que são idênticos ao de DCLK-long, um efeito de estabilização e polimerização similar sobre microtúbulos foi esperado para DCL. Para confirmar isto, três tipos de experimentos foram conduzidos: primeiro, sobreexpressão de DCL em células COS-1 resultou em um padrão de coloração fibrilar no recobrimento de soma de distribuição de microtúbulo (Figura 2.I A), como mostrado por co-localização com anticorpos para α -tubulina (Figuras 2.I B e C). Segundo, para testar se feixes de microtúbulo contendo DCL exibem uma resistência similar à despolimerização como é conhecido para DCX e outras MAPS, células transfectadas com DCL foram exposta a 10 μ g de colchicina, um composto que despolimeriza e interrompe os microtúbulos de tubulina. Células não transfectadas exibiram despolimerização clara do citoesqueleto de microtúbulo, enquanto que o citoesqueleto de microtúbulo de todas as células transfectadas com DCL foi resistente ao tratamento de colchicina de 1 h, em particular em feixes

condensados de microtúbulo /DCL (Figura 2.I D-F). Isto mostrou que DCL, similar a DCLK-long e DCX, é capaz de estabilizar microtúbulos. Terceiro, em um ensaio de polimerização *in vitro* as propriedades de polimerização de microtúbulo de DCL foram testadas pela incubação de concentrações diferentes de DCL não-etiquetada recombinante com tubulina purificada. Taxol foi usado como um controle positivo, que é um composto de polimerização de microtúbulo bem conhecido. Monitoração espectrofotométrica de polimerização de microtúbulo revelou que DCL polimeriza microtúbulos em uma maneira dependente de dose (Figura 2.II). Juntos, estes dados mostram que DCL, como DCLK-long e DCX, pode diretamente polimerizar e estabilizar microtúbulos.

Exemplo 3 - Caracterização de um anticorpo reconhecedor de DCL.

Recentemente a geração de um anticorpo contra CARP, chamado de anti-CaMKLK, tem sido descrita (Kruidering *et al.*, 2001, *supra*) que também reconhece outras variantes de união do gene DCLK incluindo DCLK-short (também conhecido como cpgl6 (Silverman *et al.*, 1999, J. Biol. Chem. 274, 2631-2636) ou CaMLK). CARP é uma proteína pequena de 55 aminoácidos dos quais 43 são idênticos à terminação-C de DCL, que compartilha 70% de homologia de aminoácido com DCX de humano (Vreugdenhil *et al.*, 1999). Para solucionar a especificidade de anti-CaMLK, DCX e DCL foram sobreexpressadas em células COS-1 e analisadas para possível reatividade cruzada por análise de Western Blot. Anti-CaMLK fortemente reconheceu DCL (Figura 3A pista 4-6) enquanto que apenas alguma reatividade cruzada foi observada com DCX (Figura 3A pista 2 e 3). Por outro lado, o anticorpo para DCX aqui usado, produzido contra os 17 aminoácidos C-terminais de DCX, fortemente reconheceu DCX (Figura 3A pista 2 e 3) e não DCL (Figura 3A pista 4-6). Assim, anti-CaMLK fortemente reconhece numerosas variantes de união do gene DCLK incluindo DCLK-short e DCL e portanto é aqui referido como “anti-DCLK”. Em adição,

alguma reatividade cruzada de anti-DCLK com DCX pode ocorrer, enquanto que o anticorpo para DCX é específico para apenas DCX e não para DCL.

Exemplo 4- DCL é elevadamente expressada em estágios iniciais de desenvolvimento cerebral

5 Análise de Western blot de homogeneizados de cérebro embriônico revelou a presença de uma proteína de 40 kDa imunopositiva para anti-DCLK. O tamanho desta proteína corresponde àquele da proteína DCL recombinante sobreexpressada em células COS-1 (Figura 3B). Anti-DCLK reconhece apenas DCL no cérebro de camundongo em desenvolvimento
10 porque nenhuma outra banda imunorreativas foram observadas (Figura 3B pista 8-18). Embora sinal já estivesse presente em ED10, níveis mais altos de proteína DCL imunorreativa foram encontrados em ED12 e ED14. O nível de proteína DCL declinou após ED14 e uma banda mais fraca mas clara de 40 kDa ainda estava presente em cérebro de adulto. Aqui, uma banda adicional
15 de 53 kDa foi muito proeminente (Figura 3B). De acordo com seu peso molecular de 53 kDa, esta banda mais provavelmente representou DCLK-short, que abundantemente expressada apenas em cérebro de adulto e não em cérebro em desenvolvimento (Vreugdenhil *et al.*, 2001; Omori *et al.*, 1998). Dentro de cérebro de adulto, níveis mais altos de proteína DCL foram
20 encontrados no bulbo olfativo, com níveis menores no hipocampo e no córtex cerebral, e níveis muito baixos no cerebelo, tronco cerebral e hipotálamo (Figura 3C).

 Tem sido relatado que DCX é especificamente expressada durante o desenvolvimento mas não cai abaixo do limite de detecção em
25 cérebro de adulto (Francis *et al.*, 1999 *supra*; Gleeson *et al.*, 1999 *supra*), embora DCX permaneça expressada em quantidades muito baixas em regiões selecionadas (Nacher *et al.*, 2001, Eur J Neurosci 14, 629-644). Para comparação com as descobertas de DCL, os lisados de proteína foram adicionalmente analisados com um anticorpo específico para DCX

reconhecedor da terminação-C. De acordo com os outros estudos (Francis *et al.*, 1999; Gleeson *et al.*, 1999), as concentrações mais altas de DCX foram encontradas em ED12 e foram verificadas que declinam posteriormente (Figura 3B).

5 Em contraste à DCL, nenhuma expressão de DCX, também após exposição prolongada, pôde ser detectada em cabeças de embrião de ED8 e ED10 ou no cérebro de adulto. Contudo, consistente com um papel para DCX em migração neuronal, imunorreatividade de DCX foi observada
10 do cérebro (Figura 3C pista 2-6), indicando diluição de DCX para abaixo do nível de detecção nos lisados de cérebro integrais.

 Para analisar com mais detalhe as diferenças regionais em expressão de DCX e de DCL, a expressão espaço-temporal de DCL durante o desenvolvimento embriônico inicial foi estudada usando hibridização *in situ*.
15 Níveis baixos de expressão de DCL mRNA foram observados ao longo do comprimento do neuroepitélio (destinado para produzir o sistema nervoso central e o córtex em camadas em estágios de desenvolvimento posteriores) em ED8 (Figura 4.I A). Em ED10, quando divisões massivas começam a se tornar proeminentes, expressão substancial foi encontrada no diencéfalo,
20 telencéfalo e mesencéfalo imaturos, a.o. (Figura 4.I B). Consistente com os experimentos de RT-PCR e Western blot a intensidade de expressão de DCL em ED12 aumentou profundamente (Figura 4.I C) em comparação com ED 8 e 10, com níveis altos nas zonas ventriculares proliferativas.

 Para estudar a distribuição espaço-temporal de proteína DCL,
25 imuno-histoquímica foi realizada nas seções de embriões de camundongo de 8, 9, 10, e 11 dias de idade usando o anticorpo para DCLK (anti-DCLK) que reconhece exclusivamente DCL nestas idades (veja acima e Figura 3B). Em ED8, não foi observada coloração de DCL (dados não mostrados). Contudo, em ED 9, uma idade na qual expressão de DCX não foi ainda verificada

(Figura 4.II B), sinal de DCL foi proeminente nas paredes ventriculares e nos neuroepitélios principais, áreas bem definidas de neurogênese e mitose massiva (Figura 4.II C e J). Em ED 10 e 11, proteína DCL geralmente seguiu o padrão de hibridização *in situ*, com níveis altos nas regiões proliferativas do sistema nervoso central e periférico, incluindo o telencéfalo, diencéfalo, eminência gangliônica lateral, o neuroepitélio do tubo neural, bem como e.g. a raiz dorsal e gânglios simpáticos, enquanto que tecidos não-neuronais como osso ou os intestinos e.g., foram destituídos de qualquer sinal (Figura 4.II A e D). Magnificações maiores do neocórtex imaturo, revelaram expressão de DCL não apenas nas camadas superiores da placa cortical, mas também na zona ventricular interna, com níveis menores aparentes na zona intermediária (Figura 4.II F e H).

Uma observação particularmente intrigante foi a imunorreatividade de DCL em células mitóticas, em e.g. a zona ventricular e a parede epitelial (exemplos em Figura 4.II C-F, H, J-N), enquanto que também células mitóticas, positivas para DCL, foram encontradas no neuroepitélio do tubo neural (Figura 4.II D) e na zona intermediária do neuroepitélio cortical (Figura 4.II F), geralmente com uma ocorrência mais isolada e em frequências menores. Em adição ao padrão de coloração de DCL dos epitélios na mesma seção, dubletos imunopositivos claros foram observados (Figura 4.II D e F). Também células mitóticas em estágios específicos do ciclo celular puderam ser reconhecidas (Figura 4.II J-N), com imunorreatividade intensa entre cromossomos e até mesmo estruturas centrossomo-semelhantes imunopositivas (Figura 4.II L) claramente visíveis.

Tomados juntos, os dados mostraram claramente que a presença de expressão de DCL mRNA precede aquela de DCX iniciando já de ED8, e proteína DCL de ED9 progressivamente. Expressão mais alta de DCL mRNA e proteína foi verificada em ED12 e ED14, respectivamente, enquanto que, contrário à DCX, também foi observada expressão de transcrito e

proteína de DCL nos Western blots de cérebro de adulto. Distribuição de proteína durante desenvolvimento inicial não é apenas diferente daquela de DCX no tempo, mas também em localização, i.e., DCL foi encontrada na zona ventricular e na placa cortical em vez de apenas na placa cortical (Figura 4.II C, F-H). Mais de modo impressionante, imunorreatividade de DCL foi regularmente encontrada em células mitóticas do neuroepitélio e algumas vezes na zona intermediária.

Exemplo 5 - DCL é endogenamente expressada em células de neuroblastoma

Para investigar um possível papel para DCL em proliferação neuronal, a expressão de DCL endógena em várias linhagens de células neuronais foi analisada. Uma banda imunorreativa de DCL de aproximadamente 40 kDa foi observada em 4 linhagens de células de neuroblastoma diferentes, que estava ausente em qualquer uma das linhagens de células de não-neuroblastoma estudadas (Figura 5.I A), indicando a especificidade para expressão de DCL em células com um fenótipo semelhante a neuroblasto. Seleção de outras linhagens de células de não-neuroblastoma incluindo células PC12, falhou em identificar qualquer linhagem de célula positiva para DCL (dados não mostrados). Na linhagem de célula de neuroblastoma N1E-115, o dubleto imunorreativo de 40 kDa co-migrou com o dubleto resultante da sobreexpressão de DCL (Figura 5.I B). Esta banda de 40 kDa não pôde ser explicada pela presença de DCX em células N115 porque ambos os experimentos de RT-PCR e análise de Western falharam em detectar sinais de DCX usando anticorpos e iniciadores específicos para DCX (dados não mostrados). A banda superior do dubleto de DCL de 40 kDa portanto mais provavelmente representa uma fosfoisoforma de DCL, uma noção que foi confirmada pelo desaparecimento da banda superior de ambas DCL endógena e sobreexpressada quando os lisados de célula foram incubados com fosfatase. Isto demonstra que DCL, similar à DCX, é uma fosfoproteína, pelo menos em linhagens de célula neuronal.

Exemplo 6 - DCL afeta organização e arquitetura de microtúbulo em células N1E-115.

