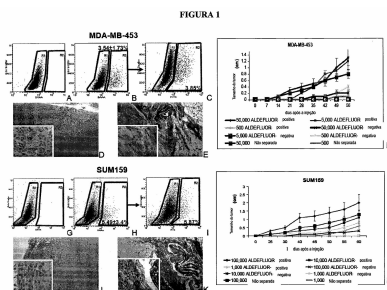


* R R P T 0 9 2 1 1 5 0 A 2 *

(43) Data da Publicação Nacional: 17/11/2020

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS ANTI-CXCR1. Trata-se de métodos de tratamento de câncer mediante a administração de um inibidor da via de IL8-CXCR1 (por exemplo, um anticorpo anti-CXCR1 ou Repertaxina) sozinho ou em combinação com um agente quimioterápico adicional, de tal modo que as células de câncer não-tumorigênicas e tumorigênicas em um indivíduo sejam exterminadas. A presente invenção também fornece composições e métodos para a detecção da presença de e o isolamento de células tronco de tumor sólido em um paciente (por exemplo, com base na presença de CXCR1 ou FBXO21).



“MÉTODOS E COMPOSIÇÕES ANTI-CXCR1”

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

O presente pedido reivindica prioridade ao Pedido de Patente Provisório N° U.S. 61/113.458, depositado em 11 de Novembro de 2008, incorporado aqui por referência em sua totalidade.

DECLARAÇÃO SOBRE PESQUISA OU DESENVOLVIMENTO PATROCINADO PELO GOVERNO FEDERAL

Esta invenção foi feita com o apoio do governo sob os números de concessão CA66233, CA101860 e 5 P 30 CA46592, concedidos pelo NIH. O governo tem certos direitos na invenção.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece métodos de tratamento do câncer pela administração de um inibidor da via IL8-CXCR1 (por exemplo, um anticorpo anti-CXCR1 ou Repertaxina) sozinho ou em combinação com um agente quimioterapêutico adicional, de tal forma que células cancerosas não-tumorais e tumorais em um indivíduo são mortas. A presente invenção também fornece composições e métodos para detectar a presença e isolar células-tronco de tumores sólidos em um paciente (por exemplo, com base na presença de CXCR1 ou FBXO21).

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

O câncer continua a ser a segunda maior causa de mortalidade neste país, resultando em mais de 500.000 mortes por ano. Apesar dos avanços na detecção e no tratamento, a mortalidade por câncer permanece alta. Apesar dos notáveis progressos na compreensão da base molecular do câncer, esse conhecimento ainda não foi traduzido em estratégias terapêuticas eficazes.

Em particular, o câncer de mama é o câncer mais comum em mulheres norte-americanas, com aproximadamente uma em cada nove mulheres desenvolvendo câncer de mama em sua vida. Infelizmente, o câncer de mama metastático é ainda uma doença incurável. A maioria das mulheres com câncer de mama metastático sucumbe à doença.

As formas tradicionais de tratamento (radioterapia, quimioterapia e terapia hormonal), apesar de úteis, têm sido limitadas pelo surgimento de células cancerosas resistentes ao tratamento. É evidente que são necessárias novas abordagens para identificar alvos para o tratamento de câncer de mama metastático e câncer em geral.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece métodos de tratamento do câncer pela administração de um inibidor da via IL8-CXCR1 (por exemplo, um anticorpo anti-CXCR1 ou Repertaxina) sozinho ou em combinação com um agente quimioterapêutico adicional, de tal forma que células cancerosas não-tumorais e tumorais em um indivíduo são mortas. A presente inven-

ção também fornece composições e métodos para detectar a presença e isolar células-tronco de tumores sólidos em um paciente (por exemplo, com base na presença de CXCR1 ou FBXO21).

Em algumas modalidades a presente invenção fornece métodos de tratamento do câncer, compreendendo: administração de um antagonista da via IL8-CXCR1 e um agente quimioterápico complementar a um indivíduo. Em certas modalidades a presente invenção fornece métodos para reduzir ou eliminar células-tronco cancerosas e células cancerosas não-tumorais em um indivíduo, compreendendo: a administração de Repertaxina ou derivado do mesmo a um indivíduo em condições tais que pelo menos uma parte das células-tronco cancerosas e pelo menos uma parte das células cancerosas não-tumorais são mortas. Em outras modalidades, a presente invenção fornece métodos para reduzir ou eliminar células-tronco cancerosas e células cancerosas não-tumorais em um indivíduo, compreendendo: a administração de um antagonista da via IL8-CXCR1 e um agente quimioterápico complementar a um indivíduo em condições tais que pelo menos uma parte das células-tronco cancerosas e pelo menos uma parte das células cancerosas não-tumorais são mortas. Em modalidades específicas a presente invenção fornece composições ou kits que incluem um antagonista da via IL8-CXCR1 e um agente quimioterapêutico adicional.

Em certas modalidades o antagonista da via IL8-CXCR1 compreende um agente que bloqueia especificamente a ligação de IL8 com CXCR1. Em algumas modalidades o agente se liga a (é específico para) CXCR1, mas não se liga a CXCR2. Em outras modalidades o agente se liga a CXCR1. Em modalidades específicas o agente compreende um anticorpo anti-CXCR1 ou fragmento de anticorpo. Em modalidades adicionais o agente compreende Repertaxina ou um derivativo deste. Em modalidades adicionais o agente quimioterápico adicional compreende um composto anti-mitótico. Em certas modalidades o composto anti-mitótico é selecionado a partir do grupo que consiste em: docetaxel, doxorubicina, paclitaxel, fluoruracil, vincristina, vinblastina, nocodazol, colchicina, podofilotoxina, steganacina e combretastatina. Em outras modalidades o composto anti-mitótico é um alcalóide catharalthus (por exemplo, vincristina e vinblastina); ou um benzimidazol carbamato, como nocodazol; ou colquicina ou compostos relacionados, como podofilotoxina, steganacina ou combretastatina; ou um taxano, como paclitaxel e docetaxel. Em certas modalidades o agente quimioterápico adicional compreende docetaxel.

Em modalidades específicas o indivíduo tem um tipo de câncer que, quando tratado com quimioterapia, aumentou os níveis da produção de IL-8 (por exemplo, o que provoca um aumento no número de células-tronco cancerosas da motilidade). Em algumas modalidades o indivíduo tem um tipo de câncer selecionado a partir do grupo que consiste em: câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de mama, melanoma, câncer de pulmão de células não-pequenas, câncer de pulmão de células pequenas e adenocarcinoma de esôfa-

go.

Em outras modalidades, a presente invenção fornece métodos de detecção de células-tronco de tumores sólidos, compreendendo: a) fornecimento de: i) uma amostra retirada de um tumor de um indivíduo e ii) um anticorpo ou fragmento de anticorpo (ou outra molécula de ligação) específico para a proteína CXCR1 ou a proteína FBXO21 (ou outra proteína da Tabela 1); e b) por em contato a amostra de tecido com o anticorpo ou fragmento de anticorpo em condições tais que a presença ou a ausência de células-tronco de tumor sólido de CXCR1+ ou FBXO21+ são detectadas.

Em modalidades específicas o anticorpo ou fragmento de anticorpo é conjugado em uma molécula de sinalização. Em outras modalidades a molécula de sinalização compreende uma molécula fluorescente. Em outras modalidades a molécula de sinalização compreende uma enzima que pode catalisar uma reação de produção de cor na presença de um substrato colorimétrico. Em certas modalidades o método inclui ainda por a amostra em contato com um anticorpo secundário ou fragmento de anticorpo secundário específico para o anticorpo ou fragmento de anticorpo. Em outras modalidades o anticorpo secundário ou fragmento de anticorpo secundário é composto por uma molécula de sinalização. Em modalidades específicas nenhuma outra proteína ou ácido nucleico são ensaiados a fim de determinar a presença ou a ausência de células-tronco de tumor sólido CXCR1 ou FBXO21+. Em modalidades adicionais o tumor é selecionado a partir do grupo que consiste em: tumor de câncer de próstata, tumor de câncer de ovário, tumor de câncer de mama, melanoma, tumor de câncer de pulmão de células não-pequenas, tumor de câncer de pulmão de células pequenas e tumor de adenocarcinoma de esôfago.

Em algumas modalidades a presente invenção fornece métodos de enriquecimento para uma população de células-tronco de tumores sólidos, incluindo: a) dissociar um tumor sólido para gerar células dissociadas; b) por as células dissociadas em contato com um reagente que se liga a CXCR1 ou FBXO21 (ou outra proteína da Tabela 1); e c) selecionar células que se ligam ao reagente em condições tais que uma população enriquecida para células-tronco de tumores sólidos é gerada.

Em certas modalidades nenhum reagente adicional é empregado para gerar a população enriquecida para células-tronco de tumor sólido. Em algumas modalidades o tumor selecionado a partir do grupo que consiste em: tumor de câncer de próstata, tumor de câncer de ovário, tumor de câncer de mama, melanoma, tumor de câncer de pulmão de células não-pequenas, tumor de câncer de pulmão de células pequenas e tumor de adenocarcinoma de esôfago. Em modalidades adicionais o reagente é um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, fragmento Fab). Em outras modalidades o reagente é conjugado em um fluorocromo ou partículas magnéticas. Em outras modalidades a seleção de células é realizada por citometria de fluxo, classificação de células ativadas por fluorescência, filtra-

ção, separação por coluna de afinidade, ou seleção magnética.

Em modalidades específicas a presente invenção fornece uma população enriquecida de células-tronco de tumores sólidos isoladas pelos métodos descritos aqui.

Em algumas modalidades a presente invenção fornece populações isoladas de células-tronco cancerosas que são: a) tumorigênicas e b) CXCR1+ ou FBXO21+. Em certas modalidades as células-tronco cancerosas são células-tronco cancerosas selecionadas a partir do grupo que consiste em: células-tronco de câncer de próstata, células-tronco de câncer de ovário, células-tronco de câncer de mama, células-tronco de câncer de pele, células-tronco de câncer de pulmão de células não-pequenas, células-tronco de câncer de pulmão de células pequenas e células-tronco de adenocarcinoma de esôfago. Em outras modalidades a população compreende pelo menos 60% de células-tronco cancerosas e menos de 40% de células tumorais não-tumorigênicas. Em outras modalidades as células-tronco cancerosas: são enriquecidas pelo menos duas vezes mais em comparação a células tumorais não fracionadas não-tumorigênicas (por exemplo, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, ..., 10 vezes, ... 100 vezes, ... 1.000 vezes).

Em algumas modalidades a presente invenção fornece métodos para obter, a partir de um tumor, uma composição celular que compreende células-tronco cancerosas e células tumorais não-tumorigênicas, em que pelo menos 60% são células-tronco tumorigênicas e 40% ou menos são células tumorais não-tumorigênicas, o método compreendendo: a) obter uma mistura dissociada de células tumorais de um tumor; b) separar a mistura de células tumorais em uma primeira fração, compreendendo pelo menos 60% de células-tronco cancerosas e 40% ou menos de células tumorais não-tumorigênicas e uma segunda fração de células tumorais empobrecidas de células-tronco cancerosas em que a separação é feita pondo a mistura em contato com um reagente contra CXCR1 ou FBXO21; e c) demonstrar que a primeira fração é tumorigênica através de: i) injeção em série em um primeiro animal hospedeiro e que a segunda fração é não-tumorigênica através de uma injeção em série em um segundo animal hospedeiro. Em certas modalidades a separação é realizada por citometria de fluxo, classificação celular ativada por fluorescência (FACS), filtração, cromatografia por afinidade ou seleção magnética. Em algumas modalidades a separação é feita por análise com separadores de células ativadas por fluorescência (FACS).

Em modalidades específicas a presente invenção fornece métodos de seleção de um tratamento para um paciente com um tumor sólido, compreendendo: (a) obter uma amostra do paciente; (b) identificar a presença de uma célula-tronco de tumor sólido CXCR1+ ou FBXO21+ na amostra; e (c) selecionar um tratamento para o paciente que direcione células-tronco de tumor sólido CXCR1+ ou FBXO21+ (por exemplo, selecionando o uso de um anticorpo ou fragmento de anticorpo anti-CXCR1). Em certas modalidades as células-tronco de tumor sólido CXCR1+ ou FBXO21+ são células-tronco cancerosas selecionadas a partir

do grupo que consiste em: células-tronco cancerosas da próstata, células-tronco cancerosas do ovário, células-tronco cancerosas da mama, células-tronco cancerosas da pele, células-tronco cancerosas de pulmão de células não-pequenas, células-tronco cancerosas de pulmão de células pequenas e células-tronco de adenocarcinoma de esôfago.

Em algumas modalidades a presente invenção fornece métodos para a seleção de um composto, compreendendo: a) expor uma amostra que inclui uma célula-tronco cancerosa CXCR1+ ou FBXO21+ a um composto anti-neoplásico candidato, em que o composto anti-neoplásico candidato compreende um antagonista de CXCR1 ou FBXO21 ou um antagonista da via de sinalização IL8-CXCR1; e b) detectar uma alteração na célula em resposta ao composto.

Em certas modalidades a amostra compreende uma mamoesfera não aderente. Em outras modalidades o antagonista de CXCR1 ou FBXO21, ou o antagonista da via de sinalização IL8-CXCR1 compreende um anticorpo ou fragmento de anticorpo. Em algumas modalidades o antagonista de CXCR1 é um derivado de Repartaxina. Em outras modalidades a detecção compreende detectar a morte celular da célula tumorigênica da mama. Em outras modalidades os métodos compreendem ainda a identificação do agente anti-neoplásico candidato como capaz de matar células tumorigênicas, assim como células cancerosas não-tumorigênicas.

Em algumas modalidades a presente invenção fornece métodos para determinar a capacidade de um composto de ensaio em inibir a tumorigênese de células-tronco de tumor sólido que compreendem: a) obter células-tronco de tumor sólido enriquecidas, em que as células-tronco de tumor sólido: i) são enriquecidas pelo menos duas vezes em comparação com células tumorais não fracionadas; e ii) expressam CXCR1 ou FBXO21; b) expor um primeiro conjunto, mas não um segundo conjunto, de células-tronco de tumor sólido a um composto de teste; c) injetar o primeiro conjunto de células-tronco de tumor sólido em um primeiro animal hospedeiro e injetar o segundo conjunto de células-tronco de tumor sólido em um segundo animal hospedeiro; e d) comparar um tumor, se presente, no primeiro animal com um tumor formado no segundo animal a fim de determinar se o composto de ensaio inibe a formação do tumor. Em modalidades específicas o composto de ensaio é um inibidor de CXCR1 ou FBXO21, ou um inibidor da via IL8-CXCR1.

Em outras modalidades a presente invenção fornece métodos para determinar a capacidade de um composto de ensaio para inibir a tumorigênese de células-tronco de tumor sólido que compreende: a) obter uma amostra que compreende pelo menos 60% de células-tronco de tumor sólido, em que as células-tronco de tumor sólido expressam CXCR1 ou FBXO21; b) injetar as células-tronco de tumor sólido em um primeiro e um segundo animais; c) tratar o primeiro animal hospedeiro com um composto de ensaio, e não tratar o segundo animal hospedeiro com o composto de ensaio; e d) comparar um tumor, se presente,

no primeiro animal com um tumor formado no segundo animal, a fim de determinar se o composto de ensaio inibe a formação do tumor. Em outras modalidades o composto de ensaio é um inibidor de CXCR1 ou FBXO21 ou um inibidor da via IL8-CXCR1.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra que as populações de células ALDEFLUOR-positivas de linhagens de células de câncer de mama (MDA-MB-453, SUM159) têm propriedades de célula-tronco cancerosa. A-B, G-H. Análise por citometria de fluxo representativa da atividade enzimática ALDH em células MDA-MB-453 (A-B) e SUM159 (G-H). Um ensaio ALDEFLUOR foi realizado conforme descrito no Exemplo 1 abaixo. (C, I) A população ALDEFLUOR-positiva foi capaz de gerar tumores em camundongos NOD/SCID que recapitularam a heterogeneidade fenotípica do tumor inicial. (F, L) Curvas de crescimento do tumor foram plotadas para números diferentes de células injetadas (para MDA-MB-453: 50.000 células, 5.000 células e 500 células e para SUM159: 100.000 células, 10.000 células e 1.000 células) e para cada população (ALDEFLUOR-positiva, ALDEFLUOR-negativa, não separada). Cinética de crescimento do tumor correlacionada com a latência e o tamanho da formação do tumor e o número de células ALDEFLUOR-positivas (F, L). (D, J) marcação H&E do sítio de injeção de células ALDEFLUOR-positivas, revelando a presença de células tumorais (D: sítio de injeção de células ALDEFLUOR-positivas MDA-MB-453, e J: sítio de injeção de células ALDEFLUOR-positivas SUM59). (E, K) O sítio de injeção de células ALDEFLUOR-positivas continha apenas Matrigel residual, células apoptóticas e tecido de camundongos (E: sítio de injeção de células ALDEFLUOR-negativas MDA-MB-453, e K: sítio de injeção de células ALDEFLUOR-negativas SUM59). Os dados representam a média $\pm$ SD.

A Figura 2 mostra a classificação de populações ALDEFLUOR-positivas e ALDEFLUOR-negativas isoladas de linhagens celulares da mama com base na “assinatura de célula-tronco cancerosa”. Figura 2A. Agrupamento hierárquico de 16 amostras com base em uma assinatura da expressão de 413 genes. Cada linha da matriz de dados representa um gene e cada coluna representa uma amostra. Observe a separação entre as amostras ALDEFLUOR-positivas (nomes sublinhados) e negativas (nomes não-sublinhados) com os 413 genes para 15 das 16 amostras. Alguns genes incluídos na assinatura são referenciados por sua sigla HUGO, conforme usada em ‘Entrez Gene’ (Genes reprimidos nas populações ALDEFLUOR-positivas são marcados em verde e genes aumentados nas populações ALDEFLUOR-positivas são marcados em vermelho). Fig. 2B-C. Para confirmar os resultados de expressão gênica, em um conjunto de cinco linhagens de células cancerosas da mama classificadas pelo fenótipo ALDEFLUOR, a expressão de cinco genes discriminadores super-expressos em populações ALDEFLUOR-positivas (CXCR1/IL8RA, FBXO21, NFYA, NOTCH2 e RAD51L1) foram medidos por RT-PCR quantitativo. Os níveis de expressão de RT-PCR quantitativo de CXCR1 e FBXO21 são apresentados nesta figura. Os níveis

de expressão gênica medidos por RT-PCR quantitativo confirmam os resultados obtidos utilizando micro-matrizes de DNA com um aumento do nível de RNAm CXCR1 e FBXO21 na população ALDEFLUOR-positiva em comparação com a população ALDEFLUOR-negativa ($p < 0,05$).

A Figura 3 mostra o papel do eixo IL8/CXCR1 na regulação das células-tronco cancerosas da mama. A. Células que expressam CXCR1 estão contidas na população ALDEFLUOR-positiva. As populações ALDEFLUOR-positiva e negativa de quatro linhagens celulares da mama diferentes (HCC1954, SUM159, MDA-MB-453, BrCa-MZ-01) foram isoladas por FACS, fixadas e analisadas quanto a expressão da proteína CXCR1 por imunocoloração e análise FACS. Células ALDEFLUOR-positivas foram altamente enriquecidas em células CXCR1-positivas em comparação com a população ALDEFLUOR-negativa. B. Efeito do tratamento com IL8 na formação de tumoresfera de três linhagens de células diferentes (HCC1954, SUM159, MDA-MB-453). O tratamento com IL8 aumentou a formação de tumoresferas primária e secundária de uma forma dose-dependente. C. Efeito do tratamento com IL8 na população ALDEFLUOR-positiva de quatro linhagens de células diferentes cultivadas em condições aderentes. IL8 aumentou a população ALDEFLUOR-positiva de uma forma dose-dependente da dose em cada uma das quatro linhagens de células analisadas (* $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$, diferenças estatisticamente significativas do grupo de controle).

A Figura 4 mostra que as células ALDEFLUOR-positivas exibem maior potencial metastático. A. O eixo IL8/CXCR1 está envolvido na invasão da célula-tronco cancerosa. O papel do eixo IL8/CXCR1 na invasão foi avaliado por um ensaio de invasão Matrigel usando soro ou IL8 como atrativo para três linhagens de células diferentes (HCC1954, MDA-MB-453, SUM159). Células ALDEFLUOR-positivas foram de 6 a 20 vezes mais invasivas do que as células ALDEFLUOR-negativas ($p < 0,01$). Ao utilizar IL8 (100 ng/ml) como atrativo, observou-se que um aumento significativo de células ALDEFLUOR-positivas estavam invadindo o Matrigel em comparação com o soro como atrativo ($p < 0,05$). Em contraste, IL8 não teve efeito na capacidade invasiva da população ALDEFLUOR-negativa. B-M. A população ALDEFLUOR-positiva apresentou aumento do potencial metastático. B-D. Quantificação do fluxo de fótons normalizado medido em intervalos semanais após a inoculação de 100.000 células infectadas com luciferase de cada grupo (ALDEFLUOR-positiva, ALDEFLUOR-negativa, não separada). E-J Detecção de metástase utilizando o *software* de imagem por bioluminescência (E, G, I: Camundongos virados para baixo; F, H, J: Camundongos virados para cima). Camundongos inoculados com células ALDEFLUOR-positivas desenvolveram várias metástases localizadas em diferentes sítios (osso, músculo, pulmão, tecido mole) e exibiram uma emissão maior de fluxo de fótons do que os camundongos inoculados com células não separadas, que desenvolveram não mais do que uma metástase por camundongo. Em contraste, os camundongos inoculados com células ALDEFLUOR-negativas de-

envolveram apenas uma pequena metástase ocasional, que antes era restrita aos linfonodos. K-M. Confirmação histológica, por marcação H&E, de metástase no osso (K), tecido mole (L) e músculo (M) resultante da injeção de células ALDEFLUOR-positivas.

A Figura 5 mostra o efeito da inibição de CXCR1 na viabilidade de células tumorais (Fig. 5A), bem como na viabilidade de células-tronco cancerosas (Fig. 5B).

A Figura 6 mostra que o tratamento com Repertaxina induz um efeito espectador mediado pela sinalização do FAS-ligante/FAS e, especificamente, mostra que a inibição do crescimento celular induzida pelo tratamento com Repertaxina foi parcialmente resgatada pela adição de um antagonista de FAS e que as células tratadas com um agonista de FAS exibiram uma inibição do crescimento celular semelhante à das células tratadas com Repertaxina.

A Figura 7 mostra a ativação de FAK, AKT e FOXO3 sem o tratamento com Repertaxina (7A) e na presença de Repertaxina (7B).

A Figura 8 mostra o efeito de Repertaxina, docetaxel, ou a combinação dos mesmos em uma linhagem de células de câncer de mama (8A, SUM159) e três xenoinxertos de câncer de mama humanos gerados a partir de diferentes pacientes (8B, MC1; 8C, UM2; e 8D, UM3).

A Figura 9 mostra o efeito de Repertaxina, docetaxel, ou do tratamento combinado na população de células-tronco cancerosas conforme avaliado pelo ensaio ALDEFLUOR em várias linhagens celulares, incluindo SUM159 (9A), MC1 (9B), UM2 (9C), UM3 (9D).

A Figura 10 mostra o efeito de Repertaxina, docetaxel, ou a combinação dos mesmos em diluições em série de tumores primários (10A. SUM159, 10B. MC1, 10C. UM2, 10D. UM3) que foram implantados na gordura mamária de camundongos NOD-SCID secundários.

A Figura 11 mostra que o tratamento com Repertaxina reduz o potencial metastático da linhagem de células SUM159. A Figura 11A mostra uma quantificação do fluxo de fótons normalizado medido em intervalos semanais após a inoculação com células SUM 159 administradas por via intracardíaca. A formação de metástase foi monitorada através de imageamento por bioluminescência (11B: Camundongos tratados com solução salina; 11C: Camundongos tratados com Repertaxina).

A Figura 12 mostra representações da sobreposição entre a subpopulação ALDEFLUOR-positiva e a subpopulação CXCR1-positiva (superior) ou subpopulação CXCR2-positiva (inferior) de células SUM159. B-C. Células SUM159 foram cultivadas em condições aderentes e tratadas com repertaxina (100nM) ou dois anticorpos de bloqueio específicos para CXCR1 (10µg/ml) ou CXCR2 (10µg/ml). Depois de três dias, o efeito sobre a população de células-tronco cancerosas foi analisado utilizando o ensaio ALDEFLUOR (B) a viabilidade celular foi avaliada após cinco dias de tratamento utilizando o ensaio MTT (C).

Uma redução significativa da população ALDEFLUOR-positiva e da viabilidade celular foi observada após o tratamento com repertaxina ou anticorpo anti-CXCR1. Em contraste, nenhum efeito significativo foi observado com o anticorpo anti-CXCR2. D. Após 4 dias de tratamento, o número de células apoptóticas foi avaliado utilizando um ensaio TUNEL. 36% das células apoptóticas (marcadas em verde) foram detectadas em células tratadas com repertaxina em comparação com os controles, onde a maioria de células viáveis (marcadas em azul) estavam presentes. E-F. Para determinar se a morte celular foi mediada através de um efeito espectador, populações CXCR1-positivas e CXCR1-negativas foram classificadas quanto ao fluxo e cada população tratada com várias concentrações de repertaxina (D).

Uma diminuição da viabilidade celular em populações CXCR1-positivas e populações não diferenciadas foi detectada, enquanto nenhum efeito foi observado na população CXCR1-negativa (E). Meio condicionado dialisado (dCM) a partir de células CXCR1-positivas tratadas por três dias com repertaxina foi utilizado para tratar populações CXCR1-positivas, CXCR1-negativas, ou não separadas. Diluições em série do meio condicionado dialisado foram utilizadas (Controle, dCM 1/4, dCM 1/2, dCM 3/4, dCM). Após dois dias de tratamento a viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio MTT. Uma diminuição maciça da viabilidade celular foi observada em ambas as populações CXCR1-negativa e não separada, enquanto nenhum efeito foi observado na população CXCR1-positiva (F).

A Figura 13 mostra a tumorigenicidade das populações celulares ALDEFLUOR-positivas/CXCR1-positivas e ALDEFLUOR-positivas/CXCR1-negativas da linhagem celular SUM159. A. Curvas de crescimento do tumor foram plotadas para números diferentes de células injetadas (50.000 células, 5.000 células, 1.000 células e 500 células) e para cada população (ALDEFLUOR-positiva/CXCR1-positiva, ALDEFLUOR-positiva/CXCR1-negativa). Ambas as populações de células geraram tumores. Cinética de crescimento do tumor correlacionada com a latência e o tamanho da formação do tumor e o número de células injetadas. B-C. Tumores gerados pela população ALDEFLUOR-positiva/CXCR1-positiva reconstituíram a heterogeneidade fenotípica do tumor inicial após passagens seriadas, enquanto a população ALDEFLUOR-positiva/CXCR1-negativa deu origem a tumores contendo apenas células ALDEFLUOR-positiva/CXCR1-negativa. Transplantamos a população de ambas as células por três passagens.

A Figura 14 mostra o efeito do bloqueio de CXCR1 na formação da tumoresfera. Células SUM159 e HCC1954 foram cultivadas em condições aderentes e tratadas por três dias com repertaxina (100nM), um anticorpo de bloqueio anti-CXCR1 (10µg/ml), ou um anticorpo de bloqueio anti-CXCR2 (10µg/ml). Após três dias de tratamento as células foram destacadas e cultivadas em suspensão. O número de tumoresferas formadas após 5 dias de cultura foi avaliado. Resultados similares foram observados para ambas as linhas celulares com uma diminuição significativa na formação de tumoresfera primária e secundária nas

condições tratadas com repertaxina e anti-CXCR1 em comparação com os controles. Em contraste, o anticorpo de bloqueio anti-CXCR2 não teve nenhum efeito na formação da tumoresfera.

A Figura 15 mostra o efeito do tratamento com repertaxina na viabilidade celular de linhagens de células SUM159, HCC1954 e MDA-MB-453. Três linhagens de células diferentes (SUM159, HCC1954, MDA-MB-453) foram cultivadas em condições aderentes e tratadas com repertaxina (100nM). A viabilidade celular foi avaliada após um, três e cinco dias de tratamento utilizando ensaio MTT. Uma diminuição da viabilidade celular foi observada após três dias de tratamento para as linhagens celulares SUM159 e HCC1954. No entanto, a repertaxina não teve efeito na viabilidade de células MDA-MB 453.

A Figura 16 mostra o efeito do bloqueio de CXCR1 na população ALDEFLUOR-positiva *in vitro*. A-B. Células HCC1954 (A) e MDA-MB-453 (B) foram cultivadas em condições aderentes e tratadas com repertaxina (100nM) ou dois anticorpos de bloqueio específicos para CXCR1 (10µg/ml) ou CXCR2 (10µg/ml). Após três dias o efeito na população de células-tronco cancerosas foi analisado através de ensaio ALDEFLUOR. Para HCC1954, uma redução significativa da população ALDEFLUOR-positiva e da viabilidade celular foi observada após o tratamento com repertaxina ou anticorpo anti-CXCR1. Em contraste, nenhum efeito significativo foi observado com o anticorpo anti-CXCR2 (A). Para MDA-MB-453, nenhum efeito na população ALDEFLUOR-positiva foi observado (B).

A Figura 17 mostra que o tratamento com repertaxina induz um efeito espectador mediado pela sinalização FAS/FAS-ligante. A. Para determinar se o efeito mortal espectador induzido pelo tratamento com repertaxina foi mediado pelo FAS-ligante, o nível de FAS-ligante solúvel no meio foi medido utilizando um ensaio ELISA. Após 4 dias de tratamento, um aumento maior do que de quatro vezes do FAS-ligante solúvel foi detectado no meio de células tratadas com repertaxina em comparação aos controles não tratados. B. O nível de RNAm do FAS-ligante foi medido por RT-PCR e confirmou o aumento da produção de FAS-ligante após tratamento com repertaxina. Resultados semelhantes foram observados após 4 dias de tratamento com um agonista de FAS que ativa a sinalização de FAS, com um aumento de cinco vezes do RNAm do FAS-ligante em comparação ao controle. C. Células SUM159 foram cultivadas em condições aderentes e tratadas com repertaxina apenas ou em combinação com um ligante anti-FAS. A inibição do crescimento celular induzida pelo tratamento com Repertaxina foi parcialmente resgatada pela adição do ligante anti-FAS. Células tratadas com um agonista de FAS exibiram inibição do crescimento celular semelhantes à das células tratadas com repertaxina apenas. D-E. O efeito do tratamento com repertaxina apenas ou em combinação com um ligante anti-FAS e o tratamento de um agonista de FAS na população CXCR1-positiva e ALDEFLUOR-positiva foi analisado. A diminuição acentuada na população CXCR1-positiva e ALDEFLUOR-positiva induzida pelo trata-

mento com repertaxina não foi resgatada pelo ligante anti-FAS e o tratamento com o agonista de FAS produziu aumentos de dez vezes e três vezes no percentual da população CXCR1-positiva e ALDEFLUOR-positiva, respectivamente.

A Figura 18 mostra o efeito do agonista de FAS em células CXCR1-positivas e CXCR1-negativas. Populações CXCR1-positivas e CXCR1-negativas foram classificadas quanto ao fluxo e cada população tratada com várias concentrações de agonista de FAS. Uma diminuição da viabilidade celular em populações CXCR1-negativa e não separada foi detectada, enquanto nenhum efeito foi observado na população CXCR1-positiva.

A Figura 19 mostra a análise da expressão da proteína CXCR1 no tronco da mama normal/população progenitora e o efeito do tratamento com IL-8 na formação da mamoesfera. A. A população ALDEFLUOR-positiva e negativa de células epiteliais normais da mama isoladas de redução de mamoplastias foi isolada por FACS, fixada e analisada quanto a expressão da proteína CXCR1 por imunocoloração e análise por FACS. Células ALDEFLUOR-positivas foram altamente enriquecidas em células CXCR1-positivas em comparação com a população ALDEFLUOR-negativa. B-C. Efeito do tratamento com IL8 na formação da mamoesfera. O tratamento com IL8 aumentou a formação das mamoesferas primária (B) e secundária (C) de maneira dose-dependente.

A Figura 20 mostra o efeito do tratamento com repertaxina nas células epiteliais mamárias normais. A. Células epiteliais mamárias normais isoladas das mamoplastias de redução foram cultivadas em condição aderente e tratadas com repertaxina (100nM ou 500nM) ou agonista de FAS (500ng/ml). Após cinco dias de tratamento a viabilidade celular foi avaliada utilizando MTT. O tratamento com repertaxina ou agonista de FAS não teve efeito na viabilidade das células epiteliais mamárias normais cultivadas em condições aderentes, mesmo quando altas concentrações de repertaxina (500nm) foram utilizadas. B. O nível de FAS-ligante solúvel foi avaliado por ELISA no meio de células epiteliais mamárias normais tratadas com repertaxina. Após 4 dias de tratamento, um aumento do FAS-ligante solúvel foi detectado em meio de células tratadas. C. Análise da expressão de FAS/CD95 nas células epiteliais mamárias normais por análise FACS. Nenhuma expressão FAS/CD95 foi detectada nas células epiteliais mamárias normais cultivadas em condição aderente. D. Efeito do tratamento com repertaxina na formação da mamoesfera. Células epiteliais mamárias normais foram cultivadas em condição aderente e tratadas durante quatro, oito, onze e quinze dias com repertaxina (100nM). Após o tratamento com repertaxina as células foram destacadas e cultivadas em suspensão. Uma diminuição significativa de células iniciadoras de mamoesfera foi observada na condição tratada com repertaxina.

A Figura 21 mostra o efeito do tratamento com repertaxina na ativação de FAK, AKT e FOXO3a. Para avaliar o efeito do tratamento com repertaxina na sinalização a jusante de CXCR1, dois constructos virais diferentes foram utilizados, um derrubando a expres-

são de PTEN através de um siRNA-PTEN e o outro levando á superexpressão de FAK (Ad-FAK). A. Células de controle SUM159, PTEN-siRNA SUM159 e Ad-FAK SUM159 foram cultivadas em condições aderentes por dois dias na ausência ou presença de 100nM de repertaxina e a ativação da via FAK/AKT foi avaliada por *western blotting*. O tratamento com repertaxina levou a uma diminuição da fosforilação FAK Tyr397 e AKT Ser473, enquanto a supressão de PTEN e a superexpressão de FAK bloquearam o efeito do tratamento com repertaxina na atividade de FAK e AKT. B. Utilizando marcação por imunofluorescência em células CXCR1-positivas, constatou-se que o tratamento com repertaxina resulta no desaparecimento de fosfo-FAK (marcação membranosa em vermelho) e na expressão de fosfo-AKT (marcação citoplasmática em vermelho). A marcação por imunofluorescência com um anti-FOXO3A revelou uma localização citoplasmática de FOXO3a (em vermelho) nas células não tratadas, enquanto o tratamento com repertaxina induziu uma re-localização de FOXO3A para o núcleo. Em contraste, as células com supressão de PTEN ou superexpressão de FAK exibem um alto nível de fosfo-FAK, fosfo-AKT e expressão citoplasmática de FOXO3A em ambas as células tratadas com repertaxina e nas não tratadas. Em todas as amostras, os núcleos foram contra-marcados com DAPI (em azul). C-D. Efeito de repertaxina na viabilidade celular de PTEN-siRNA SUM159 e Ad-FAK SUM159 e na população de célula-tronco cancerosa foi avaliado utilizando ensaios MTT e ALDEFLUOR, respectivamente. Após 3 dias de tratamento, células com supressão de PTEN ou superexpressão de FAK desenvolveram resistência a repertaxina (C). O tratamento com repertaxina não alterou a proporção de células SUM159 *knockdown* PTEN ALDEFLUOR-positivas. (D).

A Figura 22 mostra o efeito do tratamento com repertaxina na ativação de FAK/AKT em linhagens de células HCC1954 e MDA-MB-453. Para avaliar o efeito do tratamento com repertaxina na sinalização a jusante de CXCR1, utilizamos um constructo lentiviral derrubando a expressão de PTEN através de um PTEN-siRNA A. Células HCC1954 de controle e PTEN-siRNA HCC1954 foram cultivadas em condições aderentes por dois dias na ausência ou presença de 100nM de repertaxina e a ativação da via FAK/AKT foi avaliada por *western blotting*. O tratamento com repertaxina levou a uma diminuição da fosforilação de FAK Tyr397 e AKT Ser473, enquanto a supressão de PTEN bloqueou o efeito do tratamento com repertaxina na atividade FAK e AKT. B. O tratamento com repertaxina não tem nenhum efeito na viabilidade celular da linhagem celular de MDA-MB-453 que abrigam mutação de PTEN. Utilizando análise *western blot* constatou-se que a via FAK/AKT não foi perturbada pelo tratamento com repertaxina.

A Figura 23 mostra o efeito da repertaxina na viabilidade celular de PTEN-siRNA HCC1954, avaliada utilizando ensaio MTT. Após 3 dias de tratamento, as células com supressão de PTEN desenvolveram resistência à repertaxina.

A Figura 24 mostra a expressão do FAS-ligante e RNAm de IL-8 após tratamento

com docetaxel ou repertaxina medido por RT-PCR quantitativo. A-B. Células SUM159 cultivadas em condição aderente foram tratadas com repertaxina (100nM), agonista de FAS (500 ng/ml) ou docetaxel (10nM). Após três dias de tratamento as células foram coletadas e o RNA extraído. Docetaxel induziu o FAS-ligante (A) e RNAm de IL-8 (B) em células SUM159. Um aumento de 4 vezes no nível de RNAm de IL-8 foi detectado após tratamento com agonista de FAS ou docetaxel (B).