Para estudar a função e a localização subcelular de DCL, foram realizados experimentos imunocitoquímicos usando microscopia confocal após manipulação de expressão de DCL usando tecnologia de RNA interferente pequeno (siRNA) em células de neuroblastoma N1E-115 em interfase. Para estabelecer se siRNA capturado pelas células N115, moléculas anti-DCL sintético siRNA foram marcadas com Cy-5 e sua presença ou ausência foi monitorada em células N115 por microscopia fluorescente. Estes estudos indicaram a presença de anti-DCL siRNA em aproximadamente 95% de todas as células N115 (dados não mostrados). Três moléculas de siRNA diferentes contra DCL foram construídas: siDCL-1, 2 e 3. Análise de Western blot indicou que siDCL-1 falhou em diminuir a expressão “knock-down” de proteína DCL (Figura 5.II pista 1), uma descoberta que pode ser explicada pelos dinucleotídeos TT na extremidade-3' nesta fita de anti-senso. siDCL-1 foi subsequenteiramente usada como um controle negativo para os efeitos do procedimento de siRNA. Comparado com células não tratadas e siDCL-1, transfecção de moléculas siDCL-2 e si-DCL-3 acarretou uma expressão reduzida “knock-down” de respectivamente 80% e 90% conforme determinado da análise de Western blot (Figura 5.II pista 2 e 3). Análise imunocitoquímica subsequente de células N115 tratadas com siRNA usando anticorpos anti-DCLK e α -tubulina ou γ -tubulina revelou efeitos profundos sobre a arquitetura do citoesqueleto de microtúbulo de células em interfase. Em células não tratadas, coloração de anti-DCL foi tipicamente pontuada e presente em todo o restante do soma (veja Figura 5.III A). Em contraste à DCX, que parece estar seletivamente localizada na periferia do soma e até mesmo nas extremidades de processos neuronais (Friocourt *et al.*, 2003; Schaar *et al.*, 2004), imunorreatividade de DCL foi menos intensa na periferia do soma de célula (Figura 5.III A e C), e muitas vezes exibiu intensidade

aumentada próximo de um, o dois lados do núcleo (Figura 5.III A, C, D e F), sugerindo que DCL está concentrada particularmente ao longo do citoesqueleto circundando o centróssomo. Esta localização subcelular foi confirmada por co-coloração com o marcador de centróssomo γ -tubulina (veja Figura 5.IV A-C).

De acordo com a análise de Western blot, transfecção de siDCL-1 não alterou o padrão de coloração imunocitoquímica de DCL endógena. Expressão reduzida “knock-down” de DCL por siDCL-3, contudo, induziu um desaparecimento quase completo da coloração anti-DCLK (veja Figura 5.III G), fortemente indicando que o anticorpo anti-DCLK reconhece DCL em células N115 em uma maneira elevadamente específica. De modo impressionante, em 40% das células transfectadas com siDCL-2 e em 80% das células transfectadas com siDCL-3, o citoesqueleto foi interrompido, como foi evidente da organização irregular e do padrão de coloração de α -tubulina alterado, mais dispersado. Células N115 transfectadas com siDCL-2 e 3 nas com um citoesqueleto normal, também mostraram mais coloração anti-DCLK do que as células com citoesqueleto aberrante. Isto adicionalmente confirma uma relação casual entre expressão reduzida “knock-down” efetiva de DCL e subseqüentes anormalidades em estabilidade de microtúbulo. Comparado com o citoesqueleto de microtúbulo normal em células não tratadas, o padrão anormal após expressão reduzida “knock-down” de DCL é caracterizado por feixes de microtúbulos com uma estrutura mais condensada e menos dispersada, claramente exibindo menos ramificações laterais (Figura 5.III H e I). Isto indicou um papel para DCL em ramificação e estabilização do citoesqueleto de microtúbulo.

Visto que a distribuição de proteína DCL foi verificada em concentrações mais altas ao redor dos centróssomos, expressão reduzida “knock-down” de DCL pode afetar o complexo de centróssomo-proteína e subseqüentemente o posicionamento nuclear, a (re)organização e a

conectividade de citoesqueleto. Para solucionar este problema, expressão reduzida “knock-down” de DCL foi realizada em combinação com coloração de γ -tubulina (veja Figura 5.IV D-I). De acordo com a natureza euplóide de células N115, foram observados múltiplos centrossomos por célula. Contudo, a despeito da expressão reduzida “knock-down” eficiente de DCL, não foi vista mudança aparente no número ou na estrutura de centrossomos, indicando que DCL não é um fator chave na organização estrutural de centrossomos.

Exemplo 7 - DCL é essencial para formação de fuso mitótico em células de neuroblastoma.

A presença de DCL na zona ventricular (Figura 4) está consistente com um papel para DCL em proliferação neuronal e divisão de progenitor. Células N1E-115 se dividindo foram portanto analisadas usando microscopia confocal após expressão reduzida “knock-down” de DCL por siRNA. Imunorreatividade forte de DCL foi observada em todas as células N1E-115 se dividindo durante metáfase ou anáfase inicial (veja Figura 6A e D). Imunorreatividade de DCL largamente co-localizou com α -tubulina indicando uma associação com os fusos mitóticos. Contudo, um gradiente de imunorreatividade foi aparente para DCL em todas as células analisadas, com níveis baixos próximos do centrossomo e níveis altos nos fusos mitóticos e próximos do cinetocore, sugerindo um papel para DCL na formação de fusos mitóticos. Consistentes com isto estão os efeitos dramáticos de expressão reduzida “knock-down” de DCL por siDCL-2 e siDCL-3, que estão associados com uma deformação completa e algumas vezes ausência dos fusos mitóticos (Figura 6 G-L). Este efeito sobre os fusos mitóticos foi observado em 40% de todas as células se dividindo (siDCL-2) e em todas as células transfectadas com siDCL-3 se dividindo. Expressão reduzida “knock-down” ineficiente por siDCL-1 deixa co-localização de DCL com fusos mitóticos inalterados enquanto que a aparência fenotípica dos fusos mitóticos

é similar àquela dos fusos mitóticos não tratados. (Figura 6 D-F). Assim, aparentemente, DCL é requerida para a formação correta do fuso mitótico de progenitores neurais ou neuroblastos se dividindo.

Exemplo 8 - Sobreexpressão de DCL acarreta alongamento de fusos mitóticos.

Ganho-de-função foi estudado por sobreexpressão de DCL em células COS-1 que normalmente não expressam esta proteína. Consistente com as descobertas acima sobre expressão de DCL endógena em células N115 se dividindo, imunorreatividade de DCL co-localizou com fusos mitóticos em células COS-1 se dividindo (veja Figura 7). Dois fenótipos diferentes foram observados: primeiro, em 20% (n=126) das células COS-1 se dividindo analisadas, sobreexpressão de DCL co-localizou com α -tubulina, similar ao padrão de expressão de SCL endógena em células N1E-115 se dividindo (Figura 7 D-F), com DCL localizada no cinetocore e em fusos mitóticos. Contudo, diferentemente de célula N1E-115, DCL também foi verificada associada com os centrossomos e fibras astrais. Segundo, na maioria das células COS-1 se dividindo (80%), comparação do estágio mitótico preciso de células expressando DCL e transfectadas com vetor foi impedida pelo fato de que todas as células expressando DCL e se dividindo mostraram um fenótipo anormal com fusos mitóticos alongados.

Mais impressionantemente, meio-fusos foram observados indicando que sobreexpressão de DCL afeta a segregação de centrossomo e a orientação de fuso (Figura 7 A-C, G-I). Em adição, os fusos mitóticos pareceram ser muito mais longos e muitas vezes mais espessos do que os fusos de células de controle (comparar e.g. o comprimento do fuso de uma célula não transfectada, Figura 7B inserto de referência, com Figura 7C). Notavelmente, estes efeitos de DCL estavam associados com padrão de distribuição e coloração de DNA anormal, onde os cromossomos estão completamente deslocados e dispersados sobre o soma, um padrão

impressionantemente diferente da orientação normal (Figura 7B inserto de referência), que é perpendicular com respeito à posição de centróssomo bipolar (veja referência comprimento comparado com Figura 7C). Assim, sobreexpressão de DCL em células COS-1 acarreta o alongamento de fuso e a formação de meio-fusos, sugerindo que DCL desempenha um papel crucial em comprimento e forma de fuso mitótico.

Exemplo 9 - Material e métodos

9.1 Clonagem de DCL murina

Os presentes inventores desenvolveram um iniciador de anti-senso 1A: CTGGA ATTCT TACAC TGAGT CTCCT GAG (sítio de EcoR1 sublinhado) correspondendo à região de códon de parada do exon CARP-específico e um iniciador de senso 2S: GCAGG TTCTC ACTGA CATTACCG correspondendo ao exon 3 do gene DCLK murino. Em 30 ciclos de PCR, um fragmento de 457 pb foi amplificado usando cDNA embriônico de camundongo como um modelo e polimerase PfuI (Stratagene). Análise de sequência de DNA confirmou a sequência de DNA como sendo específica para DCLK. Subseqüentemente, um DCL cDNA codificador de proteína completa DCL foi amplificado usando CCAGGATCCACCATGTCGTTCGGCAGAGATATG (sítio BamH1 sublinhado) como um iniciador de senso e 1A como um iniciador de anti-senso, cortado com BamH1 e EcoR1 e subclonado no plasmídeo de expressão pcDNA 3.1 (InVitrogen, Groningen, Países Baixos). Um construto de DCL-EGFP foi gerado por subclonagem de um fragmento KpnI/EcoRV DCL de pcDNA3.1.DCL no sítio SmaI/KpnI de pEGFP-C1 (Clontech; veja também Figura 1).

9.2 Hibridização *in situ*

DCL mRNA inclui exon 8 (Figura 1), que está ausente em mais outros transcritos de DCLK exceto para CARP. Como CARP é expressada em níveis muito baixos durante o desenvolvimento embriônico,

um oligonucleotídeo de anti-senso de 40-mer foi desenvolvido (5' - TTTGC TGTTA GATGC TTGCT TAGGA AATGG GAAAC CTTGA-3') complementar a uma sequência específica de exon 8. Como um controle negativo foi usado o oligonucleotídeo 5'-TTTGA TGTTA TATGC TTGAT TAGGA CATGG GACAC CTGGA-3' que contém 6 más combinações (sublinhadas). Ambos os oligonucleotídeos foram marcados na extremidade com α -³³P dATP (NEN Life Science Products, Hoofddorp, Países-Baixos, 2000Ci/mmol, 10 mCi/ml) usando terminal transferase de acordo com as instruções do fabricante) (Roche Molecular Biochemicals, Almere, Países-Baixos). Hibridização *in situ* e visualização dos sinais foram realizadas como descrito anteriormente (Meijer *et al.*, 2000, Endocrinology 141, 2192-2199).

9.3 Anticorpos

A geração de anticorpos anti-DCL tem sido descrita previamente (Kruidering *et al.*, 2001, *supra*). Anticorpo monoclonal de camundongo anti- α -tubulina foi obtido de Sigma. Anticorpo policlonal de cabra anti-cortina dupla (C-18), anticorpos secundários conjugados com rodamina e anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rábano foram de Santa Cruz Biotechnology, Inc.

9.4 Tratamentos e cultura de célula

Todos os compostos químicos para cultura de célula foram obtidos de Life Science Technologies, Inc. a não ser que seja enunciado de outro modo. Todas as células foram mantidas a 37°C, CO₂ 5%. Células COS-1 foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, e 10% de Soro Fetal Bovino. Células NG108-15 e N115 foram cultivadas em DMEM sem piruvato de sódio, suplementadas com 100 µg/mL de estreptomicina, mistura de hibridoma (HAT), e 10% de Soro Fetal Bovino. Para experimentos de transfecção transiente, as células foram cultivadas sobre placas ou lamínulas revestidas com poli-L-lisina. Neurônios

dissociados primários de camundongos recém-nascidos foram cultivados em meio F-12 Ham, modificação de Kaighn (Sigma) suplementado com L-glutamina, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, e 10% de Soro Fetal Bovino. Neurônios primários foram isolados da região do hipocampo de um camundongo de um dia de idade, que foi incubado em uma solução de tripsina por 25 minutos a 37°C. Subseqüentemente, as células foram lavadas duas vezes com meio de cultura e plaqueadas sobre lamínulas revestidas com poli-L-lisina. 24 Horas mais tarde, o meio de cultura foi substituído e suplementado por citosina- β-D-arabinosídeo 7,5 µM (Sigma) para reduzir a quantidade de células gliais. Os experimentos de transfecção transiente foram realizados com Superfect (Qiagen, Valencia, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Neurônios primários forma transfectados quatro dias após isolamento.

9.5 Experimentos de siRNA

Para experimentos de siRNA, foi usada a linhagem de célula de neuroblastoma NIE-115 de camundongo (número ATCC de CRL-2263). Oligonucleotídeos sintéticos de RNA: 5'-CAAGA AGACG GCUCA CUCC-3' e 5'-GGAGU GAGCC GUCUU CUUG-3' (siDCL-1 anelado), 5'-CAAGA AGACG GCUCA CUCCT T- 3' (SEQ ID NO: 5) e 5'-GGAGU GAGCC GUCUU CUUGT T-3' (SEQ ID NO: 6) (siDCL-2 anelado) e 5'-GAAAG CCAAG AAGGU UCGAT T-3' (SEQ ID NO: 9) e 5'-TCGAA CCUUC UUGGC UUUCT T3' (SEQ ID NO: 10) (siDCL-3 anelado) nos quais 3'-timidinas são desoxinucleotídeos, foram obtidos de Eurogentec e dissolvidos em tampão de anelamento (KAc 100 mM, Hepes 30 mM pH7,5, MgAc 2 mM) para uma concentração final de 100 µM. Para a formação de complexo de siRNA, quantidades molares iguais de oligonucleotídeos de senso e de anti-senso oligonucleotídeos foram misturadas, aquecidas a 94°C por 1 minuto seguido por incubação a 37°C por 1 hora. Por cavidade foi usada uma concentração final de duplex siRNA de 100 nM. Para silenciamento de gene,

60 pmoles de duplex siRNA foram dissolvidos em 50 μ L de opti-MEM (Life Technologies) e misturados por pipetação com 3 μ L de reagente oligofectamina (Invitrogen), dissolvidos em 12 μ L de opti-MEM. Após incubação de 20 minutos na temperatura ambiente, o volume foi aumentado com 32 μ L de opti-MEM e a mistura total (100 μ L) foi adicionada nas células (500 μ L). Após 48 horas, silenciamento de gene foi testado por análise de Western blot e imunofluorescência.

9.6 Imunocitoquímica

Células foram cultivadas e transientemente transfectadas como descrito acima. Nos tempos indicados, células sobre lamínulas foram fixadas com acetona 80% em água por 5 minutos na temperatura ambiente. Células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS), Tween 20 0,05% e bloqueadas por pelo menos 1 hora em tampão de bloqueio: PBS, Tween 20 0,05%, Soro de Cabra Normal 5% (NGS, Sigma). Anticorpo primário foi adicionado por 1 hora na temperatura ambiente no tampão de bloqueio, lavado 3 vezes com PBS, Tween 20 0,05% e incubado com anticorpos secundários conjugados com rodamina por 30 minutos na temperatura ambiente em tampão de bloqueio. Após outra lavagem, os núcleos foram corados com Hoechst 33258 0,2 μ g/mL por 5 minutos, lavados 4 vezes e analisados. Imagens foram obtidas com um microscópio fluorescente Olympus AX70 acoplado em uma câmara de vídeo a cores Sony 3CCD operada por programa de computador Analysis® (Soft Imaging System, Corp.). Para mapear a distribuição de proteína DCL, embriões de camundongo CD1 embriônico de ED 9, 10 e 11 foram brevemente lavados em PBS e então fixados por 4 h em metanol / acetona / água (40:40:20)(MAW, Franco *et al*, 2001) na temperatura ambiente e então armazenados em etanol 70% por 2 semanas, antes de serem embebidos em Paraplast Plus (Kendall, Tyco Healthcare, Mansfield, MA 02048, USA) após as quais seções de espessura de 6 μ m foram montadas sobre lâminas

Superfrost Plus (Menzel-Glaser). TBS foi usado como um tampão de lavagem em todas as seguintes etapas. Após clarificação em xileno e etanol graduado, seções foram pós-fixadas em fixador de Bouin, antes da lavagem e do bloqueio de atividade de peroxidase endógena por tratamento com peróxido de hidrogênio 0,1% de 15 min. Para reduzir a ligação não específica, solução de leite em pó 1% (Camping, Países-Baixos) em PBS foi aplicada por 30 min. O anticorpo DCL primário foi aplicado 1:50 em gelatina 0,25% / triton X-100 0,5% em TBS (Supermix) por 1 hora na temperatura ambiente e então durante a noite a 4°C. Incubação de anticorpo secundário (biotinilado anti-coelho, Amersham Life Sciences, 1:200) foi em Supermix por 1 h 30 min na temperatura ambiente, amplificado com avidina-biotina (ABC) Elite (Vector Laboratories, Burlingame), tiramida biotinilada (1:500) com peróxido 0,01% por 30 min seguida por outra incubação de 45 min com ABC. As 2 últimas lavagens foram em tampão Tris HCl 0,05 M (pH 7,6), que também foi usado para dissolver diamino-benzidina (DAB)(0.05 M). Seções foram contra-coradas com violeta de cresila e cobertas com lamínula de Entellan (Merck).

Para comparação, também a distribuição de proteína DCX foi mapeada em seções adjacentes, usando o anticorpo específico C-18 de cortina dupla (Santa Cruz Biotechnology, South Cruz CA, USA) em uma diluição de 1:75. O protocolo de amostra foi usado como acima, exceto para a etapa de bloqueio em solução de leite em pó que foi omitida e um anticorpo biotinilado anti-cabra como anticorpo secundário.

9.7 Extração de proteína e western blotting

Células e tecido de camundongo foram solubilizados com tampão de lise (trietanol-amina 20mM pH 7,5, NaCl 140mM, deoxicelato 0,05%, dodecil-sulfato de sódio 0,05%, Triton X100 0,05%), suplementado com mistura de inibidor de protease livre de EDTA CompleteTM EDTA (Roche Molecular Biochemicals) e centrifugadas a 16.000g por 30 minutos. Sobrenadante foi coletado e concentração de proteína foi determinada usando

o método de Pierce. Quantidades iguais de proteína foram separadas SDS-PAGE, transferidas para membranas immobilon-P PVDF (Millipore). Blots foram bloqueados por 1 hora com tampão de bloqueio (solução salina tamponada com Tris, Tween 20 0,2% (TBST), leite 5%), incubado com anticorpos primários em tampão de bloqueio por 1 hora, lavados 3 vezes com TBST, incubados com anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rábano em tampão de bloqueio por 30 minutos e lavados 3 vezes com TBST. Ligação de anticorpo foi detectada por ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

9.8 Tratamento com fosfatase

Células N1E-115 transfectadas com DCL e não transfectadas foram solubilizadas com tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 9,3, MgCl₂ 1mM, ZnCl₂ 0,1mM, espermidina 1 mM suplementado com mistura de inibidor de protease livre de EDTA CompleteTM (Roche Molecular Biochemicals), centrifugadas a 16.000 g por 30 minutos. Sobrenadante foi coletado e concentração de proteína foi determinada usando o método de Pierce. Cada sobrenadante foi dividido em 3 amostras contendo 50 µg de proteína. Uma amostra foi não tratada, a segunda foi incubada por 30 minutos a 37°C com enzima e a terceira foi incubada com 10 unidades de Fosfatase Alcalina Intestinal (Promega Bioscience, Inc.). As amostras foram analisadas Western blotting como descrito acima.

9.9 Ensaio de polimerização de tubulina

cDNA codificador de DCL foi excisado do construto de expressão pcDNA3.1 e religado em pET28 usando *Bam*H1 e *Eco*R1. O construto de expressão de DCL resultante foi transfectado para células BL21. Uma colônia única foi crescida em 500 mL de LB para OD 0,7, em cujo ponto IPTG foi adicionado para uma concentração final 0,4 mM. Após três horas de incubação, as bactérias foram coletadas, lavadas com PBS e pelotizadas. Proteína DCL recombinante foi isolada por ressuspensão da pelota e sua passagem através de uma French após o qual ela foi purificada

- usando a resina de Probond (Invitrogen) Ni²⁺ de acordo com as instruções do fabricante. DCL purificada foi concentrada para 0,8 mg/mL usando um dispositivo de concentração Centricon 30. Ensaio de polimerização de tubulina foram realizados de acordo Gleeson *et al* (Gleeson *et al.*, 1999, supra) usando o kit de ensaio de polimerização de tubulina (cat no. BK006) de Cytoskeleton. Resumidamente, 1 mg de tubulina foi dissolvido em 1,1 mL de tampão de polimerização gelado de acordo com as instruções do fabricante e 100 µL disto foram adicionados em 10 µL del proteína DCL de várias concentrações em uma placa de microtítulo de 96 cavidades. Subseqüentemente, absorção a 340 nm foi medida por 30' em intervalos de 30" usando HTS2000 (Biorad/Perkin Elmer).

SEQÜÊNCIAS DE Dcl E DCL

SEQ ID NO: 1

```
ccacgcgtcc gcggagaacc gcatttcaat gaggaccagc tccagcgcat cagtgcacta
gcggtgcgag cttccagacg ctctgtctcc gcagccccag ccgcgcccag cccggcgagg
acagctccag cagccggcca cagacaaccc agcctccacc cgcgaccggt tccataagca
agccagccat gtcgttcggc agagatatgg agttggagca ttttgatgag cgggacaagg
cgcagaggta cagcaggggg tcccgtgtga atggcctgcc cagccccaca cacagcgccc

actgcagctt ctaccgcacc cgcaccctgc agacactcag ctccgagaag aaagccaaga
aggttcgatt ctacagaaat ggtgaccgct acttcaaagg aattgtgtat gccatctccc
cagaccgctt cagatctttc gaggcctgc tggtgattt gacccgaact ctctcgata
atgtgaattt gccccagggg gtgagaacca tctacaccat cgatggactc aagaagatct
ccagcctgga ccagctggtg gaaggtgaaa gctatgtctg cggctccatc gagcccttta
agaagctgga gtacaccaag aatgtgaacc ccaactggtc agtgaacgtc aagaccacct
cagcctcccg cgcagtgtct tctttggcca ctgccaaggg tgggccttcg gaggttcggg
agaataagga tttcattcga cccaagctgg tcaccatcat cagaagtggg gtgaagccac
ggaaggctgt cagaatcctg ctgaacaaga agacggetca ctcttcgag caggttctca
ctgacattac cgacgctatc aagctggact ccggtgtggt gaagcgctg tacactctgg
atgggaagca ggtgatgtgc cttcaggact tttttggtga cgatgacatt tttattgcat
gtggaccaga gaagtccgt taccaggatg atttcttgct agatgaaagt gaatgtcgag
tggtgaaatc aacttcttac accaaaatag catcagcgtc ccgcagaggc acaaccaaga
gcccaggacc ttcccggaga agcaagtccc cagcctccac cagctcagtt aatggaaccc
ctggtagtca gctctctact ccacgctcgg gcaagtcacc aagtccatca cccaccagcc
caggaagcct gcggaagcag agggacctgt accgccccct ctctcgatg gatttggact
caggagactc agtctaagaa ttc
```

SEQ ID NO: 2

```
gcacatccct gcaactagtgg ccgcaaccga gacgcgcgcg tccagcagct gctgccgccc
agcccggccc cgccgcccgc cccagccct gcagccccgc agcccggcc gcgcccagcc
cggcgaggac agcaccagga ggcggcccc agcgcggcca caaagacccc cggcggcgtc
tctccgcgga ccggtcctac ttgaagtcca tcatgtcctt cggcagagac atggagctgg
agcacttcga cgagcgggat aaggcgcgaga gatacagccg agggtcgcgg gtgaacggcc
tgccgagccc gacgcacagc gccactgca gtttctaccg caccgcacg ctgcagacgc
tcagctccga gaagaaggcc aagaaagttc gtttctatcg aaacggagat cgatacttca
aagggattgt gtatgccatc tcccagacc ggttcggatc ttttgaggcc ctgctggctg
atttgaccgc aactctgtcg gataacgtga atttgcccca gggagtgaga acaatctaca
```

ccattgatgg gctcaagaag atttccagcc tggaccaact ggtggaagga gagagttatg
tatgtggctc catagagccc ttcaagaaac tggagtacac caagaatgtg aacccaact
ggtcggtgaa cgtcaagacc acctcggctt ctcgggcagt gtcttcactg gccactgcca
aaggaagccc ttcaagagtg cgagagaata aggatttcat tcggcccaag ctggtcacca
tcatcagaag tggcgtgaag ccacggaaag ctgtcaggat tctgctgaac aagaaaacgg
ctcattcctt tgagcaggtc ctaccgata tcaccgatgc catcaagctg gactcgggag
tggtgaaacg cctgtacacg ttggatggga aacaggatgat gtgccttcag gacttttttg
gtgatgatga cattttttatt gcatgtggac cggagaagtt ccgttaccag gatgatttct
tgctagatga aagtgaatgt cgagtggtaa agtccacttc ttacaccaa atagcttcat
catcccgcag gagcaccacc aagagcccag gaccgtccag gcgtagcaag tcccctgcct
ccaccagctc agttaatgga acccctggta gtcagctctc tactccgcgc tcaggcaagt
cgccaagccc atcaccacc agcccaggaa gcctgcgga gcagagggac ctgtaccgcc
ccctctcttc ggatgacttg gattcagtag gagactcagt gtaaaagaaa