A Figura 25 mostra a avaliação da ativação de PTEN/FAK/AKT nos três xenoenxertos diferentes do câncer da mama. A análise *western blot* revelou que ambos os xenoenxertos apresentaram uma expressão de PTEN e uma ativação da via FAK/AKT, como mostrado pela fosforilação de FAK Tyr397 e AKT Ser473.

A Figura 26 mostra o efeito do tratamento com repertaxina na população de células-tronco cancerosas da mama *in vivo*. A-C. Para avaliar o efeito do tratamento com repertaxina no crescimento tumoral e na população de células-tronco cancerosas *in vivo* uma linhagem de células cancerosas de mama (SUM159) e três xenoenxertos de câncer de mama humanos gerados a partir de diferentes pacientes (MC1, UM2, UM3) foram utilizados. A. Para cada amostra, 50.000 células foram injetadas na gordura mamária humanizada de camundongos NOD/SCID e o tamanho do tumor monitorado. Quando os tumores tinham cerca de 4 mm, injeção s.c. de repertaxina (15mg/kg) duas vezes/dia por 28 dias ou uma vez/semana, injeção I.P. de docetaxel (10mg/Kg) ou a combinação (repertaxina/docetaxel) foi iniciada. O gráfico mostra o tamanho do tumor antes e durante o desenrolar de cada tratamento indicado (seta, início do tratamento). Resultados similares foram observados para cada amostra com uma redução estatisticamente significativa do tamanho do tumor em grupos tratados com docetaxel isoladamente ou a combinação repertaxina/docetaxel em comparação com o controle, ao passo em que não houve diferença entre o crescimento dos tumores de controle e os tumores tratados com repertaxina isoladamente. B-C. Avaliação de repertaxina, docetaxel ou do tratamento combinado na população de células-tronco cancerosas conforme avaliado pelo ensaio ALDEFLUOR (B) e por reimplante em camundongos secundários (C). xenotransplantes tumorais tratados com docetaxel demonstraram percentual semelhante ou maior de células ALDEFLUOR-positivas em comparação com o controle, enquanto o tratamento com repertaxina apenas ou em combinação com docetaxel provocou uma diminuição estatisticamente significativa nas células ALDEFLUOR-positivas, com uma redução de 65% a 85% nas células-tronco cancerosas em comparação com o controle ($p<0,01$) (B). Diluições em série de células obtidas a partir de tumores primários de camundongos sem tratamento (controle) e tratados foram implantadas na gordura mamária de camundongos NOD/SCID secundários que não receberam nenhum tratamento adicional. Tumores primários de controle e tratados com docetaxel formaram tumores secundários em todas as diluições, enquanto apenas os números mais altos de células obtidas a partir de

tumores primários tratados com repertaxina ou em combinação com docetaxel foram capazes de formar tumores. Além disso, o crescimento do tumor foi significativamente atrasado e os tumores resultantes foram significativamente menores em tamanho do que os tumores do controle ou tratados com docetaxel (C). D. Xenotransplantes de cada grupo foram coletados e marcação imuno-histoquímica foi feita para detectar a expressão de fosfo-FAK, fosfo-AKT, FOXO3A e ALDH1. A expressão de fosfo-FAK membranoso e fosfo-AKT citoplasmático (seta) foi detectada nos tumores de controle e nos tratados com docetaxel, enquanto nenhuma expressão foi detectada nos tumores tratados com repertaxina apenas ou em combinação com docetaxel. Expressão nuclear FOXO3A (em marrom) foi detectada nas células tratadas com docetaxel ou repertaxina isoladamente ou em combinação. A diminuição da expressão ALDH1 (seta) foi detectada em tumores tratados com repertaxina apenas ou em combinação, em comparação com os tumores do controle e os tratados com docetaxel.

A Figura 27 mostra o efeito do tratamento com repertaxina na população de células-tronco cancerosas da mama *in vivo*. A-C. Para avaliar o efeito do tratamento com repertaxina no crescimento tumoral e na população de células-tronco cancerosas *in vivo*, uma linhagem de células de câncer da mama (SUM159, A) e três xenoenxertos de câncer de mama humanos foram gerados a partir de pacientes diferentes.

Para cada amostra, 50.000 células foram injetadas na gordura mamária humanizada de camundongos NOD/SCID e o tamanho do tumor monitorado. Quando os tumores tinham cerca de 4 mm, injeção s.c. de repertaxina (15mg/kg) duas vezes/dia por 28 dias ou uma vez/semana, injeção I.P. de docetaxel (10mg/Kg) ou a combinação (repertaxina/docetaxel) foi iniciada. O gráfico mostra o tamanho do tumor antes e durante o desenrolar de cada tratamento indicado (seta, início do tratamento). Resultados similares foram observados para cada amostra com uma redução estatisticamente significativa do tamanho do tumor em grupos tratados com docetaxel isoladamente ou a combinação repertaxina/docetaxel em comparação com o controle, ao passo em que não houve diferença entre o crescimento dos tumores de controle e os tumores tratados com repertaxina isoladamente. Avaliação de repertaxina, docetaxel ou do tratamento combinado na população de células-tronco cancerosas foi realizada pelo ensaio ALDEFLUOR e por reimplante em camundongos secundários. Xenotransplantes tumorais tratados com docetaxel demonstraram percentual semelhante ou maior de células ALDEFLUOR-positivas em comparação com o controle, enquanto o tratamento com repertaxina apenas ou em combinação com docetaxel provocou uma diminuição estatisticamente significativa nas células ALDEFLUOR-positivas, com uma redução de 65% a 85% nas células-tronco cancerosas em comparação com o controle ($p < 0,01$). Diluições em série de células obtidas a partir de tumores primários de camundongos sem tratamento (controle) e tratados foram implantadas na gordura mamária de camundongos NOD/SCID secundários que não receberam nenhum tratamento adicional. Tumores

primários de controle e tratados com docetaxel formaram tumores secundários em todas as diluições, enquanto apenas os números mais altos de células obtidas a partir de tumores primários tratados com repertaxina ou em combinação com docetaxel foram capazes de formar tumores. O crescimento do tumor foi significativamente atrasado e os tumores res-
 5 tantes foram significativamente menores em tamanho do que os tumores do controle ou tra-
 tados com docetaxel.

A Figura 28 mostra o efeito do tratamento com repertaxina na população de células-tronco cancerosas da mama, conforme avaliado pelo fenótipo CD44+/CD24-. A-B. Avaliação de repertaxina, docetaxel, ou do tratamento combinado na população de células-tronco can-
 10 cerosas foi feita pela presença de células CD44+/CD24-. Nos tumores residuais tratados apenas com docetaxel, temos observado de forma consistente um percentual inalterado ou aumentado de células CD44+/CD24-, enquanto o tratamento com repertaxina apenas ou em combinação com docetaxel resultou em uma redução da população de células CD44+/CD24-. A. A análise do fluxograma para o xenoenxerto UM3 é apresentada. B. Re-
 15 sultados semelhantes foram observados para MC1, UM2 e UM3. Quase todas as células SUM159 são CD44+/CD24- sob todas as condições de tratamento.

A Figura 29 mostra que o tratamento com repertaxina reduz o desenvolvimento da metástase sistêmica. Para avaliar o efeito do tratamento com repertaxina na formação de metástases, linhagens de células HCC1954 (A), SUM159 (B), MDA-MB-453 (C) cancerosas
 20 da mama foram infectadas com um lentivírus que expressa luciferase e 250.000 células infectadas com luciferase inoculadas em camundongos NOD/SCID através de injeção intra-
 cardíaca. Os camundongos foram tratados 12 horas após a injeção intracardíaca, com inje-
 ção s.c. de solução salina ou injeção s.c. de repertaxina (15mg/kg), duas vezes por dia du-
 rante 28 dias. A formação de metástases foi monitorada através de imageamento por biolu-
 25 minesência. A quantificação do fluxo de fótons normalizado medido em intervalos semanais após a inoculação revelou uma diminuição estatisticamente significativa na formação de metástases em repertaxina em comparação com os controles de solução salina para ca-
 mundongos inoculados com células HCC1954 ou SUM159 (A-B). Em contraste, o tratamen-
 to com repertaxina não teve nenhum efeito na formação de metástases para os camundon-
 30 gos injetados com células MDA-MB-453. (C). Confirmação histológica, por marcação H&E, de metástase no osso e tecido mole, resultante de camundongos não tratados por repertaxi-
 na (D).

A Figura 30 mostra a sinalização de IL-8/CXCR1 em células-tronco cancerosas trata-
 35 das com quimioterapia isoladamente ou em combinação com repertaxina. A. Representa-
 ção da sinalização celular potencial de IL-8/CXCR1 em células-tronco cancerosas. A ativa-
 ção de CXCR1 após a ligação com IL-8 induz a fosforilação da quinase de adesão focal (FAK). FAK ativo fosforila AKT e ativa a via WNT, que regula a renovação das células-tronco

e FOXO3A que regula a sobrevivência celular. A ativação de FAK protege as células-tronco cancerosas de um efeito espectador mediado pelo FAS-ligante/FAS através da inibição de FADD, um efetor a jusante da sinalização de FAS. Na presença de quimioterapia, apenas células tumorais em grandes quantidades são sensíveis ao tratamento e liberam um elevado nível de IL-8 e proteínas FAS-ligante durante o processo de apoptose. Células-tronco cancerosas da mama são estimuladas através de um efeito espectador mediado por IL-8 e são resistentes ao efeito espectador mortal mediado pelo FAS-ligante. B. O tratamento com repertaxina bloqueia a sinalização de IL-8/CXCR1 e inibe a auto-renovação e a sobrevivência da célula-tronco cancerosa da mama. Quando o tratamento com repertaxina é combinado com a quimioterapia as células-tronco cancerosas são sensibilizadas para o efeito espectador mortal mediado pelo FAS-ligante.

DEFINIÇÕES

Para facilitar a compreensão da presente invenção, uma série de termos e frases são definidos abaixo:

Conforme utilizados aqui, os termos "agente anti-câncer", "agente anti-câncer convencional", ou "fármaco terapêutico contra o câncer" se referem a quaisquer agentes terapêuticos (por exemplo, compostos quimioterápicos e/ou compostos terapêuticos moleculares), terapias de radiação, ou intervenções cirúrgicas, utilizados no tratamento de câncer (por exemplo, em mamíferos).

Conforme utilizados aqui, os termos "fármaco" e "agente quimioterápico" referem-se a moléculas farmacologicamente ativas que são usadas para diagnosticar, tratar ou prevenir doenças ou condições patológicas em um sistema fisiológico (por exemplo, um indivíduo, ou células, tecidos e órgãos *in vivo*, *in vitro*, ou *ex vivo*). Os fármacos agem alterando a fisiologia de um organismo vivo, tecido, célula, ou sistema *in vitro* ao qual o fármaco foi administrado. Pretende-se que os termos "fármaco" e "agente quimioterápico" englobem compostos anti-hiperproliferativos e antineoplásicos, bem como outros compostos biologicamente terapêuticos.

Uma "quantidade eficaz" é uma quantidade suficiente para efetuar resultados benéficos ou desejáveis. Uma quantidade eficaz pode ser administrada em uma ou mais administrações.

Conforme utilizado aqui, o termo "administração" se refere ao ato de dar um fármaco, pró-fármaco, anticorpo ou outro agente, ou tratamento terapêutico para um sistema fisiológico (por exemplo, um indivíduo ou células, tecidos e órgãos *in vivo*, *in vitro*, ou *ex vivo*). Vias de administração exemplares para o corpo humano podem ser através dos olhos (oftálmica), boca (oral), pele (transdérmica), nariz (nasal), pulmões (inalante), mucosa oral (bucal), ouvido, por injeção (por exemplo, por via intravenosa, subcutânea, intratumoral, intraperitoneal, etc.) e similares.

"Co-administração" se refere à administração de mais de um agente químico ou tratamento terapêutico (por exemplo, terapia de radiação) a um sistema fisiológico (por exemplo, um indivíduo ou células, tecidos e órgãos *in vivo*, *in vitro*, ou *ex vivo*). A "co-administração" dos agentes químicos respectivos (por exemplo, antagonista da via de sinalização IL8-CXCR1 e quimioterapia adicional) pode ser simultânea, ou em qualquer ordem temporal ou combinação física.

Conforme utilizado aqui, o termo "regressão" se refere ao retorno de um indivíduo, célula, tecido, ou órgão doente a um estado não-patológico, ou menos patológico em relação ao indivíduo, célula, tecido, ou órgão basal não-patogênico exemplar. Por exemplo, a regressão de um tumor inclui uma redução da massa tumoral, bem como o desaparecimento completo de um tumor ou tumores.

Conforme utilizado aqui, o termo "*in vitro*" refere-se a um ambiente artificial e a processos ou reações que ocorrem dentro de um ambiente artificial. Ambientes *in vitro* podem consistir em, mas não estão limitados a, tubos de ensaio e culturas de células. O termo "*in vivo*" se refere ao ambiente natural (por exemplo, um animal ou uma célula) e aos processos ou reações que ocorrem dentro de um ambiente natural.

Conforme utilizado aqui, o termo "cultura de células" se refere a qualquer cultura *in vitro* de células. Incluídos neste termo estão linhagens de células contínuas (por exemplo, com um fenótipo imortal), culturas de células primárias, linhagens celulares finitas (por exemplo, células não-transformadas) e qualquer outra população de células mantidas *in vitro*, incluindo oócitos e embriões.

Conforme utilizado aqui, o termo "indivíduo" ou "paciente" refere-se a organismos a serem tratados pelos métodos da presente invenção. Tais organismos incluem, mas não estão limitados a, seres humanos e animais veterinários (cães, gatos, equinos, suínos, bovinos, ovinos, caprinos e similares). No contexto da invenção, o termo "indivíduo" ou "paciente" geralmente se refere a um indivíduo que vai receber ou que tenha recebido tratamento.

O termo "diagnóstico", conforme utilizado aqui, refere-se ao reconhecimento de uma doença pelos seus sinais e sintomas ou análise genética, análise patológica, análise histológica e assim por diante.

Conforme utilizado aqui, o termo "antisense" é usado em referência às sequências de ácido nucleico (por exemplo, RNA, DNA fosforotioato) que são complementares a uma sequência de RNA específica (por exemplo, RNAm). Incluídas nesta definição estão moléculas naturais ou sintéticas de RNA antisense, incluindo moléculas que regulam a expressão gênica, como RNAs de interferência curtos ou micro RNAs. Um tipo de sequência antisense que pode ser empregado pela presente invenção é o tipo que é específico para o RNAm de CXCR1.

O termo "composto de ensaio" ou "composto candidato" se refere a qualquer enti-

dade química, farmacêutica, fármaco e afins, que pode ser usada para tratar ou prevenir uma doença, enfermidade ou distúrbio das funções corporais, ou alterar o estado fisiológico ou celular de uma amostra. Compostos de ensaio compreendem tanto os compostos terapêuticos conhecidos quanto aqueles em potencial. Um composto de ensaio pode ser determinado como terapêutico através do uso dos métodos de triagem da presente invenção. Um "composto terapêutico conhecido" se refere a um composto terapêutico que tem se mostrado eficaz (por exemplo, através de ensaios em animais ou experiência prévia com administração a seres humanos) neste tratamento ou prevenção. Em modalidades preferidas os "compostos de ensaio" são agentes anti-câncer. Em modalidades particularmente preferidas os "compostos de ensaio" são agentes anti-câncer que induzem a apoptose em células.

Conforme utilizado aqui, o termo "proteína de ligação ao antígeno" se refere a proteínas que se ligam a um antígeno específico. "Proteínas de ligação ao antígeno" incluem, mas não estão limitadas a, imunoglobulinas, incluindo anticorpos policlonais, monoclonais, quiméricos de cadeia única e humanizados, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂ e bibliotecas de expressão de Fab. Vários procedimentos conhecidos na técnica são usados para a produção de anticorpos policlonais. Para a produção de anticorpos, vários animais hospedeiros podem ser imunizados pela injeção com o peptídeo correspondente ao epítipo desejado, incluindo, mas não limitado a, coelhos, camundongos, ratos, ovelhas, cabras, etc. Em uma modalidade preferida o peptídeo é conjugado em um carreador imunogênico (por exemplo, toxóide diftérico, albumina de soro bovino (BSA), ou hemocianina de lapa californiana (KLH)). Vários adjuvantes são usados para aumentar a resposta imunológica, dependendo da espécie de hospedeiro, incluindo, mas não limitados a, géis minerais de Freund (completos e incompletos), tais como hidróxido de alumínio, substâncias ativas de superfície, como lisolecitina, polióis plurônicos, poliânions, peptídeos, emulsões em óleo, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol e adjuvantes humanos potencialmente úteis, como BCG (Bacilo de Calmette-Guerin) e *Corynebacterium parvum*.

Para a preparação de anticorpos monoclonais, qualquer técnica que forneça a produção de moléculas de anticorpos por linhagens celulares contínuas em cultura pode ser utilizada (por exemplo, Harlow e Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Estes incluem, mas não estão limitados à técnica de hibridoma originalmente desenvolvida por Köhler e Milstein (Köhler e Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975)), bem como a técnica de trioma, a técnica de hibridomas humanos de células B (Ver, por exemplo, Kozbor *et al.*, *Immunol. Today*, 4:72 (1983)) e a técnica de hibridoma EBV para produzir anticorpos monoclonais humanos (Cole *et al.*, em *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)).

De acordo com a invenção, técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia única (U.S. 4.946.778; aqui incorporado por referência) podem ser adaptadas para

produzir anticorpos específicos de cadeia única conforme desejado. Uma modalidade adicional da invenção utiliza os métodos conhecidos na técnica para a construção de bibliotecas de expressão de Fab (Huse *et al.*, *Science*, 246:1275-1281 (1989)) para permitir uma identificação rápida e fácil de fragmentos de Fab monoclonal com a especificidade desejada.

Fragmentos de anticorpos que contêm o idiotipo (região de ligação ao antígeno) da molécula do anticorpo podem ser gerados por meio de técnicas conhecidas. Por exemplo, tais fragmentos incluem, mas não estão limitados a: fragmento F(ab')₂, que pode ser produzido pela digestão de pepsina de uma molécula de anticorpo; fragmentos Fab', que podem ser gerados pela redução das pontes dissulfeto de um fragmento F(ab')₂, e fragmentos Fab, que podem ser gerados pelo tratamento de uma molécula de anticorpo com papaína e um agente redutor.

Os genes que codificam proteínas de ligação ao antígeno podem ser isolados por métodos conhecidos na técnica. Na produção de anticorpos, a triagem do anticorpo desejado pode ser conseguida através de técnicas conhecidas na técnica (por exemplo, radioimunoensaio, ELISA (ensaio imunoabsorvente de ligação de enzimas), imunoenaios tipo "sanduíche", ensaios imunorradiométricos, reações de precipitação em gel de difusão, ensaios de imunodifusão, imunoenaios *in situ* (utilizando marcadores de ouro coloidal, enzima, ou radioisótopos, por exemplo), Western blots, reações de precipitação, ensaios de aglutinação (por exemplo, ensaios de aglutinação em gel, ensaios de hemaglutinação, etc.), ensaios de fixação complementar, ensaios de imunofluorescência, ensaios de proteína A e ensaios de imunoeletroforese, etc.), etc.

Conforme utilizado aqui, o termo "modular" se refere à atividade de um composto para atacar (por exemplo, para promover ou retardar) um aspecto da função celular, incluindo, mas não limitado ao crescimento, proliferação, invasão, angiogênese, apoptose celular e assim por diante.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece métodos de tratamento do câncer pela administração de um inibidor da via IL8-CXCR1 (por exemplo, um anticorpo anti-CXCR1 ou Repertaxina) sozinho ou em combinação com um agente quimioterapêutico adicional, de tal forma que as células cancerosas não-tumorigênicas e tumorigênicas em um indivíduo são mortas. A presente invenção também fornece composições e métodos para tratar e diagnosticar a presença de células-tronco de tumor sólido em um paciente (por exemplo, com base na presença de CXCR1 ou FBXO21).

I. Células cancerosas tumorigênicas, inibição de ALDH, CXCR1 e CXCR1

A evolução de uma célula normal para uma completamente transformada requer a desregulação de vários processos celulares (1, 2). De acordo com os modelos clássicos da carcinogênese, esses eventos podem ocorrer em qualquer célula. Em contraste, a "hipótese

da célula-tronco cancerosa" afirma que os alvos preferenciais da transformação oncogênica são células-tronco do tecido ou progenitoras novas que tenham adquirido potencial de auto-renovação (3-6). Estas "células de iniciação tumoral" ou "células-tronco cancerosas" (CSC), por sua vez, são caracterizadas pela sua habilidade de sofrer auto-renovação, um processo que leva a tumorigênese diferenciação e que contribui para a heterogeneidade celular do tumor. Evidências recentes apoiando a hipótese da célula-tronco cancerosa foram geradas utilizando xenoinxertos de tumores humanos primários. Estes estudos têm sugerido que os tumores são compostos por uma hierarquia celular induzida pelo componente da célula-tronco cancerosa. Além disso, dados recentes sugerem que linhagens de células imortalizadas derivadas de tecidos humanos e murinos também podem conter uma população celular que exibe propriedades de célula-tronco. A maioria desses estudos tem sido baseada em propriedades *in vitro*, incluindo potencial clonogênico, formação de esfera e potencial de diferenciação de multi-linhagem (7-10). Estudos mais limitados utilizando transplante funcional de linhagens celulares imortalizadas em xenoinxertos também têm sugerido a existência de tal hierarquia. Estes estudos geralmente têm utilizado exclusão do marcador Hoechst para identificar a chamada "população lateral" (SP) (7, 9, 11). Além disso, marcadores de superfície celular definidos utilizando xenoinxertos de tumor primário, como CD44 e CD133, também têm sido utilizados para identificar populações semelhantes nas linhagens celulares estabelecidas (7, 8).

Conforme descrito nos exemplos abaixo, a expressão do marcador de células-tronco aldeído desidrogenase (ALDH) foi estudada em uma série de 33 linhagens de células derivadas de células de câncer de mama humano e células mamárias não-transformadas. ALDH é uma enzima desintoxicante responsável pela oxidação de aldeídos intracelulares e imagina-se que este desempenha um papel na diferenciação de células-tronco através do metabolismo do ácido retinal para retinóico (12, 13). A atividade de ALDH, conforme avaliada pelo ensaio ALDEFLUOR fluorescente, tem sido utilizada com sucesso para isolar células-tronco cancerosas em mieloma múltiplo e leucemia mielóide aguda (LMA), bem como de tumores cerebrais (14-16). Foi demonstrado recentemente que a atividade de ALDH pode ser utilizada para isolar uma subpopulação de células que exibem propriedades de células-tronco do tecido mamário humano normal e carcinomas de mama (17). A população ALDEFLUOR-positiva isolada do tecido da mamoplastia de redução é capaz de reconstituir estruturas alveolares ductais na gordura mamária de camundongos NOD/SCID humanizados. Além disso, as células ALDEFLUOR-positivas isolados de carcinomas mamários humanos têm propriedades de células-tronco, conforme demonstrado pela sua capacidade de reconstituir tumores na passagem seriada em camundongos NOD/SCID, bem como de gerar a heterogeneidade fenotípica dos tumores iniciais (17). Nos exemplos abaixo, é demonstrado que a maioria das linhagens de células de câncer de mama contém uma população

ALDEFLUOR-positiva com um perfil molecular distinto que apresenta propriedades de célula-tronco cancerosa.

Conforme descrito nos exemplos abaixo, trabalho realizado durante o desenvolvimento de modalidades da presente invenção identificou CXCR1 (que é um receptor para a quimiocina inflamatória IL8) como um marcador de câncer de células-tronco. Apenas as células dentro da população Aldefluor-positiva expressaram CXCR1. Além disso, foi demonstrado que esse receptor desempenha um papel funcional na medida em que IL8 recombinante é capaz de aumentar a proporção de células-tronco em linhagens celulares, conforme determinado pelos ensaios Aldefluor e de formação de esfera. Embora IL8 tenha sido associado a cânceres de mama agressivos e seja maior no soro de mulheres com doença metastática, acredita-se que a presente invenção é a primeira a mostrar uma ligação funcional entre IL8 e seu receptor CXCR1 em células-tronco.

Conforme descrito nos exemplos abaixo, foi demonstrado que se pode direcionar seletivamente células-tronco cancerosas bloqueando-se o receptor CXCR1 nessas células. Em uma abordagem descrita nos exemplos, linhagens de células de câncer de mama foram tratadas com anticorpos monoclonais para CXCR1, mas não para o outro receptor de IL8, CXCR2. Esse tratamento direcionou seletivamente células-tronco cancerosas, conforme demonstrado pela redução das populações Aldefluor-positivas. Surpreendentemente, descobriu-se que apesar de CXCR1 só ser expresso em uma porcentagem muito pequena de células (por exemplo, menos de 1%), o bloqueio do receptor de CXCR1 induziu a morte celular na maioria das outras células cancerosas, apesar do fato de que elas não têm o receptor de CXCR1. A via molecular que medeia os efeitos de IL nas células-tronco cancerosas e é responsável por este chamado "efeito espectador" de matar outras células foi elucidada. IL8 estimula a auto-renovação de células-tronco ligando ao CXCR1, que por sua vez, ativa a via Fak da quinase de adesão focal. Isto resulta na ativação de Akt, que direciona a auto-renovação de células-tronco. Quando essa via está bloqueada nas células-tronco cancerosas, a diminuição da sinalização de Akt provoca o sequestro citoplasmático dos fatores de transcrição Foxo, resultando em um aumento da síntese do Fas-ligante. O Fas-ligante é secretado das células-tronco cancerosas e induz a morte celular nas células vizinhas que contêm o receptor de Fas.

Embora a invenção não se limite a nenhum mecanismo específico, e um entendimento do mecanismo não seja necessário para a prática da presente invenção, acredita-se que CXCR1 medeia a auto-renovação da célula-tronco cancerosa através de uma via que envolve Fak e Akt e que o bloqueio desta via induz a morte celular em células-tronco cancerosas, bem como das células tumorais vizinhas. Assim, em certas modalidades a presente invenção fornece composições e métodos para romper a via IL8-CXCR1 (por exemplo, com anticorpos anti-CXCR1, anticorpos anti-FAK, ou outros agentes), a fim de tratar o câncer.

Como IL8 é uma quimiocina envolvida na inflamação do tecido, houve um interesse prévio no desenvolvimento de inibidores da sinalização de IL8. Um inibidor de molécula pequena, Repartaxina, foi desenvolvido como um agente anti-inflamatório para reduzir potencialmente as complicações do infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral. A repartaxina foi introduzida nos ensaios médicos de fase I e II e mostrou pouca toxicidade. Conforme mostrado nos exemplos abaixo, a repartaxina (como os anticorpos anti-CXCR1) é capaz de direcionar células-tronco cancerosas, bem como induzir uma apoptose mediada por Fas-ligante através do efeito espectador em células vizinhas. Importaneamente, em xenoenxertos tumorais a repartaxina potencializa o efeito da quimioterapia. Além disso, diferentemente da quimioterapia, que destrói preferencialmente as células diferenciadas em tumores, poupando as células-tronco tumorais, a repartaxina é capaz de direcionar células-tronco tumorais. Como mostrado nos exemplos, isto foi demonstrado por uma diminuição na população Aldefluor em tumores tratados com repartaxina e pela diminuição da capacidade dessas células tumorais tratadas de formar tumores secundários em camundongos. Também foram testados os efeitos da repartaxina na capacidade de bloquear a metástase. As células tumorais foram marcadas com luciferase e injetadas por via intracardíaca em um modelo experimental de metástase. Um dia depois das células tumorais serem introduzidas, um grupo de animais foi colocado em tratamento com repartaxina apenas e o outro sem tratamento. A repartaxina reduziu significativamente o desenvolvimento da metástase.

A presente invenção identificou o receptor de IL8 CXCR1 como um alvo no tratamento de células-tronco cancerosas. O inibidor de pequenas moléculas, repartaxina, inibe CXCR1 e CXCR2. Os exemplos demonstraram que CXCR1 é o receptor mais importante nas células-tronco cancerosas. Além disso, os exemplos indicam que a falha da quimioterapia citotóxica em tratar efetivamente cânceres estabelecidos pode ser não só devido à incapacidade desta terapia em direcionar células-tronco cancerosas, mas, além do documentado, aumentar a secreção de IL8 no tratamento de quimioterapia citotóxica tumoral. Os presentes exemplos indicam que o uso de inibidores de CXCR1 tem efeitos benéficos ao ser capaz de direcionar especificamente as células-tronco cancerosas, bem como de bloquear o estímulo de IL8 dessas células, induzido por quimioterapia citotóxica.

O direcionamento da via IL8-CXCR1 não se limita ao câncer de mama, mas em vez disso, pode ser utilizado em qualquer tipo de câncer. De preferência, o tipo de câncer tratado é aquele em que há evidência de aumento na produção de IL8 (por exemplo, em conjunto com a quimioterapia). Agentes quimioterápicos mostraram regular diretamente a transcrição de IL8 em células cancerosas. Paclitaxel aumenta a transcrição e a secreção de IL8 em linhagens de células cancerosas da mama, ovário e pulmão (Uslu *et al.*, 2005, *Int. J. Gynecol. Cancer*, 15:240-245; e Collins *et al.*, 2000, *Can. Imm. Immuno.*, 49:78-84, ambos incorporados aqui por referência). Além disso, a administração de adriamicina e 5-fluoro-2'-

deoxiuridina a células cancerosas da mama (DeLarco *et al.*, 2001, *Can. Res.* 61:2857-2861, incorporado aqui por referência), a adição de 5-FU nas células do câncer bucal (Tamatani *et al.*, 2004, *Int. J. Can.*, 108:912:921, incorporado aqui por referência), a adição de doxorrubicina a células de câncer de pulmão de células pequenas (Shibakura *et al.*, 2003, *Int. J. Can.*, 103:380-386, incorporado aqui por referência) e a administração de dacarbazina a células de melanoma (Lev *et al.*, 2003, *Mol. Can. Ther.*, 2:753-763, incorporado aqui por referência), todos resultaram na expressão aumentada de CXCL8. Como tal, em certas modalidades a presente invenção fornece agentes para direcionar o IL-CXCR1, em combinação com agentes de quimioterapia (por exemplo aqueles mencionados nas referências acima) para o tratamento de um indivíduo com um tipo de câncer, incluindo, mas não limitado a, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de mama, melanoma, câncer de pulmão de células não-pequenas, câncer de pulmão de células pequenas e adenocarcinoma de esôfago.

A presente invenção não se limita ao tipo de câncer tratado e, em vez disso, inclui, mas não está limitada a, fibrossarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma, condrossarcoma, sarcoma osteogênico, cordoma, angiossarcoma, endoteliossarcoma, linfangiossarcoma, limfangioendoteliossarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, carcinoma de cólon, câncer pancreático, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basais, adenocarcinoma, carcinoma de glândulas sudoríparas, carcinoma de glândulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de células renais, hepatoma, carcinoma do ducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionário, tumor de Wilms, câncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmão, carcinoma do pulmão de células pequenas, carcinoma da bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma do acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma e retinoblastoma.

II. Detecção de Marcadores de Câncer de célula-tronco de tumor sólido

Em algumas modalidades a presente invenção fornece métodos para detecção da expressão de marcadores de câncer de células-tronco (por exemplo, CXCR1, FBXO21, NFYA, NOTCH2, RAD51L1, TBP e outras proteínas da Tabela 1). Em algumas modalidades a expressão é medida diretamente (por exemplo, no nível de proteína ou RNA). Em algumas modalidades a expressão é detectada em amostras de tecido (por exemplo, tecido de biópsia). Em outras modalidades a expressão é detectada em fluidos corporais (por exemplo, incluindo, mas não limitado a, plasma, soro, sangue, muco e urina).

A presente invenção fornece ainda painéis e kits para a detecção de marcadores. Em algumas modalidades a presença de um marcador de câncer de células-tronco é usada para fornecer um prognóstico de um indivíduo. As informações fornecidas também são usa-

das para direcionar o curso do tratamento. Por exemplo, se um indivíduo tem um marcador indicativo de uma célula-tronco de tumor sólido (por exemplo, CXCR1, FBXO21, NFYA, NOTCH2, RAD51L1, TBP e outras proteínas da Tabela 1), terapias complementares (por exemplo, terapias de radiação) podem ser iniciadas em um momento anterior, quando são
 5 mais propensas a serem eficazes (por exemplo, antes da metástase). Além disso, se um indivíduo tem um tumor que não responde a uma determinada terapia, o custo e a inconveniência de tais terapias podem ser evitados.

Em algumas modalidades a presente invenção fornece um painel para a análise de uma pluralidade de marcadores (por exemplo, a combinação de CXCR1 ou FBXO21 e pelo
 10 menos um dentre CD44, CD24 e ESA). O painel permite a análise simultânea de múltiplos marcadores, correlacionando com a carcinogênese e/ou metástase. Dependendo do indivíduo, os painéis podem ser analisados isoladamente ou em combinação, a fim de proporcionar o melhor diagnóstico e prognóstico possíveis. Os marcadores para inclusão em um painel são selecionados por triagem quanto ao seu valor preditivo, usando qualquer método
 15 adequado, incluindo, mas não limitado aqueles descritos nos exemplos abaixo.

1. Detecção de RNA

Em algumas modalidades a detecção de marcadores de cancer de célula-tronco de tumor sólido é feita medindo-se a expressão de RNAm correspondente em uma amostra de tecido. A expressão de RNAm pode ser medida por qualquer método adequado, incluindo,
 20 mas não limitado aqueles divulgados abaixo. O número de acesso para o ácido nucleico humano CXCR1 é NM_000634 (incorporado aqui por referência) e o número de acesso para o FBXO21 humano é NM_033624 (incorporado aqui por referência). Essas sequências podem ser usadas para projetar *primers* e sondas (assim como sequências de siRNA).

Em algumas modalidades o RNA é detectado por análise *Northern blot*. A análise
 25 *Northern blot* envolve a separação do RNA e a hibridização de uma sonda marcada complementar.

Em outras modalidades o RNA (ou DNAc correspondente) é detectado por hibridização a uma sonda de oligonucleotídeos). Uma variedade de ensaios de hibridização utilizando diferentes tecnologias para hibridização e detecção está disponível. Por exemplo, em
 30 algumas modalidades, ensaio TaqMan (PE Biosystems, Foster City, CA; Ver, por exemplo, Patente N^{os} U.S. 5.962.233 e 5.538.848, cada umas das quais é incorporada aqui por referência) é utilizado. O ensaio é realizado durante uma reação de PCR. O ensaio TaqMan explora a atividade da 5'-3' exonuclease da polimerase do DNA AMPLITAQ GOLD. Uma sonda consistindo em um oligonucleotídeo com um corante 5'-repórter (por exemplo, um
 35 corante fluorescente) e um corante 3'-repressor está incluída na reação de PCR. Durante o PCR, se a sonda estiver ligada ao seu alvo, a atividade nucleolítica da 5'-3' polimerase AMPLITAQ GOLD cliva a sonda entre o repórter e o corante repressor. A separação do co-

rante repórter do corante repressor resulta em um aumento de fluorescência. O sinal se acumula a cada ciclo de PCR e pode ser monitorado com um fluorímetro.

Em outras modalidades PCR com transcriptase reversa (RT-PCR) é usado para detectar a expressão do RNA. No RT-PCR o RNA é enzimaticamente convertido em DNA complementar, ou "DNAc", utilizando uma enzima transcriptase reversa. O DNAc é então usado como um molde para uma reação de PCR. Os produtos de PCR podem ser detectados por qualquer método adequado, incluindo, mas não limitados a eletroforese em gel e marcação com um corante específico de DNA ou hibridização a uma sonda marcada. Em algumas modalidades o método de PCR da transcriptase reversa quantitativa com misturas padronizadas de modelos competitivos descrito nas Patentes U.S. 5.639.606, 5.643.765 e 5.876.978 (cada umas das quais é incorporada aqui por referência) é utilizado.

2. Detecção de Proteína

Em outras modalidades uma expressão gênica de marcadores de câncer de células-tronco é detectada medindo-se a expressão da proteína ou polipeptídeo correspondente (por exemplo, CXCR1, FBXO21, NFYA, NOTCH2, RAD51L1, TBP e outras proteínas da Tabela 1). A expressão da proteína pode ser detectada por qualquer método adequado. Em algumas modalidades proteínas são detectadas por imuno-histoquímica. Em outras modalidades as proteínas são detectadas pela sua ligação a um anticorpo feito contra a proteína. O número de acessão para a proteína CXCR1 humana é NP_000625 (incorporado aqui por referência) e o número de acessão para FBXO21 humano é NP_296373 (incorporado aqui por referência). A geração de anticorpos é descrita abaixo.

A ligação ao anticorpo é detectada através de métodos conhecidos na técnica (por exemplo, radioimunoensaio, ELISA (ensaio imunoabsorvente de ligação de enzimas), imunoenaios tipo "sanduíche", ensaios imunorradiométricos, reações de precipitação em gel de difusão, ensaios de imunodifusão, imunoenaios *in situ* (utilizando marcadores de ouro coloidal, enzima, ou radioisótopos, por exemplo), *Western blots*, reações de precipitação, ensaios de aglutinação (por exemplo, ensaios de aglutinação em gel, ensaios de hemaglutinação, etc.), ensaios de fixação complementar, ensaios de imunofluorescência, ensaios de proteína A e ensaios de imunoeletroforese, etc.), etc.