SEQ ID NO: 3

Met Ser Phe Gly Arg Asp Met Glu Leu Glu His Phe Asp Glu Arg Asp
1 5 10 15

Lys Ala Gln Arg Tyr Ser Arg Gly Ser Arg Val Asn Gly Leu Pro Ser
20 25 30

Pro Thr His Ser Ala His Cys Ser Phe Tyr Arg Thr Arg Thr Leu Gln
35 40 45

Thr Leu Ser Ser Glu Lys Lys Ala Lys Lys Val Arg Phe Tyr Arg Asn
50 55 60

Gly Asp Arg Tyr Phe Lys Gly Ile Val Tyr Ala Ile Ser Pro Asp Arg
65 70 75 80

Phe Arg Ser Phe Glu Ala Leu Leu Ala Asp Leu Thr Arg Thr Leu Ser
85 90 95

Asp Asn Val Asn Leu Pro Gln Gly Val Arg Thr Ile Tyr Thr Ile Asp
100 105 110

Gly Leu Lys Lys Ile Ser Ser Leu Asp Gln Leu Val Glu Gly Glu Ser
115 120 125

Tyr Val Cys Gly Ser Ile Glu Pro Phe Lys Lys Leu Glu Tyr Thr Lys
130 135 140

Asn Val Asn Pro Asn Trp Ser Val Asn Val Lys Thr Thr Ser Ala Ser
145 150 155 160

Arg Ala Val Ser Ser Leu Ala Thr Ala Lys Gly Gly Pro Ser Glu Val
165 170 175

Arg Glu Asn Lys Asp Phe Ile Arg Pro Lys Leu Val Thr Ile Ile Arg
180 185 190

Ser Gly Val Lys Pro Arg Lys Ala Val Arg Ile Leu Leu Asn Lys Lys
 195 200 205

Thr Ala His Ser Phe Glu Gln Val Leu Thr Asp Ile Thr Asp Ala Ile
 210 215 220

Lys Leu Asp Ser Gly Val Val Lys Arg Leu Tyr Thr Leu Asp Gly Lys
 225 230 235 240

Gln Val Met Cys Leu Gln Asp Phe Phe Gly Asp Asp Asp Ile Phe Ile
 245 250 255

Ala Cys Gly Pro Glu Lys Phe Arg Tyr Gln Asp Asp Phe Leu Leu Asp
 260 265 270

Glu Ser Glu Cys Arg Val Val Lys Ser Thr Ser Tyr Thr Lys Ile Ala
 275 280 285

Ser Ala Ser Arg Arg Gly Thr Thr Lys Ser Pro Gly Pro Ser Arg Arg
 290 295 300

Ser Lys Ser Pro Ala Ser Thr Ser Ser Val Asn Gly Thr Pro Gly Ser
 305 310 315 320

Gln Leu Ser Thr Pro Arg Ser Gly Lys Ser Pro Ser Pro Ser Pro Thr
 325 330 335

Ser Pro Gly Ser Leu Arg Lys Gln Arg Asp Leu Tyr Arg Pro Leu Ser
 340 345 350

Ser Asp Asp Leu Asp Ser Gly Asp Ser Val
 355 360

SEQ ID NO: 4

Met Ser Phe Gly Arg Asp Met Glu Leu Glu His Phe Asp Glu Arg Asp
 1 5 10 15

Lys Ala Gln Arg Tyr Ser Arg Gly Ser Arg Val Asn Gly Leu Pro Ser
 20 25 30

Pro Thr His Ser Ala His Cys Ser Phe Tyr Arg Thr Arg Thr Leu Gln
 35 40 45

Thr Leu Ser Ser Glu Lys Lys Ala Lys Lys Val Arg Phe Tyr Arg Asn
 50 55 60

Gly Asp Arg Tyr Phe Lys Gly Ile Val Tyr Ala Ile Ser Pro Asp Arg
 65 70 75 80

Phe Arg Ser Phe Glu Ala Leu Leu Ala Asp Leu Thr Arg Thr Leu Ser
 85 90 95

Asp Asn Val Asn Leu Pro Gln Gly Val Arg Thr Ile Tyr Thr Ile Asp
 100 105 110

Gly Leu Lys Lys Ile Ser Ser Leu Asp Gln Leu Val Glu Gly Glu Ser
 115 120 125

Tyr Val Cys Gly Ser Ile Glu Pro Phe Lys Lys Leu Glu Tyr Thr Lys
 130 135 140

Asn Val Asn Pro Asn Trp Ser Val Asn Val Lys Thr Thr Ser Ala Ser
 145 150 155 160

Arg Ala Val Ser Ser Leu Ala Thr Ala Lys Gly Ser Pro Ser Glu Val
 165 170 175

Arg Glu Asn Lys Asp Phe Ile Arg Pro Lys Leu Val Thr Ile Ile Arg
 180 185 190

Ser Gly Val Lys Pro Arg Lys Ala Val Arg Ile Leu Leu Asn Lys Lys
 195 200 205

Thr Ala His Ser Phe Glu Gln Val Leu Thr Asp Ile Thr Asp Ala Ile
 210 215 220

Lys Leu Asp Ser Gly Val Val Lys Arg Leu Tyr Thr Leu Asp Gly Lys
 225 230 235 240

Gln Val Met Cys Leu Gln Asp Phe Phe Gly Asp Asp Asp Ile Phe Ile
 245 250 255

Ala Cys Gly Pro Glu Lys Phe Arg Tyr Gln Asp Asp Phe Leu Leu Asp
 260 265 270

Glu Ser Glu Cys Arg Val Val Lys Ser Thr Ser Tyr Thr Lys Ile Ala
 275 280 285

Ser Ser Ser Arg Arg Ser Thr Thr Lys Ser Pro Gly Pro Ser Arg Arg
 290 295 300

Ser Lys Ser Pro Ala Ser Thr Ser Ser Val Asn Gly Thr Pro Gly Ser
 305 310 315 320

Gln Leu Ser Thr Pro Arg Ser Gly Lys Ser Pro Ser Pro Ser Pro Thr
325 330 335

Ser Pro Gly Ser Leu Arg Lys Gln Arg Asp Leu Tyr Arg Pro Leu Ser
340 345 350

Ser Asp Asp Leu Asp Ser Val Gly Asp Ser Val
355 360

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Prosensa BV<120> uma nova variante de união mRNA do gene quinase tipo cortina dupla e seu uso no diagnóstico e terapia de cânceres de origem neuroectodermal

<130> <160> 20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1283

<212> DNA

<213> desconhecido

<220><223> sequência cDNA de dcl (camundongo)

<220><221> códon de início <222> (189)..(191)<223>

<220><221> exon2<222> (169)..(564)<223> início de exon 2 em 169

<220><221> exon3<222> (565)..(911)<223> início de exon 3 em 565

<220><221> exon4<222> (912)..(1011)<223> início de exon 4 em 912

<220><221> exon5<222> (1012)..(1128)<223> início de exon 5 at 1012

<220><221> exon7<222> (1129)..(1223)<223> início de exon 7 em 1129

<220><221> exon8<222> (1224)..(1274)<223> início de exon 8 em 1224

<220><221> códon de parada<222> (1275)..(1277)<223>

<400> 1

```
ccacgcgtcc gcggagaacc gcatttcaat gaggaccagc tccagcgcac cagtgcacta      60
gcggtcgcag cttccagacg ctctgtctcc gcagccccag ccgcgcccag cccggcgagg      120
acagctccag cagccggcca cagacaaccc agcctccacc cgcgaccggt tccataagca      180
agccagccat gtcgttcggc agagatatgg agttggagca ttttgatgag cgggacaagg      240
cgcagaggta cagcaggggg tcccgtgtga atggcctgcc cagccccaca cacagcgccc      300
actgcagctt ctaccgcacc cgcaccctgc agacactcag ctccgagaag aaagccaaga      360
aggttcgatt ctacagaaat ggtgaccgct acttcaaagg aattgtgtat gccatctccc      420
cagaccgctt cagatctttc gaggccctgc tggctgattt gaccggaact ctctcgata      480
atgtgaattht gccccagggg gtgagaacca tctacaccat cgatggactc aagaagatct      540
ccagcctgga ccagctgggtg gaaggtgaaa gctatgtctg cggctccatc gagcccttta      600
agaagctgga gtacaccaag aatgtgaacc ccaactggtc agtgaacgtc aagaccacct      660
cagcctcccg cgcagtgtct tctttggcca ctgccaaggg tgggccttcg gaggttcggg      720
agaataagga tttcattcga cccaagctgg tcaccatcat cagaagtggg gtgaagccac      780
ggaaggctgt cagaatcctg ctgaacaaga agacggctca ctcttcgag caggttctca      840
ctgacattac cgacgctatc aagctggact ccggtgtggt gaagcgctg tacactctgg      900
```

```

atgggaagca ggtgatgtgc cttcaggact tttttggtga cgatgacatt tttattgcat      960
gtggaccaga gaagttccgt taccaggatg atttcttgct agatgaaagt gaatgtcgag     1020
tggtgaaatc aacttcttac accaaaatag catcagcgtc ccgcagagggc acaaccaaga     1080
gcccaggacc ttcccggaga agcaagtccc cagcctccac cagctcagtt aatggaaccc     1140
ctggtagtca gctctctact ccacgctcgg gcaagtcacc aagtccatca cccaccagcc     1200
caggaagcct gcggaagcag agggacctgt accgccccct ctcgtcggat gatttggact     1260
caggagactc agtgaagaa ttc                                              1283

```

<210> 2

<211> 1310

<212> DNA

<213> desconhecido

<220><223> sequência de cDNA de humano dcl

<220><221> códon de início<222> (213)..(215)<223> início de tradução

<220><221> códon de parada<222> (1302)..(1304)<223> parada de tradução

<220><221> exon2<222> (194)..(588)<223> início de exon 2 at 194

<220><221> exon3<222> (589)..(935)<223> início de exon 3 at 589

<220><221> exon4<222> (936)..(1035)<223> início de exon 4 at 936

<220><221> exon5<222> (1036)..(1152)<223> início de exon 5 at 1036

<220><221> exon7<222> (1153)..(1247)<223> início de exon 7 at 1153

<220><221> exon8<222> (1248)..(1301)<223> início de exon 8 at 1248

<400> 2

```

gcacatccct gcactagtgg ccgcaaccga gacgccgcgc tccagcagct gctgccgccc      60
agcccggccc cgccgccgcc cccagccct gcagccccgc agcccgggcc ggcgccagcc     120
cggcgaggac agcaccagga ggcgggcccc agcgcggccca caaagacccc cggcggcgtc     180
tctccgcgga ccggtcctac ttgaagtcca tcatgtcctt cggcagagac atggagctgg     240
agcacttoga cgagcgggat aaggcgcgaga gatacagccg agggtcgcgg gtgaacggcc     300
tgccgagccc gacgcacagc gcccaactga gcttctaccg caccgcacg ctgcagacgc     360
tcagctccga gaagaaggcc aagaaagttc gtttctatcg aaacggagat cgatacttca     420
aagggattgt gtatgccatc tcccagacc ggttccgatc ttttgaggcc ctgctggctg     480
atttgaccog aactctgtcg gataacgtga atttgcccca gggagtgaga acaatctaca     540
ccattgatgg gctcaagaag atttcagcc tggaccaact ggtggaagga gagagttatg     600
tatgtggctc catagagccc ttcaagaaac tggagtacac caagaatgtg aaccccaact     660
ggtcggtgaa cgtcaagacc acctcggctt ctcgggcagt gtcttactg gccactgcca     720
aaggaagccc ttcagaggtg cgagagaata aggatttcat tcggcccaag ctggtcacca     780

```

```

tcatcagaag tggcgtgaag ccacggaaag ctgtcaggat tctgctgaac aagaaaacgg      840
ctcattcctt tgagcagggtc ctcaccgata tcaccgatgc catcaagctg gactcgggag      900
tggtgaaaacg cctgtacacg ttggatggga aacagggtgat gtgccttcag gacttttttg      960
gtgatgatga cattttttatt gcatgtggac cggagaagtt ccgttaccag gatgatttct     1020
tgctagatga aagtgaatgt cgagtggtaa agtccacttc ttacaccaaa atagcttcat     1080
catcccgcag gagcaccacc aagagcccag gaccgtccag gcgtagcaag tcccctgcct     1140
ccaccagctc agttaatgga acccctggta gtcagctctc tactccgcgc tcaggcaagt     1200
cgccaagccc atcaccacc agcccaggaa gcctgcggaa gcagagggac ctgtaccgcc     1260
ccctctcttc ggatgacttg gattcagtag gagactcagt gtaaaagaaa     1310

```

<210> 3

<211> 362

<212> PRT

<213> desconhecido

<220><223> sequência de aminoácido de DCL (camundongo)

<400> 3

```

Met Ser Phe Gly Arg Asp Met Glu Leu Glu His Phe Asp Glu Arg Asp
1              5              10              15

```

```

Lys Ala Gln Arg Tyr Ser Arg Gly Ser Arg Val Asn Gly Leu Pro Ser
                20              25              30

```

```

Pro Thr His Ser Ala His Cys Ser Phe Tyr Arg Thr Arg Thr Leu Gln
          35              40              45

```

```

Thr Leu Ser Ser Glu Lys Lys Ala Lys Lys Val Arg Phe Tyr Arg Asn
50              55              60

```

```

Gly Asp Arg Tyr Phe Lys Gly Ile Val Tyr Ala Ile Ser Pro Asp Arg
65              70              75              80

```

```

Phe Arg Ser Phe Glu Ala Leu Leu Ala Asp Leu Thr Arg Thr Leu Ser
          85              90              95

```

```

Asp Asn Val Asn Leu Pro Gln Gly Val Arg Thr Ile Tyr Thr Ile Asp
          100              105              110

```

```

Gly Leu Lys Lys Ile Ser Ser Leu Asp Gln Leu Val Glu Gly Glu Ser
          115              120              125

```

```

Tyr Val Cys Gly Ser Ile Glu Pro Phe Lys Lys Leu Glu Tyr Thr Lys
          130              135              140

```

Asn Val Asn Pro Asn Trp Ser Val Asn Val Lys Thr Thr Ser Ala Ser
145 150 155 160

Arg Ala Val Ser Ser Leu Ala Thr Ala Lys Gly Gly Pro Ser Glu Val
165 170 175

Arg Glu Asn Lys Asp Phe Ile Arg Pro Lys Leu Val Thr Ile Ile Arg
180 185 190

Ser Gly Val Lys Pro Arg Lys Ala Val Arg Ile Leu Leu Asn Lys Lys
195 200 205

Thr Ala His Ser Phe Glu Gln Val Leu Thr Asp Ile Thr Asp Ala Ile
210 215 220

Lys Leu Asp Ser Gly Val Val Lys Arg Leu Tyr Thr Leu Asp Gly Lys
225 230 235 240

Gln Val Met Cys Leu Gln Asp Phe Phe Gly Asp Asp Asp Ile Phe Ile
245 250 255

Ala Cys Gly Pro Glu Lys Phe Arg Tyr Gln Asp Asp Phe Leu Leu Asp
260 265 270

Glu Ser Glu Cys Arg Val Val Lys Ser Thr Ser Tyr Thr Lys Ile Ala
275 280 285

Ser Ala Ser Arg Arg Gly Thr Thr Lys Ser Pro Gly Pro Ser Arg Arg
290 295 300

Ser Lys Ser Pro Ala Ser Thr Ser Ser Val Asn Gly Thr Pro Gly Ser
305 310 315 320

Gln Leu Ser Thr Pro Arg Ser Gly Lys Ser Pro Ser Pro Ser Pro Thr
325 330 335

Ser Pro Gly Ser Leu Arg Lys Gln Arg Asp Leu Tyr Arg Pro Leu Ser
340 345 350

Ser Asp Asp Leu Asp Ser Gly Asp Ser Val
355 360

<210> 4

<211> 363

<212> PRT

<213> desconhecido

<220><223> sequência de aminoácido de DCL (humano)

<400> 4

Met	Ser	Phe	Gly	Arg	Asp	Met	Glu	Leu	Glu	His	Phe	Asp	Glu	Arg	Asp	1	5	10	15
Lys	Ala	Gln	Arg	Tyr	Ser	Arg	Gly	Ser	Arg	Val	Asn	Gly	Leu	Pro	Ser	20	25	30	
Pro	Thr	His	Ser	Ala	His	Cys	Ser	Phe	Tyr	Arg	Thr	Arg	Thr	Leu	Gln	35	40	45	
Thr	Leu	Ser	Ser	Glu	Lys	Lys	Ala	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Tyr	Arg	Asn	50	55	60	
Gly	Asp	Arg	Tyr	Phe	Lys	Gly	Ile	Val	Tyr	Ala	Ile	Ser	Pro	Asp	Arg	65	70	75	80
Phe	Arg	Ser	Phe	Glu	Ala	Leu	Leu	Ala	Asp	Leu	Thr	Arg	Thr	Leu	Ser	85	90	95	
Asp	Asn	Val	Asn	Leu	Pro	Gln	Gly	Val	Arg	Thr	Ile	Tyr	Thr	Ile	Asp	100	105	110	
Gly	Leu	Lys	Lys	Ile	Ser	Ser	Leu	Asp	Gln	Leu	Val	Glu	Gly	Glu	Ser	115	120	125	
Tyr	Val	Cys	Gly	Ser	Ile	Glu	Pro	Phe	Lys	Lys	Leu	Glu	Tyr	Thr	Lys	130	135	140	
Asn	Val	Asn	Pro	Asn	Trp	Ser	Val	Asn	Val	Lys	Thr	Thr	Ser	Ala	Ser	145	150	155	160
Arg	Ala	Val	Ser	Ser	Leu	Ala	Thr	Ala	Lys	Gly	Ser	Pro	Ser	Glu	Val	165	170	175	
Arg	Glu	Asn	Lys	Asp	Phe	Ile	Arg	Pro	Lys	Leu	Val	Thr	Ile	Ile	Arg	180	185	190	
Ser	Gly	Val	Lys	Pro	Arg	Lys	Ala	Val	Arg	Ile	Leu	Leu	Asn	Lys	Lys	195	200	205	
Thr	Ala	His	Ser	Phe	Glu	Gln	Val	Leu	Thr	Asp	Ile	Thr	Asp	Ala	Ile	210	215	220	
Lys	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Val	Lys	Arg	Leu	Tyr	Thr	Leu	Asp	Gly	Lys	225	230	235	240
Gln	Val	Met	Cys	Leu	Gln	Asp	Phe	Phe	Gly	Asp	Asp	Asp	Ile	Phe	Ile	245	250	255	

Ala Cys Gly Pro Glu Lys Phe Arg Tyr Gln Asp Asp Phe Leu Leu Asp
 260 265 270

Glu Ser Glu Cys Arg Val Val Lys Ser Thr Ser Tyr Thr Lys Ile Ala
 275 280 285

Ser Ser Ser Arg Arg Ser Thr Thr Lys Ser Pro Gly Pro Ser Arg Arg
 290 295 300

Ser Lys Ser Pro Ala Ser Thr Ser Ser Val Asn Gly Thr Pro Gly Ser
 305 310 315 320

Gln Leu Ser Thr Pro Arg Ser Gly Lys Ser Pro Ser Pro Ser Pro Thr
 325 330 335

Ser Pro Gly Ser Leu Arg Lys Gln Arg Asp Leu Tyr Arg Pro Leu Ser
 340 345 350

Ser Asp Asp Leu Asp Ser Val Gly Asp Ser Val
 355 360

<210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> desconhecido
 <220><223> fita senso siDCL-2

<400> 5
 caagaagacg gcucacucct t 21

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> desconhecido
 <220><223> fita anti-senso siDCL-2

<400> 6
 ggagugagcc gucuucuugt t 21

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> desconhecido
 <220><223> fita senso hu-siDCL-2

<400> 7
 caagaaaacg gcucauucct t 21

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA

<213> desconhecido
 <220><223> fita anti-senso hu-siDCL-2

 <400> 8
 ggaaugagcc guuuucuugt t 21

 <210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> desconhecido
 <220><223> fita senso siDCL-3

 <400> 9
 gaaagccaag aagguucgat t 21

 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> desconhecido
 <220><223> fita anti-senso siDCL-3

 <400> 10
 tcgaaccuuc uuggcuuuct t 21

 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> desconhecido
 <220><223> fita senso hu-siDCL-3

 <400> 11
 gaaggccaag aaaguucgut t 21

 <210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> desconhecido
 <220><223> fita anti-senso hu-siDCL-3

 <400> 12
 acgaacuuuc uuggccuuct t 21

 <210> 13
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> desconhecido
 <220><223> oligonucleotídeo de RNA anti-senso DCLex2C

 <400> 13
 gcugggcagg ccauucacac 20

 <210> 14
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> desconhecido
 <220><223> oligonucleotídeo de RNA anti-senso hu-DCLex2C

<400> 14	
gcucggcagg ccguucaccc	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> desconhecido	
<220><223> oligonucleotídeo de RNA anti-senso DCLex2D	
<400> 15	
cuucucggag cugagugucu	20
<210> 16	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> desconhecido	
<220><223> oligonucleotídeo de RNA anti-senso hu- DCLex2D	
<400> 16	
cuucucggag cugagcgucu	20
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> desconhecido	
<220><223> oligonucleotídeo de DNA anti-senso DCLex2A	
<400> 17	
gctgggcagg ccattcacac	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> desconhecido	
<220><223> oligonucleotídeo de DNA anti-senso hu-DCLex2A	
<400> 18	
gctcggcagg ccgttcaccc	20
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> desconhecido	
<220><223> oligonucleotídeo de DNA anti-senso DCLex2B	
<400> 19	
cttctcggag ctgagtgtct	20
<210> 20	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> desconhecido	
<220><223> oligonucleotídeo de DNA anti-senso hu-DCLex2B	
<400> 20	
cttctcggag ctgagcgtct	20

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um fragmento de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 ou 2, ou de uma variante de SEQ ID NO: 1 ou 2, o citado fragmento de ácido nucleico sendo capaz de causar uma redução significativa da quantidade de proteína-DCL de SEQ ID NO: 3 ou 4, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma composição para o tratamento de câncer.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o citado câncer é de origem neuroectodermal.

3. Uso de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de ser para o tratamento de neuroblastoma, meduloblastoma, glioblastoma, oligodendroglioma, oligoastrocitoma, astrocitoma, neurofibroma, ependimoma, MPNST (tumores malignos de bainha de nervo periférico), ganglioneuroma, Schwannoma, rabdomiossarcoma, retinoblastoma, carcinoma pulmonar de célula pequena, feocromocitoma adrenal, PNET primitivo (tumor neuroectodermal periférico), sarcoma de Ewing e melanoma.

4. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 3, caracterizado pelo fato de que o fragmento de ácido nucleico é selecionado de oligonucleotídeo de RNA de anti-senso, um oligonucleotídeo de DNA de anti-senso e/ou um RNA interferente pequeno de fita dupla.

5. Fragmento de ácido nucleico de senso e/ou anti-senso de SEQ ID NO: 1 ou 2, ou de uma variante de SEQ ID NO: 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o citado fragmento de ácido nucleico é capaz de causar uma redução significativa da quantidade de proteína-DCL de SEQ ID NO: 3 ou 4 quando introduzido em células de câncer de origem neuroectodermal.

6. Composição, caracterizada pelo fato de compreender um ou mais fragmentos de ácido nucleico como definido na reivindicação 4 e um veículo fisiologicamente aceitável.

7. Composição de acordo com qualquer uma das

reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de adicionalmente compreender um ou mais compostos de alvejamento, na qual os citados compostos de alvejamento são capazes de alvejar células de câncer de origem neuroectodermal *in vivo* ou *in vitro*.

5 8. Composição de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que o composto de alvejamento é um imunolipossomo ou um anticorpo monoclonal.

 9. Composição de acordo com as reivindicações 6-8, caracterizada pelo fato de que a citada composição é adequada para
10 tratamento de cânceres de origem neuroectodermal.

 10. Proteína, caracterizado pelo fato de ser proteína tipo cortina dupla de camundongo de SEQ ID NO: 3 e proteína tipo cortina dupla de humano de SEQ ID NO: 4.