Em uma modalidade a ligação ao anticorpo é detectada através da detecção de um marcador no anticorpo primário. Em outra modalidade o anticorpo primário é detectado através da detecção da ligação de um anticorpo secundário ou reagente ao anticorpo primário. Em outra modalidade o anticorpo secundário é marcado. Vários métodos são conhecidos na técnica para a detecção de ligação em um imunensaio e estão dentro do escopo da presente invenção.

Em algumas modalidades um ensaio de detecção automática é utilizado. Métodos para a automação de imunoenaios incluem aqueles descritos nas Patentes U.S. 5.885.530,

4.981.785, 6.159.750 e 5.358.691, cada uma das quais é incorporada aqui por referência. Em algumas modalidades a análise e a apresentação dos resultados também são automatizadas. Por exemplo, em algumas modalidades é utilizado um *software* que gera um prognóstico baseado na presença ou na ausência de uma série de proteínas correspondentes a marcadores do câncer.

Em outras modalidades o imunoensaio é o descrito nas Patentes U.S. 5.599.677 e 5.672.480; cada uma das quais é incorporada aqui por referência.

3. Tecnologia de Micro-matriz de DNAC

Micro-matrizes de DNAC são compostos de vários (normalmente milhares) DNACs diferentes marcados (geralmente usando um dispositivo de marcação robótico) em posições conhecidas sobre um suporte sólido, como uma lâmina de vidro de microscópico. Os DNACs são normalmente obtidos por amplificação por PCR de insertos da biblioteca plasmidial utilizando *primers* complementares à parte estrutural do vetor do plasmídeo ou ao próprio gene em si para genes em que a sequência é conhecida. Produtos de PCR adequados para a produção de micro-matrizes estão tipicamente entre 0,5 e 2,5 kB de comprimento. DNACs de comprimento total, etiqueta de sequência expressa (ESTs), ou DNACs aleatoriamente escolhidos a partir de qualquer biblioteca de interesse podem ser escolhidos. ESTs são DNAs parcialmente sequenciados, como descrito, por exemplo, em Hillier, *et al.*, 1996, 6:807-828. Embora algumas ESTs correspondam a genes conhecidos, por vezes muito pouca ou nenhuma informação sobre qualquer EST em particular está disponível, exceto por uma pequena quantidade de sequência 3' e/ou 5' e, possivelmente, o tecido de origem do RNAm do qual a EST foi derivada. Como será apreciado por aqueles versados na técnica, em geral os DNACs contêm informações de sequência suficientes para identificar exclusivamente um gene no genoma humano. Além disso, em geral os DNACs são de comprimento suficiente para se hibridizar, seletivamente, especificamente ou exclusivamente, a um DNAC obtido a partir do RNAm derivado de um único gene sob as condições de hibridização do experimento.

Em um experimento de micro-matriz típico, um micro-matriz é hibridizado com populações de RNA, DNA ou DNAC diferencialmente marcadas, provenientes de duas amostras diferentes. Mais comumente, o RNA (RNA total ou RNA poli A+) é isolado de células ou tecidos de interesse e é transcrito de forma reversa para produzir o DNAC. A marcação é geralmente realizada durante a transcrição reversa, incorporando um nucleotídeo marcado na mistura da reação. Apesar de vários marcadores poderem ser usados, mais comumente o nucleotídeo é conjugado com corantes fluorescentes Cy3 ou Cy5. Por exemplo, Cy5-dUTP e Cy3-dUTP podem ser usados. DNAC derivado de uma amostra (representando, por exemplo, um tipo específico de célula, tipo de tecido ou condição de crescimento) é marcado com um fluoróforo enquanto o DNAC derivado de uma segunda amostra (representando, por e-

xemplo, um tipo de célula diferente, tipo de tecido, ou condição de crescimento) é marcado com o segundo fluoróforo. Quantidades similares de material marcado das duas amostras são co-hibridizadas ao micro-matriz. No caso de um experimento de micro-matriz em que as amostras são marcadas com Cy5 (que emite fluorescência vermelha) e Cy3 (que emite fluorescência verde), os dados primários (obtidos por imageamento do micro-matriz usando um detector capaz de detectar quantitativamente a intensidade da fluorescência) são razões de intensidade de fluorescência (vermelho/verde, R/G). Essas razões representam as concentrações relativas de moléculas de DNAc que se hibridizaram aos DNAs representados no micro-matriz e, portanto, refletem os níveis de expressão relativa do RNAm correspondente a cada DNAc/gene representado no micro-matriz.

Cada experimento de micro-matriz pode fornecer dezenas de milhares de pontos de dados, cada um representando a expressão relativa de um gene em particular nas duas amostras. A organização e a análise adequadas dos dados são de fundamental importância, e vários programas de computador que incorporam ferramentas estatísticas padrão foram desenvolvidos para facilitar a análise dos dados. Uma base para organizar os dados de expressão gênica e para agrupar os genes com padrões de expressão similar em *clusters*. Um método para a realização da análise de agrupamento hierárquico e visualização de dados provenientes dos experimentos de micro-matriz é descrito em Eisen *et al.* 1998, PNAS 95:14863-14868. Conforme descrito nele, o agrupamento pode ser combinado com uma representação gráfica dos dados primários, em que cada ponto de dados é representado com uma cor que representa quantitativamente e qualitativamente esse ponto de dados. Ao converter os dados de uma grande tabela de números em um formato visual, este processo facilita uma análise intuitiva dos dados. Informações adicionais e detalhes sobre as ferramentas matemáticas e/ou a abordagem de agrupamento em si podem ser encontradas, por exemplo, em Sokal & Sneath, *Principles of numerical taxonomy*, xvi, 359, W. H. Freeman, San Francisco, 1963; Hartigan, *Clustering algorithms*, xiii, 351, Wiley, New York, 1975; Paull *et al.*, 1989, *J. Natl. Cancer Inst.* 81:1088-92; Weinstein *et al.* 1992, *Science* 258:447-51; van Osdol *et al.*, 1994, *J. Natl. Cancer Inst.* 86:1853-9; e Weinstein *et al.*, 1997, *Science*, 275:343-9.

Mais detalhes sobre os métodos experimentais usados na presente invenção encontram-se no exemplo abaixo. Informações complementares descrevendo métodos para fabricar e usar os micro-matrizes são encontradas na Pat. U.S. Nº 5.807.522, que é incorporada aqui por referência. Instruções para a construção de hardware de micro-matriz (por exemplo, *arrayers* e *scanners*) usando peças comercialmente disponíveis. Discussões adicionais da tecnologia de micro-matrizes e protocolos para o preparo de amostras e realização de experimentos de micromatriz são encontrados, por exemplo, em *DNA arrays for analysis of gene expression*, *Methods Enzymol*, 303:179-205, 1999; *Fluorescence-based expression*

monitoring using microarrays, Methods Enzymol, 306: 3-18, 1999; e M. Schena (ed.), *DNA Microarrays: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, UK, 1999.

4. Análise de Dados

Em algumas modalidades um programa de análise baseado em computador é usado para traduzir os dados brutos gerados pelo ensaio de detecção (por exemplo, a presença, ausência, ou quantidade de um determinado marcador ou marcadores) em dados de valor preditivo de um médico. O médico pode acessar os dados preditivos utilizando qualquer meio adequado. Assim, em algumas modalidades a presente invenção fornece para benefício do médico, que provavelmente não é treinado em genética e biologia molecular, este não precisa entender os dados brutos. Os dados são apresentados diretamente para o médico em sua forma mais útil. O médico então é capaz de utilizar imediatamente a informação, a fim de otimizar o atendimento ao indivíduo.

A presente invenção contempla qualquer método capaz de receber, processar e transmitir as informações para e a partir dos laboratórios que conduzem os ensaios, informações fornecidas, pessoal médico e indivíduos. Por exemplo, em algumas modalidades da presente invenção uma amostra (por exemplo, uma biópsia ou uma amostra de soro ou urina) é obtida de um indivíduo e enviada a um serviço de perfil (por exemplo, laboratório médico no centro médico, empresa de perfil genômico, etc.), localizado em qualquer parte do mundo (por exemplo, em um país diferente do país onde o indivíduo reside ou onde a informação é, em última análise, utilizada) para gerar dados brutos. Quando a amostra é constituída por um tecido ou outra amostra biológica, o indivíduo pode visitar um centro médico para que a amostra seja obtida e enviada para o centro de perfil, ou os indivíduos podem coletar a amostra por si mesmos e enviá-la diretamente a um centro de perfil. Quando a amostra é constituída por informação biológica previamente determinada, as informações podem ser enviadas diretamente para o serviço de perfil pelo indivíduo (por exemplo, um cartão de informação contendo as informações pode ser escaneado por um computador e os dados transmitidos para um computador do centro de perfis usando um sistema de comunicação eletrônica). Uma vez recebida pelo serviço de perfil, a amostra é processada e um perfil é produzido (por exemplo, dados de expressão), específico para as informações de diagnóstico ou prognóstico desejáveis para o indivíduo.

Os dados de perfil são então preparados em um formato adequado para interpretação por um médico. Por exemplo, em vez de fornecer dados de expressão brutos (por exemplo, examinar um número de marcadores), o formato elaborado pode representar um diagnóstico ou avaliação de risco para o indivíduo, juntamente com recomendações para opções de tratamento específico. Os dados podem ser exibidos ao médico por qualquer método adequado. Por exemplo, em algumas modalidades o serviço de perfil gera um relatório que pode ser impresso para o médico (por exemplo, no ponto de atendimento) ou exibido

para o médico em um monitor de computador.

Em algumas modalidades as informações são primeiro analisadas no ponto de atendimento ou em uma instalação regional. Os dados brutos são então enviados a uma unidade central de processamento para posterior análise e/ou para converter os dados brutos em informações úteis para um médico ou paciente. A unidade de processamento central oferece a vantagem da privacidade (todos os dados são armazenados em um local central, com protocolos de segurança uniforme), velocidade e uniformidade de análise de dados. A unidade central de processamento pode então controlar o destino dos dados após o tratamento do indivíduo. Por exemplo, usando um sistema de comunicação eletrônica, a unidade central pode fornecer dados para o médico, o indivíduo, ou aos pesquisadores.

Em algumas modalidades o indivíduo é capaz de acessar diretamente os dados usando o sistema de comunicação eletrônica. O indivíduo pode escolher uma nova intervenção ou aconselhamento com base nos resultados. Em algumas modalidades os dados são utilizados para fins de pesquisa. Por exemplo, os dados podem ser usados para promover a inclusão a eliminação de marcadores como indicadores úteis de uma determinada condição ou estágio da doença.

5. Kits

Em outras modalidades a presente invenção fornece kits para a detecção e caracterização do câncer (por exemplo, para detectar um ou mais dos marcadores, ou para modular a atividade de um peptídeo expresso por um ou mais dos marcadores). Em algumas modalidades os kits contêm anticorpos específicos para um marcador do câncer, além de reagentes de detecção e tampões. Em outras modalidades os kits contêm reagentes específicos para a detecção de RNAm ou DNAm (por exemplo, sondas de oligonucleotídeos ou *primers*). Em algumas modalidades os kits contêm todos os componentes necessários e/ou suficientes para realizar um ensaio de detecção, incluindo todos os controles, indicações para ensaios de desempenho e qualquer software necessário para a análise e apresentação dos resultados.

Outra modalidade da presente invenção compreende um kit para testar a presença do polinucleotídeos ou proteínas. O kit pode incluir, por exemplo, um anticorpo para a detecção de um polipeptídeo ou uma sonda para a detecção de um polinucleotídeo. Além disso, o kit pode incluir uma referência ou amostra de controle; instruções para tratamento das amostras, realização do teste e interpretação dos resultados; e tampões e outros reagentes necessários para a realização do teste. Em outras modalidades o kit compreende pares de *primers* para detectar a expressão de um ou mais dos genes da assinatura genética da célula-tronco de tumor sólido. Em outras modalidades o kit é composto por um DNAm ou uma matriz de oligonucleotídeos para detecção da expressão de um ou mais dos genes da assinatura genética da célula-tronco de tumor sólido.

6. Imageamento *in vivo*

Em algumas modalidades técnicas de imageamento *in vivo* são utilizadas para visualizar a expressão de marcadores do câncer em um animal (por exemplo, um mamífero humano ou não-humano). Por exemplo, em algumas modalidades o RNAm do marcador do câncer (por exemplo, RNAm de CXCR1 ou FBXO21) ou proteína (por exemplo, proteína de CXCR1 ou FBXO21) é marcado usando um anticorpo marcado específico para o marcador do câncer. Um anticorpo especificamente ligado e marcado pode ser detectado em um indivíduo usando-se um método de imageamento *in vivo*, incluindo, mas não limitado a cintilografia, tomografia de emissão de pósitrons, tomografia axial computadorizada, método de ressonância magnética ou raios-X, detecção por fluorescência e detecção quimiluminescente. Métodos para gerar anticorpos para os marcadores de câncer da presente invenção são descritos abaixo.

Os métodos de imageamento *in vivo* da presente invenção são úteis no diagnóstico de cânceres que expressam os marcadores de câncer da célula-tronco de tumor sólido da presente invenção. O imageamento *in vivo* é usado para visualizar a presença de um marcador indicativo de câncer. Tais técnicas permitem o diagnóstico sem o desagradável uso de uma biópsia. Os métodos de imageamento *in vivo* da presente invenção também são úteis para fornecer prognósticos para pacientes com câncer. Por exemplo, a presença de um marcador indicativo de células-tronco cancerosas pode ser detectada. Os métodos de imageamento *in vivo* da presente invenção também podem ser usados para detectar cânceres metastáticos em outras partes do corpo.

Em algumas modalidades, reagentes (por exemplo, anticorpos) específicos para CXCR1 ou FBXO21 são marcados com fluorescência. Os anticorpos marcados são introduzidos em um indivíduo (por exemplo, por via oral ou parenteral). Os anticorpos marcados com fluorescência são detectados através de qualquer método adequado (por exemplo, usando o aparelho descrito na Patente U.S. 6.198.107, incorporada aqui por referência).

Em outras modalidades os anticorpos são marcados radioativamente. O uso de anticorpos para o diagnóstico *in vivo* é bem conhecido na técnica. Sumerdon *et al.*, (*Nucl. Med. Biol* 17:247-254 [1990]) descreveram e otimizaram um anticorpo-quelante para o imageamento radioimunocintilográfico de tumores usando índio-111 como marcador. Griffin *et al.*, (*J Clin Onc* 9:631-640 [1991]) descreveram o uso deste agente na detecção de tumores em pacientes com suspeita de câncer no pâncreas. O uso de agentes similares com os íons paramagnéticos como marcadores para a ressonância magnética é conhecido na técnica (Lauffer, *Magnetic Resonance in Medicine* 22:339-342 [1991]). O marcador utilizado vai depender da modalidade de imagem escolhida. Marcadores radioativos, como índio-111, tecnécio-99m, ou iodo-131 podem ser usados para varreduras planas ou tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT). Marcadores que emitem pósitrons, como o

flúor-19, também podem ser usados para tomografia por emissão de pósitrons (PET). Para a ressonância magnética, íons paramagnéticos, como gadolínio (III) ou manganês (II) podem ser usados.

5 Metais radioativos com meias-vidas que variam de 1 hora a 3,5 dias estão disponíveis para conjugação em anticorpos, como o escândio-47 (3,5 dias), gálio-67 (2,8 dias), gálio-68 (68 minutos), tecnécio-99m (6 horas) e índio-111 (3,2 dias), dos quais gálio-67, tecnécio-99m e índio-111 são preferíveis para imageamento por câmera gama, gálio-68 é preferível para tomografia por emissão de pósitrons.

10 Um método útil para marcar anticorpos com estes radiometais é por meio de um agente quelante bifuncional, como o ácido dietilenopentacético (DTPA), conforme descrito, por exemplo, por Khaw *et al.* (*Science* 209:295 [1980]) para In-111 e Tc-99m, e por Scheinberg *et al.* (*Science* 215:1511 [1982]). Outros agentes quelantes também podem ser usados, mas o 1-(p-carboximetoxibenzil)EDTA e o anidrido carboxicarbônico de DTPA são vantajosos, porque seu uso permite a conjugação sem afetar substancialmente a imunorreatividade
15 do anticorpo.

Outro método para o acoplamento de DTPA às proteínas é pelo uso do anidrido cíclico de DTPA, como descrito por Hnatowich *et al.* (*Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 33:327 [1982]) para marcação de albumina com In-111, mas que pode ser adaptado para a marcação de anticorpos. Um método adequado de marcação de anticorpos com Tc-99m que não usa
20 quelação com DTPA é o método de estanhagem Crockford *et al.*, (Pat. N° U.S. 4.323.546, incorporada aqui por referência).

Um método de marcação de imunoglobulinas com Tc-99m é o descrito por Wong *et al.* (*Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 29:251 [1978]) para proteínas do plasma e recentemente aplicado com sucesso por Wong *et al.* (*J. Nucl. Med.*, 23:229 [1981]) para marcar anticorpos.

25 No caso do radiometais conjugados em um anticorpo específico também é desejável introduzir uma proporção tão elevada do radiomarcador quanto possível na molécula do anticorpo sem destruir a sua imunoespecificidade. Uma melhoria pode ser obtida efetuando radiomarcação na presença do marcador específico do câncer da célula-tronco da presente invenção para garantir que o sítio de ligação ao antígeno no anticorpo seja protegido.

30 Em outras modalidades o imageamento *in vivo* biofotônico (Xenogen, Alameda, CA) é utilizado para imageamento *in vivo*. Este imageamento *in vivo* em tempo real utiliza luciferase. O gene da luciferase é incorporado nas células, microorganismos e animais (por exemplo, como uma proteína de fusão com um marcador do câncer da presente invenção). Quando ativa, ela leva a uma reação que emite luz. Uma câmera CCD e um software são
35 usados para capturar a imagem e analisá-la.

III. Anticorpos e Fragmentos de Anticorpos

A presente invenção fornece anticorpos e fragmentos de anticorpos isolados contra

CXCR1, FBXO21, NFYA, NOTCH2, RAD51L1, TBP e outras proteínas da Tabela 1. O anticorpo ou fragmento de anticorpo pode ser qualquer anticorpo monoclonal ou policlonal que reconheça especificamente estas proteínas. Em algumas modalidades a presente invenção fornece anticorpos monoclonais, ou fragmentos dos mesmos, que se ligam especificamente a CXCR1, FBXO21, NFYA, NOTCH2, RAD51L1, TBP e outras proteínas da Tabela 1. Em algumas modalidades os anticorpos monoclonais, ou fragmentos dos mesmos, são anticorpos quiméricos ou humanizados que se ligam especificamente a essas proteínas. Em outras modalidades os anticorpos monoclonais, ou fragmentos dos mesmos, são anticorpos humanos que se ligam especificamente a estas proteínas.

Os anticorpos contra CXCR1, FBXO21, NFYA, NOTCH2, RAD51L1, TBP e outras proteínas da Tabela 1 encontram uso nos métodos experimentais de diagnóstico e terapêuticos aqui descritos. Em certas modalidades os anticorpos da presente invenção são usados para detectar a expressão de uma proteína marcadora da célula-tronco cancerosa em amostras biológicas, como, por exemplo, a biópsia do tecido de um paciente, efusão pleural, ou amostra de sangue. As biópsias de tecido podem ser seccionadas e a proteína detectada usando, por exemplo, imunofluorescência ou imuno-histoquímica. Alternativamente, as células individuais de uma amostra são isoladas e a expressão de proteína detectada em células fixas ou vivas por análise FACS. Além disso, os anticorpos podem ser usados em matrizes de proteína para detectar a expressão de um marcador da célula-tronco cancerosa, por exemplo, nas células tumorais, em lisados celulares, ou em amostras de outras proteínas. Em outras modalidades os anticorpos da presente invenção são usados para inibir o crescimento de células tumorais pondo os anticorpos em contato com células tumorais, tanto em ensaios baseados em células *in vitro* quanto em modelos animais *in vivo*. Em outras modalidades os anticorpos são usados para tratar o câncer em um paciente humano através da administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo contra um marcador da célula-tronco cancerosa (por exemplo, da Tabela 1).

Anticorpos policlonais podem ser preparados por qualquer método conhecido. Anticorpos policlonais podem ser conseguidos por meio da imunização de um animal (por exemplo, coelho, rato, camundongo, burro, etc.) por múltiplas injeções por via subcutânea ou intraperitoneal do antígeno relevante (um fragmento de peptídeo purificado, proteína recombinante de comprimento total, proteína de fusão, etc.) opcionalmente conjugado com hemocianina de lapa californiana (KLH), albumina sérica, etc. diluídos em solução salina estéril e combinadas com um adjuvante (por exemplo, Adjuvante de Freund completo ou incompleto) para formar uma emulsão estável. O anticorpo policlonal é então recuperado do sangue, ascites e semelhantes, de um animal então imunizado. O sangue coletado é coagulado e o soro decantado, clarificado por centrifugação e analisado para a titulação de anticorpos. Os anticorpos policlonais podem ser purificados a partir do soro ou ascite, de acordo com méto-

dos padrão na técnica, incluindo cromatografia por afinidade, cromatografia por troca iônica, eletroforese em gel, diálise, etc.

Os anticorpos monoclonais podem ser preparados através de métodos de hibridoma, como os descritos por Kohler e Milstein (1975) *Nature* 256:495. Utilizando o método de hibridoma, um camundongo, hamster, ou outro animal hospedeiro apropriado, é imunizado conforme descrito acima para induzir a produção pelos linfócitos de anticorpos que se ligam especificamente a um antígeno imunizante. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Após a imunização os linfócitos são isolados e fundidos com uma linhagem celular de mieloma adequada, utilizando, por exemplo, polietileno glicol, para formar células de hibridoma que podem depois ser selecionadas a partir de linfócitos não fundidos e células de mieloma. Hibridomas que produzem os anticorpos monoclonais especificamente direcionados contra um antígeno escolhido, como determinado por imunoprecipitação, *immunoblotting*, ou por um ensaio de ligação *in vitro*, como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente de ligação de enzimas (ELISA) podem ser reproduzidos tanto em cultura *in vitro*, usando métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986) quanto *in vivo*, como tumores de ascites em um animal. Os anticorpos monoclonais podem ser então purificados a partir do meio de cultura ou do fluido ascítico, conforme descrito acima para os anticorpos policlonais.

Alternativamente, os anticorpos monoclonais também podem ser feitos através de métodos de DNA recombinante, tal como descrito na Patente U.S. 4.816.567. Os polinucleotídeos que codificam um anticorpo monoclonal são isolados, como de células B maduras ou células de hibridoma, como por RT-PCR usando primers de oligonucleotídeo que amplificam especificamente os genes que codificam as cadeias leve e pesada do anticorpo, e sua sequência é determinada utilizando procedimentos convencionais. Os polinucleotídeos isolados que codificam das cadeias pesada e leve são depois clonados em vetores de expressão adequados, que, quando transfectados em células hospedeiras, como células de *E. coli*, células COS de símios, células do ovário de hamster chinês (CHO), ou células de mieloma que não produzem proteína da imunoglobulina, anticorpos monoclonais são gerados pelas células do hospedeiro. Além disso, os anticorpos monoclonais recombinantes, ou fragmentos dos mesmos, da espécie desejada podem ser isolados das bibliotecas de exibição de fagos, conforme descrito (McCafferty *et al.*, 1990, *Nature*, 348:552-554; Clackson *et al.*, 1991, *Nature*, 352:624-628; e Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597).

O(s) polinucleotídeo(s) que codificam um anticorpo monoclonal podem ser modificados adicionalmente em uma série de maneiras diferentes, usando tecnologia de DNA recombinante para gerar anticorpos alternativos. Em uma modalidade os domínios constantes das cadeias leve e pesada de, por exemplo, um anticorpo monoclonal de camundongo, podem ser substituídos 1) para as regiões de, por exemplo, um anticorpo humano para gerar

um anticorpo quimérico ou 2) para um polipeptídeo não-imunoglobulínico para gerar um anticorpo de fusão. Em outras modalidades as regiões constantes são truncadas ou removidas para gerar os fragmentos de anticorpos desejados de um anticorpo monoclonal. Além disso, a mutagênese sítio-dirigida ou de alta densidade da região variável pode ser usada para
5 otimizar a especificidade, afinidade, etc. de um anticorpo monoclonal.

Em algumas modalidades da presente invenção o anticorpo monoclonal contra um marcador da célula-tronco cancerosa é um anticorpo humanizado. Os anticorpos humanizados são anticorpos que contêm sequências mínimas de anticorpos não-humanos (por exemplo, murinos) dentro das regiões variáveis. Tais anticorpos são usados terapeuticamente
10 para reduzir a antigenicidade e as respostas a HAMA (anticorpos humanos anti-camundongo) quando administrados a um ser humano. Na prática, anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos com um mínimo de ou nenhuma sequência não-humana. Um anticorpo humano é um anticorpo produzido por um humano ou um anticorpo com uma sequência de aminoácidos correspondente a um anticorpo produzido por um ser
15 humano.

Anticorpos humanizados podem ser produzidos usando vários métodos conhecidos na técnica. Um anticorpo pode ser humanizado substituindo-se a CDR de um anticorpo humano pela de um anticorpo não-humano (por exemplo, camundongo, rato, coelho, hamster, etc.) com a especificidade, afinidade e capacidade desejadas (Jones *et al.*, 1986, *Nature*,
20 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science*, 239:1534-1536). O anticorpo humanizado pode ser modificado pela substituição do resíduo suplementar, na região da estrutura Fv e/ou dentro dos resíduos não-humanos substituídos para aperfeiçoar e otimizar a especificidade, afinidade e/ou capacidade do anticorpo.

Os anticorpos humanos podem ser diretamente preparados utilizando vários métodos conhecidos na técnica. Linfócitos B humanos imortalizados imunizados *in vitro* ou isolados de um indivíduo imunizado que produzem um anticorpo direcionado contra um antígeno-alvo podem ser gerados (Ver, por exemplo, Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer *et al.*, 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; e Patente U.S. 5.750.373). Além disso, os anticorpos humanos podem ser selecionados a partir
30 de uma biblioteca de fagos, onde esta biblioteca de fagos expressa anticorpos humanos (Vaughan *et al.*, 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets *et al.*, 1998, PNAS, 95:6157-6162; Hoogenboom e Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Os anticorpos humanizados também podem ser feitos em camundongos transgênicos contendo loci de imunoglobulina humana que são capazes, em imunização,
35 de produzir o repertório completo de anticorpos humanos na ausência da produção de imunoglobulina endógena. Esta abordagem está descrita nas Patentes U.S. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; e 5.661.016.

Esta invenção também engloba anticorpos biespecíficos que reconhecem especificamente os marcadores da célula-tronco cancerosa. Anticorpos biespecíficos são anticorpos que são capazes de reconhecer especificamente e ligar pelo menos dois epítomos diferentes.

5 Anticorpos biespecíficos podem ser anticorpos intactos ou fragmentos de anticorpos. Os métodos de produção de anticorpos biespecíficos são comuns na técnica (Millstein *et al.*, 1983, *Nature* 305:537-539; Brennan *et al.*, 1985, *Science* 229:81; Suresh *et al.*, 1986, *Methods in Enzymol.* 121:120; Traunecker *et al.*, 1991, *EMBO J.* 10:3655-3659; Shalaby *et al.*, 1992, *J. Exp. Med.* 175:217-225; Kostelny *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553; Gruber *et al.*, 1994, *J. Immunol.* 152:5368; e Patente U.S. 5.731.168).

10 Em certas modalidades da invenção pode ser desejável a utilização de fragmentos de anticorpos ao invés de um anticorpo intacto, para aumentar a penetração do tumor, por exemplo. Várias técnicas são conhecidas para a produção de fragmentos de anticorpos. Tradicionalmente, esses fragmentos são obtidos através da digestão proteolítica de anticorpos intactos (por exemplo, Morimoto *et al.*, 1993, *Journal of Biochemical and Biofísica Methods* 24:107-117 e Brennan *et al.*, 1985, *Science*, 229:81). No entanto, esses fragmentos são agora normalmente produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes, tal como descrito acima. Assim, fragmentos de anticorpos Fab, Fv e scFv podem todos ser expressos e secretados de *E. coli* ou outras células do hospedeiro, permitindo assim a produção de grandes quantidades desses fragmentos. Alternativamente, estes fragmentos de anticorpos podem ser isolados das bibliotecas de fagos de anticorpo discutidas acima. O fragmento de anticorpo anticorpos também podem ser anticorpos lineares, como descrito na Patente U.S. 5.641.870, por exemplo, e podem ser monoespecíficos ou biespecíficos. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos ficará aparente para aquele versado na técnica.

25 Pode ainda ser desejável, especialmente no caso de fragmentos de anticorpos, modificar um anticorpo a fim de aumentar a sua meia-vida sérica. Isto pode ser conseguido, por exemplo, pela incorporação de um epítomo de ligação do receptor de salvamento nos fragmentos de anticorpos por mutação na região apropriada no fragmento de anticorpo, ou incorporando o epítomo em uma etiqueta de peptídeo que é então fundida ao fragmento de anticorpo em cada extremidade ou no meio (por exemplo, por síntese de DNA ou peptídeo).

30 A presente invenção ainda abrange variantes e equivalentes que são substancialmente homólogas aos anticorpos quiméricos, humanizados e humanos, ou fragmentos de anticorpos dos mesmos, aqui estabelecidos. Estes podem conter, por exemplo, mutações de substituição conservadora, ou seja, a substituição de um ou mais aminoácidos por aminoácidos similares. Por exemplo, a substituição conservadora se refere à substituição de um aminoácido por outro na mesma classe geral, como, por exemplo, um aminoácido por outro

aminoácido, um aminoácido básico por outro aminoácido básico, ou um aminoácido neutro por outro aminoácido neutro. O que se pretende pela substituição conservadora do aminoácido é bem conhecido na técnica.

A invenção também se refere a imunokonjugados que compreendem um anticorpo conjugado em um agente citotóxico. Agentes citotóxicos incluem agentes quimioterápicos, agentes inibidores do crescimento, toxinas (por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, de plantas, ou animal, ou fragmentos da mesma), isótopos radioativos (ou seja, um radioconjugado), etc. Agentes quimioterapêuticos úteis na geração de imunokonjugados incluem, por exemplo, metotrexato, adriamicina, doxorubicina, melfalano, mitomicina C, clorambucil, daunorrubicina ou outros agentes intercalantes. Toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos das mesmas que podem ser usados incluem a cadeia de difteria A, fragmentos ativos não-ligantes da toxina difteria, cadeia da exotoxina A, cadeia da ricina A, cadeia da abrina A, cadeia da modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Fitolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor da momordica carantia, curcina, crotina, inibidor da sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e tricotecenos. Uma variedade de radionuclídeos estão disponíveis para a produção de anticorpos radioconjugados, incluindo ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y e ^{186}Re . Conjugados do anticorpo e agente citotóxico são feitos usando uma variedade de agentes de ligação da proteína bifuncional, tais como N-succinimidil-3-(2-piridiliditiol)propionato (SPDP) iminotiolano (TI), derivados bifuncionais de imidoésteres (tal como dimetil adipimidato HCL), ésteres ativos (como suberato de disuccinimidil), aldeídos (como glutareldeído), compostos bis-azido (como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (como bis(p-diazoniombenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (como tolieno 2,6-diisocianato) e compostos de flúor bis-ativos (como 1,5-diflúor-2,4-dinitrobenzeno). Conjugados de um anticorpo e uma ou mais toxinas de molécula pequena, como caliqueamicina, maitansinoides, tricoteno e CC1065, e os derivados destas toxinas que têm atividade de toxina, também podem ser usados.

Em algumas modalidades o anticorpo da invenção contém regiões Fc humanas que são modificadas para aumentar a função efetora, por exemplo, citotoxicidade antígeno-dependente mediada por células (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Isto pode ser conseguido através da introdução de uma ou mais substituições de aminoácidos em uma região Fc do anticorpo. Por exemplo, resíduo(s) de cisteína podem ser introduzidos na região Fc para permitir a formação da ligação dissulfeto inter-cadeia nesta região para melhorar a morte celular mediada por complemento e a citotoxicidade antígeno-dependente mediada por células (ADCC) (Caron *et al.*, 1992, *J. Exp Med.* 176:1191-1195; Shopes, 1992, *Immunol.* 148:2918-2922). Anticorpos homodiméricos com atividade antitumoral reforçada também podem ser preparados usando ligantes cruzados heterobifuncio-

nais, conforme descrito em Wolff *et al.*, 1993, *Cancer Research* 53:2560-2565. Como alternativa, pode ser projetado um anticorpo que tem regiões Fc duplas (Stevenson *et al.*, 1989, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230).

IV. Triagem de Fármacos

Em algumas modalidades a presente invenção fornece ensaios de triagem de fármacos (por exemplo, para selecionar fármacos anti-câncer). Os métodos de triagem da presente invenção utilizam marcadores do câncer da célula-tronco (por exemplo, CXCR1, FBXO21, NFYA, NOTCH2, RAD51L1, TBP e outras proteínas da Tabela 1) identificados usando os métodos da presente invenção. Por exemplo, em algumas modalidades a presente invenção fornece métodos de triagem para compostos que alteram (por exemplo, aumentam ou reduzem) a expressão, ou a atividade de CXCR1 ou FBXO21. Em algumas modalidades compostos candidatos são agentes antisense ou agentes siRNA (por exemplo, oligonucleotídeos) direcionados contra marcadores do câncer. Em outras modalidades compostos candidatos são anticorpos que se ligam especificamente a um marcador de câncer das células-tronco da presente invenção. Em certas modalidades, bibliotecas de compostos de moléculas pequenas são selecionadas usando os métodos descritos aqui.

Em um método de triagem os compostos candidatos são avaliados pela sua capacidade de alterar a expressão dos marcadores de células-tronco cancerosas pelo contato do composto com uma célula que expressa um marcador de câncer de células-tronco e, em seguida, avaliando o efeito dos compostos candidatos na expressão. Em algumas modalidades o efeito dos compostos candidatos na expressão de um gene do marcador do câncer é analisado através da detecção do nível do RNAm do marcador de câncer expresso pela célula. A expressão de RNAm pode ser detectada por qualquer método adequado. Em outras modalidades o efeito dos compostos candidatos na expressão de genes dos marcadores de câncer é analisado através da medição do nível de polipeptídeos codificados pelos marcadores de câncer. O nível de polipeptídeos expressos podem ser medidos utilizando qualquer método adequado, incluindo, mas não limitado aqueles divulgados aqui. Em algumas modalidades outras alterações na biologia celular (apoptose, por exemplo) são detectadas.

Especificamente, a presente invenção fornece métodos de triagem para identificação de moduladores, ou seja, compostos candidatos de ensaio ou agentes (por exemplo, proteínas, peptídeos, peptidomiméticos, peptídeos, pequenas moléculas ou outros fármacos) que se ligam a, ou alteram a sinalização ou função associada a marcadores de câncer da presente invenção, têm um efeito inibitório (ou estimulante) em, por exemplo, expressão do marcador células-tronco cancerosas ou atividade dos marcadores de câncer, ou têm um efeito estimulador ou inibidor, por exemplo, a expressão ou a atividade de um substrato do marcador do câncer. Os compostos assim identificados podem ser usados para modular a

atividade dos produtos do gene-alvo (por exemplo, genes de marcadores de células-tronco cancerosas, como CXCR1 ou FBXO21), direta ou indiretamente em um protocolo terapêutico para elaborar a função biológica do produto do gene-alvo, ou para identificar compostos que rompem as interações normais do gene-alvo. Compostos que inibem a atividade ou expressão de marcadores de câncer são úteis no tratamento de distúrbios proliferativos, por exemplo, câncer, particularmente metastático, ou eliminação ou controle de células-tronco tumorais para prevenir ou reduzir o risco de câncer.

Em uma modalidade a invenção fornece ensaios para a triagem de compostos de ensaio ou candidatos que são substratos de uma proteína ou polipeptídeo marcadores de câncer ou uma porção biologicamente ativa da mesma. Em outra modalidade a invenção fornece ensaios para a triagem de compostos de ensaio ou candidatos que se ligam ou modulam a atividade de uma proteína ou polipeptídeo marcadores do câncer ou uma porção biologicamente ativa do mesmo.

Os compostos de ensaio da presente invenção podem ser obtidos utilizando qualquer uma das várias abordagens em métodos de biblioteca combinatória conhecidos na técnica, incluindo bibliotecas biológicas; bibliotecas de peptídeos (bibliotecas de moléculas com funcionalidades de peptídeos, mas com uma nova estrutura não-peptídica, que são resistentes à degradação enzimática, mas que, todavia, permanecem bioativos; ver, por exemplo, Zuckermann *et al.*, *J. Med. Chem.* 37: 2678-85 [1994]); bibliotecas fase de solução ou fase sólida paralelas espacialmente endereçáveis; métodos de biblioteca sintéticos que requerem deconvolução; método de biblioteca "uma microesfera um composto"; e métodos de biblioteca sintéticos que usam seleção de afinidade cromatográfica. As abordagens de biblioteca biológica e biblioteca peptídeo são preferidas para uso com bibliotecas de peptídeos, enquanto as outras quatro abordagens são aplicáveis aos oligômeros peptídicos não-peptídicos ou bibliotecas de moléculas pequenas de compostos (Lam (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145).

Exemplos de métodos para a síntese de bibliotecas moleculares podem ser encontrados na técnica, por exemplo, em DeWitt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA.* 90:6909 [1993]; Erb *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA.* 91:11422 [1994]; Zuckermann *et al.*, *J. Med. Chem.* 37:2678 [1994]; Cho *et al.*, *Science* 261:1303 [1993]; Carrell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059 [1994]; Carrell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061 [1994]; e Gallop *et al.*, *J. Med. Chem.* 37:1233 [1994].

Bibliotecas de compostos podem ser apresentadas em solução (por exemplo, Houghton, *Biotechniques* 13:412-421 [1992]), ou em microesferas (Lam, *Nature* 354:82-84 [1991]), chips (Fodor, *Nature* 364:555-556 [1993]), bactérias ou esporos (Patente N° U.S. 5.223.409; incorporada aqui por referência), plasmídeos (Cull *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869 [1992]) ou em fagos (Scott e Smith, *Science* 249:386-390 [1990]; Devlin

Science 249:404-406 [1990]; Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382 [1990]; Felici, *J. Mol. Biol.* 222:301 [1991]).

Em uma modalidade um ensaio é um ensaio baseado em células no qual uma célula que expressa uma proteína marcadora de células-tronco cancerosas ou porção biologicamente ativa dela é posta em contato com um composto de ensaio, e a capacidade do composto de ensaio para a atividade do marcador do câncer modulado é determinada. A determinação da capacidade do composto de ensaio para modular a atividade marcadora de células-tronco cancerosas pode ser realizada através do monitoramento, por exemplo, de mudanças na atividade enzimática. A célula, por exemplo, pode ser originária de mamíferos.

A capacidade do composto de ensaio de modular o marcador do câncer de ligação a um composto, por exemplo, um substrato do marcador de câncer de células-tronco, também pode ser avaliada. Isto pode ser conseguido, por exemplo, pelo acoplamento do complexo, por exemplo, o substrato, com um radioisótopo ou etiqueta enzimáticas de modo que a ligação do composto, por exemplo, o substrato, a um marcador do câncer possa ser determinada através da detecção do composto marcado, por exemplo, substrato, em um complexo.

Alternativamente, o marcador de câncer de células-tronco é acoplado com um radioisótopo ou etiqueta enzimática para monitorar a capacidade de um composto de ensaio de modular o marcador do câncer que se liga a um substrato de marcadores de câncer em um complexo. Por exemplo, os compostos (por exemplo, substratos) podem ser marcados com ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C ou ³H, direta ou indiretamente, e o radioisótopo detectado através da contagem direta de radioemissão ou por contagem de cintilação. Alternativamente, os compostos podem ser marcados enzimaticamente com, por exemplo, peroxidase, fosfatase alcalina, ou luciferase, e a etiqueta enzimática pode ser detectada por determinação de conversão de um substrato adequado ao produto.

A capacidade de um composto (por exemplo, um substrato marcador de câncer de células-tronco) de interagir com um marcador de câncer de células-tronco com ou sem a marcação de qualquer um dos interagentes pode ser avaliada. Por exemplo, um microfisiômetro pode ser usado para detectar a interação de um composto com um marcador de câncer sem a marcação do composto ou do marcador de câncer (McConnell *et al.* *Science* 257:1906-1912 [1992]). Conforme utilizado aqui, um "microfisiômetro" (por exemplo, Cito-sensor) é um instrumento analítico que mede a taxa na qual uma célula acidifica seu ambiente usando um sensor de luz endereçável potenciométrica (LAPS). As alterações nesta taxa de acidificação podem ser usadas como um indicador da interação entre um composto e os marcadores de câncer.

Em outra modalidade um ensaio livre de células é fornecido em que uma proteína marcadora de câncer ou porção biologicamente ativa dela é posta em contato com um com-

posto de ensaio e a capacidade do composto de ensaio de se ligar à proteína do marcador de células-tronco cancerígenas ou porção biologicamente da mesma será avaliada. Porções biologicamente ativas de proteínas de marcadores do câncer a serem usadas em ensaios da presente invenção incluem fragmentos que participam das interações com substratos ou outras proteínas, por exemplo, fragmentos com alta pontuação de probabilidade de superfície.

Ensaio livres de células envolvem a preparação de uma mistura de reação da proteína do gene-alvo e do composto de ensaio sob condições e por um tempo suficiente para que os dois componentes interajam e se liguem, formando assim um complexo que pode ser removido e/ou detectado.

A interação entre duas moléculas também pode ser detectada, por exemplo, utilizando transferência de energia de fluorescência (FRET) (ver, por exemplo, Lakowicz *et al.*, Patente N° U.S. 5.631.169; Stavrianopoulos *et al.*, Patente N° U.S. 4.968.103; cada uma das quais é incorporada aqui por referência). Um marcador fluoróforo é selecionado de modo que a energia fluorescente emitida pela molécula de um primeiro doador será absorvida por uma etiqueta fluorescente em uma segunda molécula do "receptor", que por sua vez é capaz de fluorescer devido à energia absorvida.

Alternativamente, a molécula da proteína do 'doador' pode simplesmente utilizar a energia fluorescente natural dos resíduos de triptofano. São escolhidos marcadores que emitem diferentes comprimentos de onda de luz, de tal forma que a etiqueta da molécula do "receptor" possa ser diferenciada da do "doador". Uma vez que a eficiência da transferência de energia entre as etiquetas está relacionada com a distância que separa as moléculas, as relações espaciais entre as moléculas podem ser avaliadas. Em uma situação em que a ligação ocorre entre as moléculas, a emissão fluorescente da etiqueta da molécula do "receptor" no ensaio deve ser máxima. Um evento de ligação FRET pode ser facilmente medido através da detecção fluorométrica padrão, bem conhecida na técnica (por exemplo, usando um fluorímetro).

Em outra modalidade a determinação da capacidade da proteína dos marcadores da célula-tronco cancerosa de se ligar a uma molécula-alvo pode ser realizada utilizando a Análise de Interação Biomolecular em tempo real (BIA) (ver, por exemplo, Sjolander e Urbaniczky, *Anal. Chem.* 63:2338-2345 [1991] e Szabo *et al. Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705 [1995]). "Ressonância de plásmon de superfície" ou "BIA" detecta interações bioespecíficas em tempo real, sem a marcação de nenhum dos interagentes (por exemplo, BIAcore). As alterações na massa na superfície de ligação (indicativas de um evento de ligação) resultam em alterações do índice de refração da luz perto da superfície (o fenômeno ótico de ressonância de plásmon de superfície (SPR)), resultando em um sinal detectável que pode ser usado como uma indicação de reações em tempo real entre as moléculas biológicas.

Em uma modalidade o produto do gene-alvo ou da substância de ensaio é ancorado em uma fase sólida. O produto do gene-alvo/composto de ensaio complexo ancorados na fase sólida pode ser detectado no final da reação. O produto do gene-alvo pode ser ancorado em uma superfície sólida e o composto de ensaio (que não está ancorado) pode ser marcado, quer direta quer indiretamente, com as etiquetas detectáveis aqui discutidas.

Pode ser desejável imobilizar os marcadores de células-tronco cancerosas, um anticorpo marcador anti-câncer, ou sua molécula-alvo para facilitar a separação de formas complexadas de formas não complexadas de uma ou de ambas as proteínas, bem como acomodar a automação do ensaio. A ligação de um composto de ensaio a uma proteína do marcador da célula-tronco cancerosa, ou interação de uma proteína do marcador de câncer com uma molécula-alvo na presença e na ausência de um composto candidato pode ser realizada em qualquer recipiente adequado para conter os reagentes. Exemplos destes recipientes incluem placas de microtitulação, tubos de ensaio e tubos de micro-centrífuga. Em uma modalidade uma proteína de fusão pode ser fornecida, o que acrescenta um domínio que permite que uma ou ambas as proteínas se liguem a uma matriz. Por exemplo, as proteínas de fusão do marcador de câncer da glutathione-S-transferase ou as proteínas de fusão da glutathione-S-transferase/alvo podem ser adsorvidos em microesferas de glutathione sefa-rose (Sigma Chemical, St. Louis, MO) ou placas de microtitulação de glutathione-derivada, que são então combinadas com o composto de ensaio ou o composto de ensaio e a proteína-alvo não-adsorvida ou a proteína marcador do câncer, e a mistura é incubada em condições propícias para a formação do complexo (por exemplo, em condições fisiológicas de sal e pH). Após a incubação, as microesferas ou poços de placas de microtitulação são lavadas para remover quaisquer componentes não ligados, a matriz é imobilizada, no caso das microesferas, o complexo determinado, direta ou indiretamente, por exemplo, como descrito acima.

Alternativamente, os complexos podem ser dissociados da matriz e o nível de ligação ou atividade dos marcadores de câncer determinado por técnicas convencionais. Outras técnicas para imobilizar proteínas de marcadores de câncer ou uma molécula-alvo em matrizes incluem o uso de uma conjugação de biotina e estreptavidina. Proteínas do marcador de câncer ou moléculas-alvo biotiniladas podem ser preparadas a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) utilizando métodos conhecidos na técnica (por exemplo, kit de biotinilação, Pierce Chemicals, Rockford, IL) e imobilizados em poços de placas revestidas com estreptavidina de 96 poços (Pierce Chemical).

A fim de realizar o ensaio, o componente não imobilizado é adicionado à superfície revestida que contém o componente ancorado. Após a reação estar completa, os componentes não reagidos são removidos (por exemplo, por lavagem) sob condições tais que quaisquer complexos formados permanecerão imobilizados na superfície sólida. A detecção

dos complexos ancorados na superfície sólida pode ser realizada de várias maneiras. Quando o componente anteriormente não imobilizado é pré-marcado, a detecção da etiqueta imobilizada na superfície indica que os complexos foram formados. Quando o componente anteriormente não imobilizado não é pré-marcado, uma etiqueta indireta pode ser usada para detectar complexos ancorados na superfície; por exemplo, usando um anticorpo marcado específico para o componente imobilizado (o anticorpo, por sua vez, pode ser diretamente ou indiretamente marcado com, por exemplo, um anticorpo marcado anti-IgG).

Este ensaio é realizado utilizando anticorpos reativos com a proteína do marcador de câncer de células-tronco ou moléculas-alvo, mas que não interferem na ligação da proteína de marcadores das célula-tronco cancerosas com sua molécula-alvo. Esses anticorpos podem ser derivados em poços da placa, e o alvo não ligado ou proteína dos marcadores de câncer presos nos poços pela conjugação de anticorpos. Métodos para a detecção de tais complexos, além dos descritos acima para os complexos GST-imobilizados, incluem imunodetecção de complexos utilizando anticorpos reativos com a proteína do marcador de câncer ou uma molécula-alvo, bem como ensaios de enzima ligada que se baseiam na detecção de uma atividade enzimática associada à proteína do marcador de câncer ou uma molécula-alvo.

Alternativamente, os ensaios livres de células podem ser realizados em uma fase líquida. Neste ensaio, os produtos da reação são separados de componentes que não reagiram, por qualquer uma dentre uma série de técnicas padrão, incluindo, mas não limitadas a: centrifugação diferencial (ver, por exemplo, Rivas e Minton, *Trends Biochem Sci* 18:284-7 [1993]); cromatografia (cromatografia por filtração em gel, cromatografia por troca iônica); eletroforese (ver, por exemplo, Ausubel *et al.*, eds. *Current Protocols in Molecular Biology* 1999, J. Wiley: New York.); e imunoprecipitação (ver, por exemplo, Ausubel *et al.*, eds. *Current Protocols in Molecular Biology* 1999, J. Wiley: New York). Tais resinas e técnicas cromatográficas são conhecidas daqueles versados na técnica (Ver, por exemplo, Heegaard *J. Mol. Recognit* 11:141-8 [1998]; Hageand Tweed *J. Chromatogr. Biomed. Sci.* App1 699:499-525 [1997]). Além disso, a transferência de energia de fluorescência também pode ser convenientemente utilizada, como descrito aqui, para detectar ligação sem purificação adicional do complexo a partir de solução.

O ensaio pode incluir por a proteína dos marcadores de células-tronco cancerosas ou porções biologicamente ativas das mesmas em contato com um composto conhecido que se liga ao marcador de câncer para formar uma mistura de ensaio, por a mistura de ensaio em contato com um composto de ensaio, e determinar a capacidade do composto de ensaio de interagir com uma proteína marcador do câncer, Que in determinar a capacidade do Composto de Ensaio para interagir com uma proteína do marcador de câncer inclui determinar a capacidade do composto de ensaio de se ligar preferencialmente a marcadores

de câncer ou uma porção biologicamente ativa dos mesmos, ou modular a atividade de uma molécula-alvo em comparação com os composto conhecido.

Na medida em que surgem os marcadores de células-tronco cancerosas podem, *in vivo*, interagir com um ou mais macromoléculas celulares ou extracelulares, tais como proteínas, os inibidores de tal interação são úteis. Um ensaio homogêneo pode ser usado para identificar os inibidores.

Por exemplo, um complexo pré-formado do produto do gene-alvo e do produto parceiro de ligação celular interativa ou extracelular é preparado de tal forma que os produtos de gene-alvo ou os seus parceiros de ligação são marcados, mas o sinal gerado pela etiqueta é extinto devido à formação do complexo (ver, por exemplo, Patente N° U.S. 4.109.496, incorporada aqui por referência, que utiliza essa abordagem para os imunoenaios). A adição de uma substância de ensaio que compete com e desloca uma das espécies do complexo pré-formado vai resultar na geração de um sinal acima do fundo. Desta forma, as substâncias de ensaio que destroem a interação do parceiro de ligação ao produto do gene-alvo podem ser identificadas. Alternativamente, proteínas de marcadores de câncer podem ser usadas como uma "proteína isca" em um ensaio duplo-híbrido, ou ensaio triplo-híbrido (ver, por exemplo, Patente N° U.S. 5,283,317; Zervos *et al.*, *Cell* 72:223-232 [1993]; Madura *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054 [1993]; Bartel *et al.*, *Biotechniques* 14:920-924 [1993]; Iwabuchi *et al.*, *Oncogene* 8:1693-1696 [1993]; e Brent W0 94/10300; cada uma das quais é incorporada aqui por referência), para identificar outras proteínas que se ligam ou interagem com marcadores de câncer ("proteínas de ligação ao marcador de câncer" ou pl-marcador de câncer") e estão envolvidas na atividade do marcador de câncer. Tais pl-marcador de câncer podem ser ativadoras ou inibidoras de sinais pelas proteínas do marcador de câncer ou alvos, como, por exemplo, elementos a jusante de uma via de sinalização mediada por marcadores de câncer.

Moduladores de expressão de marcadores de câncer também podem ser identificados. Por exemplo, uma mistura de células ou livre de células é posta em contato com um composto de candidato do RNAm do marcador de câncer ou proteína avaliada em relação ao nível de expressão do RNAm de proteína ou marcador de câncer de células-tronco na ausência do composto candidato. Quando a expressão do RNAm de proteína ou marcador de câncer é maior na presença do composto candidato do que na sua ausência, o composto candidato é identificado como um estimulador da expressão do RNAm da proteína ou marcador de câncer. Alternativamente, quando a expressão do RNAm da proteína ou marcador de câncer é menor (ou seja, significativamente menor, estatisticamente) na presença do composto candidato do que na sua ausência, o composto candidato é identificado como um inibidor do RNAm da proteína ou marcador de câncer. O nível da expressão do RNAm da proteína ou marcador de câncer pode ser determinado por métodos descritos aqui para a

detecção de RNAm da proteína ou marcador de câncer.

Esta invenção refere-se ainda a novos agentes identificados pelos testes de triagem descritos acima (Ver, por exemplo, a descrição abaixo de terapias contra o câncer). Assim, é do escopo desta invenção utilizar ainda um agente identificado conforme descrito aqui (por exemplo, um agente marcador do marcador de câncer, uma molécula de ácido nucleico do marcador de câncer antisense, uma molécula de siRNA, um anticorpo específico do marcador de câncer, ou um parceiro de ligação ao marcador de câncer) em um modelo animal apropriado (como aqueles descritos aqui) para determinar a eficácia, toxicidade, efeitos colaterais, ou mecanismo de ação do tratamento com um desses agentes. Além disso, novos agentes identificados pelos ensaios de triagem descritos acima podem ser, por exemplo, usados em tratamentos conforme descrito aqui (por exemplo, para tratar um paciente humano que tem câncer).

Em certas modalidades a presente invenção emprega mamoesferas não-aderentes para vários procedimentos de triagem, incluindo métodos de triagem de antagonistas da via de sinalização CXCR1 ou FBXO21. Mamoesferas não-aderentes são um sistema de cultura *in vitro* que permite a propagação de células-tronco epiteliais mamárias humanas primárias e células progenitoras em um estado indiferenciado, com base na sua capacidade de se proliferar em suspensão como estruturas esféricas. Mamoesferas não-aderentes foram descritas previamente em Dontu *et al Genes Dev.* 2003 May 15;17(10):1253-70, e Dontu *et al., Breast Cancer Res.* 2004;6(6):R605-15, ambos incorporados aqui por referência. Essas referências são incorporadas por referência em suas totalidades e especificamente para o ensino da construção e utilização de mamoesferas não-aderentes. Conforme descrito em Dontu *et al.*, as mamoesferas foram caracterizadas como sendo compostas por células-tronco e progenitoras capazes de auto-renovação e diferenciação de multi-linhagem. Dontu *et al.* também descreve que as mamoesferas contêm células capazes de gerar clonalmente estruturas ductal-alveolares funcionais complexas em sistemas de cultura 3-D reconstituídos em Matrigel.

Em certas modalidades, os seguintes métodos de seleção exemplares são empregados. Para estudos *in vitro*, poderia-se tratar células com construções adenovirais expressando controle ou siRNA candidato de CXCR1 ou FBXO21 (m.o.i. 10 a 100) por três dias ou um candidato de molécula pequena (por exemplo, o derivado PHA665752) (0,1-0,5 μ M) por 3 dias e comparar a capacidade de CXCR1+ ou FBXO21 + células para formar as esferas do tumor comparadas em células não tratadas contra tratadas. Para estudos *in vivo*, poderia-se infectar células humanas de câncer de mama com um lentivírus expressando luciferase para acompanhar o crescimento do tumor. Células cancerosas que expressam luciferase poderiam ser injetadas no tecido da mama e tumores de aproximadamente 0,5-0,7 cm de tamanho poderiam ser estabelecidos, com 5 animais por grupo. Animais com tu-

mores estabelecidos poderiam então ser tratados com um inibidor de FBXO21 ou CXCR1 candidato (diariamente i.v. 30mg/kg/dia por 7 dias), ou controle do veículo. Poderiam ser realizados estudos em paralelo usando infecção com adenovírus expressando controle ou siRNA de CXCR1 ou FBXO21 candidato (m.o.i. 100 ou 500 por 7 dias). Animais poderiam ser visualizados nos dias 7, 14, 21 e 28 para avaliar o tamanho do tumor e, em seguida, serem sacrificados. O tamanho do tumor poderia ser adicionalmente avaliado na autópsia e uma parte do tumor corado para avaliar a histologia do tumor. O restante do tumor poderia ser coletado e classificado para avaliar o percentual de células positivas para CXCR1 ou FBXO21 e negativas para CXCR1 ou FBXO21. Para verificar se a administração de infecção por adenovírus com inibidor candidato de CXCR1 ou FBXO21 e siRNA candidato de CXCR1 ou FBXO21 está inibindo a função de sinalização de CXCR1 ou FBXO21, fosforilação de mediadores a jusante, como Gab-1 e ERK poderia ser examinada (veja, Chistensen *et al.*, Cancer Res., 2003; 63:7345-7355, aqui incorporado como referência).

V.Terapias para Câncer

Em algumas modalidades, a presente invenção fornece terapias para o câncer. Em algumas modalidades, terapias se direcionam a marcadores de câncer (por exemplo, incluindo mas não limitando a, CXCR1 ou FBXO21 e proteínas na via de sinalização de CXCR1 ou FBXO21). Em algumas modalidades, qualquer terapia para células-tronco cancerosas conhecida ou posteriormente desenvolvida pode ser usada. Por exemplo, agentes terapêuticos para células-tronco cancerosas são descritos nas Pats. US 6.984.522 e 7.115.360 e pedidos WO03/050502, WO05/074633 e WO05/005601, aqui incorporados como referência em suas totalidades.

Terapia com Anticorpo

Em algumas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos que se direcionam aos tumores que expressam um marcador canceroso de células-tronco da presente invenção. Qualquer anticorpo adequado (por exemplo, monoclonal, policlonal, ou sintético) pode ser utilizado nos métodos terapêuticos aqui divulgados. Em algumas modalidades, os anticorpos utilizados para terapia de câncer são anticorpos humanizados. Métodos para a humanização de anticorpos são bem conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Patentes US 6.180.370, 5.585.089, 6.054.297 e 5.565.332; cada uma das quais é aqui incorporada como referência).

Em algumas modalidades, os anticorpos terapêuticos incluem um anticorpo gerado contra um marcador cancerosos de células-tronco da presente invenção, onde o anticorpo é conjugado a um agente citotóxico. Nessas modalidades, é gerado um agente terapêutico tumor-específico que não se direciona às células normais, reduzindo assim muitos dos efeitos colaterais nocivos da quimioterapia tradicional. Para determinadas aplicações, prevê-se que os agentes terapêuticos serão agentes farmacológicos que atuarão como agentes úteis

para a fixação de anticorpos, particularmente agentes citotóxicos ou de outra forma anticelulares com a capacidade de matar ou suprimir o crescimento ou divisão celular de células endoteliais. A presente invenção contempla o uso de qualquer agente farmacológico que possa ser conjugado a um anticorpo, e distribuído na forma ativa. Agentes anticelulares e-
 5 xemplares incluem agentes quimioterápicos, radioisótopos e citotoxinas. Os anticorpos terapêuticos da presente invenção podem incluir uma variedade de moléculas citotóxicas, incluindo mas não limitando a, isótopos radioativos (por exemplo, iodo-131, iodo-123, tecnécio-99m, índio-111, rênio-188, rênio-186, gálio-67, cobre-67, ítrio-90, iodo-125 ou astato-211), hormônios, como um esteroide, antimetabólitos, como citosinas (por exemplo, arabinosídeo,
 10 fluoruracil, metotrexato, ou aminopterina; uma antraciclina; mitomicina C), vinca alcaloides (por exemplo, demecolcina; etoposídeo; mitramicina) e agente alquilante antitumoral, como clorambucil e melfalano. Outras modalidades podem incluir agentes como um coagulante, uma citocina, fator de crescimento, endotoxina bacteriana ou a molécula de lipídio de endotoxina bacteriana. Por exemplo, em algumas modalidades, agentes terapêuticos incluirão
 15 toxina derivada de plantas, fungos ou bactérias, como toxinas de cadeia A, uma proteína inativadora de ribossomo, α -sarcina, aspergillina, restrictocina, uma ribonuclease, toxina diftérica ou exotoxina de pseudomonas, para citar apenas alguns exemplos. Em algumas modalidades, a cadeia A de ricina deglicosilada é utilizada.

De qualquer modo, é proposto que os agentes como esses possam, se desejado,
 20 ser conjugados com sucesso a um anticorpo, de forma que permita o seu direcionamento, internalização, liberação ou apresentação aos componentes sanguíneos no sítio das células tumorais alvo conforme necessário, utilizando-se a tecnologia de conjugação conhecida (veja, por exemplo, Ghose *et al.*, *Methods Enzymol.*, 93:280 [1983]).

Por exemplo, em algumas modalidades, a presente invenção fornece imunotoxinas
 25 que se direcionam ao marcador canceroso de células-tronco da presente invenção. Imunotoxinas são conjugados de um agente de direcionamento específico tipicamente um anticorpo ou fragmento direcionado para tumor, com um agente citotóxico, como uma molécula de toxina. O agente de direcionamento dirige a toxina para e, desse modo, elimina seletivamente, células portadoras do antígeno alvo. Em algumas modalidades, os anticorpos terapêuticos empregam reticuladores que proporcionam alta estabilidade *in vivo* (Thorpe *et al.*, *Cancer Res.*, 48:6396 [1988]).
 30

Em outras modalidades, particularmente aquelas que envolvem o tratamento de tumores sólidos, os anticorpos são projetados para ter um efeito citotóxico ou de outra forma anticelular contra a vasculatura do tumor, suprimindo o crescimento ou a divisão celular das
 35 células do endotélio vascular. Este ataque é destinado a levar a um colapso vascular localizado do tumor, privando as células tumorais, particularmente aquelas células tumorais da vasculatura distal, de oxigênio e nutrientes, levando por fim à morte celular e necrose do

tumor.

Em algumas modalidades, a terapêutica baseada em anticorpos é formulada como composições farmacêuticas, como descrito abaixo. Em algumas modalidades, a administração de uma composição de anticorpo da presente invenção resulta em uma redução mensurável do câncer (por exemplo, redução ou eliminação do tumor).

VI. Therapeutic Compositions and Administration

Uma composição farmacêutica contendo um regulador de tumorigênese de acordo com a presente invenção pode ser administrada por qualquer método eficaz. Por exemplo, um antagonista da via de sinalização de IL8-CXCR1, ou outro agente terapêutico que atue como um antagonista de proteínas na via de transdução de sinal/resposta de IL8-CXCR1, pode ser administrado por qualquer método eficaz. Em certas modalidades da presente invenção, o agente terapêutico compreende repertaxina ou seu derivativo.

Em certas modalidades, uma solução adequada fisiologicamente contendo uma concentração eficaz de um antagonista da via de sinalização de IL8-CXCR1 pode ser administrada por via tópica, intraocular, parenteral, oral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutânea ou por qualquer outro meio eficaz. Em particular, o agente antagonista da via de sinalização de IL8-CXCR1 pode ser injetado diretamente em um câncer ou tumor alvo (por exemplo, no tecido de mama) por uma agulha em quantidades eficazes para tratar as células tumorais do tecido alvo. Em alternativa, um câncer ou tumor presente em uma cavidade corporal, como no olho, trato gastrointestinal, trato geniturinário (por exemplo, a bexiga urinária), sistema pulmonar e brônquico e similares, pode receber uma composição fisiologicamente adequada (por exemplo, uma solução como uma salina ou tampão fosfato, uma suspensão, ou uma emulsão, que é estéril) contendo uma concentração eficaz de um antagonista da via de sinalização de IL8-CXCR1 através da injeção direta com uma agulha ou através de um cateter ou outro tubo de distribuição colocado no órgão oco afetado com câncer ou tumor. Qualquer dispositivo de imagem eficaz, tais como raios-X, ultrassom, ou sistema de visualização por fibra óptica pode ser usado para localizar o tecido-alvo e guiar a agulha ou o tubo do cateter. Em outra alternativa, uma solução fisiologicamente adequada, contendo uma concentração eficaz de um antagonista da via de sinalização de IL8-CXCR1, pode ser administrada por via sistêmica na circulação sanguínea para tratar um câncer ou tumor que não pode ser diretamente atingido ou anatomicamente isolado.

Tais manipulações têm em comum o objetivo de colocar o antagonista da via de sinalização de IL8-CXCR1 em contato suficiente com o tumor alvo para permitir que o antagonista entre em contato, transduza ou transfete as células tumorais (dependendo da natureza do agente). Em uma modalidade, os tumores sólidos presentes nos revestimentos epiteliais dos órgãos ocos podem ser tratados através da infusão da suspensão em um órgão oco cheio de fluido, ou por pulverização ou nebulização em um órgão oco cheio de ar. As-

sim, as células tumorais (tais como células-tronco de tumor sólido) podem estar presentes no ou entre o tecido epitelial no revestimento da árvore brônquica pulmonar, no revestimento do trato gastrointestinal, no revestimento do trato reprodutor feminino, no trato geniturinário, na vesícula biliar e qualquer outro tecido de órgãos acessível ao contato pelo antagonista da via de sinalização de IL8-CXCR1. Em outra modalidade, o tumor sólido pode estar localizado no ou sobre o revestimento do sistema nervoso central, como, por exemplo, a medula espinhal, raízes nervosas ou cérebro, de modo que o antagonista da via de sinalização de IL8-CXCR1 infundido no líquido cefalorraquidiano entre em contato e transduza as células do tumor sólido nesse espaço. Alguém versado na técnica da oncologia pode apreciar que o antagonista pode ser administrado ao tumor sólido por injeção direta no tumor de forma que o antagonista entra em contato e afeta as células tumorais dentro do tumor.

As células tumorigênicas identificadas pela presente invenção também podem ser usadas para aumentar anticorpos anti-células cancerosas. Em uma modalidade, o método envolve a obtenção de uma população enriquecida por células tumorigênicas ou células tumorigênicas isoladas, o tratamento da população para evitar a replicação celular (por exemplo, por irradiação) e a administração das células tratadas a um indivíduo humano ou animal, em uma quantidade eficaz para induzir uma resposta imune para células-tronco de tumor sólido. Para orientação quanto a uma dose eficaz de células a ser injetada ou administrada por via oral; veja, Pat. US Nos. 6.218.166, 6.207.147 e 6.156.305, aqui incorporadas como referência. Em outra modalidade, o método envolve a obtenção de uma população enriquecida por células-tronco de tumor sólido ou células-tronco de tumor sólido isoladas; a mistura das células-tronco tumorais em uma cultura *in vitro* com células imunes efetoras (de acordo com métodos imunológicos conhecidos na técnica) de um ser humano ou animal hospedeiro, no qual o anticorpo é para ser gerado; a remoção das células imunes efetoras da cultura; o transplante das células imunes efetoras em um animal hospedeiro, em uma dose que é eficaz para estimular uma resposta imune no animal.

Em algumas modalidades da presente invenção, os agentes terapêuticos antitumorigênicos (por exemplo, antagonistas da via de sinalização de IL8-CXCR1) da presente invenção são co-administrados com outras terapias antineoplásicas. Uma ampla gama de agentes terapêuticos são úteis com a presente invenção. Qualquer agente terapêutico que pode ser co-administrado com os agentes da presente invenção, ou associado aos agentes da presente invenção é adequado para uso nos métodos da presente invenção.

Várias classes de agentes antineoplásicos (p. ex., anticancerígenos) estão previstas para uso em certas modalidades da presente invenção. Agentes anticancerígenos adequados para uso com a presente invenção incluem, mas não estão limitados a, agentes que induzem apoptose, agentes que inibem a função da adenosina desaminase, inibem a biossíntese de pirimidina, inibem a biossíntese do anel de purina, inibem interconversões nu-

cleotídicas, inibem a ribonucleotídeo redutase, inibem a síntese de timidina monofosfato (TMP), inibem a redução de di-hidrofolato, inibem a síntese de DNA, formam adutos com o DNA, causam danos ao DNA, inibem o reparo do DNA, se intercalam com o DNA, desaminam asparaginas, inibem a síntese de RNA, inibem a síntese ou a estabilidade proteica, inibem a síntese ou função dos microtúbulos e semelhantes.

Em algumas modalidades, agentes anticancerígenos exemplares adequados para uso em composições e métodos da presente invenção incluem, mas não estão limitados a:

- 1) alcaloides, incluindo inibidores de microtúbulos (p. ex., vincristina, vimblastina e vindesina, etc.), estabilizadores de microtúbulos (p. ex., paclitaxel (TAXOL) e docetaxel, etc.) e inibidores de função da cromatina, incluindo inibidores da topoisomerase, como epipodofilotoxinas (p. ex., etoposídeo (VP-16) e teniposídeo (VM-26), etc.) e agentes que têm como alvo a topoisomerase I (p. ex., camptotecina e irinotecano (CPT-11), etc.);
- 2) agentes de ligação ao DNA covalentes (agentes alquilantes), incluindo mostardas nitrogenadas (p. ex., mecloretamina, clorambucil, ciclofosfamida, ifosfamida e busulfano (MYLERAN), etc.), nitrosoureas (p. ex., carmustina, lomustina e semustina, etc.) e outros agentes alquilantes (p. ex., dacarbazina, hidroximetilmelamina, tiotepa e mitomicina, etc.);
- 3) agentes de ligação ao DNA não covalentes (antibióticos antitumorais), incluindo inibidores de ácido nucleico (p. ex., dactinomicina (actinomicina D), etc.), antraciclina (p. ex., daunorrubicina (daunomicina e cerrubidina), doxorubicina (adriamicina) e idarrubicina (idamicina), etc.), antracenodionas (p. ex., análogos de antraciclina, tais como mitoxantrona, etc.), bleomicinas (BLENOXANE), etc. e plicamicina (mitramicina), etc.);
- 4) antimetabólitos, incluindo antifolatos (p. ex., metotrexato, FOLEX e MEXATE, etc.), antimetabólitos de purina (p. ex., 6-mercaptopurina (6-MP, PURINETHOL), 6-tioguanina (6-TG), azatioprina, aciclovir, ganciclovir, clorodesoxiadenosina, 2-clorodesoxiadenosina (CdA) e 2'-desoxicoformicina (pentostatina), etc.), antagonistas de pirimidina (p. ex., fluorpirimidinas (p. ex., 5-fluoruracil (ADRUCIL), 5-fluordesoxiuridina (FdUrd) (floxuridina)) etc.) e citosina arabinosídeos (p. ex., CYTOSAR (ara-C) e fludarabina, etc.);
- 5) enzimas, incluindo L-asparaginase e hidroxíureia, etc.;
- 6) hormônios, incluindo glicocorticoides, antiestrogênios (p. ex., tamoxifeno, etc.), antiandrogênios não esteroidais (p. ex., flutamida, etc.) e inibidores de aromatase (p. ex., anastrozol (ARIMIDEX), etc.);
- 7) compostos de platina (p. ex., cisplatina e carboplatina, etc.);
- 8) anticorpos monoclonais conjugados com radionuclídeos, toxinas e/ou fármacos anticâncer, etc.;
- 9) modificadores de resposta biológica (p. ex., interferons (p. ex., IFN- α , etc.) e interleucinas ((p. ex., IL-2, etc.) etc.);
- 10) imunoterapia adotiva;
- 11) fatores de crescimento hematopoiéticos;
- 12) agentes que induzem a diferenciação das células tumorais (p. ex., ácido all-trans-retinoico, etc.);
- 13) técnicas de terapia gênica;
- 14) técnicas de terapia antisentido;
- 15) vacinas tumorais;
- 16) terapias direcionadas contra metástases tumorais (p. ex., batimastat, etc.);
- 17) inibidores de angiogênese;
- 18) inibidores de proteossomo (p. ex., VELCADE);
- 19) inibidores de acetilação e/ou meti-

lação (p. ex., inibidores de HDAC); 20) moduladores de NF-kappa B; 21) inibidores da regulação do ciclo celular (p. ex., inibidores de CDK); 22) moduladores da função da proteína p53 e 23) radiação.

Qualquer agente oncolítico que é rotineiramente usado em um contexto de terapia contra o câncer é útil nas composições e métodos da presente invenção. Por exemplo, o Food and Drug Administration dos EUA mantém um formulário de agentes oncolíticos aprovados para uso nos Estados Unidos. Organismos congêneres internacionais para o USFDA mantêm formulários similares. A Tabela 3 fornece uma lista de agentes antineoplásicos exemplares aprovados para uso nos EUA. Aqueles versados na técnica irão apreciar que os "rótulos dos produtos" necessários em todos os quimioterápicos aprovados nos EUA descrevem indicações aprovadas, informações sobre dose, dados relativos à toxicidade e semelhantes, para os agentes exemplares.