 11. Método para diagnosticar cânceres de origem
15 neuroectodermal, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de a) analisar uma amostra de soro sanguíneo ou uma amostra de biopsia de um indivíduo para a presença ou ausência de SEQ ID NO: 2 RNA ou DNA e/ou para a presença ou ausência de proteína DCL de SEQ ID NO: 4 e b) opcionalmente quantificar a quantidade de SEQ ID NO: 2 e/ou SEQ ID NO: 4
20 presente na amostra.

 12. Kit diagnóstico, caracterizado pelo fato de compreender iniciadores, sondas e/ou anticorpos capazes de detectar a presença de SEQ ID NO: 2 e/ou SEQ ID NO: 4 em uma amostra, reagentes de detecção adicionais requeridos, e instruções para uso.

Fig 1a

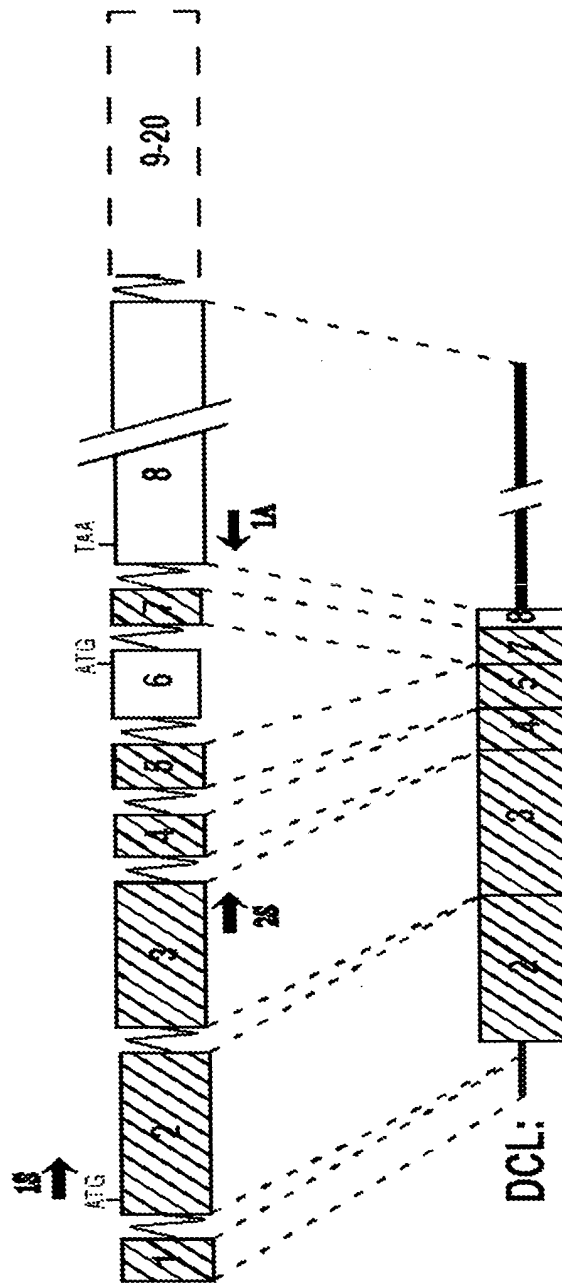


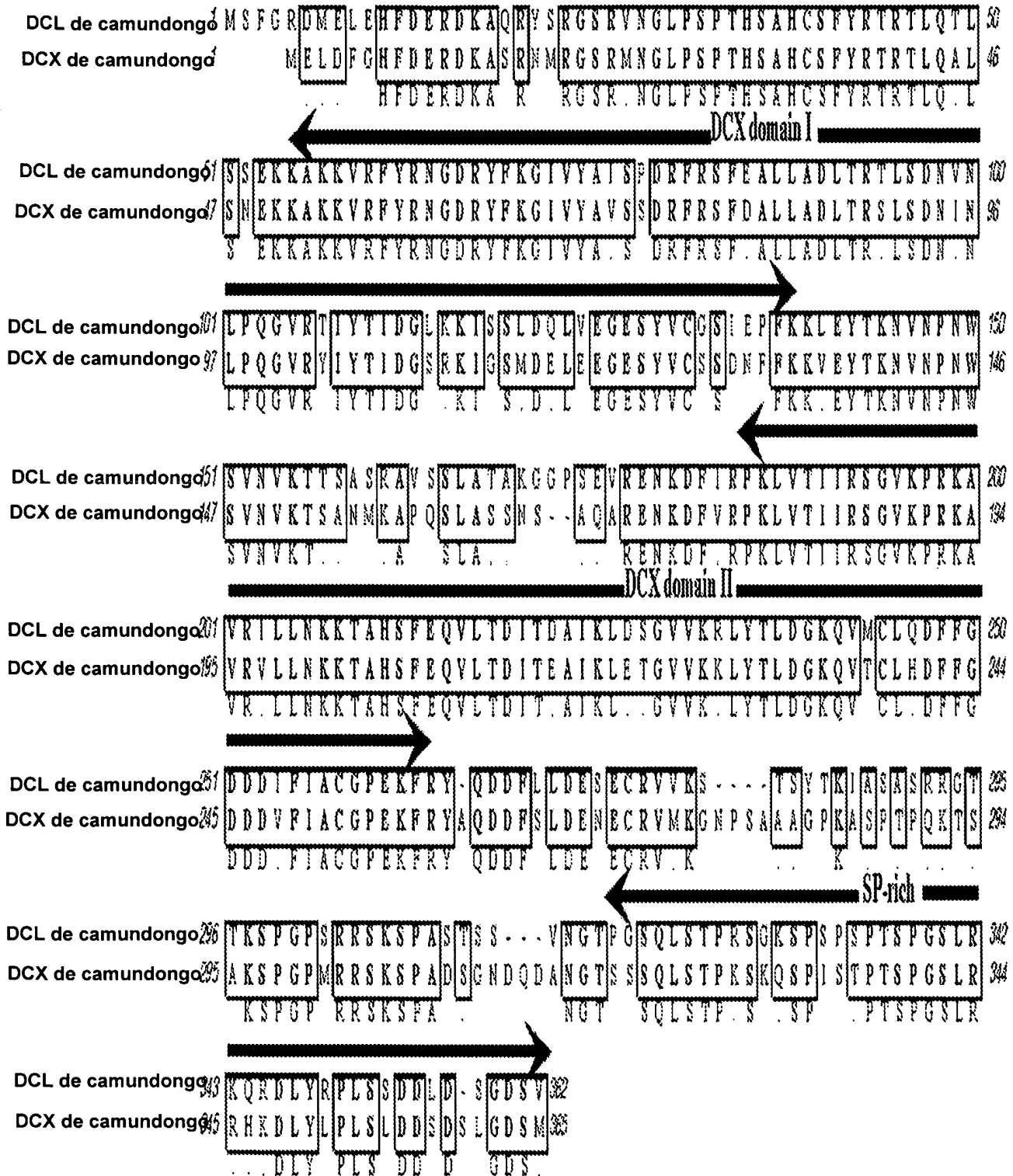
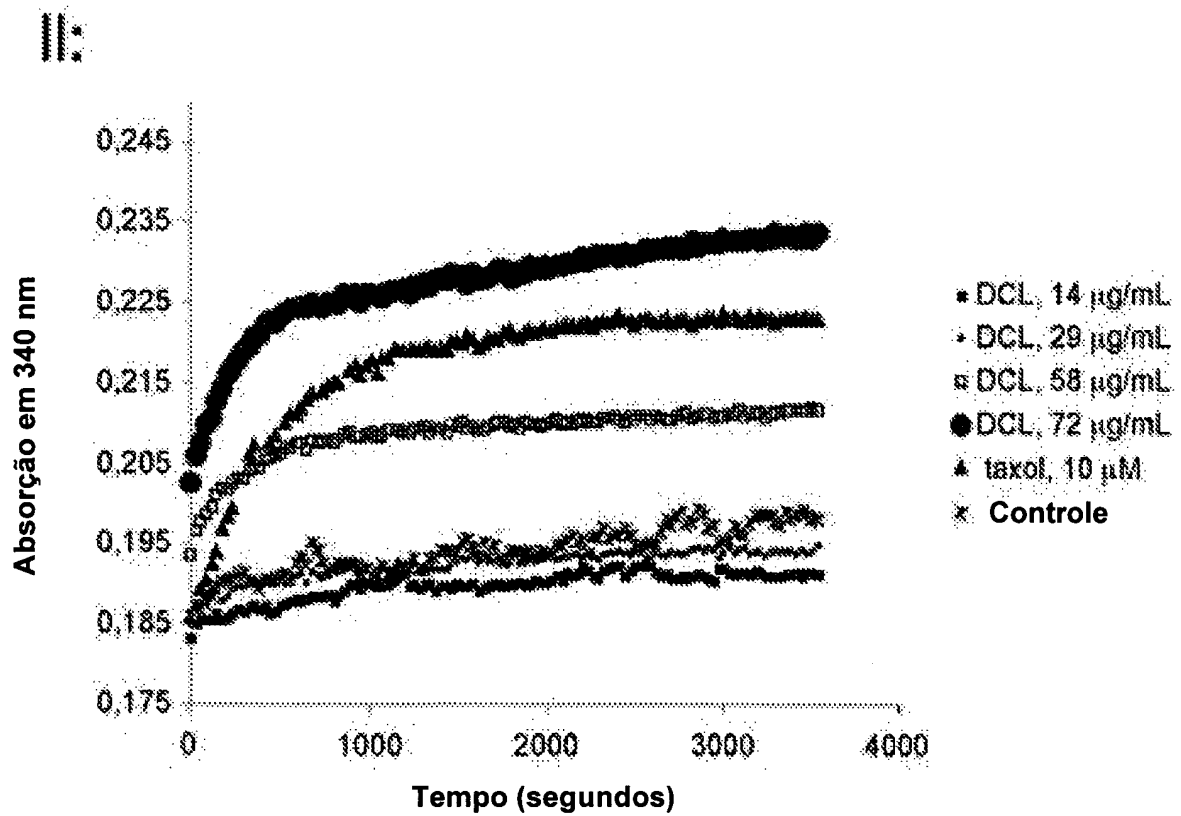
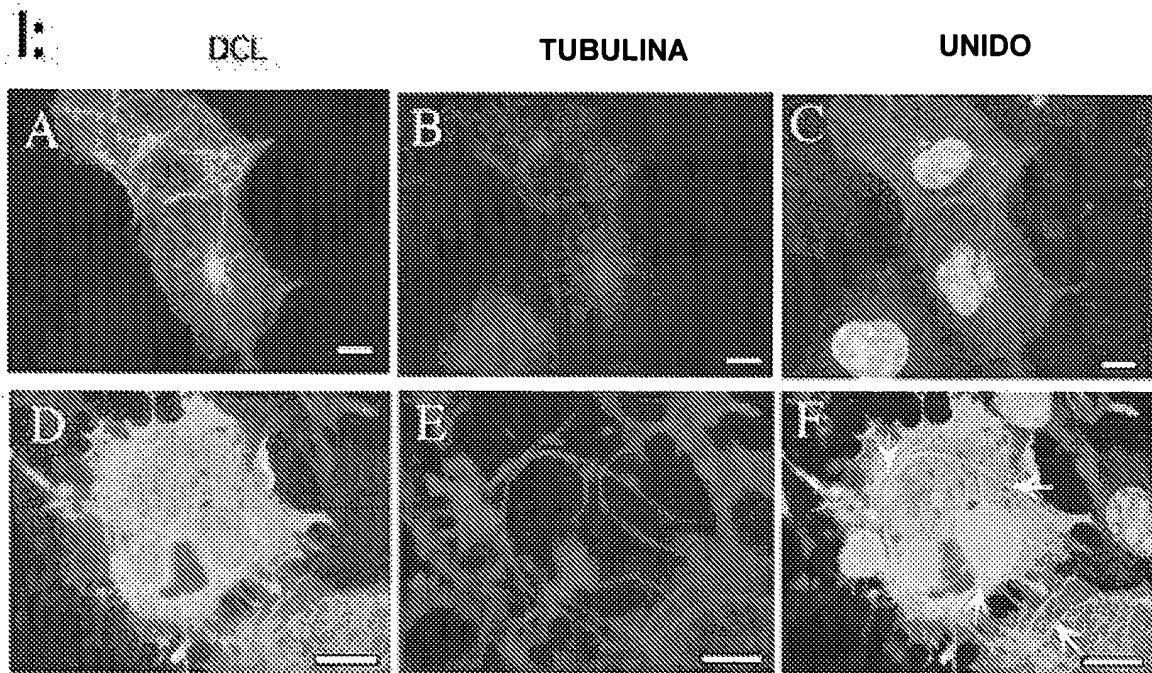
Fig 1b

Fig 2

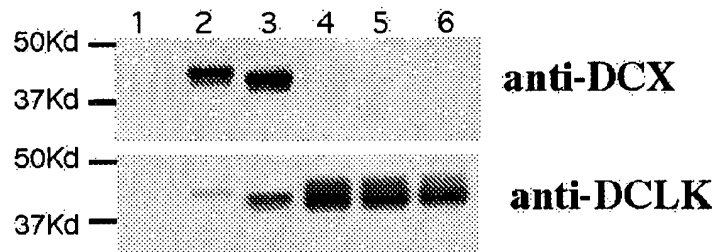
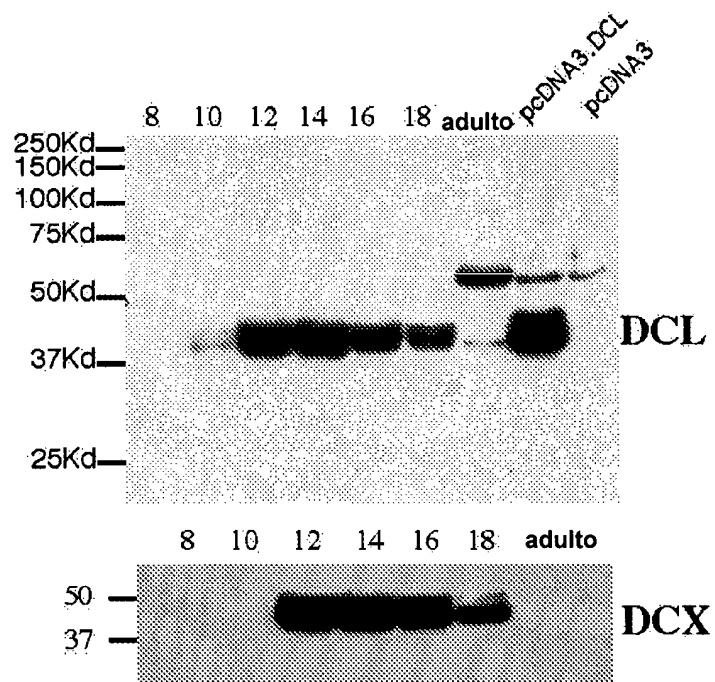
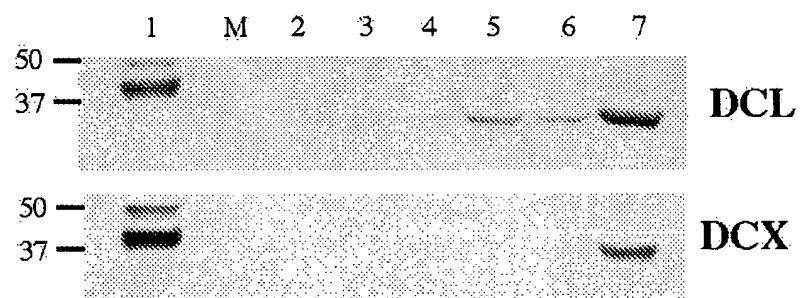
*Fig 3***A****B****C**

Fig 4 (I)

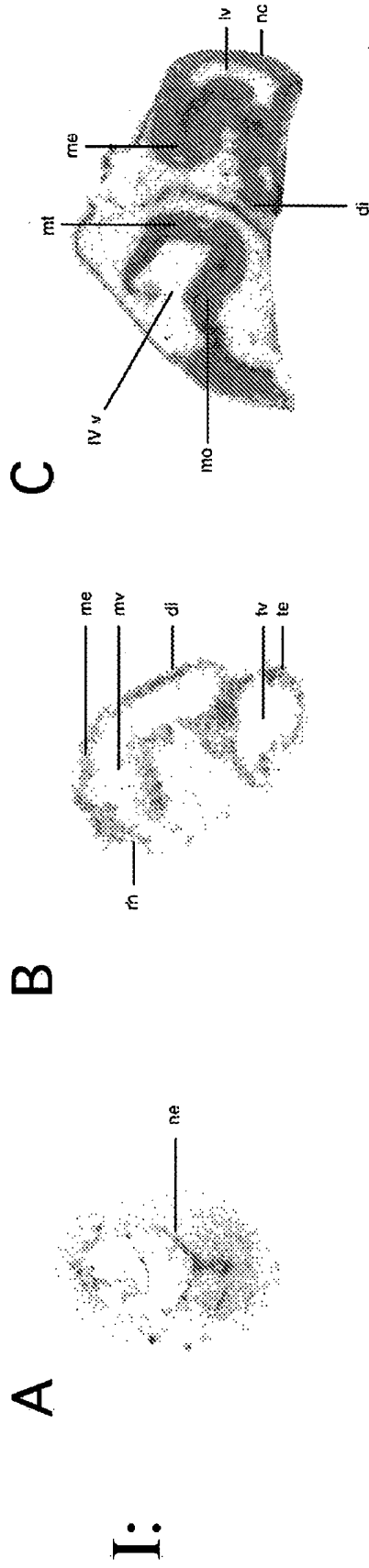


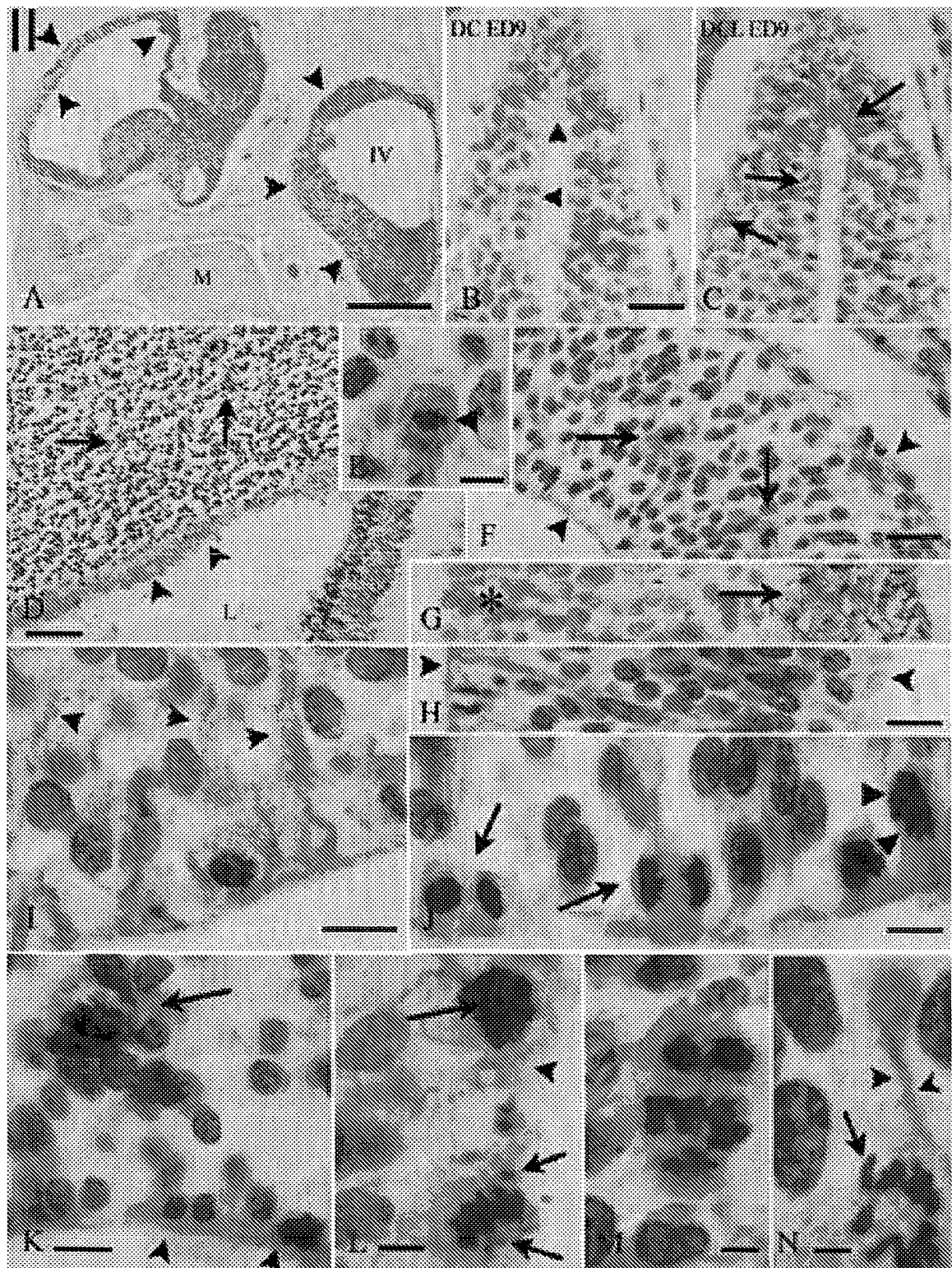
Fig 4 (II)