TABELA 3

Aldelesleucina (des-alanil-1, serino-125 interleucina humana 2)	Proleukin	Chiron Corp., Emeryville, CA
Alemtuzumab (anticorpo IgG1k anti-CD52)	Campath	Millennium and ILEX Partners, LP, Cambridge, MA
Alitretinoína (ácido 9-cis-retinoico)	Panretin	Ligand Pharmaceuticals, Inc., San Diego CA
Alopurinol (sal monossódico de 1,5-di-hidro-4 H - pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona)	Zyloprim	GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC
Altretamina (N,N,N',N',N'',N''- hexametil-1,3,5-triazino-2, 4, 6-triamina)	Hexalen	US Bioscience, West Conshohocken, PA
Amifostina (etanotiol, 2-[(3-aminopropil)amino]-, di-hidrogeno fosfato (éster))	Ethyol	US Bioscience
Anastrozol (1,3-Benzenodiacetonitrile, a, a, a', a'-tetrametil-5-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil))	Arimidex	AstraZeneca Pharmaceuticals, LP, Wilmington, DE
Trióxido de arsênio	Trisenox	Cell Therapeutic, Inc., Seattle, WA
Asparaginase (L-asparagine amido-hidrolase, tipo EC-2)	Elspar	Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ

BCG Viva (preparação liofilizada de uma cepa atenuada de <i>Mycobacterium bovis</i> (<i>Bacillus Calmette-Guérin</i> [BCG], subcepa Montreal)	TICE BCG	Organon Teknika, Corp., Durham, NC
Cápsulas de bexaroteno (ácido 4-[1-(5,6,7,8-tetrahidro-3,5,5,8,8-pentametil-2-naftalenil) etenil] benzoico)	Targretin	Ligand Pharmaceuticals
Gel de bexaroteno	Targretin	Ligand Pharmaceuticals
Bleomicina (antibiótico de glicopeptídeo citotóxico produzido por <i>Streptomyces verticillus</i> ; bleomicina A ₂ e bleomicina B ₂)	Blenoxane	Bristol-Myers Squibb Co., NY, NY
Capecitabina (5'-desóxi-5-flúor-N-[(pentilóxi)carbonil]-citidina)	Xeloda	Roche
Carboplatina (platina, diamina [1,1-ciclobutanodicarboxilato(2-)-0, 0']-, (SP-4-2))	Paraplatin	Bristol-Myers Squibb
Carmustina (1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea)	BCNU, BiCNU	Bristol-Myers Squibb
Carmustina com implante de Polifeprosan 20	Gliadel Wafer	Guilford Pharmaceuticals, Inc., Baltimore, MD
Celecoxib (como 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluormetil)-1H-pirazol-1-il] benzenossulfonamida)	Celebrex	Searle Pharmaceuticals, England
Clorambucil (ácido 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzenobutanoico)	Leukeran	GlaxoSmithKline
Cisplatina (PtCl ₂ H ₆ N ₂)	Platinol	Bristol-Myers Squibb
Cladribina (2-cloro-2'-desóxi-b-D-adenosina)	Leustatin, 2-CdA	R.W. Johnson Pharmaceutical Research Institute, Raritan, NJ
Ciclofosfamida	Cytosan,	Bristol-Myers Squibb

(2-óxido monoidratado de 2-[bis(2-cloroetil)amino] tetraidro-2H-13,2-oxazafosforina)	Neosar	
Citarabina (1-b-D-Arabinofuranosilcitosina, $C_9H_{13}N_3O_5$)	Cytosar-U	Pharmacia & Upjohn Company
citarabine lipossomal	DepoCyt	Skye Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA
Dacarbazina (5-(3,3-dimetil-1-triazeno)-imidazol-4-carboxamida (DTIC))	DTIC-Dome	Bayer AG, Leverkusen, Germany
Dactinomicina, actinomicina D (actinomicina produzida por <i>Streptomyces parvullus</i> , $C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$)	Cosmegen	Merck
Darbepoetina alfa (peptídeo recombinante)	Aranesp	Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA
daunorrubicina lipossomal (cloridrato de (8S-cis)-8-acetil-10-[(3-amino-2,3,6-tridesóxi- α -L-lyxo-hexopiranosil)óxi]-7,8,9,10-tetraidro-6,8,11-tri-hidróxi-1-metóxi-5,12-naftacenodiona)	DanuoXome	Nexstar Pharmaceuticals, Inc., Boulder, CO
Daunorrubicina HCl, daunomicina (cloridrato de (1 S ,3 S)-3-Acetil-1,2,3,4,6,11-hexaidro-3,5,12-tri-hidróxi-10-metóxi-6,11-dioxo-1-naftacenil 3-amino-2,3,6-tridesóxi-(alfa)-L-lyxo -hexopiranosídeo)	Cerubidine	Wyeth Ayerst, Madison, NJ
Denileucina diftotox (peptídeo recombinante)	Ontak	Seragen, Inc., Hopkinton, MA
Dexrazoxano (((S)-4,4'-(1-metil-1,2-etanodi-il)bis-2,6-piperazinodiona)	Zinecard	Pharmacia & Upjohn Company
Docetaxel (((2R,3S)-N-carbóxi-3-fenilisoserino, N-terc-butyl éster, 13-éster com 5b-20-epóxi-	Taxotere	Aventis Pharmaceuticals, Inc., Bridgewater, NJ

12a,4,7b,10b,13a-hexaidroxita- 11-en-9-ona 4-acetato 2-benzoato, tri-hidratado)		
Doxorrubicina HCl Cloridrato de (8S,10S)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesóxi-a-L-lyxo-hexopiranosil)óxi] -8-glicolil-7,8,9,10-tetraidro-6,8,11- tri-hidróxi-1-metóxi-5,12-naftacenodiona)	Adriamycin, Rubex	Pharmacia & Upjohn Company
doxorubicina	Adriamycin PFS Intra-venous injection	Pharmacia & Upjohn Company
doxorubician lipossomal	Doxil	Sequus Pharmaceuticals, Inc., Menlo park, CA
Propionato de dromostanolona (17b-Hidróxi-2a-metil-5a-androstan-3-ona propionato)	Dromo- stanolone	Eli Lilly & Company, Indianapolis, IN
propionato de dromostanolona	Masterone injection	Syntex, Corp., Palo Alto, CA
Solução B de Elliott	Elliott's B Solution	Orphan Medical, Inc
Epirubicina (cloridrato de (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesóxi-a-L-arabino- hexopiranosil)óxi]-7,8,9,10-tetraidro-6,8,11-tri-hidróxi-8- (hidroxiacetil)-1-metóxi-5,12-naftacenodiona)	Ellence	Pharmacia & Upjohn Company
Epoetina alfa (peptídeo recombinante)	Epogen	Amgen, Inc
Estramustina (estra-1,3,5(10)-trieno-3,17-diol(17(beta))-3-[bis(2-cloroetil)carbamato] 17-(di-hidrogeno fosfato), sal dissódico, monoidratado, ou estradiol 3-[bis(2-cloroetil)carbamato] 17-(di-hidrogeno fosfato), sal dissódico, monoidratado)	Emcyt	Pharmacia & Upjohn Company
Fosfato de etoposídeo	Etopophos	Bristol-Myers Squibb

(4'-Demetilepipodofilotoxina 9-[4,6-O-(R)-etilideno-(beta)-D-glicopiranosídeo], 4'-(di-hidrogeno fosfato))		
etoposídeo, VP-16 (4'-demetilepipodofilotoxina 9-[4,6-O-(R)-etilideno-(beta)-D-glicopiranosídeo])	Vepesid	Bristol-Myers Squibb
Exemestano (6-metilenandrosta-1,4-dieno-3, 17-diona)	Aromasin	Pharmacia & Upjohn Company
Filgrastim (r-metHuG-CSF)	Neupogen	Amgen, Inc
floxuridina (intra-arterial) (2'-desóxi-5-fluoruridina)	FUDR	Roche
Fludarabina (análogo nucleotídico fluorado do agente antiviral vidarabina, 9-b -D-arabinofuranosiladenina (ara-A))	Fludara	Berlex Laboratories, Inc., Cedar Knolls, NJ
Fluoruracil, 5-FU (5-flúor-2,4(1H,3H)-pirimidinodiona)	Adrucil	ICN Pharmaceuticals, Inc., Humacao, Puerto Rico
Fulvestrant (7-alfa-[9-(4,4,5,5,5-penta fluorpentilsulfinil)nonil]estra-1,3,5-(10)- triene-3,17-beta-diol)	Faslodex	IPR Pharmaceuticals, Guayama, Puerto Rico
Gencitabina (monocloridrato de 2'-desóxi-2', 2'-difluorcitidina (isômero b))	Gemzar	Eli Lilly
Gemtuzumab Ozogamicina (anti-CD33 hP67.6)	Mylotarg	Wyeth Ayerst
Acetato de goserelina (sal de acetato de [D-Ser(But) ⁶ ,Azgly ¹⁰]LHRH; acetato de piro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH2 [C ₅₉ H ₈₄ N ₁₈ O ₁₄ •(C ₂ H ₄ O ₂) _x]	Zoladex Implant	AstraZeneca Pharmaceuticals
Hidroxiureia	Hydrea	Bristol-Myers Squibb
Ibritumomab Tiuxetano (imunconjugado resultante de ligação covalente de tioureia entre o anticorpo mo-	Zevalin	Biogen IDEC, Inc., Cambridge MA

noclonal Ibritumomab e o ligante-quelante tiuxetan [N-[2-bis(carboximetil)amino]-3-(p-isotiocianatofenil)-propil]-[N-[2-bis(carboximetil)amino]-2-(metil)etil]glicina)		
Idarrubicina (5, 12-Naftacenodiona, 9-acetil-7-[(3-amino-2,3,6-tridesóxi-(alfa)-L-lyxo-hexopiranosil)óxi]-7,8,9,10-tetraidro-6,9,11-tri-hidroxiclорidrato, (7S- cis))	Idamycin	Pharmacia & Upjohn Company
Ifosfamida (2-óxido de 3-(2-cloroetil)-2-[(2-cloroetil)amino]tetraihidro-2H-1,3,2-oxazafosforina)	IFEX	Bristol-Myers Squibb
Mesilato de Imatinib (metanossulfonato de 4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-fenil]benzamida)	Gleevec	Novartis AG, Basel, Switzerland
Interferon alfa-2a (peptídeo recombinante)	Roferon-A	Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, NJ
Interferon alfa-2b (peptídeo recombinante)	Intron A (Lyophilized Betaseron)	Schering AG, Berlin, Germany
Irinotecano HCl (cloridrato tri-hidratado de (4S)-4,11-dietil-4-hidróxi-9-[(4-piperidinopiperidino)carbonilóxi]-1H-pirano[3', 4': 6,7] indolizino[1,2-b] quinolino-3,14(4H, 12H) diona)	Camptosar	Pharmacia & Upjohn Company
Letrozol (4,4'-(1H-1,2,4 -Triazol-1-ilmetileno) dibenzonitrile)	Femara	Novartis
Leucovorina (ácido L-glutâmico, N[4[[[(2amino-5-formil-1,4,5,6,7,8 hexaidro4oxo6-	Wellcovorin, Leucovorin	Immunex, Corp., Seattle, WA

pteridinil)metil]amino]benzoil], sal de cálcio (1:1))		
Levamisol HCl (monocloridrato de (-)-(S)-2,3,5, 6-tetraidro-6-fenilimidazo [2,1-b] tiazol C ₁₁ H ₁₂ N ₂ S·HCl)	Ergamisol	Janssen Research Foundation, Titusville, NJ
Lomustina (1-(2-cloro-etil)-3-ciclo-hexil-1-nitrosourea)	CeeNU	Bristol-Myers Squibb
Mecloretamina, mostarda nitrogenada (cloridrato de 2-cloro-N-(2-cloroetil)-N-metiletanamina)	Mustargen	Merck
Acetato de Megestrol 17α(acetilóxi)- 6- metilpregna- 4,6- dieno-3,20- diona	Megace	Bristol-Myers Squibb
Melfalano, L-PAM (4-[bis(2-cloroetil) amino]-L-fenilalanina)	Alkeran	GlaxoSmithKline
Mercaptopurina, 6-MP (1,7-di-hidro-6 H -purino-6-tiona monoidratada)	Purinethol	GlaxoSmithKline
Mesna (2-mercaptoetano sulfonato de sódio)	Mesnex	Asta Medica
Metotrexato (ácido N-[4-[(2,4-diamino-6-pteridinil)metil]metilamino]benzoil]-L-glutâmico)	Methotrexate	Lederle Laboratories
Metoxsaleno (9-metóxi-7H-furo[3,2-g][1]-benzopiran-7-ona)	Uvadex	Therakos, Inc., Way Exton, Pa
Mitomicina C	Mutamycin	Bristol-Myers Squibb
mitomicina C	Mitozytrex	SuperGen, Inc., Dublin, CA
Mitotano (1,1-dicloro-2-(o-clorofenil)-2-(p-clorofenil)etano)	Lysodren	Bristol-Myers Squibb
Mitoxantrona (dicloridrato de 1,4-di-hidróxi-5,8-bis[[2- [(2-	Novantrone	Immunex Corporation

hidroxi-etil)amino]etil]amino]-9,10-antracenodiona)		
Fenpropionato de nandrolona	Durabolin-50	Organon, Inc., West Orange, NJ
Nofetumomab	Verluma	Boehringer Ingelheim Pharma KG, Germany
Oprelvecina (IL-11)	Neumega	Genetics Institute, Inc., Alexandria, VA
Oxaliplatina (cis-[(1R,2R)-1,2-ciclohexanodiamino-N,N'] [oxalato(2-)-O,O'] platina)	Eloxatin	Sanofi Synthelabo, Inc., NY, NY
Paclitaxel (5β, 20-Epóxi-1,2a, 4,7β, 10β, 13a-hexaidroxitax-11-en-9-ona 4,10-diacetato 2- benzoato 13-éster com (2R, 3 S)- N-benzoil-3-fenilisoserina)	TAXOL	Bristol-Myers Squibb
Pamidronato (ácido fosfônico (3-amino-1-hidroxi-propilideno) bis-, sal dissódico, pentaidratado, (APD))	Aredia	Novartis
Pegademase ((monometoxipolietileno glicol succinimidil) 11 - 17 -adenosina desaminase)	Adagen (Pegademase Bovine)	Enzon Pharmaceuticals, Inc., Bridgewater, NJ
Pegaspargase (monometoxipolietileno glicol succinimidil L-asparaginase)	Oncaspar	Enzon
Pegfilgrastim (conjugado covalente de G-CSF humano metionil recombinante (Filgrastim) e monometoxipolietileno glicol)	Neulasta	Amgen, Inc
Pentostatina	Nipent	Parke-Davis Pharmaceutical Co., Rockville, MD
Pipobromano	Vercyte	Abbott Laboratories, Abbott Park, IL

Plicamicina, Mitramicina (antibiótico produzido por <i>Streptomyces plicatus</i>)	Mithracin	Pfizer, Inc., NY, NY
Porfimer sódio	Photofrin	QLT Phototherapeutics, Inc., Vancouver, Canada
Procarbazina (monocloridrato de N-isopropil- μ -(2-metilidrazino)-p-toluamida)	Matulane	Sigma Tau Pharmaceuticals, Inc., Gaithersburg, MD
Quinacrina (6-cloro-9-(1-metil-4-dietil-amino) butilamino-2-metoxiacridina)	Atabrine	Abbott Labs
Rasburicase (peptídeo recombinante)	Elitek	Sanofi-Synthelabo, Inc.,
Rituximab (anticorpo anti-CD20 recombinante)	Rituxan	Genentech, Inc., South San Francisco, CA
Sargramostim (peptídeo recombinante)	Prokine	Immunex Corp
Estreptozocina (estreptozocina 2'-desóxi-2'-[[[(metilnitrosoamino)carbonil]amino]-a(e b)]-D-glicopiranosose e 220 mg de ácido cítrico anidro)	Zanosar	Pharmacia & Upjohn Company
Talco ($\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$)	Sclerosol	Bryan, Corp., Woburn, MA
Tamoxifeno ((Z)-2-[4-(1,2-difenil-1-butenil) fenóxi]-N, N-dimetiletanamina 2-hidróxi-1,2,3-propano-tricarboxilato (1:1))	Nolvadex	AstraZeneca Pharmaceuticals
Temozolomida (3,4-di-hidro-3-metil-4-oxoimidazo[5,1-d]-as-tetrazino-8-carboxamida)	Temodar	Schering
teniposídeo, VM-26 (4'-demetilepipodofilotoxin 9-[4,6-O-(R)-2-tenilideno-(beta)-D-glicopiranosídeo])	Vumon	Bristol-Myers Squibb

Testolactona (ácido 13-hidróxi-3-oxo-13,17-secoandrosta-1,4-dien-17-oico [dgr]-lactona)	Teslac	Bristol-Myers Squibb
Tioguanina, 6-TG (2-amino-1,7-di-hidro-6 H - purino-6-tiona)	Thioguanine	GlaxoSmithKline
Tiotepa (Aziridina, 1,1',1"-fosfinotioilidinetris-, ou Tris (1-aziridinil) fosfino sulfeto)	Thioplex	Immunex Corporation
Topotecano HCl ((S)-10-[(dimetilamino) metil]-4-etil-4,9-dihidróxi-1H-pirano[3', 4': 6,7] indolizino [1,2-b] quinolino-3,14-(4H,12H)-diona monoclóridrato)	Hycamtin	GlaxoSmithKline
Toremifeno (citrato de 2-(p-[(Z)-4-cloro-1,2-difenil-1-butenil]-fenóxi)-N,N-dimetiletilamina (1:1))	Fareston	Roberts Pharmaceutical Corp., Eatontown, NJ
Tositumomab, I 131 Tositumomab (anticorpo anti-CD20 de IgG _{2a} lambda monoclonal imunoterápico murino recombinante (I 131 é um anticorpo radioimunoterapêutico))	Bexxar	Corixa Corp., Seattle, WA
Trastuzumab (anticorpo anti-HER2 IgG ₁ kappa monoclonal recombinante)	Herceptin	Genentech, Inc
Tretinoína, ATRA (ácido all-trans retinoico)	Vesanoid	Roche
Mostarda de Uracila	Uracil Mustard Capsules	Roberts Labs
Valrubicina, N-trifluoracetiladriamicin-14-valerato (pentanoato de (2S-cis)-2- [1,2,3,4,6,11-hexahidro-2,5,12-tri-hidróxi-7 metóxi-6,11-dioxo-[[4 2,3,6-tridesóxi-3- [(trifluoracetil)-	Valstar	Anthra --> Medeva

amino- α -L-/yxo-hexopiranosil]oxil]-2-naftacenil]-2-oxoetil)		
Vinblastina, Leurocristina ($C_{46}H_{56}N_4O_{10} \cdot H_2SO_4$)	Velban	Eli Lilly
Vincristina ($C_{46}H_{56}N_4O_{10} \cdot H_2SO_4$)	Oncovin	Eli Lilly
Vinorelbina (3',4'-didesidro-4'-desóxi-C'-norvincalcoblastina [R-(R*,R*)-2,3-dihidroxibutanodioato (1:2)(sal)])	Navelbine	GlaxoSmithKline
Zoledronato, Ácido Zoledrônico (ácido (1-Hidróxi-2-imidazol-1-il-fosfonoetil) fosfônico monoidratado)	Zometa	Novartis

Agentes terapêuticos antimicrobianos também podem ser utilizados como agentes terapêuticos na presente invenção. Qualquer agente que possa matar, inibir, ou de outra forma atenuar a função de microrganismos pode ser utilizados, assim como qualquer agente contemplado por ter essas atividades. Os agentes antimicrobianos incluem, mas não estão limitados a, antibióticos naturais e sintéticos, anticorpos, proteínas inibidoras (p. ex., defen-
5 sinas), ácidos nucleicos antissentido, agentes perturbadores de membrana e similares, utilizados isoladamente ou em combinação. Na verdade, qualquer tipo de antibiótico pode ser utilizado, incluindo mas não limitando a, agentes antibacterianos, antivirais, agentes antifú-
- gicos e semelhantes.

10 Em modalidades ainda adicionais, a presente invenção fornece compostos da presente invenção (e quaisquer outros agentes quimioterápicos) associados com agentes de direcionamento que são capazes de se direcionarem especificamente a tipos celulares parti-
- culares (p. ex., células tumorais). Geralmente, o composto terapêutico que está associado com um agente de direcionamento, se direciona às células neoplásicas através da interação
15 do agente de direcionamento com uma molécula de superfície celular que é levada para dentro da célula através de endocitose mediada por receptor.

Qualquer molécula conhecida por estar localizada na superfície de células alvo (p. ex., células tumorais) é útil com a presente invenção. Por exemplo, um anticorpo dirigido
20 contra tal molécula direciona as composições da presente invenção para superfícies celulares que contêm a molécula. Em alternativa, a molécula de direcionamento pode ser um li-
- gante dirigido a um receptor presente na superfície celular ou vice-versa. Da mesma forma, as vitaminas também podem ser usadas para direcionar a terapêutica da presente invenção a uma célula em particular.

Conforme aqui utilizado, o termo "moléculas de direcionamento" refere-se a moléculas químicas e suas partes úteis para direcionamento de compostos terapêuticos para células, tecidos e órgãos de interesse. Vários tipos de moléculas de direcionamento estão contemplados para uso com a presente invenção, incluindo mas não limitando a, peptídeos
5 sinais, anticorpos, ácidos nucleicos, toxinas e semelhantes. Moléculas de direcionamento podem adicionalmente promover a ligação dos compostos químicos associados (p. ex., pequenas moléculas) ou a entrada dos compostos nas células, tecidos e órgãos alvos. De preferência, moléculas de direcionamento são selecionadas de acordo com sua especificidade, afinidade e eficácia na distribuição seletiva de compostos ligados aos sites alvos em um
10 indivíduo, tecido ou uma célula, incluindo organelas e localizações subcelulares específicas.

Várias questões de eficiência afetam a administração de todos os fármacos - e de fármacos altamente citotóxicos (p. ex., fármacos anticâncer), em particular. Uma questão de particular importância é garantir que os agentes administrados afetem apenas células (p. ex., células cancerosas), tecidos ou órgãos-alvo. A distribuição inespecífica ou não intencio-
15 nal de agentes altamente citotóxicos para células não-alvo pode causar problemas de toxicidade grave.

Numerosas tentativas foram feitas para desenvolver esquemas de direcionamento de fármacos para tratar os problemas associados à distribuição inespecífica de fármacos. (Veja, p. ex., K.N. Syrigos and A.A. Epenetos *Anticancer Res.*, 19:606-614 (1999); Y.J. Park
20 *et al.*, *J. Controlled Release*, 78:67-79 (2002); R.V.J. Chari, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 31:89-104 (1998); e D. Putnam and J. Kopecek, *Adv. Polymer Sci.*, 122:55-123 (1995)). A conjugação de moléculas de direcionamento, tais como anticorpos e peptídeos ligantes (p. ex., RDG para células endoteliais), a moléculas de fármaco tem sido usada para aliviar alguns problemas de toxicidade colateral associada a determinados fármacos.

Os compostos e agentes anticancerígenos pode ser administrados em qualquer carreador farmacêutico estéril, biocompatível, incluindo, mas não limitando a, salina, salina tamponada, dextrose e água. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas da presente invenção podem conter um agente (p. ex., um anticorpo). Em outras modalidades, as composições farmacêuticas contêm uma mistura de pelo menos dois agentes (p. ex., um
30 anticorpo e um ou mais agentes anticancerígenos convencionais). Em modalidades ainda adicionais, as composições farmacêuticas da presente invenção contêm pelo menos dois agentes que são administrados a um paciente sob uma ou mais das seguintes condições: em periodicidades diferentes, em durações diferentes, em diferentes concentrações, por diferentes vias de administração, etc. Em algumas modalidades, o antagonista da via de sinalização de IL8-CXCR1 é administrado antes do segundo agente anticancerígeno, p. ex.,
35 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12 ou 18 horas, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias, 1, 2, 3 ou 4 semanas antes da administração do agente anticancerígeno. Em algumas modalidades, o antagonista da via

de sinalização de IL8-CXCR1 é administrado após o segundo agente anticancerígeno, p. ex., 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12 ou 18 horas, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias, 1, 2, 3 ou 4 semanas após a administração do agente anticancerígeno. Em algumas modalidades, o antagonista da via de sinalização de IL8-CXCR1 e o segundo agente anticancerígeno são administrados simultaneamente, mas em agendamentos diferentes, p. ex., o composto de antagonista de via de sinalização de IL8-CXCR1 é administrado diariamente, enquanto o segundo agente anticancerígeno é administrado uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, ou uma vez a cada quatro semanas. Em outras modalidades, o antagonista da via de sinalização de IL8-CXCR1 é administrado uma vez por semana, enquanto o segundo agente anticancerígeno é administrado diariamente, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, ou uma vez a cada quatro semanas.

Dependendo da doença a ser tratada, modalidades preferidas das presentes composições farmacêuticas são formuladas e administradas por via sistêmica ou local. Técnicas para a formulação e administração podem ser encontradas na última edição de "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Publishing Co, Easton Pa.). Vias adequadas podem, por exemplo, incluir a administração oral ou por transmucosa, assim como a distribuição parenteral (p. ex., administração intramuscular, subcutânea, intramedular, intratecal intraventricular, intravenosa, intraperitoneal, ou intranasal).

A presente invenção contempla a administração de compostos terapêuticos e, em algumas modalidades, um ou mais agentes anticancerígenos convencionais, de acordo com métodos de distribuição farmacêutica e técnicas de preparo aceitáveis. Por exemplo, compostos terapêuticos e agentes anticancerígenos adequados podem ser administrados a um indivíduo por via intravenosa em um carreador farmacêuticamente aceitável, tal como salina fisiológica. Métodos padrões para a distribuição intracelular de agentes farmacêuticos são contempladas (p. ex., distribuição através de lipossomo). Tais métodos são bem conhecidos por aqueles de conhecimento ordinário da técnica.

Em algumas modalidades, as formulações da presente invenção são úteis para a administração parenteral (p. ex., intravenosa, subcutânea, intramuscular, intramedular e intraperitoneal). A co-administração terapêutica de alguns agentes anticancerígenos contemplados (p. ex., polipeptídeos terapêuticos) também pode ser feita com o uso de reagentes e técnicas de terapia gênica.

Em algumas modalidades da presente invenção, compostos terapêuticos são administrados a um indivíduo isoladamente ou em combinação com um ou mais agentes anticancerígenos convencionais (p. ex., sequências nucleotídicas, fármacos, hormônios, etc.) ou em composições farmacêuticas onde os componentes são opcionalmente misturados com excipiente(s) ou outros carreadores farmacêuticamente aceitáveis. Em modalidades preferidas da presente invenção, carreadores farmacêuticamente aceitáveis são biologicamente

inertes. Em modalidades preferidas, as composições farmacêuticas da presente invenção são formuladas usando carreadores farmaceuticamente aceitáveis bem conhecidos na técnica, em doses adequadas para administração oral. Esses carreadores permitem que as composições farmacêuticas sejam formuladas na forma de comprimidos, pílulas, cápsulas, drágeas, líquidos, géis, xaropes, pastas fluidas, soluções, suspensões e afins, para a respectiva ingestão oral ou nasal por um indivíduo.

Preparações farmacêuticas para uso oral podem ser obtidas pela combinação dos princípios ativos com excipientes sólidos, moendo opcionalmente a mistura resultante e processando a mistura em grânulos, após adicionar auxiliares adequados, se desejado, para obter núcleos de drágeas ou comprimidos. Excipientes adequados são enchimentos de carboidratos ou proteína, tais como açúcares, incluindo lactose, sacarose, manitol ou sorbitol; amido de milho, trigo, arroz, batata, etc.; celulose, tal como a metil celulose, hidroxipropilmetil-celulose, ou carboximetilcelulose de sódio; gomas, incluindo arábica e tragacanto; proteínas como gelatina e colágeno. Se desejado, agentes desintegrantes ou de solubilização podem ser adicionados, tais como a polivinil pirrolidona reticulada, ágar, ácido algínico ou seu sal, como o alginato de sódio.

Em modalidades preferidas, regimes de dose e administração são adaptados pelo médico, ou outros versados nas técnicas farmacológicas, com base em considerações farmacológicas e terapêuticas bem conhecidas, incluindo, mas não limitando a, o nível desejado de efeito terapêutico e o nível prático de efeito terapêutico capaz de ser obtido. Geralmente, é aconselhável seguir princípios farmacológicos bem conhecidos para administrar agentes quimioterápicos (p. ex., é geralmente aconselhável não alterar as doses em mais de 50% no tempo e não mais de cada 3-4 de meias-vidas de agente). Para composições que têm relativamente pouca ou nenhuma consideração sobre toxicidade dose-dependente e quando deseja-se máxima eficácia (p. ex., a destruição de células cancerosas), doses superiores à dose média necessária não são incomuns. Esta abordagem para a dose é comumente referida como a estratégia da "máxima dose". Em certas modalidades, o antagonista da via de sinalização de IL8-CXCR1 é administrado a um indivíduo com uma dose de 10-40 mg por dia (p. ex., por 4-6 semanas). Em certas modalidades, ao indivíduo é administrada uma dose de carga entre 15 e 70 mg do antagonista da via de sinalização de IL8-CXCR1. Em certas modalidades, ao indivíduo é administrada uma dose de carga de cerca de 35-45 mg do antagonista da via de sinalização de IL8-CXCR1 (p. ex., por via subcutânea) e, em seguida, doses diárias de cerca de 10 mg (p. ex., por via subcutânea) por cerca de 4-6 semanas.

Considerações adicionais sobre dose estão relacionadas com o cálculo dos níveis-alvo apropriados para o agente a ser administrado, a toxicidade potencial e acúmulo do agente, estimulação da resistência, falta de eficácia e com a descrição do intervalo do índice

terapêutico do agente.

Em certas modalidades, a presente invenção contempla a utilização de métodos de rotina de titulação da administração do agente. Uma estratégia comum para a administração é definir um nível-alvo razoável para o agente no indivíduo. Em algumas modalidades preferidas, os níveis de agente são medidos no plasma do indivíduo. Frequências e níveis de dose apropriados são então projetados para atingir o nível-alvo de estado estacionário desejado para o agente. Níveis reais, ou médios, do agente no indivíduo são monitorados (p. ex., por hora, diariamente, semanalmente, etc.) tal que os níveis de dose ou frequência podem ser ajustados para manter os níveis-alvo. Naturalmente, a farmacocinética e a farmacodinâmica (p. ex., biodisponibilidade, depuração ou bioacumulação, biodistribuição, interações medicamentosas, etc.) do agente ou agentes em particular que estão sendo administrados pode potencialmente afetar o que são considerados níveis-alvo razoáveis e, assim, afetar níveis ou frequências de dose.

Métodos de dose em nível-alvo tipicamente dependem do estabelecimento de um objetivo terapêutico razoável definido em termos de um intervalo desejável (ou intervalo terapêutico) para o agente no indivíduo. Em geral, o limite inferior do intervalo terapêutico é aproximadamente igual à concentração do agente que fornece cerca de 50% do máximo efeito terapêutico possível. O limite superior do intervalo terapêutico é geralmente estabelecido pela toxicidade do agente e não por sua eficácia. A presente invenção contempla que o limite superior do intervalo terapêutico para um determinado agente será a concentração na qual menos de 5 ou 10% dos indivíduos apresentam efeitos colaterais tóxicos. Em algumas modalidades, o limite superior do intervalo terapêutico é de cerca de duas vezes, ou menos, que o limite inferior. Aqueles versados na técnica entenderão que estas considerações sobre dose são altamente variáveis e até certo ponto, individualistas (p. ex., com base em predisposições genéticas, considerações imunológicas, tolerâncias, resistências e outros). Assim, em algumas modalidades, níveis de dose-alvo eficazes de um agente em um determinado indivíduo podem ser de 1, ... 5, ... 10, ... 15, ... 20, ... 50, ... 75, ... 100, ... 200, ... X%, superior à ideal em outro indivíduo. Por outro lado, alguns indivíduos podem sofrer significativos efeitos colaterais significativos e toxicidade relacionada com a saúde em níveis ou frequências de dose muito menores (1, ... 5, ... 10, ... 15, ... 20, ... 50, ... 75, ... 100, ... 200, ... X%) do que aquelas que tipicamente produzem níveis terapêuticos ideais em alguns ou na maioria dos indivíduos. Na ausência de informações mais específicas, os níveis de administração-alvo são frequentemente situados no meio do intervalo terapêutico.

Em modalidades preferidas, o médico racionalmente projeta um regime de dose individualizado baseado em equações e princípios farmacológicos conhecidos. Em geral, o médico projeta um regime de dose individualizado baseado no conhecimento de várias propriedades farmacológicas e farmacocinéticas do agente, incluindo, mas não limitando a, F

(biodisponibilidade fracionada da dose), C_p (concentração no plasma), CL (taxa de depuração/depuração), V_{ss} (volume de distribuição de fármaco no estado estacionário) C_{ss} (concentração no estado estacionário) e $t_{1/2}$ (meia-vida do fármaco), assim como informações sobre a taxa de absorção e distribuição do agente. Aqueles versados na técnica são apresentados a todo número de textos farmacológicos bem conhecidos (p. ex., Goodman and Gilman's, *Pharmaceutical Basis of Therapeutics*, 10th ed., Hardman *et al.*, eds., 2001) para mais explicações sobre essas variáveis e para equações completas ilustrando o cálculo de regimes de dose individualizados. Aqueles versados na técnica também serão capazes de antecipar possíveis flutuações nessas variáveis em diversos indivíduos. Por exemplo, o desvio-padrão dos valores observados para F , CL , e V_{ss} é tipicamente de cerca de 20%, 50% e 30%, respectivamente. O efeito prático de parâmetros potencialmente muito diferentes em diversos indivíduos é que 95% do tempo do C_{ss} alcançado em um indivíduo está entre 35 e 270% daquele do nível-alvo. Para fármacos com baixos índices terapêuticos, este é um intervalo indesejavelmente amplo. Aqueles versados na técnica irão apreciar, entretanto, que uma vez que a C_p (concentração no plasma) do agente é medida, é possível estimar os valores de F , CL , e V_{ss} diretamente. Isso permite que o médico ajuste eficazmente um regime de dose de um determinado indivíduo.

Em ainda outras modalidades, a presente invenção contempla que a continuação das técnicas de monitoramento terapêutico do fármaco seja usada para ajustar regimes e métodos individuais. Por exemplo, em uma modalidade, dados de C_{ss} são usados para aperfeiçoar ainda mais as estimativas de CL/F e, subsequentemente, ajustar a dose de manutenção individual para alcançar os níveis-alvo desejados do agente usando equações e princípios farmacológicos conhecidos. O monitoramento terapêutico do fármaco pode ser conduzido durante praticamente todo o esquema de dose. Em modalidades preferidas, o monitoramento é realizado em diferentes períodos durante a dose e, especialmente, quando se administram doses intermitentes. Por exemplo, o monitoramento de fármaco pode ser conduzido concomitantemente, em frações de segundo, segundos, minutos, horas, dias, semanas, meses, etc., da administração do agente, independentemente da metodologia de dose empregada (p. ex., dose intermitente, doses de carga, dose de manutenção, dose aleatória, ou qualquer outro método de dose). Entretanto, aqueles versados na técnica irão apreciar que quando a amostragem ocorre imediatamente após a administração de agentes, as alterações nos efeitos e dinâmicas de agentes podem não ser prontamente observáveis, pois as alterações na concentração plasmática do agente podem ser postergadas (p. ex., devido a uma baixa taxa de distribuição ou a outros fatores farmacodinâmicos). Consequentemente, amostras de indivíduos obtidas logo após a administração do agente podem ter valor limitado ou diminuído.

O principal objetivo da coleta de amostras biológicas do indivíduo durante o nível-

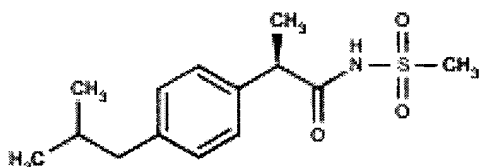
alvo de estado estacionário previsto da administração é modificar o regime de dose do indivíduo com base no cálculo subsequente de estimativas revisadas da proporção de CL/F do agente. Entretanto, aqueles versados na técnica irão apreciar que concentrações de fármaco pós-absorção iniciais tipicamente não refletem a depuração do agente. Concentrações de fármaco iniciais pós-absorção são ditadas principalmente pela taxa de absorção do agente, pela estado central, ao invés do estacionário, volume de distribuição de agentes e pela taxa de distribuição. Cada uma dessas características farmacocinéticas têm valor limitado para o cálculo de regimes terapêuticos de dose de manutenção a longo prazo.

Assim, em algumas modalidades, quando o objetivo é a dose terapêutica de manutenção a longo prazo, as amostras biológicas são obtidas do indivíduo, células ou tecidos de interesse bem após a dose anterior ter sido administrada, e ainda de maior preferência logo antes da próxima dose planejada ser administrada.

Ainda em outras modalidades, quando o agente terapêutico está quase totalmente depurado pelo indivíduo no intervalo entre as doses, então, a presente invenção contempla a coleta de amostras biológicas do indivíduo em vários pontos do tempo após a administração anterior e da maior preferência logo após a dose ter sido administrada.

VII.Repertaxina e Outros Inibidores de CXCR1 de Pequena Molécula

Em certas modalidades, os métodos, kits e composições da presente invenção empregam inibidores de pequena molécula de CXCR1. Um agente exemplar é repartaxina. Em certas modalidades, a dose *in vivo* da repartaxina está entre 3 e 60 mg por quilograma (p. ex., 3 30 50 60 mg/kg). Em modalidades particulares, a dose de repartaxina é de cerca de 30 mg por quilograma. A fórmula química da repartaxina é mostrada abaixo:



Em outras modalidades, os derivados da repertaxina são empregados. Outros antagonistas de CXCR1 de pequena molécula incluem SB265610 (Glaxo SmithKline Beecham; Benson *et al.*, 2000, 151:196-197), assim como SCH 527123 (2-hidróxi-N,N-dimetil-3-{2-[[[(R)-1-(5-metilfuran-2-il)propil]amino]-3,4-dioxociclobut-1-enilamino} benzamida (SCH 527123), um antagonista do receptor CXCR2/CXCR1 oralmente biodisponível (Schering Plough)). Outros inibidores de pequena molécula podem ser identificados pelos métodos de seleção descritos acima.

EXEMPLOS

O exemplo a seguir é fornecido, a fim de demonstrar e ilustrar ainda mais certas modalidades e aspectos preferidos da presente invenção e não deve ser interpretado como limitante do escopo da mesma.

EXEMPLO 1

CXCR1 Identifica Células-tronco Cancerosas

Este exemplo descreve a identificação de CXCR1, assim como de outras proteínas (p. ex., FBXO21), como marcadores de células-tronco cancerosas.

Cultura de células. Linhagens celulares de mama (BCL) foram obtidas a partir da ATCC ("http://www." seguido por "lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/cellBiology/cellBiologyIndex.cfm") ou de coleções desenvolvidas nos laboratórios de Drs. S. Ethier (agora disponível em "http://www." seguido por "asterand.com/Asterand/BIOREPOSITORY

Hbreastcancerellines.aspx, SUM44, SUM52, SUM149, SUM159, SUM185, SUM190, SUM225, SUM229"), V.J. Möbus (BrCa-MZ-01), e V. Catros (S68). Todas as BCLs testadas foram obtidas de carcinomas exceto a MCF10A, que é derivada de doença fibrocística e a 184A1 derivada de HMEC, que foi derivada de tecido mamário normal. As linhagens celulares foram cultivadas usando as condições de cultivo recomendadas. Todos os experimentos foram realizados com células confluentes na fase exponencial de crescimento.

Separação e ensaio ALDEFLUOR da população positiva para ALDH por FACS. A atividade de ALDH foi avaliada em 33 BCLs representando os principais subtipos moleculares de câncer de mama humano. O kit ALDEFLUOR (StemCell technologies, Durham, NC, EUA) foi usado para isolar a população com alta atividade enzimática de ALDH (17). Células obtidas a partir de linhagens celulares subconfluentes após tripsinização ou de xenoenxertos recém dissociados foram suspensas em tampão de ensaio ALDEFLUOR contendo substrato para ALDH (BAAA, 1 μ mol/L por 1×10^6 células) e incubadas por 40 minutos a 37°C. Em cada experimento, uma amostra de células foi corada sob condições idênticas, com 50mmol/L de dietilaminobenzaldeído (DEAB), um inibidor específico de ALDH, como controle negativo. A triagem por citometria de fluxo foi realizada utilizando um FACStarPLUS (Becton Dickinson). A fluorescência do ALDEFLUOR foi excitada a 488 nm e detectada usando isotiocianato de fluoresceína padrão (FITC) filtro passa-banda de 530/30. Para tumores xenotransplantados, a incubação com um anticorpo anti-H2Kd (BD Biosciences, 1/200, 20 min no gelo), seguido por um anticorpo secundário marcado com ficoeritrina (Jackson labs, 1/250, 20 min no gelo) foi utilizada para eliminar as células de origem de camundongo. Os padrões de triagem foram estabelecidos utilizando células coradas com PI para a viabilidade, células coradas com ALDEFLUOR tratadas com DEAB e aquelas marcadas com anticorpo secundário sozinho. Antes de realizar perfis de RNA ou injeção em camundongos NOD/SCID, a pureza das populações classificadas foi verificada com a dupla triagem de 10.000 células positivas e negativas para ALDEFLUOR em linhagens celulares BrCA-MZ-01 e SUM159. Para ambas as linhagens celulares, populações classificadas positivas para ALDEFLUOR continham mais de 98% das células positivas para ALDEFLUOR e nenhuma

célula positiva para ALDEFLUOR foi detectada na população negativa para ALDEFLUOR.

Tumorigenicidade em camundongos NOD/SCID. A tumorigenicidade de células positivas, negativas para ALDEFLUOR e SUM159, MDA-MB-453 e BrCA-MZ-01 não separadas foi avaliada em camundongos NOD/SCID. Bolsas de gordura foram depuradas do epitélio em 3 semanas de idade antes da puberdade e humanizadas, injetando fibroblastos humanos (1:1 irradiados:não irradiados, 50.000 células/ 100µL de Matrigel/bolsa de gordura), como descrito (17). Os animais foram sacrificados, quando os tumores tinham 1,2 cm no maior diâmetro, em conformidade com os regulamentos para o uso de animais vertebrados em pesquisa. Uma parte de cada bolsa de gordura foi fixada em formalina e incluída em parafina para análise histológica. Outra parte foi avaliada pelo ensaio ALDEFLUOR, seguido de triagem e transplante em série.

Cultura independente de ancoragem. Células positivas, negativas para ALDEFLUOR e as não separadas de 184A1, SUM149 e SUM159 foram plaqueadas como células únicas em placas de adesão ultra-baixa (Corning, Acton, MA) em baixa densidade (5000 células viáveis/mL). As células foram cultivadas em meio livre de soro de epitélio basal de mama (Cambrex Bio Science, Walkerville, MD), durante 3-7 dias, como descrito (18). A capacidade das células para formar esferas foi quantificada após tratamento com diferentes doses de IL8 (Genway Biotech, San Diego, CA) adicionadas ao meio.

Extração de RNA. O RNA total foi extraído de células positivas e negativas para ALDEFLUOR congeladas usando o kit DNA/RNA All Prep Maxi, de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen, Sample and Assay technologies, Holanda). Oito BCLs foram usadas para análise da transcrição: 184A1, BrCA-MZ-01, HCC1954, MDA-MB-231, MDA-MB-453, SK-BR-7, SUM149 e SUM159. A integridade do RNA foi controlada por eletroforese em gel de agarose com formaldeído desnaturante e micro-análise (Agilent Bioanalyzer, Palo Alto, CA).

Perfis de expressão gênica com microarranjos de DNA. Análises de expressão gênica utilizaram microarranjos de oligonucleotídeos humanos Affymetrix U133 Plus 2.0 que continham mais de 47.000 transcritos e variantes, incluindo 38.500 genes humanos bem caracterizados. A preparação de cRNA, hibridizações, lavagens e detecção, foi feita conforme recomendado pelo fornecedor ("[http://www.](http://www.affymetrix.com/index.affx)" seguido por "[affymetrix.com/index.affx](http://www.affymetrix.com/index.affx)"). Os dados de expressão foram analisados pelo método RMA (Robust Multichip Average) em R usando Bioconductor e pacotes associados (19), como descrito (20, 21). O RMA fez ajuste de valores basais, normalização de quantile e resumo de 11 oligonucleotídeos por gene.

Antes da análise, um processo de filtragem removeu os genes de conjunto de dados com expressão baixa e mal medida, conforme definido pelo valor da expressão inferior a 100 unidades em todas as 16 amostras, mantendo 25,285 genes/ESTs. Um segundo filtro, com base na intensidade do desvio padrão (DP), foi aplicado para a análise não supervisio-

nada para excluir os genes que mostram baixa variação de expressão em toda a análise. O DP foi calculado com dados transformados por log2, em que os valores mais baixos foram primeiro submetidos a função chão em um valor mínimo de 100 unidades, ou seja, a intensidade basal, mantendo a 13.550 genes/ESTs com DP superior a 0,5. Uma análise não supervisionada foi realizada em 16 células positivas, negativas para ALDEFLUOR em 13.550 genes. Antes do agrupamento hierárquico, os dados filtrados foram transformados em log2 e submetidos ao programa Cluster (22) usando dados mediana-centrados em genes, a correlação de Pearson como similaridade métrica e agrupamento de articulação centroide. Os resultados foram apresentados utilizando o programa TreeView (22). Para identificar e classificar os genes discriminando populações positivas e negativas para ALDEFLUOR, um teste de Mann e Whitney foi aplicado aos 25.285 genes/ESTs e a taxa de falsa descoberta (FDR (23), foi usada para corrigir a hipótese de múltiplos testes. O poder de classificação da assinatura discriminadora foi ilustrado pela classificação de amostras por agrupamento hierárquico. UM LOOCV foi aplicado para estimar a acurácia de predição das assinaturas moleculares identificadas e a validade da análise supervisionada; cada amostra foi excluída, uma por uma, e classificada com a análise discriminante linear (LDA (24), usando modelo definido nas amostras não excluídas.

RT-PCR em tempo real. Depois que as populações positivas para ALDEFLUOR e negativas para ALDEFLUOR de diferentes linhagens celulares foram triadas, o RNA total foi isolado utilizando o kit RNeasy Mini (QIAGEN) e utilizado para ensaios de RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) em um sistema de detecção de sequência ABI PRISM® 7900HT com módulo de bloco de 384 poços e acessório de automação (Applied Biosystems). Iniciadores e sondas para o sistema Taqman foram selecionados a partir do site da Applied Biosystems. As sequências dos pares de iniciadores de PCR e sondas fluorogênicas utilizadas para CXCR1, FBXO21, NFYA, NOTCH2, RAD51L1 e TBP estão disponíveis no site da Applied Biosystems (ID de ensaio de CXCR1: Hs_00174146_mi; ID de ensaio de FBXO21: Hs_00372141_mi, ID de ensaio de NFYA: Hs_00953589_mi, ID de ensaio de NOTCH2: Hs_01050719_mi, ID de ensaio de RAD51L1: Hs00172522_mi, ID de ensaio de TBP: Hs_00427620_mi). O nível de expressão relativa de RNAm de CXCR1, FBXO21, NFYA, NOTCH2, RAD51L1 foi computado com o relação gene TBP como padrão interno para normalizar as variações na qualidade do RNA e na quantidade de cDNA de entrada, conforme descrito anteriormente (25).

Ensaio de invasão. Ensaios foram feitos em triplicata em câmaras Transwell com insertos de filtro de polycarbonato de 8µm de poro para placas de 12-poços (Corning, NY). Filtros foram revestidos com 30 µl de extrato de membrana basal gelada 1:6 (Matrigel, BD-Bioscience) em DMEM/F12 incubado 1 hora a 37°C. Células foram adicionadas à câmara superior em 200 µl de meio livre de soro. Para o ensaio de invasão, 5000 células foram se-

meadas sobre filtros revestidos com Matrigel e a câmara inferior foi preenchida com 600 μ l de meio suplementado com 10% de soro humano (Cambrex) ou com 600 μ l de meio livre de soro suplementado com IL8 (100ng/mL). Após incubação de 48 horas, as células na parte inferior do filtro foram contadas usando microscopia ótica. A invasão relativa foi normalizada para as linhagens celulares correspondentes não separadas sob condição de soro.

Infecção por lentivírus. Para a transdução do gene da luciferase, células 70% confluentes de HCC1954, MDA-MB-453 e SUM159 foram incubadas durante a noite com uma mistura precipitada 1:3 de sobrenadantes lentivirais Lenti-LUC-VSVG (Vector Core, Ann Arbor, MI) em meio de cultura. No dia seguinte, as células foram coletadas por tripsina/EDTA e repicadas na proporção de 1:6. Após 1 semana de incubação, as células foram triadas de acordo com o fenótipo ALDEFLUOR e a expressão da luciferase foi verificada em cada população triada (positiva para ALDEFLUOR e negativa para ALDEFLUOR), adicionando 2 ml de D-luciferina a 0,0003% (Promega, Madison, WI) no meio de cultura e contando o fluxo de fótons pelo sistema de câmera de dispositivo (Xenogen, Alameda, CA).

Inoculação intracárdica. Camundongos NOD/SCID de seis semanas de idade foram anestesiados com mistura de isoflurano/ar a 2% e injetados no ventrículo esquerdo do coração com 100000 células em 100 μ L de PBS de Dulbecco estéril livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Para cada uma das três linhagens celulares (HCC1954, MDA-MB-453, SUM159) e para cada população (positiva para ALDEFLUOR, negativa para ALDEFLUOR e não triada), três animais foram injetados.

Deteção de bioluminescência. A bioluminescência basal foi avaliada antes da inoculação e inoculações de cada semana depois disso. Os camundongos foram anestesiados com mistura de isoflurano/ar a 2% e receberam uma dose única i.p. de 150 mg/kg de D-luciferina (Promega, Madison, WI) em PBS. Animais foram, em seguida, re-anestesiados 6 minutos após a administração da D-luciferina. Para a contagem de fluxo de fótons, um sistema de câmera de dispositivo acoplada à carga (Xenogen, Alameda, CA) foi usado com um sistema de distribuição de isoflurano de bocal cônico e aquecido para manter a temperatura corporal. Resultados foram analisados após 2 a 12 minutos de exposição usando o software de Living Image fornecido com o sistema de imagem Xenogen. A intensidade de sinal foi quantificada como a soma de todas as contagens de fluxo de fótons detectados dentro de uma região uniforme de interesse colocada manualmente durante o pós-processamento de dados. O fluxo de fótons normalizado representa a relação entre o fluxo de fótons detectado cada semana após inoculações e o fluxo de fótons detectado antes da inoculação.

Análise estatística. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ DP de pelo menos três experimentos individuais repetidos para cada grupo. As análises estatísticas utilizaram o programa SPSS (versão 10.0.5). Correlações entre grupos de amostra e parâmetros moleculares foram calculados com o teste exato de Fisher ou ANOVA unidirecional

para amostras independentes. Um valor de p de *0,05 foi considerado significativo.

A maioria das linhagens celulares de mama contém uma população positiva para ALDEFLUOR. O ensaio ALDEFLUOR (17) foi usado para isolar CSCs de 33 BCLs que representam as diversas características e subtipos moleculares do câncer de mama (20). Verificou-se que 23 das 33 linhagens celulares continham uma população de células positiva para ALDEFLUOR que variou de 0,2 a quase 100%. Todas as 16 BCLs basais/mesenquimais continham uma população positiva para ALDEFLUOR, enquanto 7 das 12 BCLs luminais não continham quaisquer detectáveis células positivas para ALDEFLUOR ($p = 0,0006$, teste exato de Fischer).

Células positivas para ALDEFLUOR têm a capacidade de formação de tumoresfera. Foi previamente relatado que células-tronco e progenitoras do epitélio mamário são capazes de sobreviver e proliferar em condições de independentes de ancoragem e formam colônias esféricas flutuantes que são denominadas mamoesferas (18). Dados de tumores de mama, assim como linhagens celulares, demonstraram que células semelhantes às células-tronco cancerosas ou células iniciadoras de câncer também podem ser isoladas e propagadas como "tumoresferas" em ensaios similares (26). Todas as células iniciadoras de mamoesferas na glândula mamária humana normal estão contidas dentro de uma população positiva para ALDEFLUOR (17). Para caracterizar a população positiva para ALDEFLUOR de BCLs, a capacidade das populações positivas e negativas para ALDEFLUOR de 184A1, SUM149 e SUM159 em formar tumoresferas foi comparada. Em cada linhagem celular, a população positiva para ALDEFLUOR apresentou maior capacidade formadora de tumoresfera em relação às células negativas para ALDEFLUOR.

Células BCL positivas para ALDEFLUOR têm propriedades de célula-tronco cancerosa in vivo. Para determinar a organização hierárquica da BCL, foram analisadas as propriedades de células-tronco das populações positivas e negativas para ALDEFLUOR das linhagens celulares MDA-MB-453, SUM159 e BrCA-MZ-01. As populações positivas para ALDEFLUOR destas três BCLs constituíram entre $3,54 \pm 1,73\%$ e $5,49 \pm 3,36\%$ da população total de células (Fig. 1A-B, G-H; Fig. 2A-B). Como mostrado na Fig. 1F, L o tamanho e a latência de formação de tumores se correlacionou ao número de células positivas para ALDEFLUOR injetadas. Notavelmente, 500 células positivas para ALDEFLUOR de MDA-MB-453 e 1.000 células positivas para ALDEFLUOR de SUM159 foram capazes de formar tumores. A capacidade de geração de tumor foi mantida através de passagens seriadas demonstrando a capacidade de auto-renovação dessas células. Em contraste, as células negativas para ALDEFLUOR não conseguiram gerar tumores, embora um crescimento limitado tenha sido produzido quando 50.000 células de MDA-MB-453 negativas para ALDEFLUOR foram injetadas. A marcação por H&E dos cortes de bolsa de gordura confirmou que os tumores formados por células positivas para ALDEFLUOR continham células

malignas, enquanto apenas células apoptóticas, residuais de Matrigel e tecido de camundongo foram observados nos locais das injeções de células negativas para ALDEFLUOR (Fig. 1E, K). Consistente com a população positiva para ALDEFLUOR ter características de célula-tronco cancerosa, tumores gerados por esta população recapitularam a heterogeneidade fenotípica do tumor inicial, com uma proporção similar de células positivas e negativas para ALDEFLUOR (Fig. 1C, I). Isso indica que as células positivas para ALDEFLUOR foram capazes de se auto-renovar, gerando células positivas para ALDEFLUOR e foram capazes de se diferenciar, gerando células negativas para ALDEFLUOR.

Quando células BrCa-MZ-01 foram separadas em componentes positivos e negativos para ALDEFLUOR, ambos foram capazes de geração de tumor. Tumores gerados pela população positiva para ALDEFLUOR consistiram tanto em células positivas como negativas para ALDEFLUOR, recapitulando a heterogeneidade fenotípica do tumor inicial. Em contrapartida, os tumores gerados pelas células negativas para ALDEFLUOR deram origem aos tumores de crescimento lento, contendo apenas células negativas para ALDEFLUOR. Em contraste com a capacidade de células positivas para ALDEFLUOR de serem transplantadas em série, passagens seriadas de tumores negativos para ALDEFLUOR produziram a diminuição do crescimento do tumor, não havendo crescimento após três passagens. Isto sugere que o componente positivo para ALDEFLUOR das células BrCa-MZ-01 contém células com propriedades de células-tronco, enquanto as células negativas para ALDEFLUOR contém células progenitoras capazes de sofrer um crescimento limitado, mas não de auto-renovação.

Caracterização de perfil de expressão gênica das populações de células positivas e negativas para ALDEFLUOR. Para determinar se as células positivas para ALDEFLUOR isoladas de diferentes BCLs expressavam um conjunto comum de genes de "célula-tronco cancerosa", as populações de células positivas e negativas para ALDEFLUOR isoladas de oito BCLs (184A1, BrCa-MZ-01, HCC1954, MDA-MB-231, MDA-MB-453, SK-BR-7, SUM49 e SUM159) foram analisados utilizando microarranjos de oligonucleotídeos de genoma inteiro da Affymetrix. O agrupamento hierárquico não supervisionado, aplicado às 16 amostras e aos 13.550 genes/ESTs filtrados, não separou as populações positivas e negativas para ALDEFLUOR. Em vez disso, as populações positivas e negativas para ALDEFLUOR se agruparam com a linhagem celular parental. Isto sugere que as diferenças de transcritos de mRNA entre linhagens celulares clonais prevalecem sobre as diferenças entre as células positivas para ALDEFLUOR e negativas para ALDEFLUOR. Isso sugere ainda que apenas um número limitado de genes é diferencialmente expresso entre as putativas células-tronco cancerosas e sua progênie.

Para determinar quais genes separariam populações positivas e negativas para ALDEFLUOR, o teste de Mann e Whitney U foi aplicado a todos os genes, menos aqueles

com expressão fraca e mal medida, ou seja, 25.285 conjuntos de sonda. Este teste identificou e classificou após a correção por FDR, 413 genes/ESTs que separaram as populações de células positivas e negativas para ALDEFLUOR. Os 28 genes superexpressos correspondentes a genes específicos são apresentados na Tabela 1 e os genes mais frequentemente subexpressos são apresentados na Tabela 2.

TABELA 1 – Genes Regulados Ascendentemente

Categoria	Símbolo	Descrição	Citobanda	ID de conjunto de sonda	Função
Genes anteriormente descritos por ter um papel na biologia de células-tronco	TPRXL	repetição tetrapeptídica semelhante a homeobox	chr3p25.1	239061_at	desenvolvimento embrionário inicial
	NOTCH2	homólogo 2 de Notch (<i>Drosophila</i>)	chr1p13-p11	202443_x_at	Programa de auto-renovação
	RBM15	proteína de motivo de ligação a RNA 15	chr1p13	1555700_a_at	determinação de fate de célula hematopoietica
	ST3GAL3	beta-galactosídeo alfa-2,3-sialiltransferase 3 ST3	chr1p34.1	1555181_a_at	manutenção dos antígenos embrionários SSEA-3 e -4
	NFYA	fator de transcrição nuclear Y, alfa	chr6p21.3	204107_at	Programa de auto-renovação
	PCNX	homólogo de pectinex (<i>Drosophila</i>)	chr14q24.2	213173_at	determinação de fate de célula neural de embrião em desenvolvimento inicial
Sinalização	FBXO21 *	proteína F-box 21	chr12q24.22	212231_at	Ubiquitinação
	WWOX	oxidoreductase contendo domínio WW	chr18q23.3-q24.1	210895_s_at	Degradação proteica, transcrição e splicing de RNA
	CAMK2B	proteína quinases dependente de cálcio/calmodulina (CaM quinases) II beta	chr22q12	34846_at	Sinalização de cálcio
	PNPLA2	contendo domínio de fosfolipase semelhante à patatina 2	chr1p15.5	39854_r_at	Hidrólise de triglicerídeos
	CLIC5	canal intracelular de cloreto 5	chr6p12.1-21.1	213317_at	Transporte de íon cloreto
	UGCG1	semelhante à UDP-glicose ceramida glicosiltransferase 1	chr2q14.3	222569_at	Glicosilação proteica
	FBXL18	proteína de repetição rica em leucina e F-box 18	chr7p22.2	220896_at	Ubiquitinação
	ADRBK1	quinase de receptor 1, beta, adrenérgico	chr11q13	38447_at	Fosforilação de receptores acoplados a proteína G
	SLC38A2	família carreadora de soluto 38, membro 2	chr12q	1559024_at	Transportador de aminoácido neutro
	IL13RA* (CXCR1)	receptor de interleucina 8, alfa	chr2q35	207004_at	Resposta inflamatória
Proteína de membrana	TAS2R14	receptor de paladar, tipo 2, membro 14	chr12p13	241897_at	Percepção do amargo
	CD300LB	membro b da família semelhante a molécula CD300	chr17q25.1	1554173_at	Resposta imune
	GIPC3	família contendo domínio GIPC PDZ, membro 3	chr10p13.3	236730_at	
Reparo de DNA	RAD51L1	semelhante a RAD51 (<i>S. cerevisiae</i>)	chr14q23-q24.2	1570166_a_at	Reparo de recombinação homóloga
Remodelagem de cromatina	ARID1B	domínio de interação rico em AT 1B (semelhante a SWI1)	chr6q25.1	225181_at	Remodelagem de cromatina (complexo SWI/SNF)
Citoesqueleto	EPPK1	epiplacina 1	chr8q24.3	208156_x_at	Manutenção dos filamentos intermediários de queratina
Matriz extracelular	COL11A2	colágeno, tipo XI, alfa 2	chr6p21.3	218063_s_at	Morfogênese esquelética
	KLK3	calicreína 3, (antígeno específico da próstata)	chr18q13.41	231829_x_at	Protease
RNA de interferência	EIF2C2	fator de iniciação à tradução eucariótica 2C, 2	chr8q24	213310_at	Silenciamento gênico mediado por RNA de interferência curto
Desconhecido	ZFP41	homólogo de proteína de dedo de zinco 41 (camundongo)	chr8q24.3	227898_s_at	Desconhecido
	FAM49B	Família com similaridade de sequência 49, membro B	chr8q24.21	243182_at	Desconhecido
	PSORS1C2	candidato 2 de suscetibilidade à psoríase 1	chr6p21.3	220835_at	Desconhecido

TABELA 2 – Genes Regulados Descendentemente

Categoria	Símbolo	Descrição	Citobanda	ID de conjunto de sonda	Função
Síntese de proteína	MRPL42*	Proteína ribossomal mitocondrial L42	chr12q22	217919_s_at	Síntese de proteína na mitocôndria
	MRPL54*	Proteína ribossomal mitocondrial L54	chr10p13.3	225797_at	Síntese de proteína na mitocôndria
	MRPL47*	Proteína ribossomal mitocondrial L47	chr3q26.33	223480_s_at	Síntese de proteína na mitocôndria
	MRPS23*	Proteína ribossomal mitocondrial S23	chr17q22-q23	223156_at	Síntese de proteína na mitocôndria
	EIF3S9*	Fator de iniciação de tradução eucariótica 3, Subunidade 9 (ela: 116kDa)	chr7p22.2	236274_at	Iniciação da síntese de proteína (complexo multiproteico EIF3)
Sinalização	ALG5*	Glicosilação asparagina-ligada homólogo 5	chr13q13.3	218203_at	Glicosilação de proteína
	DNAJC19*	Homólogo DnaJ (Hsp40), subfamília C, membro 19	chr3q26.33	225350_at	Importação da proteína mitocondrial
	HBLD2*	Domínio HESB-similar contendo 2	chr9q21.33	221425_s_at	Biogênese de cluster ion-enxofre
	GART*	Fosforibosilglicinamida Formiltransferase Fosforibosilglicinamida sintetase Fosforibosilaminimidazol sintetase	chr21q22.1	230097_at	Biossíntese de purina de novo
	NUP37*	Nucleoporina 37k Da	chr12q23.2	218822_at	Transporte de proteína intracelular ao longo da membrana nuclear
	RNF7*	Proteína dedo de anel 7	chr3q22-q24	224439_x_at	Sub-unidade da caixa SKP1-culina/CDC53-F
	DC2*	Proteína DC2	chr4q25	223001_at	Lipases de ubiquitina de proteína
	USP15*	Peptidase específica de ubiquitina 15	chr12q14	218681_s_at	Glicosilação de proteína
	COMMD6*	Domínio COMM contendo 6	---	225312_at	Degradação de proteína
	UBL5*	Ubiquitina-similar 5	chr10p13.3	218011_at	Inibição da sinalização NF-KappaB
Apoptose	MRPL41*	Proteína ribossomal mitocondrial L41	chr9q34.3	225425_s_at	Ubiquitinação
	PDCD10*	Morte celular programada 10	chr3q26.1	218907_s_at	Estabilização da proteína p53, arresto de ciclo celular (p21(WAF1/CIP1) e p27(Kip1) dependente)
	PDCD5*	Morte celular programada 5	chr10q12-	227751_at	Iniciação da apoptose
	NACA*	Complexo nascente-polipeptídeo-associado Polipeptídeo alpha	chr12q23-q24.1	222018_at	Diferenciação entróide
	FAM82B*	Família com s similaridade de sequência 82, elemento B	chr9q21.3	218540_s_at	Regulação da dinâmica de microtúbulo
	CCNL1*	Ciclina L1	chr3q25.32	1555411_a_at	Processamento pré-RNA
	PRPF39*	Fator de processamento pré-mRNA PRP39 Homólogo (S. cerevisiae)	chr14q21.3	220553_s_at	Processamento pré-RNA
	LSM3*	Homólogo LSM3, RNA nuclear pequeno U6 associado (S. cerevisiae)	chr3p25.1	202209_at	Processamento pré-RNA
	SFRS7*	Fator de splicing, rico em arginina/serina 7, 35kDa	chr2p22.1	213649_at	Regulação de splicing de RNA
	PRPF48*	Fator de processamento pré-mRNA PRP4 Homólogo (B. flexuosa)	chr8p25.2	202127_at	Processamento pré-RNA
Fosforilação oxidativa	ATP5S*	Sintetase ATP, transporte H+, complexo FO mitocondrial, sub-unidade s (fator B)	chr14q22.1	206992_s_at	Sub-unidade de sintetase mitocondrial de ATP
	NDUFA2*	Desidrogenase NADH (ubiquinona) 1 sub-complexo alpha_2	chr5q31	209224_s_at	Componentes do complexo 1 multi-subunidade enzima
	ATP5J2*	Sintetase ATP, transporte H+, complexo FO mitocondrial, sub-unidade F2	chr7q22.1	202961_s_at	Sub-unidade de sintetase mitocondrial de ATP
	IMMP1L*	Membrana mitocondrial interna IMP1 peptidase-similar	chr11p13	230556_at	Proteólise
	ASTE1*	Homólogo asteride 1 (Drosophila)	chr3q22.1	221135_s_at	Desconhecido
Desconhecido	MGC61571*	Proteína hipotética MGC61571	chr3p24.1	228283_at	Desconhecido
	WDR53*	Domínio de repetição WD 53	chr3q29	227814_at	Desconhecido
	DKFZP880A10121*	Proteína hipotética	chr7q21.13	234311_s_at	Desconhecido
	CHCHD8*	Domínio hélice-bobina-hélice contendo 8	chr11q13.4	220647_s_at	Desconhecido
	FLJ32745*	Proteína hipotética FLJ32745	chr2q13	235644_at	Desconhecido
	CHURC1*	Domínio Churchill contendo 1	chr14q23.3	233268_s_at	Desconhecido
	XTP3TPA*	Proteína XTP3-transitivada 1 A	chr10p11.2	218009_at	Desconhecido
	FLJ37953*	Proteína hipotética FLJ37953	chr2q33.1	235181_at	Desconhecido
	SNORD50A*	RNA nuclear pequeno, G/D caixa box 50A	chr8q14.3	244659_at	Desconhecido
	LOC844053*	Proteína hipotética LOC844053	chr1q41	235466_s_at	Desconhecido
	TMEM141*	Proteína transmembrana 141	chr9q34.3	225568_at	Desconhecido
	C8orf59*	Estrutura de leitura aberta do cromossomo 8 59	chr8q21.2	226165_at	Desconhecido

O poder de classificação desta assinatura de separação foi ilustrado, classificando as 16 amostras positiva e negativas para ALDEFLUOR com os 413 genes/ESTs diferencionalmente expressos. O agrupamento hierárquico classificou 15 das 16 amostras (Fig. 2A).

5

Vários genes conhecidos por desempenhar um papel na biologia de células-tronco estavam ascendentemente regulados nas populações positivas para ALDEFLUOR (Tabela 1), incluindo NFYA, NOTCH2, PCNX, RBM15, ST3GAL3 e TPRXL. Outros genes codificam proteínas que desempenham um papel putativo ou não caracterizado na função das células-tronco, como ARID1B, RAD51L1 e o receptor de quimiocina CXCR1/IL8RA (27). Genes subexpressos na população positiva para ALDEFLUOR estão envolvidos na diferenciação

10

celular, apoptose, splicing de RNA e metabolismo mitocondrial.

Para aumentar a estringência da análise, o limiar da análise de Mann e Whitney foi elevado para o risco 0,5 e obteve uma lista de 49 genes/ESTs que separou as populações positiva e negativa para ALDEFLUOR (genes com asterisco nas Tabelas 1-2). Com esta lista, todas as células positivas para ALDEFLUOR, com exceção de SK-BR-7, ficaram no mesmo grupo. Entre estes 49 genes/ESTs, 45 corresponderam a genes únicos identificados; apenas 3 destes 45 foram superexpressos no grupo positivo para ALDEFLUOR, enquanto 42 foram subexpressos. Genes superexpressos caracterizados codificam uma proteína F-box FBXO21 e CXCR1/IL8RA. Genes subexpressos incluem aqueles que codificam proteínas mitocondriais (MRPL41, MRPL42, MRPL47, MRPL54, MRPS23, IMMP1L) e fatores de diferenciação (NACA) e de splicing de pré-mRNA (LSM3, fator de processamento de pré-mRNA PRPF39 e PRPF4B). A validação cruzada que deixa um de fora (Leave-one-out) (LOOCV) a 0,5% de risco estimou a exatidão da predição da assinatura molecular identificadora e 88% das amostras foram preditas na classe certa com esta "assinatura de célula-tronco cancerosa", confirmando a análise supervisionada.

Avaliação de RT-PCR quantitativa confirmou um aumento significativo de CXCR1 e FBXO21 em células positivas para ALDEFLUOR. A análise por RT-PCR quantitativa de cinco genes discriminantes superexpressos em populações positivas para ALDEFLUOR (CXCR1/IL8RA, FBXO21, NFYA, NOTCH2 e RAD51L1) foi realizada. Três linhagens celulares utilizadas na análise de caracterização de perfis (BrCa-MZ-01, MDA-MB-453, SUM159) e duas linhagens celulares luminais adicionais (MCF7, S68) foram classificados pelo ensaio ALDEFLUOR e populações positivas e negativas para ALDEFLUOR foram processadas separadamente para análise de RT-PCR quantitativa. O nível de expressão na RT-PCR quantitativa de CXCR1 e FBXO21 é apresentado na Fig. 2 B e C. Os níveis de expressão gênica medidos por RT-PCR quantitativa confirmaram os resultados obtidos utilizando microarranjos de DNA com um aumento do nível de mRNA de CXCR1 e FBXO21 na população positiva para ALDEFLUOR em relação à população negativa para ALDEFLUOR ($p < 0,05$).

IL8 promove auto-renovação de células-tronco cancerosas. Os estudos de caracterização de perfil sugerem que o receptor de IL8 CXCR1/IL8RA foi consistentemente expresso na população de células positivas para ALDEFLUOR. Para confirmar esta associação, a expressão da proteína de CXCR1/IL8RA foi medida por citometria de fluxo em populações positivas e negativas para ALDEFLUOR. As populações positivas e negativas para ALDEFLUOR de quatro linhagens celulares diferentes foram isoladas por FACS, fixadas e marcadas com um anticorpo monoclonal de CXCR1 marcado com ficoeritrina. Como mostrado na Fig. 3A, células positivas para ALDEFLUOR estavam altamente enriquecidas com células positivas para CXCR1 em comparação com as populações ALDEFLUOR-negativas.

Para determinar se a sinalização de IL8 é importante na função de células-tronco, quatro BCLs foram tratadas com IL8 recombinante humana para determinar seu efeito sobre a população de células-tronco cancerosas, conforme medido pela formação de tumoresferas e pela atividade enzimática de ALDH. Como mostrado na Fig. 3B, a adição de IL8 aumentou a formação de tumoresferas primárias e secundárias de uma forma dose-dependente. Além disso, a IL8 aumentou a população ALDEFLUOR-positiva de uma forma dose-dependente em cada uma das quatro BCLs analisadas (Fig. 3C). Isso ilustra o poder da "assinatura CSC" para identificar vias que podem desempenhar um papel na função de células-tronco.

O eixo de IL8/CXCR1 está envolvido na invasão de células-tronco cancerosas. O eixo de IL8/CXCR1 foi relatado como desempenhador de um papel na invasão por células-tronco cancerosas (28, 29). Um ensaio de invasão de Matrigel foi utilizado, com soro como atrativo, para examinar a capacidade das populações de células positivas e negativas para ALDEFLUOR de três linhagens celulares diferentes (HCC1954, MDA-MB-453, SUM159) em invadir. Como mostrado na Fig. 4A, células positivas para ALDEFLUOR demonstraram invasão através de Matrigel 6 a 20 vezes maior que a da população negativa para ALDEFLUOR ($p < 0,01$). Quando usado como quimioatrativo, a IL8 (100 ng/mL) aumentou a invasão por células ALDEFLUOR-positivas ($p < 0,05$) (Fig. 4A). Em contraste com os seus efeitos sobre as células positivas para ALDEFLUOR, a IL8 não teve qualquer efeito sobre a capacidade invasiva de células negativas para ALDEFLUOR. Estes resultados indicam que as células-tronco cancerosas exibiram comportamento invasivo e além disso que a IL8 facilita esse processo.

Células positivas para ALDEFLUOR aumentaram o potencial metastático. Foi proposto que CSCs desempenham um papel crucial na metástase do câncer (30, 31). Os experimentos acima demonstraram que as células ALDEFLUOR-positivas têm maior capacidade invasiva em relação às células ALDEFLUOR-negativas. Para determinar a relação entre a positividade para ALDEFLUOR e a capacidade metastática, HCC1954, MDA-MB-453 e SUM159 foram infectadas com um sistema repórter de lentivírus e luciferase. Células infectadas com luciferase foram triadas utilizando o ensaio ALDEFLUOR e introduzidas em camundongos NOD/SCID por injeção intracardíaca. Uma suspensão de 100.000 células de cada população foi injetada e a metástase foi avaliada pela imagem de bioluminescência. Camundongos inoculados com células positivas para ALDEFLUOR desenvolveram metástases em diferentes locais e exibiram uma emissão maior de fluxo de fótons que camundongos inoculados com células não separadas, que desenvolveram não mais que uma metástase por camundongo, ou camundongos inoculados com células negativas para ALDEFLUOR, que desenvolveram apenas metástases ocasionais limitadas aos linfonodos (Fig. 4B-J). Cortes histológicos confirmaram a presença de metástases nesses locais (Fig. 4K-M). Assim, a capacidade metastática de BCLs é predominantemente mediada por CSCs

contidas na população positiva para ALDEFLUOR.

A hipótese de que tumores são organizados em uma hierarquia celular impulsiona-
da por CSCs tem implicações fundamentais para a biologia do câncer, assim como implica-
ções clínicas para a precoce detecção, prevenção e tratamento do câncer. Evidências das
CSCs baseou-se em grande parte em modelos de xenoenxerto de passagem primária e
inicial (32-34). Entretanto, o sucesso do estabelecimento do xenoenxerto de tumor de mama
foi baixo particularmente para certos subtipos moleculares. Em contraste com os tumores
primários, linhagens celulares estão disponíveis em quantidades ilimitadas e fornecem ape-
nas populações carcinomatosas para análise molecular sem o tecido normal e estroma. No
câncer de mama, foi produzido um grande número de linhagens celulares imortalizadas que
representam os diferentes subtipos moleculares encontrados em cânceres de mama huma-
nos primários (2, 20). Entretanto, uma questão fundamental permanece: com que seme-
lhança estas linhagens celulares são capazes de recapitular a biologia do câncer de mama
humano.

Evidência in vivo de células-tronco em linhagens celulares. Estudos recentes sugere-
rem que, embora linhagens celulares possam ser derivadas de modo clonal, elas contêm
uma hierarquia celular que representa diferentes estágios da diferenciação celular. Vários
estudos utilizaram marcadores como CD44+/CD24- para identificar CSCs dentro de linha-
gens celulares de câncer de mama. Entretanto, sua utilidade é limitada pela observação de
que frequentemente uma grande porcentagem de células dentro de uma linhagem celular
expressa esses putativos marcadores de células-tronco. Por exemplo, mais de 90% das
células em linhagens celulares de câncer de mama basal exibem o fenótipo CD44+/CD24-.
Na verdade, o fenótipo CD44+/CD24- não isolou a população tumorigênica dessas linha-
gens celulares (Ginestier *et al.* Cell Stem Cell 1:555-567., aqui incorporada como referência
em sua totalidade). Uma abordagem alternativa foi utilizada usar o SP dessas linhagens
celulares. Entretanto, estudos funcionais utilizando coloração Hoechst são limitados pela
toxicidade deste agente (35). Há também evidências de que a atividade funcional das célu-
las-tronco não está contida dentro do SP (36).

A atividade de ALDH avaliada pelo ensaio ALDEFLUOR isola células com proprie-
dades de células-tronco de vários tipos de câncer (14, 37). Neste exemplo foi demonstrado
que 23 das 33 BCLs (predominantemente linhagens basocelulares) contêm uma população
positiva para ALDEFLUOR. Falta de uma população positiva para ALDEFLUOR em algumas
BCLs luminais pode indicar que essas BCLs luminais são derivadas de células progenitoras
negativas para ALDEFLUOR.

Este exemplo utilizou ensaios *in vivo* em camundongos NOD/SCID para demonstrar
as propriedades de células-tronco das populações positivas para ALDEFLUOR. A auto-
renovação foi demonstrada por passagem seriada em camundongos NOD/SCID e a diferen-

ciação foi demonstrada pela capacidade de células positivas para ALDEFLUOR, mas não das negativas para ALDEFLUOR em regenerar a heterogeneidade celular do tumor inicial.