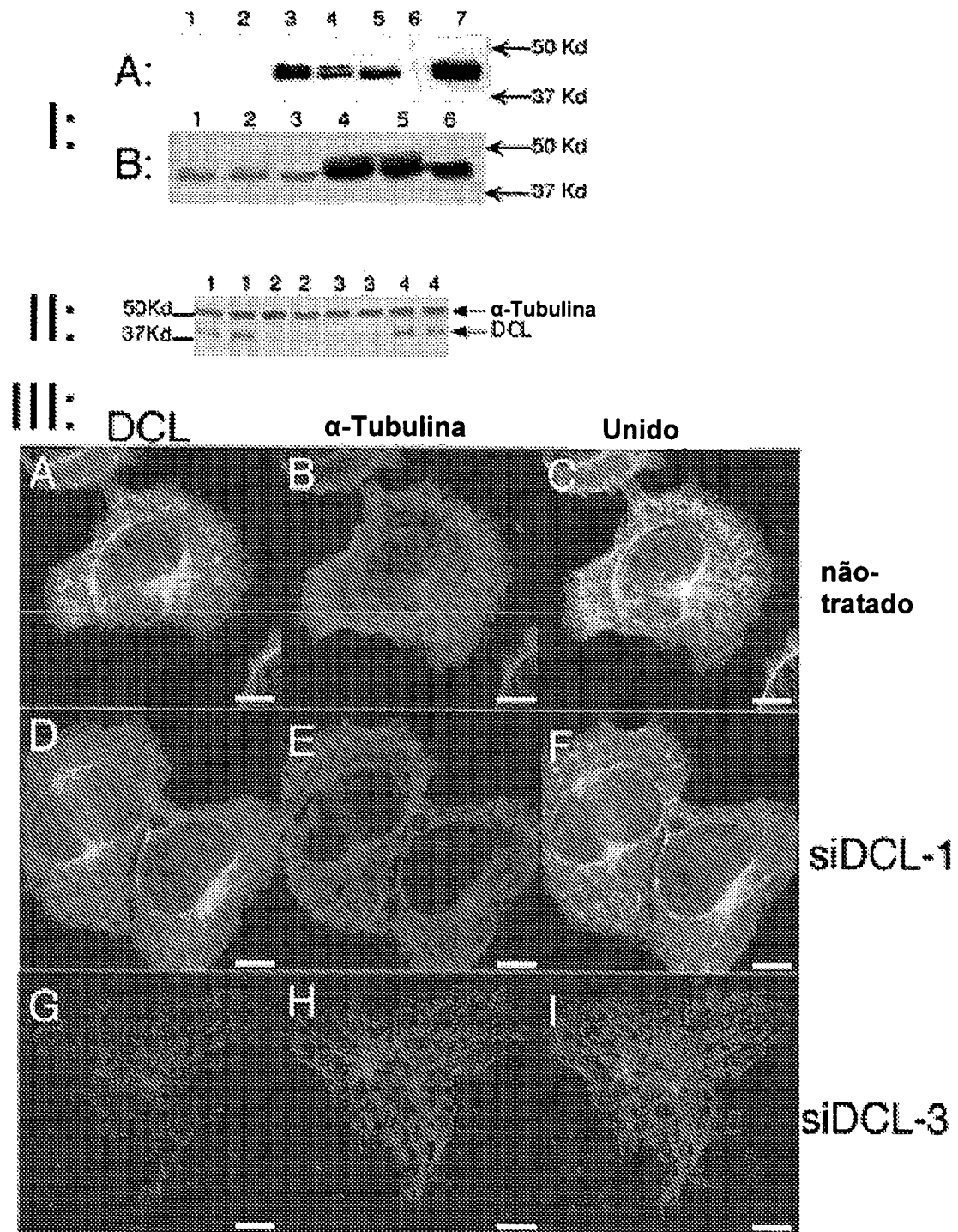
Fig 5

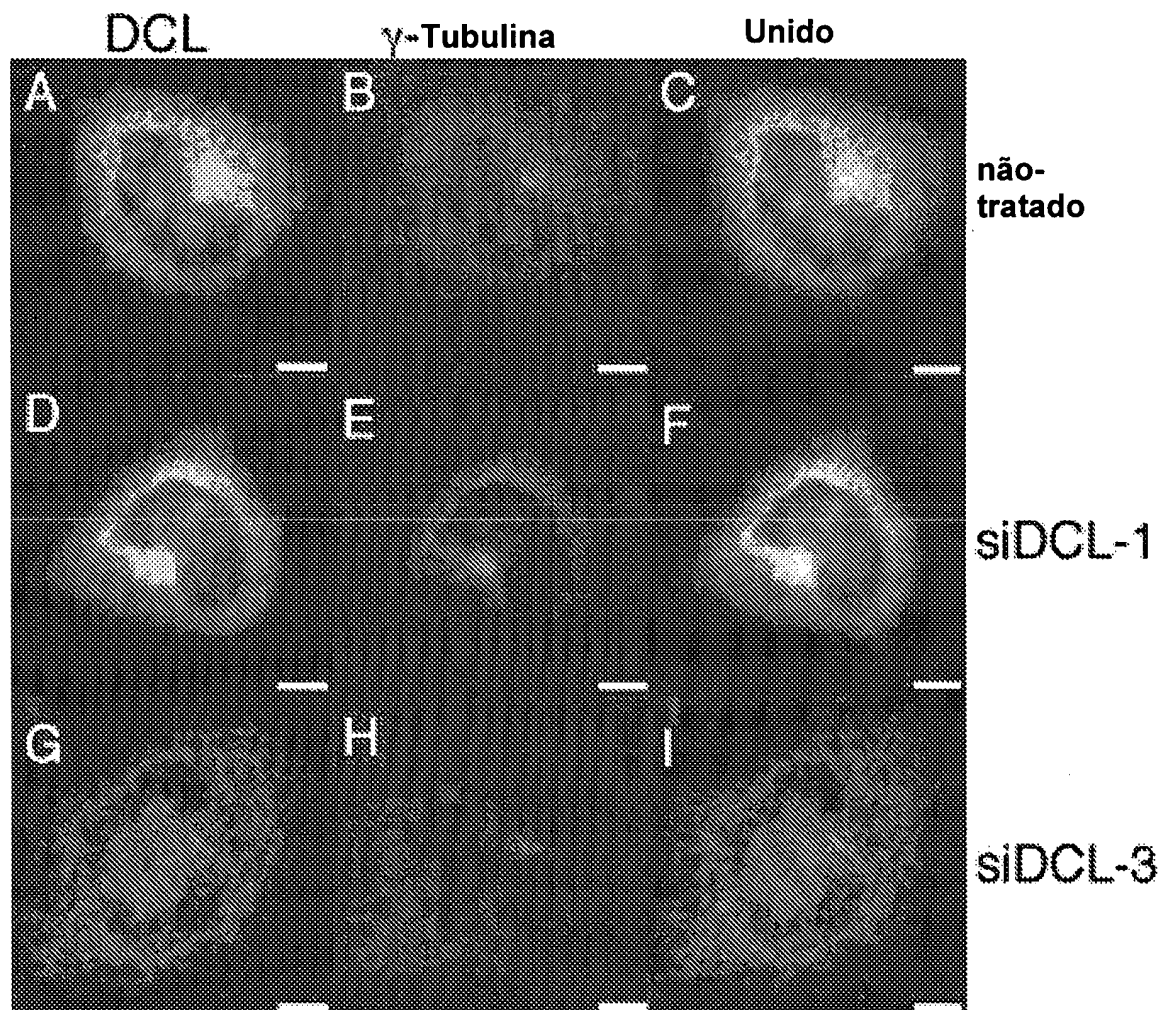
Fig 5 (IV)

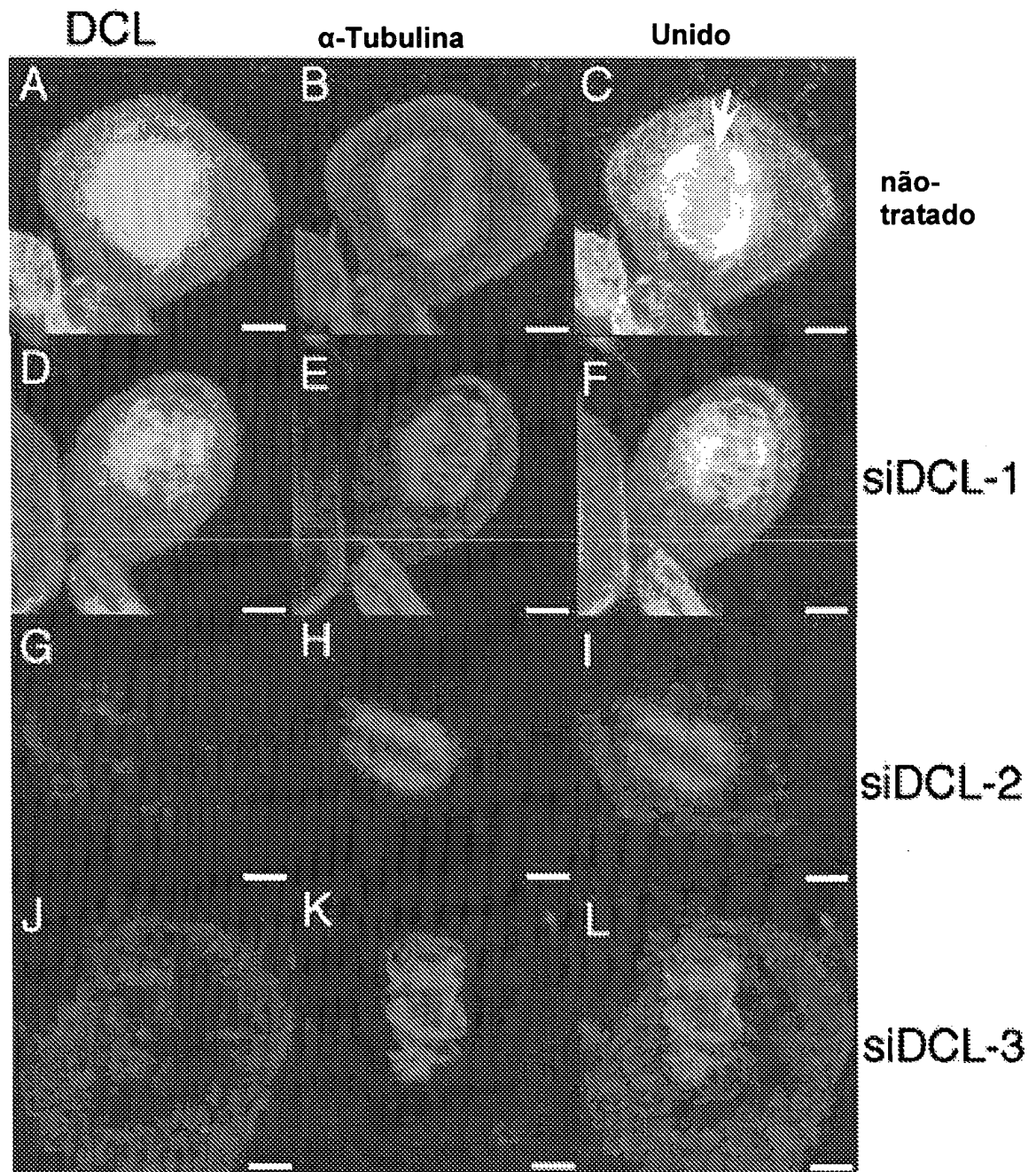
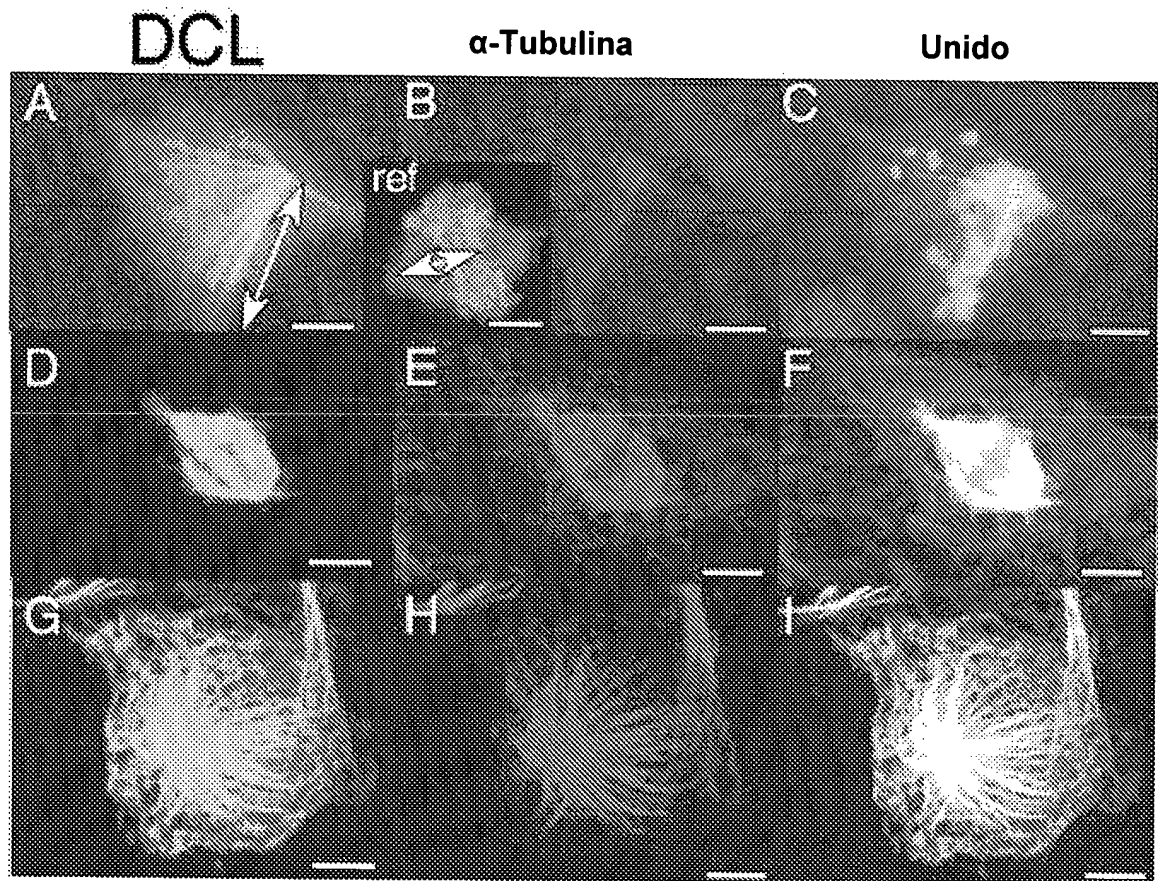
Fig 6

Fig 7

RESUMO

“USO DE UM FRAGMENTO DE ÁCIDO NUCLEICO DE SEQ ID NO: 1
OU 2, OU DE UMA VARIANTE DE SEQ ID NO: 1 OU 2, FRAGMENTO
DE ÁCIDO NUCLEICO DE SENSO E/OU ANTI-SENSO DE SEQ ID NO:
5 1 OU 2, OU DE UMA VARIANTE DE SEQ ID NO: 1 OU 2,
COMPOSIÇÃO, PROTEÍNA, MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR
CÂNCERES DE ORIGEM NEUROECTODERMAL, E, KIT
DIAGNÓSTICO”

A presente invenção refere-se às novas moléculas de ácido
10 nucleico e de proteína e ao seu uso em diagnose e terapia de câncer.