Uma assinatura de células-tronco de câncer de mama. Utilizando oito linhagens celulares de mama, este Exemplo identificou 413 genes cuja expressão discrimina células positivas de negativas para ALDEFLUOR. Essa assinatura contém uma série de genes conhecidos por desempenhar um papel na biologia das células-tronco. Genes superexpressos na população positiva para ALDEFLUOR incluem o homólogo 2 de Notch (NOTCH2), que regula a auto-renovação e a diferenciação de células-tronco mamárias (18, 38), NFYA, conhecido por regular a auto-renovação e a diferenciação de células-tronco. (39, 40), o homólogo de pecanex PCNX, RBM15/OTT, que desempenha um papel pleiotrópico em células-tronco hematopoéticas (41) e afeta a diferenciação mieloide através da sinalização de NOTCH (42), o fator semelhante a homeobox TPRXL envolvido no desenvolvimento embrionário, ST3GAL3, que codifica uma antígeno embrionário estágio-específico 4 sintase, associada ao desenvolvimento fetal e à carcinogênese renal e gástrica (43). Notavelmente, a proteína do antígeno embrionário estágio-específico 4 (SSEA-4) é expressa em populações de células-tronco, tais como células-tronco CXCR4+/CD133+/CD34+/lin- no sangue do cordão umbilical humano e células-tronco mamárias quiescentes (44).

Genes subexpressos na população positiva para ALDEFLUOR estão envolvidos na diferenciação celular, apoptose e oxidação mitocondrial. Eles incluem genes que codificam subunidades alfa de complexo associado ao polipeptídeo nascente NACA, proteínas de morte programada PDCD5 e PDCD10, proteína de ribossomo mitocondrial L41 (MRPL41), que induz a apoptose através de maneira P53-dependente e independente através de BCL2 e caspases e proteínas envolvidas em processos mitocondriais como a fosforilação oxidativa (NDUFA2, ATP5J2, IMMP1L) e síntese proteica na mitocôndria (MRPL42, MRPL47, MRPL54, MRPS23). A regulação descendente de genes apoptóticos em CSCs pode desempenhar um papel na resistência destas células à radiação e quimioterapia (45, 46). ALDH1A1 não foi identificado como um gene diferencialmente expresso na assinatura positiva para ALDEFLUOR. Entretanto, a análise do perfil de expressão gênica de BCLs individuais revelou que, embora algumas tenham exibido expressão diferencial de ALDH1A1 na população positiva para ALDEFLUOR, outras mostraram expressão diferencial de ALDH1A3, uma isoforma diferente de ALDH nesta população. Isto sugere que a expressão de diferentes isoformas de ALDH poderia contribuir para o fenótipo positivo par ALDEFLUOR.

De quimiocinas a "truncocinas." A expressão de CXCR1, um receptor de IL8, está aumentada em uma variedade de cânceres (47-50). Embora a expressão de IL8 esteja associada ao câncer de mama ER-negativo (51), esta quimiocina não foi anteriormente relatada como desempenhadora de papel na função de células-tronco. Sua implicação na regula-

ção de crescimento e metástase é bem estabelecida no câncer de próstata independente de androgênio (52). Além disso, o nível de expressão de IL8 está associado à tumorigenicidade e metástase através da angiogênese e produção de VEGF (53, 54). Os dados de expressão gênica foram validados de três maneiras. Primeiro, a análise por RT-PCR quantitativa confirmou um aumento significativo do RNAm de CXCR1 na população positiva para ALDEFLUOR tanto de linhagens celulares incluídas como não incluídas na análise de caracterização de perfil. Segundo, demonstrou-se utilizando citometria de fluxo que células contendo CXCR1 foram encontradas exclusivamente na população positiva para ALDEFLUOR. Terceiro, a IL8 recombinante aumentou a formação de mamoesfera e a porcentagem de células positivas para ALDEFLUOR em BCLs. O eixo IL8/CXCR1 assim, parece regular a proliferação ou auto-renovação de células-tronco mamárias. Já que células endoteliais e estromais secretam IL8, esta quimioquina parece desempenhar um papel na mediação de interações entre células-tronco tumorais e o microambiente tumoral.

Estudos recentes sugeriram um papel para as interleucinas/quimioquinas na regulação das CSCs (55, 56). Isso inclui um papel para a IL6 em CSCs de mama e para a IL4 na mediação da quimiorresistência de CSCs de cólon (56-59). Estes fatores podem estar envolvidos na associação entre inflamação e câncer. Isto também inclui um papel para CCL5 (RANTES), uma quimioquina secretada por células-tronco mesenquimais, que atua como um fator parácrino e intensifica a motilidade, invasão e metástase de células de câncer de mama (55).

As raízes da metástase. CSCs podem ser responsáveis pela mediação de metástases de tumor. Um elo entre CSC e metástase foi sugerido pela primeira vez com a identificação de genes de células-tronco em uma assinatura de 11 genes gerada usando o perfil comparativo de tumores metastáticos e primários em modelo de camundongo transgênico do câncer de próstata e pacientes com câncer (60). Essa assinatura foi também um poderoso preditor de recorrência da doença, morte após a terapia e metástases distantes em uma variedade de tipos de câncer. Este exemplo demonstrou que células positivas para ALDEFLUOR são mais metastáticas que células negativas para ALDEFLUOR e que a IL8, relatada previamente como desempenhadora de um papel na metástase tumoral, promove a invasão e quimiotaxia de células-tronco cancerosas, que preferencialmente expressam o receptor de IL8, CXCR1. A capacidade de isolar células-tronco cancerosas metastáticas de linhagens celulares deve facilitar os estudos sobre os mecanismos moleculares pelos quais as células-tronco cancerosas mediam a metástase do tumor.

EXEMPLO 2

Inibição de CXCR1 e Terapia de Combinação

Este exemplo descreve vários métodos utilizados para testar o efeito da inibição de CXCR1 em células tumorais, assim como a combinação da inibição de CXCR1 em combinação com um agente antimitótico (docetaxel).

Efeito da inibição de CXCR1 no crescimento celular e na população positiva para ALDEFLUOR da linhagem celular SUM159.

A linhagem celular SUM159 foi cultivada em condição aderente e as células tratadas usando o inibidor de CXCR1/CXCR2, Repertaxina, ou dois anticorpos específicos de bloqueio para CXCR1 ou CXCR2. Após 4 dias de tratamento, o efeito sobre o crescimento celular foi analisado usando o ensaio MTT (Figura 5A) e sobre a população de células-tronco cancerosas usando o ensaio ALDEFLUOR (Figura 5B). Mais de 95% de inibição do crescimento celular foi observado nas células tratadas com Repertaxina ou com o anticorpo de bloqueio a CXCR1, enquanto nenhum efeito foi observado para as células tratadas com o anticorpo de bloqueio a CXCR2 (Figura 5A). Curiosamente, efeito similar foi observado na população positiva para ALDEFLUOR com uma redução de 80% e 50% da população positiva para ALDEFLUOR nas células tratadas com Repertaxina e anticorpo de bloqueio a CXCR1 respectivamente (Figura 5B).

Tratamento com Repertaxina induz um efeito espectador mediado pela sinalização de FAS/ligante de FAS

Células da linhagem celular SUM159 foram cultivadas em condições aderentes e, em seguida, tratadas com Repertaxina, isoladamente ou em combinação com um antagonista de FAS. Curiosamente, a inibição do crescimento celular induzida pelo tratamento com Repertaxina foi parcialmente recuperada pela adição de um antagonista de FAS (anti/Fas-ligante da BD PharMingen (cat # 556371)). Além disso, as células tratadas com um agonista de FAS apresentaram uma inibição do crescimento celular similar àquele das células tratadas com Repertaxina. Estes resultados sugerem que o tratamento com a Repertaxina induz um efeito espectador mediado pela sinalização de FAS/ligante de FAS.

Efeito do tratamento com Repertaxina sobre a ativação de FAK, AKT e FOXOA3.

Para avaliar o efeito do tratamento com Repertaxina sobre a sinalização a jusante de CXCR1, células SUM159 foram cultivadas, durante 2 dias, em condição aderente na ausência ou na presença de 100nM de Repertaxina e marcadas por imunofluorescência com anticorpos contra p-FAK, p-AKT e FOXOA3. Nas células não tratadas (Fig. 7A), detectou-se que 30% das células expressando p-FAK e 10% das células expressando p-AKT apresentaram inativação, enquanto células tratadas com Repertaxina exibiram uma completa inativação de p-FAK e p-AKT (Fig. 7B). As células SUM159 não tratadas apresentaram 80% de células positivas no citoplasma para FOXOA3. Curiosamente, células SUM159 tratadas com Repertaxina apresentaram 80% de células positivas no núcleo para FOXOA3. A alteração na localização celular de FOXOA3 do citoplasma para o núcleo indica uma ativação da proteína FOXOA3.

Curvas de crescimento de tumores após o tratamento com Repertaxina, docetaxel ou com a combinação

O efeito de repertaxina, docetaxel, ou da combinação deles foi avaliado utilizando

uma linhagem celular de câncer de mama (8A, SUM159) e três xenoenxertos de câncer de mama humano gerados a partir de diferentes pacientes (8B, MC1; 8C, UM2; 8D, UM3). Para cada amostra, 50.000 células foram injetadas na bolsa de gordura mamária de camundongos NOD-SCID que foram monitorados pelo tamanho do tumor. Injeções foram iniciadas quando o tamanho do tumor era de cerca de 4 mm. A Repertaxina foi injetada (15 mg/Kg) duas vezes por dia por 28 dias ou uma vez por semana, docetaxel foi injetado I.P. (10 mg/Kg), ou a combinação (Repertaxina/Docetaxel) foi empregada. A Figura 8 mostra os tamanhos dos tumores antes e durante o desenrolar de cada tratamento indicado (seta, início do tratamento). Resultados similares foram observados para cada amostra (SUM159, MC1, UM2, UM3), com uma redução estatisticamente significativa do tamanho do tumor, quando tratadas com docetaxel isoladamente ou com a combinação repertaxina/docetaxel comparada ao controle ($p < 0,01$), enquanto nenhuma diferença significativa foi observada entre o crescimento dos tumores de controle e os tumores tratados com repertaxina.

Efeito do tratamento com repertaxina, docetaxel, ou com a combinação sobre a população de células-tronco cancerosas, conforme avaliado pelo ensaio ALDEFLUOR

A atividade de ALDH foi avaliada pelo ensaio ALDEFLUOR para analisar o tamanho das populações de células-tronco cancerosas em cada tumor (9A. SUM159, 9B. MC1, 9C. UM2, 9D. UM3) tratado com repertaxina, docetaxel ou com a combinação. Resultados similares são observados para cada amostra. Xenoenxertos tumorais tratados com docetaxel mostraram porcentagem similar ou aumento de porcentagem de células positivas para ALDEFLUOR em comparação com o controle, enquanto o tratamento com repertaxina isoladamente ou em combinação com docetaxel produziu uma diminuição estatisticamente significativa nas células positivas para ALDEFLUOR com 65% a 85% menos células-tronco cancerosas em comparação com o controle ($p < 0,01$).

Efeito do tratamento com repertaxina, docetaxel, ou com a combinação sobre a população de células-tronco cancerosas, conforme avaliado por implantação em um camundongo secundário.

Diluições em série de células obtidas de tumores primários (10A. SUM159, 10B. MC1, 10C. UM2., 10D. UM3) sem tratamento (controle) e tratados com repertaxina, docetaxel ou com a combinação foram implantados na bolsa de gordura mamária de camundongos NOD-SCID secundários. Tumores primários controle e tratados com docetaxel formaram tumores secundários em todas as diluições enquanto, apenas uma maior concentração de tumores primários tratados com repertaxina ou em combinação com docetaxel foi capaz de formar tumores secundários tardios, que eram de tamanho significativamente menor que o dos tumores controle ou tratados com docetaxel ($p < 0,01$). Além disso, 1.000 e 100 células primárias tratadas com a combinação não conseguiram formar tumores secundários para 3 das 4 amostras (SUM159, UM2, UM3).

O tratamento com repertaxina reduz o potencial metastático da linhagem celular SUM159

A linhagem celular SUM159 foi infectada com um lentivírus expressando luciferase e 250.000 células infectadas com luciferase foram inoculadas no coração de camundongos NOD/SCID. Os camundongos foram organizados em dois grupos. Os dois grupos de camundongos foram tratados 12 horas após a injeção intracardíaca quer com injeção s.c. de solução salina quer com injeção s.c. de repertaxina (15mg/kg), duas vezes por dia durante 28 dias. A formação de metástase foi monitorada através de imagem de bioluminescência (11B: Camundongos tratados com solução salina; 11C: Camundongos tratados com repertaxina). A quantificação do fluxo de fótons normalizado medido em intervalos semanais após a inoculação revelou um aumento estatisticamente significativo da formação de metástase no grupo de camundongos tratados com solução salina em comparação ao grupo de camundongos tratados com repertaxina (11A).

EXEMPLO 3

Tratamento de células-tronco cancerosas por bloqueio de CXCR1

Este exemplo demonstra o efeito da inibição de CXCR1 nas células tumorais, tanto através de ensaios *in vitro* como de modelos de camundongo.

Dissociação do tecido mamário. Cem a duzentos gramas de tecido mamário normal de mamoplastias de redução foram picados com bisturis, dissociados enzimaticamente e células individuais foram cultivadas em suspensão para gerar mamoesferas ou sobre um substrato de colágeno em condição aderente para induzir a diferenciação celular (Dontu *et al.* Genes Dev. 17:1253-1270., aqui incorporada como referência em sua totalidade).

Cultura de células. Linhagens celulares de câncer de mama foram cultivadas usando condições de cultura recomendadas (Charafe-Jauffret *et al.* Cancer Res. 69:1302-1313., aqui incorporada como referência em sua totalidade). Linhagens celulares de câncer de mama foram tratadas em condição aderente com repertaxina (Sigma-Aldrich), anticorpo monoclonal de camundongo anti-CXCR1 humano (Clone 42705, R&D Systems), anticorpo monoclonal de camundongo anti-CXCR2 humano (clone 48311, R&D Systems), anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD95 humano (clone DX2, BD Pharmingen) utilizado como um agonista da sinalização de FAS, anticorpo monoclonal de camundongo anti-FAS-ligante humano (clone NOK-1, BD Pharmingen) utilizado como um antagonista da sinalização de FAS, ou com docetaxel (Taxotere, da Sanofi-Aventis).

Viabilidade celular. Para ensaios de MTT, as células foram plaqueadas em condições de aderência em placas de 96 poços a 5.000 células por poço. Depois um dia, o tratamento com repertaxina foi iniciado. O efeito do tratamento com repertaxina na viabilidade celular foi estimado em momentos diferentes pela adição de 20 µL da solução de MTT (5 mg/mL em PBS) em cada poço. As células foram então incubadas por 1 hora a 37°C, seguida pela adição de 50 µL de DMSO a cada poço. A absorbância foi medida a 560 nm em lei-

tor de placas de fluorescência (Spectrafluor, Tecan). Para ensaios TUNEL, as células foram plaqueadas em condições de aderência em placas de 6 poços a 50.000 células por poço. Depois um dia, o tratamento com repertaxina foi iniciado. O número de células apoptóticas foi estimado após quatro dias de tratamento. As células foram fixadas em 3,7% de formalde-
 5 ído e coradas utilizando o kit TACS TdT (R&D Systems). Os núcleos foram contracorados com DAPI/antifade (Invitrogen). Os cortes foram examinados com um microscópio de fluorescência (Leica, Bannockborn, IL, EUA), com células apoptóticas detectadas em verde.

Ensaio ALDEFLUOR. O kit ALDEFLUOR (StemCell technologies) foi usado para isolar a população com alta atividade enzimática de ALDH usando um FACStarPLUS (Bec-
 10 ton Dickinson), como descrito anteriormente (Ginestier *et al.* Cell Stem Cell 1:555-567., aqui incorporada como referência em sua totalidade). Para eliminar células de origem de camundongos dos tumores xenotransplantados, a população celular foi marcada com um anticorpo anti-H2Kd (BD Biosciences, 1/200, 20 min no gelo), seguido por marcação com um anticorpo secundário marcado com ficoeritrina (PE) (Jackson labs, 1/250, 20 min no gelo).

Teste ELISA. Para medir o nível de ligante de FAS solúvel secretado no meio de cultura de células tratadas ou não com repertaxina, foi utilizado o Elisa de Human sFAS Ligand (Bender MedSystems). A absorbância foi lida em um espectrofotômetro utilizando 450 nm como o comprimento de onda primário.

Transferência (blotting) de Western. As células foram lisadas em tampão de Laemmli e carregadas em géis de SDS-poliacrilamida. As transferências foram incubadas com os respectivos anticorpos primários diluídos em TBST (contendo 0,1% de Tween20 e 2% de BSA), quer durante a noite a 4°C quer por 2 horas em temperatura ambiente. As transferências foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários apropriados (GE Healthcare, UK) e detectadas usando o substrato quimioluminescente SuperSignal West Pico (Pierce).

Imunomarcação. Para a marcação de imunofluorescência, células positivas para CXCR1 triadas foram fixadas com metanol a 95% a -20°C por 10 minutos. As células foram reidratadas em PBS e incubadas com os respectivos anticorpos em temperatura ambiente por 1 hora. Os anticorpos primários utilizados foram P-FAK (1:50, Cell Signaling Technology), P-AKT (1:300, Cell Signaling Technology) e FOXO3a (1:250, Cell Signaling Technology). As lâminas foram em seguida lavadas e incubadas por 30 minutos com anticorpos secundários conjugados a PE (Jackson Labs). Os núcleos foram contracorados com DAPI/antifade (Invitrogen) e cobertos com lamínulas. Os cortes foram examinados em um microscópio de fluorescência (Leica, Bannockborn, IL, EUA). A imuno-histoquímica para a detecção da expressão de ALDH1 (1:100, BD Biosciences), P-FAK, P-AKT, FOXO3a foi
 30 feita em corte de parafina (Ginestier *et al.* Am. J Pathol. 161:1223-1233., aqui incorporada como referência em sua totalidade). A marcação foi feita utilizando o kit Histostainplus (Zymed laboratories). Diaminobenzidina (DAB) ou 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) foi usado como

cromógeno e os cortes foram contracolorados.

Modelo animal. A tumorigenicidade de células SUM159 ALDEFLUOR-positivas/CXCR1-positivas e ALDEFLUOR-positivas/CXCR1-negativas foi avaliada em camundongos NOD/SCID (Ginestier *et al.* Cell Stem Cell 1:555-567., aqui incorporada como referência, em sua totalidade). A linhagem celular SUM159 e três xenoenxertos de câncer de mama humano primário gerados a partir de três pacientes diferentes (MC1, UM2, UM3) foram utilizados para determinar a eficiência do tratamento com repertaxina sobre o crescimento tumoral (Ginestier *et al.* Cell Stem Cell 1:555-567., aqui incorporada como referência em sua totalidade). Células destes tumores foram transplantadas ortotopicamente na bolsa de gordura depurada humanizado de camundongos NOD/SCID, sem cultivo *in vitro*. Bolsas de gordura foram preparadas como descrito anteriormente (Ginestier *et al.* Cell Stem Cell 1:555-567., aqui incorporada como referência em sua totalidade). Cinquenta mil células de cada xenotransplante foram injetadas na bolsa de gordura humanizada de camundongos NOD/SCID e o crescimento do tumor foi monitorado. Quando o tamanho do tumor era de aproximadamente 4 mm, o tratamento com repertaxina isoladamente (s.c., 15mg/Kg duas vezes ao dia, durante 28 dias), docetaxel isoladamente (i.p., 10mg/kg, uma vez por semana, durante 4 semanas), em combinação (repertaxina/docetaxel), ou um grupo controle injetado com salina (i.p., uma vez por semana e s.c. duas vezes ao dia, durante 28 dias) foi iniciado. Os animais foram sacrificados, quando os tumores tinham aproximadamente 1,5 cm no maior diâmetro, para evitar a necrose do tumor e em conformidade com os regulamentos para o uso de animais vertebrados em pesquisa. Uma parte de cada bolsa de gordura injetada foi fixada em formalina e incluída em parafina para análise histológica. O restante das células tumorais foram re-implantadas em camundongos NOD/SCID secundários. Diluições seriadas de células foram utilizadas para a re-implantação com a injeção de 10.000, 1.000 e 100 células para cada tumor tratado.

Cultura independente de ancoragem. BCLs tratadas, em condições de aderência, com repertaxina (100nM), anticorpo anti-CXCR1 (10µg/ml), ou anti-CXCR2 (10µg/ml) foram dissociadas e plaqueadas como células isoladas em placas de adesão ultrabaixa (Corning, Acton, MA) em baixa densidade (5.000 células viáveis/mL). As células foram cultivadas como descrito anteriormente (Charafe-Jauffret *et al.* Cancer Res. 69:1302-1313., aqui incorporada como referência em sua totalidade). Culturas subsequentes após a dissociação de tumoresferas primárias foram plaqueadas em placas de adesão ultra-baixo em uma densidade de 5.000 células viáveis/mL. A capacidade de células em formar tumoresferas foi quantificada após a primeira (tumoresferas primárias) e a segunda (tumoresferas secundárias) passagem.

Extração de RNA e qRT-PCR. Após as células SUM159 serem tratadas, o RNA total foi isolado utilizando o kit RNeasy Mini (QIAGEN) e utilizado em ensaios de RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) em um sistema de detecção de sequências ABI PRISM® 7900HT. Inicia-

dores e sondas para o sistema Taqman foram selecionados a partir do site da Applied Biosystems (www.ponto.appliedbiosystems.ponto.com) (ID de ensaio de FAS-Ligante: Hs_00899442_mi; ID de ensaio de IL8: Hs_00174103_mi, ID de ensaio de TBP: Hs_00427620_mi). O nível de expressão relativa de RNAm de FAS-Ligante e IL8 foi computado com relação ao gene TBP como padrão interno para normalizar as variações na qualidade do RNA e na quantidade de cDNA de entrada, conforme descrito anteriormente (Ginestier *et al.* Clin. Cancer Res. 12:4533-4544., aqui incorporada como referência em sua totalidade).

Análise por citometria de fluxo. A marcação de CD44/CD24/Lin foi realizada (Ginestier *et al.* Cell Stem Cell 1:555-567., aqui incorporada como referência, em sua totalidade). A marcação de CD95/FAS foi realizada utilizando-se um anti-CD95 marcado com APC (1:20, BD biosciences). Para a marcação com CXCR1 e CXCR2, anticorpos primários anti-CXCR1 (1:100, Clone 42705, R&D Systems) e anti-CXCR2 (1:100, clone 48311, R&D Systems) foram seguidos por uma marcação com um anticorpo secundário anti-camundongo marcado com PE (diluição 1:250, Jackson Labs). Células frescas foram coradas com 1µg/mL de PI (Sigma) por 5 min para viabilidade.

Infecção viral. Duas construções lentivirais diferentes foram produzidas para a expressão do gene da luciferase (Lenti-LUC-VSVG) (Charafe-Jauffret *et al.* Cancer Res. 69:1302-1313., aqui incorporada como referência, em sua totalidade) e para a inibição da expressão de PTEN (Lenti-PTEN-SiRNA-DsRed) (Korkaya *et al.* PLoS Biolog. 7:e1000121., aqui incorporada como referência em sua totalidade), respectivamente. Todas as construções lentivirais foram preparadas pela University of Michigan Vector. Uma construção adenoviral para a superexpressão de FAK (Ad-FAK-GFP) também foi utilizada (Luo *et al.* Cancer Res. 69:466-474., aqui incorporada como referência em sua totalidade). A infecção de células com diferentes vetores foi realizada como descrito previamente (Charafe-Jauffret *et al.* Cancer Res. 69:1302-1313., aqui incorporada como referência, em sua totalidade). A eficiência de infecção foi verificada pela mensuração do percentual de células expressando DsRed ou GFP.

Inoculação intracardíaca. Camundongos NOD/SCID de seis semanas de idade foram anestesiados com mistura de isoflurano/ar a 2% e injetados no ventrículo esquerdo do coração com 250.000 células em 100 µL de PBS de Dulbecco estéril livre de Ca²⁺ e Mg²⁺. Para cada uma das três linhagens celulares (HCC1954, MDA-MB-453 e SUM159) e para cada tratamento (salina ou repertaxina) seis animais foram injetados. Doze horas após as injeções intracardíacas, os camundongos foram iniciados em injeções duas vezes ao dia de repertaxina ou soro fisiológico para os controles.

Deteção de bioluminescência. A bioluminescência basal foi avaliada antes da inoculação e inoculações de cada semana depois disso. Procedimentos de detecção de bioluminescência foram realizados conforme descrito anteriormente (Charafe-Jauffret *et al.* Cancer Res. 69:1302-1313., aqui incorporada como referência, em sua totalidade). O fluxo de

fótons normalizado representa a relação entre o fluxo de fótons detectado cada semana após inoculações e o fluxo de fótons detectado antes da inoculação.

A expressão de CXCR1 subdivide as populações de células-tronco cancerosas. A identificação de vias de sinalização celular que regulam as células-tronco cancerosas (CSC) fornece potenciais alvos terapêuticos em uma população de células. Uma assinatura de CSC de mama baseada em caracterização de perfil de expressão gênica que continha vários genes potencialmente envolvidos nas vias regulatórias de CSC de mama foi identificada (Charafe-Jauffret *et al.* Cancer Res. 69:1302-1313., aqui incorporada como referência, em sua totalidade). Entre os genes superexpressos na população de CSC de mama, CXCR1, um receptor que se liga a quimiocina pró-inflamatório IL-8/CXCL8, pareceu ser um candidato promissor já que a IL-8 recombinante estimulou a auto-renovação de CSCs de mama (Charafe-Jauffret *et al.* Cancer Res. 69:1302-1313., aqui incorporada como referência, em sua totalidade). Utilizando citometria de fluxo, a expressão da proteína CXCR1 foi medida na população CSC de mama, conforme avaliado pelo ensaio ALDEFLUOR nas linhagens celulares de câncer de mama humano HCC1954, MDA-MB-453 e SUM159. Células com propriedades funcionais de células-tronco em xenoenxertos de camundongo NOD/SCID estavam contidas na população de células ALDEFLUOR-positivas (Charafe-Jauffret *et al.* Cancer Res. 69:1302-1313., aqui incorporada como referência, em sua totalidade). A população CXCR1-positiva, que representa menos de 2% da população total, estava quase exclusivamente contida na população ALDEFLUOR-positiva (VEJA a FIG.12A e a Tabela 4).

Tabela 4.

	ALDEFLUOR (%)	C) Sobreposição CXCR1/ALDEFLUOR IR (%)	
Linhagens celulares de câncer de mama			
HCC1954	3.42	1.72	0.94
MDA-MB-453	4.22	0.8	0.5
SUM159	5.24	0.52	0.48
Xenoenxertos de câncer de mama humano			
MC1	12.3	1.81	1.32
UM2	8.4	1.23	0.88
UM3	9.7	0.84	0.76

A expressão CXCR2 também foi avaliada. CXCR2 é um receptor que pode também se ligar a IL-8/CXL8, embora com menor afinidade em comparação com CXCR1. Em contraste com as células CXCR1 positivo, as células CXCR2 positivo foram igualmente distribu-

idas entre as populações ALDEFLUOR positivo e ALDEFLUOR negativo (ver figura 12A). Para determinar a organização hierárquica da população de células-tronco cancerosas de acordo com a expressão CXCR1, populações de células ALDEFLUOR-positivo/CXCR1-positivo e ALDEFLUOR-positivo/CXCR1-negativo foram ordenadas e injetadas em camundongos NOD / SCID (ver FIG. 13 Ambas as populações de células geraram tumores. A cinética de crescimento do tumor foi correlacionada com a latência e o tamanho da formação do tumor e o número de células injetadas. Tumores gerados pela população ALDEFLUOR-positivo/CXCR1-positivo reconstituíram a heterogeneidade fenotípica do tumor inicial após passagens seriadas considerando que a população ALDEFLUOR-positivo/CXCR1-negativo deu origem aos tumores que contêm apenas células ALDEFLUOR-positivo/CXCR1-negativo. Estes resultados sugerem que a hierarquia celular CSC é organizada de acordo com a expressão CXCR1, porém as duas populações de células tumorais exibiram capacidade similar.

O bloqueio CXCR1 diminui o câncer de mama na população de células-tronco in vitro. Três linhas de células diferentes foram tratadas com repertaxina (100nM), um inibidor de CXCR1 / 2, para avaliar o efeito do bloqueio CXCR1 sobre a população de mama CSC (Bertini *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. SA 101:11791-11796., aqui incorporado por referência, na sua totalidade). Para SUM159, após três dias de tratamento, uma redução de cinco vezes na proporção de células ALDEFLUOR-positiva foi observada (VER FIG. 12B). Um efeito similar foi observado após o tratamento de células SUM159 com um anticorpo de bloqueio anti-CXCR1. Em contraste, nenhum efeito foi observado após o tratamento com um anticorpo de bloqueio anti-CXCR2, sugerindo que os efeitos de repertaxina sobre a população ALDEFLUOR-positivo foram mediadas por CXCR1.

Dados de tumores de mama, bem como linhas de células, demonstram que as células-tronco cancerosas ou células iniciadoras de câncer também podem ser isoladas e propagadas como "tumoresferas" na cultura de suspensão (Ponti *et al.* Cancer Res. 65:5506-5511., aqui incorporado por referência, na sua totalidade). Após três dias de tratamento com repertaxina ou com o anticorpo de bloqueio anti-CXCR1, quando células foram desanexadas e cultivadas em suspensão, uma diminuição de oito vezes na formação da tumoresfera primária e secundária foi observada em relação aos controles. Em contraste, o anticorpo anti-CXCR2 de bloqueio não teve nenhum efeito sobre a formação da tumorsphere (VER FIG. 14).

Surpreendentemente, após cinco dias de tratamento com repertaxina observamos uma diminuição maciça na viabilidade da população celular total avaliada pelo teste de MTT, com apenas 3% das restantes células viáveis (ver FIG. 12C). Resultados semelhantes foram observados com o anticorpo anti-CXCR1 de bloqueio, mas não os anticorpos de bloqueio anti-CXCR2, indicando que este efeito foi dependente do bloqueio de CXCR1. Este efeito de

repertaxina foi retardado com perda de viabilidade celular a partir de três dias após o tratamento (ver FIG. 15A). O tratamento com repertaxina induziu um efeito similar na linha celular do câncer da mama HCC1954 enquanto nenhum efeito foi observado em células MDA-MB-453 que abrigam uma mutação PTEN (Hollestelle *et al.* Cancer Res. 5:195-201., aqui incorporado por referência, na sua totalidade). (VIDE FIG. 14, 15B-C, e 16).

Utilizando um ensaio TUNEL, as células SUM159 foram marcadas após 4 dias de tratamento com repertaxina e um decréscimo maciço da viabilidade celular, devido à indução de apoptose, com 36% de células apoptóticas detectadas após o tratamento de repertaxina foi observada (ver FIG. 12D). Os resultados sugerem que o bloqueio CXCR1 resulta em uma diminuição da população de mama CSC seguida de indução de apoptose em massa na população restante volume do tumor.

Bloqueio CXCR1 induz a morte celular nas células CXCR1 negativo através de um efeito espectador. A observação de que uma morte de célula maciça de anticorpos induz bloqueio de repertaxina ou anti-CXCR1 apesar do fato de que a população CXCR1-positivo representava menos de 2% da população total de célula sugeriu que bloqueio de CXCR1 em células CXCR1-positivo induziu a morte de células CXCR1-negativo através de um efeito atmosférico. As populações classificadas de CXCR1-positivo e CXCR1-negativo foram tratadas com repertaxina (ver FIG. 12E). Repertaxina diminuiu a viabilidade celular na população CXCR1 positivo dentro de três dias, enquanto nenhum efeito foi observado na população CXCR1-negativo. Repertaxina induziu a morte celular em massa de células separadas. O efeito de repertaxina na viabilidade celular das populações não separadas e CXCR1-positivo foi dependente de dose (ver FIG. 12E). Os resultados são consistentes com o tratamento de repertaxina direcionados à população CXCR1 positivo que, por sua vez, induz a morte de célula CXCR1 negativo através de um efeito espectador.

Para determinar se este efeito foi mediado por um fator solúvel induzido por repertaxin, o meio condicionado foi coletado da população CXCR1 positivo depois de três dias de tratamento de repertaxina e dialisada este meio, utilizando uma membrana de 3,5 KDa exclusão, a fim de remover repertaxina do meio, mantendo moléculas maiores que 3,5 KDa. O meio condicionado dialisado induziu uma diminuição maciça da viabilidade celular em ambas as populações CXCR1-negativo e não separadas, mas não na população CXCR1-positivo (ver FIG. 12F). Esses resultados demonstram que o bloqueio de CXCR1 na população CXCR1 positivo induz a morte celular na população CXCR1 negativo através de um fator não solúvel dialisável. Embora a população CXCR1 positivo é sensível a repertaxin, é resistente ao fator de morte dialisável.

O efeito induzido pelo espectador de bloqueio de CXCR1 é mediado por sinalização FAS-ligante/FAS. A interação FAS-ligante/FAS é ativada em diferentes estádios fisiológicos, como a involução da glândula mamária ou em condições de lesão tecidual, incluindo a indu-

zida pela quimioterapia (Chhipa *et al.* J Cell Biochem. 101:68-79., Song *et al.* J Clin. Invest 106:1209-1220., aqui incorporado por referência em sua totalidade). O nível de FAS solúvel ligante no meio das células tratadas com SUM159 repertaxina utilizando um teste ELISA para avaliar o papel da interação FAS-ligante/FAS na mediação do efeito observador de apoptose induzida por CXCR1 bloqueio. Mais do que um aumento de cinco vezes de FAS solúvel ligante no meio das células tratadas por quatro dias com repertaxina em comparação com células não tratadas foi observado (ver FIG. 17A). A regulação da transcrição do FAS-ligante por tratamento repertaxina medindo FAS-ligante nível de mRNA foi confirmada por RT-PCR (ver FIG. 17B). Um aumento de 4 vezes do nível de mRNA de FAS ligante na repertaxina trataram células foi observada em comparação com células não tratadas. Resultados semelhantes foram observados após o tratamento com um agonista FAS que ativa a sinalização FAS, indicando que a FAS ligante é um alvo da sinalização FAS gerando um ciclo positivo de feed-back. 100% das células SUM159 expressaram a proteína FAS, conforme determinado por citometria de fluxo. Tratamento das células SUM159 com o agonista FAS reproduziu o efeito de matar observado com o tratamento repertaxina com redução acentuada da viabilidade celular (ver FIG. 17C). O efeito do tratamento repertaxina na viabilidade celular foi parcialmente compensado por um anticorpo bloqueador anti-FAS-Ligante, com 44% de células remanescentes viáveis após o tratamento com repertaxina e anticorpo anti-FAS-ligante em comparação com apenas 3% com repertaxina sozinho (veja FIG. 17C). Os resultados sugerem que a morte celular massiva induzida por repertaxina é devido a um efeito de espectador mediada pela via FAS-Ligante/FAS.

Tratamento de células SUM159 com o agonista do FAS resultou em um aumento de dez vezes e três vezes no percentual de células positivas e CXCR1 ALDEFLUOR-positivo, respectivamente (ver FIG. 17D / E e 18). Os efeitos de repertaxina em ambas as populações não foi resgatado pelos anti-FAS-ligante (ver FIG. 17D / E), sugerindo que a população ALDEFLUOR positivo que contém a população CXCR1 positivo, enquanto diretamente sensível ao bloqueio CXCR1 que por sua vez, induz a produção de FAS-ligante por estas células são resistentes à FAS-ligante/FAS pró-apoptótico de sinalização. Em contraste, a população de células ALDEFLUOR negativo em massa não expressam CXCR1 mas é sensível à morte celular mediada por FAS-ligante.

A FAS-ligante/FAS sinalização desempenha um papel importante durante a involução da glândula mamária (Song *et al.* J Clin. Invest 106:1209-1220., aqui incorporado por referência em sua totalidade). O efeito do bloqueio CXCR1 em células epiteliais mamárias humanas normais obtidas de mamoplastia de redução foi examinado. Como observado em linhas de células cancerígenas da mama, células mamárias CXCR1 positivo normais foram quase exclusivamente contidas na população ALDEFLUOR-positivo (ver FIG. 19A). Para determinar se a sinalização IL-8 é importante no tronco da mama normal / função de células

progenitoras, células epiteliais mamárias normais cultivadas em suspensão foram tratados com humanos recombinantes IL-8 e determinado o seu efeito sobre a população CSC, medida pela formação de mamoesferas (Dontu *et al.* Genes Dev. 17:1253-1270., aqui incorporado por referência em sua totalidade). A adição de IL-8 aumentou a formação de mamoesferas primária e secundária de uma forma dependente de dose (ver FIG. 19B), sugerindo que o eixo IL-8/CXCR1 pode estar envolvido na regulação do tronco mamário normal / proliferação de células progenitoras ou auto-renovação. O tratamento com o agonista ou repertaxina FAS não teve efeito sobre a viabilidade das células epiteliais mamárias normais cultivadas em condições de aderência, mesmo quando altas concentrações de repertaxina (500nm) foram utilizadas (ver FIG. 16A). No entanto, como observado para as linhas de células de câncer de mama, um aumento FAS solúvel ligante foi detectado no meio de células epiteliais mamárias normais tratadas com repertaxina (ver FIG. 20B). Essa observação pode ser explicada pela ausência de expressão de FAS nas células epiteliais normais cultivadas sob estas condições (ver FIG. 20C). Isto é consistente com estudos que demonstram que a expressão de FAS na glândula mamária ocorre apenas durante o processo de involução seguintes de lactação (Song *et al.* J Clin. Invest 106:1209-1220., aqui incorporado por referência em sua totalidade). Em contraste com a ausência de efeito sobre a população em massa de células do epitélio mamário normal, repertaxina diminuiu significativamente a formação mammosphere por essas células (ver FIG. 20C).

Estes resultados sugerem que o eixo IL-8/CXCR1 desempenha um papel importante na regulação e na sobrevivência do tronco normais e malignas epiteliais mamárias / populações de células progenitoras. A capacidade de afetar a população de células em massa através de um efeito de espectador mediado por FAS-ligante pode estar relacionado com o nível de expressão de FAS nestas células.

Efeitos do bloqueio CXCR1 sobre células-tronco cancerosas são mediadas pela via FAK/AKT/FOXO3A. CXCR1 age através de uma via de transdução de sinal que envolve a fosforilação da quinase de adesão focal (FAK), resultando na ativação da AKT (Waugh *et al.* Clin. Cancer Res. 14:6735-6741., aqui incorporado por referência, na sua totalidade). Para avaliar o impacto do bloqueio CXCR1 da ativação FAK e AKT o nível de FAK e proteínas AKT fosforiladas foi medido por western blot para as três linhas de células diferentes. Para SUM159 e HCC1954, foi detectada uma diminuição de FA fosforilação de FAK Tyr³⁹⁷ e AKT Ser⁴⁷³ em células tratadas com repertaxina em comparação com células não tratadas, sugerindo que os efeitos de repertaxina podem ser mediados pela via FAK / AKT (ver figuras. 21A e 22). A observação de que MDA-MB453 é resistente ao tratamento de repertaxina pode ser explicado pela presença de uma mutação PTEN(919G> A), que ativa a via PI3K/AKT (Hollestelle *et al.* Mol. Cancer Res. 5:195-201., aqui incorporado por referência, na sua totalidade). Nenhuma modificação de fosforilação de FAK Tyr³⁹⁷ and AKT Ser⁴⁷³ foi detectado

após o tratamento de repertaxina em linha celular MDAMB453 (ver FIG. 22). Para confirmar um papel funcional da via FAK / AKT na mediação dos efeitos do bloqueio CXCR1, duas construções virais foram utilizadas, um derrubando a expressão PTEN através de um PTEN shRNA e a outra levando a superexpressão de FAK. PTEN, através da sua fosfatase lipídica antagoniza a sinalização PI3-K/AKT (Vivanco *et al.* Nat. Rev. Cancer 2:489-501., aqui incorporado por referência, na sua totalidade). PTEN knockdown resultou na ativação de AKT, como demonstrado pelo aumento da fosforilação AKT Ser⁴⁷³ (ver figuras. 21A e 22). knock-down PTEN bloqueou o efeito do tratamento sobre repertaxina FAK e atividade de AKT. A superexpressão FAK também bloqueou os efeitos de repertaxina e induziu a ativação da FAK e AKT, medido pelo aumento da expressão de fosforilação de FAK Tyr³⁹⁷ e AKT Ser⁴⁷³. Estes resultados indicam que os efeitos do bloqueio CXCR1 são mediados pela sinalização FAK / AKT.

O uso da marcação da imunofluorescência em células-CXCR1 positivo confirmou que os resultados do tratamento de repertaxina em uma diminuição dramática de expressão fosfo-FAK e fosfo-AKT em comparação com células não tratadas (ver FIG. 21B). AKT regula a atividade do fator de transcrição FOXO3A forkhead através de um evento de fosforilação que resulta em seqüestro de FOXO3A citoplasmática (Brunet *et al.* Mol. Cell Biol. 21:952-965., aqui incorporado por referência, na sua totalidade). Em contraste, a forma não fosforilada de FOXO3A transita para o núcleo, onde atua como um fator de transcrição que regula a síntese do FAS-ligante (Jonsson *et al.* Nat. Med. 11:666-671.), aqui incorporado por referência, na sua totalidade). Repertaxina induz a morte celular através de um efeito de espectador mediado por FAS-ligante; os efeitos de repertaxina nesta via de transdução de sinal foram examinadas pela técnica de imunofluorescência. FOXO3A esteve presente em uma localização citoplasmática em células não tratadas, mas empurrados para o núcleo após o tratamento repertaxina (ver FIG. 21B). Isso indica que o bloqueio CXCR1 induz atividade FOXO3A através da inibição da via FAK / AKT. Células com supressão de PTEN ou a superexpressão FAK exibem um alto nível de FAK-fosfo e expressão fosfo-Akt, detectados por imunofluorescência, em ambas as células tratadas com repertaxina e não tratadas. O tratamento de repertaxina não induziu a ativação de FOXO3A em células com supressão de PTEN ou a superexpressão FAK, como mostrado pela localização citoplasmática de FOXO3A (VER FIG. 21B).

As a consequence of the constitutive activation of the FAK/AKT pathway, cells with PTEN deletion or FAK overexpression displayed resistance to repertaxina treatment. Células com a supressão PTEN ou a superexpressão FAK não exibem qualquer diminuição da viabilidade celular com o tratamento de repertaxin. Já foi proposto que a sinalização AKT desempenha um papel fundamental na biologia do CSC (ver figuras. 21B e 22) (Dubrovskaya *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A 106:268-273., Korkaya *et al.* PLoS Biolog. 7:e1000121., Yil-

maz *et al.* Nature 441:475-482., aqui incorporados por referência em suas totalidades). A ativação da via FAK /AKT bloqueou os efeitos de repertaxina nas populações CSC, como mostra a manutenção das populações ALDELFUOR positivo após o tratamento com o inibidor (ver FIG. 21B). Todos os resultados indicam que o bloqueio CXCR1 afeta diretamente o

5 caminho FAK/AKT/FOXO3A. O tratamento de repertaxina inibe a sinalização AKT que é crucial para a atividade CSC e, posteriormente, induz um efeito espectador sobre o grosso das células tumorais mediadas por FAS-ligante gerado por CSC.

O tratamento de repertaxina reduz a população de câncer de mama de células-tronco in vivo. Evidências recentes sugerem que CSC de mama são relativamente resistentes à quimioterapia e à radiação e podem contribuir para o ressurgimento do tumor após a

10 terapia (Phillips *et al.* J Natl. Cancer Inst. 98:1777-1785. Yu *et al.* Cell 131:1109-1123., Li *et al.* J Natl. Cancer Inst. 100:672-679., aqui incorporado por referência em sua totalidade). O conceito de CSC sugere que melhorias significativas na evolução clínica iriam exigir efetiva segmentação da população CSC (Reya *et al.* Nature 414:105-111., aqui incorporado por referência, na sua totalidade). Vários fatores são sintetizados e secretados durante o processo de apoptose das células tumorais em massa são orientados pela quimioterapia. Dentre esses fatores, FAS-ligante amplifica os efeitos da quimioterapia mediando um efeito letal espectador (Chhipa *et al.* J Cell Biochem. 101:68-79. aqui incorporada por referência em sua

15 totalidade). A quimioterapia também pode induzir a produção de IL-8 em células lesadas. O agente quimioterápico comumente utilizado, docetaxel, induziu IL-8 e mRNA FAS-ligante nas células SUM159 (ver FIG. 10a/ B). Também foi detectado um aumento de 4 vezes dos níveis de mRNA para IL-8 após tratamento com o agonista FAS (ver FIG. 10B). Demonstramos que IL-8 é capaz de regular a população CSC. Isso indica que a adição de repertaxina à quimioterapia citotóxica pode bloquear o efeito e ser direcionado para população de célula

20 tronco de câncer.

A linha celular SUM159 e três xenoenxertos primários de mama humana gerados a partir de três pacientes diferentes (MC1, UM2, UM3) foram utilizados para explorar a eficiência do tratamento de repertaxina no crescimento do tumor. As células destes tumores foram transplantadas para a pata ortotopicamente humanizada apurada de camundongos NOD /

30 SCID, sem cultivo *in vitro* . Para cada um destes xenotransplantes a população CSC foi exclusivamente contida na população ALDEFLUOR-positivo (Ginestier *et al.* Cell Stem Cell 1:555-567., Charafe al-Jauffret *al.* Cancer Res. 69:1302-1313., aqui incorporado por referência em sua totalidade). Em cada um dos tumores, a população CXCR1-positivo foi quase exclusivamente contida nessa população ALDEFLUOR-positivo (ver Tabela 5) e a via PTEN

35 / FAK / AKT é ativada (ver FIG. 25).

Tabela 5.

	ALDEFLUOR (%)	CXCR1 (%)	Sobreposição CXCR1/ALDEFLUOR (%)
Linhagens celulares de câncer de mama			
HCC1954	3.42	1.72	0.94
MDA-MB-453	4.22	0.8	0.5
SUM159	5.24	0.52	0.48
Xenoinxertos de câncer de mama humano			
MC1	12.3	1.81	1.32
UM2	8.4	1.23	0.88
UM3	9.7	0.84	0.76

50.000 células de cada xenotransplante foram injetadas na pata ortotopicamente humanizada apurada de camundongos NOD / SCID e o crescimento tumoral controlado. Quando o tamanho do tumor for de aproximadamente quatro milímetros, o tratamento foi iniciado com apenas repertaxina (15mg/kg, duas vezes ao dia, durante 28 dias), apenas docetaxel (10mg/Kg, uma vez por semana, durante 4 semanas), ou uma combinação das duas drogas. O crescimento tumoral foi comparado a controles injetados de solução salina. Para cada xenotransplante, uma significativa inibição do crescimento tumoral induzido por tratamento com docetaxel ou a combinação de repertaxina / docetaxel foi observada (ver figuras 26A e 27). O tratamento com apenas repertaxina teve um impacto moderado sobre o crescimento tumoral. Após quatro semanas de tratamento, os animais foram sacrificados e os tumores residuais foram analisados utilizando o teste ALDEFLUOR. Tumores residuais tratados com apenas docetaxel continham uma manutenção ou aumento de porcentagem de células ALDEFLUOR-positivo em comparação aos controles (ver figuras 26B e 27). Em contraste, o tratamento de apenas repertaxina ou em combinação com docetaxel reduziu a população de ALDEFLUOR positivo em mais de 75% (ver as figuras 26B e 27). Os resultados foram confirmados por imunoistoquímica de expressão ALDH1 em xenotransplantes diferentes. A diminuição de células ALDH1-positivo foi detectada em tumores tratados com repertaxina comparados aos tumores não tratados, enquanto que a porcentagem de células ALDH1-positivo permaneceram inalteradas ou aumentadas em tumores tratados com docetaxel (ver figuras 26D).

A presença de células CD44⁺/CD24⁻ desses tumores foi avaliada. Marcadores apresentaram previamente serem expressos em células-tronco de câncer de mama (Al Hajj *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A 100:3983-3988., aqui incorporado por referência na sua totalidade). A sobreposição entre o fenótipo CD44⁺/CD24⁻ e a expressão CXCR1 foi medida.

Células CXCR1-positivo estavam presentes na população de células CD44⁺/CD24⁻ e da população de células expressando CD24 ou CD44 negativo (ver Tabela 6).

Tabela 6

	CD24 ⁻ /CD44 ⁺ (%)	CXCR1 (%)	Sobreposição CD44-CD44 ⁺ /CXCR1 ⁺ (%)
Xenoinxertos de câncer de mama humano			
MC1	6.8	1.8	0.5
UM2	3.7	1.2	0.3
UM3	4.8	0.8	0.2

Nos tumores residuais tratados apenas com docetaxel, ou uma porcentagem inalterada ou aumentada de células CD44⁺/CD24⁻ foi observada, visto que o tratamento com apenas repertaxina ou em combinação com docetaxel resultou em uma redução da população de células CD44⁺/CD24⁻ (ver figura 28).

Um ensaio funcional *in vivo* que consiste de reimplante de células de tumores tratados em camundongos NOD/SCID secundário forneceu um teste direto avaliando a iniciação do tumor e a capacidade de auto-renovação da CSC remanescente após o tratamento. As células tumorais derivadas de animais controle ou tratados com docetaxel mostrou o recrescimento do tumor semelhante em todas as diluições de camundongos NOD/SCID secundários. Em contraste, o tratamento de repertaxina com ou sem docetaxel, reduziu o crescimento do tumor em pacientes secundários (ver FIG. 26C). Quando o mesmo número de células foram injetadas, os de animais tratados com repertaxina apresentaram uma redução de 2-5 vezes no crescimento do tumor em comparação com células de animais controle ou tratados com docetaxel (ver FIG. 26C). Para cada modelo de xenotransplante, 1000 ou 100 mil células tumorais provenientes de animais tratados com uma combinação de docetaxel e repertaxina não formaram quaisquer tumores secundários em camundongos NOD / SCID (ver FIG. 26C, 27 e Tabela 7). Estes estudos demonstram que o tratamento de repertaxina especificamente é dirigido e reduz a população CSC.

Tabela 7

Tumores/injeções							
	Números de células injetadas						
	10,000	5,000	2,500	1,000	500	250	100
Controle	6/6	2/2	—	8/8	—	—	6/8
Repertaxina	4/4	2/2	2/2	4/8	1/3	0/2	0/9
Docetaxel	2/2	4/4	2/2	6/6	3/4	2/3	8/9
Repertaxina/docetaxel	2/2	3/4	2/2	1/6	1/4	0/4	0/9

O tratamento de repertaxina inibe a sinalização FAK / AKT e ativa FOXO3A in vivo.

A expressão de fosfo-FAK e fosfo-Akt foi analisada por imunistoquímica em cada um dos xenotransplantes após o tratamento. A expressão de fosfo-FAK membranosa foi detectada em 50% das células do controle e os tumores tratados com docetaxel enquanto que a expressão fosfo-FAK foi abolida nos tumores tratados com apenas repertaxina ou em combinação com docetaxel (ver FIG. 26D). Resultados similares foram observados para a expressão de fosfo-AKT, com 70% de células expressando AKT-fosfo nos tumores não tratados, 20% de células fosfo-AKT-positivo em tumores tratados com docetaxel e uma completa inibição da expressão de fosfo-AKT nos tumores tratados com repertaxina sozinho ou em combinação com docetaxel (ver FIG. 26D). FOXO3A nuclear foi detectado nas células dos tumores tratados com docetaxel, repertaxina sozinho, e a combinação de repertaxina / docetaxel. Estes dados *in vivo* são consistentes com os dados *in vitro* e confirmar que o tratamento de repertaxina inibe a sinalização de FAK / AKT e ativa FOXO3A.

O tratamento de repertaxina reduz o desenvolvimento de metástases sistêmicas.

Para determinar se repertaxina reduz metástases sistêmicas, infectamos e linhas celulares de câncer da mama HCC1954, MDA-MB-453, e SUM159 com um sistema de repórter luciferase lentivírus e introduziu as células em camundongos NOD / SCID por injeção intracardíaca. Uma suspensão de 250.000 células por cada linha celular foram injetadas e a formação de metástases foi monitorada uma vez por semana pela imagem de bioluminescência. Doze horas após a injeção intracardíaca, os camundongos foram tratados duas vezes por dia por injeção repertaxina ou soro fisiológico para os controles. O tratamento de repertaxina em camundongos injetados com células HCC1954 e SUM159 e formação de metástase significativamente reduzida com menor emissão de fluxo de fótons no tratamento em comparação com os camundongos não tratados (ver FIG. 29A/B). Seções histológicas confirmaram a presença de metástases em vários locais em animais não tratados (ver FIG. 29D). O tratamento de repertaxina não tem qualquer efeito sobre a formação de metástases em camundongos injetados com células MDA-MB-453 (ver FIG. 29C). As emissões de fluxo de fótons e do número de animais que desenvolveram metástases foram semelhantes em am-

5 bos os grupos tratados com repertaxina e não tratados. Este resultado é consistente com
 dados que descrevem MDA-MB-453 como uma linhagem de células resistentes à repertaxi-
 na devido à presença de uma mutação de PTEN. Esses resultados indicam que o bloqueio
 CXCR1 com agentes como repertaxina pode ser capaz de reduzir a metástase, que é medi-
 5 ada pela população CSC (Charafe-Jauffret *et al.* Cancer Res. 69:1302-1313., aqui incorpo-
 rado por referência na sua totalidade).

Experimentos conduzidos durante o desenvolvimento de modalidades da presente
 invenção indicam que subcomponentes celulares com propriedades de células-tronco inici-
 am o crescimento do tumor e a metástase Visvader *et al.* Nat. Rev. Cancer 2:489-501., aqui
 10 incorporado por referência na sua totalidade). Em virtude da sua relativa resistência às atu-
 ais modalidades terapêuticas, essas células podem contribuir para a resistência ao trata-
 mento e relapso (Reya *et al.* Nature 414:105-111., aqui incorporado por referência na sua
 totalidade). A presente invenção proporciona uma abordagem baseada no bloqueio do re-
 ceptor de citocina CXCR1, que se expressa em células-tronco do câncer de mama, para ser
 15 eficazmente direcionado a população de células-tronco cancerosas e melhorar os resultados
 terapêuticos. Experimentos realizados durante o desenvolvimento de modalidades da inven-
 ção presente em uma série de sistemas têm demonstrado que as redes de citocinas de-
 sempenham um papel importante na tumorigênese. Há evidências de que várias dessas
 citocinas podem regular o comportamento das células-tronco. IL-4 é capaz de regular a au-
 20 to-renovação das células-tronco do câncer de pâncreas e IL-6 de regulação células-tronco
 do câncer no câncer de cólon e de mama (Todaro *et al.* Cell Stem Cell 1:389-402., Sansone
et al. J Clin. Invest 117:3988-4002., aqui incorporado por referência em sua totalidade). O
 papel de IL-8 na mediação da invasão tumoral e metástase já foi demonstrado (Waugh &
 Wilson. Cancer Res. 14:6735-6741., Inoue *et al.* Clin. Cancer Res. 6:2104-2119., aqui incor-
 25 porado por referência em sua totalidade). Além disso, IL-8 aumenta a auto-renovação de
 células-tronco neurais durante o processo cicatricial no cérebro (Beech *et al.* J Neuroimmu-
 nol. 184:198-208., aqui incorporado por referência na sua totalidade). As células-tronco do
 câncer de pulmão foram descritas como expressando o receptor de quimiocina CXCR1 (Le-
 vina *et al.* PLoS. ONE. 3:e3077., aqui incorporado por referência na sua totalidade). Experi-
 30 mentos realizados durante o desenvolvimento de modalidades da presente invenção de-
 monstraram que a população CXCR1 positivo é quase exclusivamente contida na população
 ALDEFLUOR positivo em linhas celulares de câncer de mama e xenoenxertos primários,
 bem como em células mamárias normais. O receptor de quimiocina é superexpresso em
 ALDEFLUOR positivo de mama na população de células de câncer (*et al.* Charafe-Jauffret.
 35 Cancer Res. 69:1302-1313., aqui incorporado por referência na sua totalidade). No câncer
 de mama, IL-8 é produzido no microambiente tumoral por um número de tipos de células,
 incluindo células inflamatórias, células do endotélio vascular, fibroblastos associados ao tu-

mor e as células-tronco mesenquimais (Waugh *et al.* Clin. Cancer Res. 14:6735-6741., aqui incorporado por referência, na sua totalidade). As redes de citocinas mediam a interação entre estes dois tipos de células, portanto, células-tronco cancerosas podem ser direcionadas por meio do bloqueio do receptor da IL-8 CXCR1.

Utilizando ensaios *in vitro*, foi demonstrado que CXCR1 mas não o bloqueio CXCR2 (uma alternativa receptor IL-8) reduziu a população de câncer de mama de células-tronco. Isso foi seguido da indução de apoptose em toda população de células remanescente, que carece de expressão CXCR1. Além dos anticorpos bloqueadores CXCR1, experimentos realizados durante o desenvolvimento de modalidades demonstram que repertaxin, um inibidor CXCR1 / 2, induziu efeitos similares, orientando a população CXCR1 positivo. Em contraste com seus efeitos diretos sobre a população de células-tronco de câncer expressando CXCR1, repertaxina não teve efeito direto sobre a população em massa de células tumorais que carece de expressão CXCR1. Isso indica que o bloqueio CXCR1 em células CXCR1 positivo induziu morte celular nas células CXCR1 negativa através de um efeito espectador. Os experimentos aqui descritos demonstram que o caminho FAS-ligante/FAS é o mediador deste efeito de morte de espectador. Este fenômeno explica a eficácia do tratamento de repertaxina em induzir apoptose maciça na população de células inteiras apesar do fato de que a população CXCR1 positivo representar menos de 1% da população celular. O papel da FAS ligante foi demonstrada pelo efetivo bloqueio de transeunte matando pelo anticorpo anti-FAS-ligante.

Experimentos conduzidos durante o desenvolvimento de modalidades da presente invenção indicam que as interações de citocina semelhantes podem ocorrer em tumores expostos a quimioterapia citotóxica. A quimioterapia pode diretamente induzir a apoptose celular em células tumorais diferenciadas, bem como induzir a produção de FAS-ligante por estas células que morrem, que por sua vez, induzem apoptose em células tumorais vizinhas através de um efeito de espectador FAS mediada. Concomitante com a produção de FAS-ligante, essas células lesadas também secretam o aumento dos níveis de IL-8-in um processo semelhante a involução mamária ou cicatrização de feridas. Como é o caso na glândula mamária involutiva, esta IL-8 pode estimular as células-tronco do câncer de mama, bem como protegê-las da apoptose. Isso pode contribuir para o aumento relativo em células-tronco do câncer observadas após quimioterapia em modelos pré-clínicos (4) e ensaios clínicos neo-adjuvantes (5). Os efeitos da quimioterapia na apoptose e vias de auto-renovação em tumores são mostrados na Figura 30.

Para determinar se o bloqueio CXCR1 poderia ter como alvo as células-tronco do câncer de mama *in vivo*, os efeitos do docetaxel citotóxico foram comparados com repertaxina sobre compartimentos de células tronco cancerígenas e sobre o crescimento tumoral em camundongos NOD / SCID. O Docetaxel é um dos mais eficazes agentes quimioterápi-

cos usados atualmente para tratar mulheres com câncer de mama. O câncer de populações de células foram avaliadas pelo ensaio ALDEFLUOR e transplante de série em camundongos NOD / SCID. Utilizando estes ensaios, foi determinado que o tratamento com quimioterapia resultou em nenhuma mudança ou um aumento relativo do câncer de populações de células progenitoras. Em contraste, o tratamento de apenas repertaxina ou com quimioterapia reduziu significativamente a população de células-tronco cancerosas. Apesar da redução significativa nas populações de tumor inicial, o uso de repertaxina só não resultou em redução significativa do tumor. A combinação de repertaxina mais a quimioterapia resultou em uma redução significativa no tamanho do tumor, bem como na população de células tronco cancerosas. Combinando estes agentes para atingir tanto o câncer de células-tronco e uma população de células tumorais em massa maximiza a eficácia desses tratamentos.

Para elucidar o mecanismo de ação de repertaxin, os caminhos a jusante da CXCR1 foram analisados. A interação entre CXCR1, FAK e AKT foi confirmada. O bloqueio CXCR1 age especificamente através de FAK e ativação da AKT. Experimentos realizados durante o desenvolvimento de modalidades da presente invenção indicam que a ativação de AKT regula células tronco normais e malignas da mama com células-tronco de auto-renovação através da fosforilação de GSK3 β resultando na ativação da via WNT (al Korkaya al. PLoS Biolog. 7:e1000121, aqui incorporado por referência na sua totalidade). Estes resultados indicam por que as células com PTEN knockdown são resistentes a repertaxin. Uma função adicional de AKT é a regulação da sobrevivência das células através da fosforilação do fator de transcrição forkhead FOXO3A. Fosforilação da AKT de FOXO3A resulta em seu seqüestro citoplasmática. Em contraste, foi demonstrado que o bloqueio CXCR1 leva a ativação de AKT, resultando em diminuição da translocação de FOXO3A no núcleo onde induz a um certo número de genes, incluindo FAS ligante (Jonsson *et al.* Nat. Med. 11:666-671.), aqui incorporado por referência, na sua totalidade). FAS-ligante CXCR1 induzido através de bloqueio por sua vez é responsável pelos efeitos de eliminação observados (ver FIG. 30).

Além de seu papel na sinalização de CXCR1, FAK medeia as interações das células com componentes da matriz extracelular através de receptores de integrina (Waugh *et al.* Clin. Cancer Res. 14:6735-6741., aqui incorporado por referência, na sua totalidade). A sinalização FAK desempenha um papel na regulação do auto-renovação de células-tronco mamárias normais e malignas de camundongos em modelos transgênicos (Luo *et al.* Cancer Res. 69:466-474., aqui incorporado por referência na sua totalidade). ativação de FAK também promove a sobrevivência da célula, bloqueando FADD e apoptose mediada por RIP (Kurenova *et al.* Mol. Cell Biol. 24:4361-4371. Xu *et al.* J Biol. Chem. 275:30597-30604., aqui incorporado por referência em sua totalidade). Isso fornece uma explicação para a resistência da população de células-tronco cancerígenas para a apoptose induzida por FAS/ FAS-ligante.

Foi demonstrado que o câncer de mama de células-tronco desempenha um papel importante na invasão tumoral e metástase (Crocker *et al.* J Mol Cell. Med. 2008, Charafe-Jauffret *et al.* Cancer Res. 69:1302-1313., aqui incorporado por referência em sua totalidade). É mostrado aqui que IL-8 e CXCR1 também desempenham um papel importante nesses processos. Os efeitos do bloqueio CXCR1 foram analisados utilizando repertaxina sobre a formação de metástase experimental. Foi demonstrado que o bloqueio CXCR1 reduz o desenvolvimento da metástase, quando administrado após a injeção intracardíaca de células de câncer de mama.

Estudos clínicos utilizando repertaxina demonstraram uma falta de toxicidade. As estratégias que visam a interferir com loops de regulação de citocinas como a IL-8 e CXCR1 representam métodos para atingir o câncer de mama de células-tronco.

REFERÊNCIAS

As seguintes referências são incorporadas neste documento como referência em suas totalidades, como se fossem totalmente apresentadas neste documento.

1. Hanahan D and Weinberg R A. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100: 57-70.
2. Neve R M, Chin K, Fridlyand J et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. Cancer Cell 2006; 10: 515-527.
3. Bonnet D and Dick J E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat.Med. 1997; 3: 730-737.
4. Glinisky G V. Stem cell origin of death-from-cancer phenotypes of human prostate and breast cancers. Stem Cell Rev. 2007; 3: 79-93.
5. Jaiswal S, Traver D, Miyamoto T, Akashi K, Lagasse E, and Weissman I L. Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2003; 100: 10002-10007.
6. Krivtsov A V, Twomey D, Feng Z et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. Nature 2006; 442: 818-822.
7. Christgen M, Ballmaier M, Bruchhardt H, von Wasielewski R, Kreipe H, and Lehmann U. Identification of a distinct side population of cancer cells in the Cal-51 human breast carcinoma cell line. Mol.Cell Biochem. 2007; 306: 201-212.

8. Fillmore C M and Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 2008; 10: R25.
9. Kondo T, Setoguchi T, and Taga T. Persistence of a small subpopulation of
5 cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004; 101: 781-786.
10. Setoguchi T, Taga T, and Kondo T. Cancer stem cells persist in many cancer cell lines. *Cell Cycle* 2004; 3: 414-415.
11. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, and Tang D
10 G. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and A. *Cancer Res.* 2005; 65: 6207-6219.
12. Chute J P, Muramoto G G, Whitesides J et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2006; 103: 11707-11712.
- 15 13. Duester G. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur.J Biochem.* 2000; 267: 4315-4324.
14. Cheung A M, Wan T S, Leung J C et al. Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. *Leukemia* 2007; 21: 1423-1430.
- 20 15. Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D et al. Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells* 2006; 24: 975-985.
16. Pearce D J, Taussig D, Simpson C et al. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples.
25 *Stern Cells* 2005; 23: 752-760.
17. Ginestier C, Hur M H, Charafe-Jauffret E et al. ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 555-567.
18. Dontu G, Abdallah W M, Foley J M et al. In vitro propagation and transcriptional
30 profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* 2003; 17: 1253-1270.

19. Irizarry R A, Hobbs B, Collin F et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003; 4: 249-264.
20. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Monville F et al. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene* 2006; 25: 2273-2284.
- 5 21. Finetti P, Cervera N, Charafe-Jauffret E et al. Sixteen-kinase gene expression identifies luminal breast cancers with poor prognosis. *Cancer Res*. 2008; 68: 767-776.
22. Eisen M B, Spellman P T, Brown P O, and Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998; 95: 14863-14868.
- 10 23. Reiner A, Yekutieli D, and Benjamini Y. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics*. 2003; 19: 368-375.
24. Hua J, Balagurunathan Y, Chen Y et al. Normalization benefits microarray-based classification. *EURASIP.J Bioinform.Syst.Biol*. 2006; 43056.
- 15 25. Ginestier C, Cervera N, Finetti P et al. Prognosis and gene expression profiling of 20q13-amplified breast cancers. *Clin.Cancer Res*. 2006; 12: 4533-4544.
26. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*. 2005; 65: 5506-5511.
- 20 27. Ringe J, Strassburg S, Neumann K et al. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem*. 2007; 101: 135-146.
28. Hughes L, Malone C, Chumsri S, Burger A M, and McDonnell S.
- 25 Characterisation of breast cancer cell lines and establishment of a novel isogenic subclone to study migration, invasion and tumourigenicity. *Clin.Exp.Metastasis* 2008.
29. Itoh Y, Joh T, Tanida S et al. IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells. *Cytokine* 2005; 29: 275-282.
- 30 30. Gupta G P, Perk J, Acharyya S et al. ID genes mediate tumor reinitiation during breast cancer lung metastasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2007; 104: 19506-19511.

31. Li F, Tiede B, Massague J, and Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* 2007; 17: 3-14.
32. Al Hajj M, Wicha M S, Benito-Hernandez A, Morrison S J, and Clarke M F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 5 2003; 100: 3983-3988.
33. Li C, Heidt D G, Dalerba P et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007; 67: 1030-1037.
34. Ricci-Vitiani L, Lombardi D G, Pilozzi E et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; 445: 111-115.
- 10 35. Montanaro F, Liadaki K, Schiend J, Flint A, Gussoni E, and Kunkel L M. Demystifying SP cell purification: viability, yield, and phenotype are defined by isolation parameters. *Exp.Cell Res.* 2004; 298: 144-154.
36. Stingl J, Eirew P, Ricketson I et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 2006; 439: 993-997.
- 15 37. Matsui W, Huff C A, Wang Q et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 2004; 103: 2332-2336.
38. Farnie G and Clarke R B. Mammary stem cells and breast cancer--role of Notch signalling. *Stem Cell Rev.* 2007; 3: 169-175.
39. Krstic A, Mojsin M, and Stevanovic M. Regulation of SOX3 gene expression is 20 driven by multiple NF-Y binding elements. *Arch.Biochem.Biophys.* 2007; 467: 163-173.
40. Zhu J, Zhang Y, Joe G J, Pompetti R, and Emerson S G. NF-Ya activates multiple hematopoietic stem cell (HSC) regulatory genes and promotes HSC self-renewal. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2005; 102: 11728-11733.
41. Raffel G D, Mercher T, Shigematsu H et al. Ott1(Rbm15) has pleiotropic roles in 25 hematopoietic development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2007; 104: 6001-6006.
42. Ma X, Renda M J, Wang L et al. Rbm15 modulates Notch-induced transcriptional activation and affects myeloid differentiation. *Mol.Cell Biol.* 2007; 27: 3056-3064.
43. Peiffer I, Eid P, Barbet R et al. A sub-population of high proliferative potential- 30 quiescent human mesenchymal stem cells is under the reversible control of interferon alpha/beta. *Leukemia* 2007; 21: 714-724.

44. Villadsen R, Fridriksdottir A J, Ronnov-Jessen L et al. Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *J Cell Biol.* 2007; 177: 87-101.
45. Hambardzumyan D, Becher O J, and Holland E C. Cancer stem cells and survival pathways. *Cell Cycle* 2008; 7.
- 5 46. Jagani Z and Khosravi-Far R. Cancer stem cells and impaired apoptosis. *Adv.Exp.Med.Biol.* 2008; 615: 331-344.
47. Maxwell P J, Gallagher R, Seaton A et al. HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells. *Oncogene* 2007; 26: 7333-7345.
- 10 48. Murphy C, McGurk M, Pettigrew J et al. Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer. *Clin.Cancer Res.* 2005; 11: 4117-4127.
49. Trentin L, Miorin M, Facco M et al. Multiple myeloma plasma cells show different chemokine receptor profiles at sites of disease activity. *Br.J Haematol.* 2007; 15 138: 594-602.
50. Varney M L, Johansson S L, and Singh R K. Distinct expression of CXCL8 and its receptors CXCR1 and CXCR2 and their association with vessel density and aggressiveness in malignant melanoma. *Am.J Clin.Pathol.* 2006; 125: 209-216.
51. Freund A, Chauveau C, Brouillet J P et al. IL-8 expression and its possible 20 relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells. *Oncogene* 2003; 22: 256-265.
52. Inoue K, Slaton J W, Eve B Y et al. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer. *Clin.Cancer Res.* 2000; 6: 2104-2119.
- 25 53. Balbay M D, Pettaway C A, Kuniyasu H et al. Highly metastatic human prostate cancer growing within the prostate of athymic mice overexpresses vascular endothelial growth factor. *Clin.Cancer Res.* 1999; 5: 783-789.
54. Kim S J, Uehara H, Karashima T, Mccarty M, Shih N, and Fidler I J. Expression of interleukin-8 correlates with angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis of human 30 prostate cancer cells implanted orthotopically in nude mice. *Neoplasia.* 2001; 3: 33-42.

55. Karnoub A E, Dash A B, Vo A P et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007; 449: 557-563.
56. Schafer Z T and Brugge J S. IL-6 involvement in epithelial cancers. *J Clin. Invest* 2007; 117: 3660-3663.
57. Todaro M, Alea M P, Di Stefano A B et al. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 389-402.
58. Landi S, Bottari F, Gemignani F et al. Interleukin-4 and interleukin-4 receptor polymorphisms and colorectal cancer risk. *Eur.J Cancer* 2007; 43: 762-768.
59. Sansone P, Storci G, Tavolari S et al. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *J Clin. Invest* 2007; 117: 3988-4002.
60. Glinsky G V, Berezovska O, and Glinskii A B. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J Clin. Invest* 2005; 115: 1503-1521.
61. Golub T R, Slonim D K, Tamayo P et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; 286: 531-537.

Todas as publicações e patentes mencionadas nas especificações acima são aqui incorporados por referência. Várias modificações e variações do método descrito e sistema da invenção serão evidentes para aqueles versados na técnica sem se afastar do escopo e do espírito da invenção. Embora a invenção ter sido descrita em conexão com determinadas modalidades preferidas, deve ser entendido que a invenção, tal como alegado não deve ser indevidamente limitada a tais modalidades específicas. De fato, várias modificações dos modos descritos para realizar a invenção que são óbvias para aqueles especializados nas áreas pertinentes são destinadas a estarem no âmbito da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de detecção de células tronco de tumor sólido, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende: a detecção de células tronco de tumor sólido CXCR1 + ou FBXO21 + a partir de uma amostra de tecido tomadas a partir de um tumor de um indivíduo.

5 2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita detecção compreende colocar a dita amostra de tecido em contato com um anticorpo ou fragmento de anticorpo.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende Repertaxina.

10 4. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende uma molécula de sinal.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita molécula de sinal compreende uma molécula fluorescente ou uma enzima que pode catalisar uma reação de produção de cor na presença de um substrato colorimétrico.

15 6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que nenhuma outra proteína ou ácido nucléico é analisado a fim de determinar a presença ou ausência das ditas células tronco de tumor sólido CXCR1 ou FBXO21+.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito tumor é selecionado a partir do grupo que consiste em: um tumor de câncer de próstata,
20 um tumor de câncer de ovário, um tumor de câncer de mama, um melanoma, um tumor de câncer de pulmão de célula não-pequena, um tumor de câncer de pulmão de célula pequena e um tumor de adenocarcinoma esofágico.

8. População isolada de células tronco de câncer, **CARACTERIZADA** pelo fato de que consiste em:

25 a) tumorigênica e

 b) CXCR1+ ou FBXO21+.

9. População isolada de células tronco de câncer, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as ditas células tronco de câncer consistem em células tronco de câncer selecionadas a partir do grupo que consiste em: células tronco de câncer
30 de próstata, células tronco de câncer de ovário, células tronco de câncer de mama, células tronco de câncer de pele, células tronco de câncer de pulmão de célula não-pequena, células tronco de câncer de pulmão de célula pequena e células tronco de adenocarcinoma esofágico.

10. População isolada de células tronco de câncer, de acordo com a reivindicação
35 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a população compreende ao menos 60% de células tronco de câncer e menos do que 40% de células de tumor não-tumorigênicas.

11. População isolada de células tronco de câncer, de acordo com a reivindicação

8, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que as células tronco de câncer são enriquecidas ao menos ao dobro, comparado com as células de tumor não-tumorigênicas não-fracionadas.

12. População isolada de células tronco de câncer, de acordo com a reivindicação 8, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que as células tronco de câncer são enriquecidas ao menos quatro vezes, comparado com as células de tumor não-tumorigênicas não-fracionadas.

13. Uso de um composto, em que o composto consiste em um antagonista de CXCR 1 ou FBXO21, ou um antagonista de via de sinalização de IL8-CXCR1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de ser na preparação de um medicamento para tratamento de tumor.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 13, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o dito composto consiste em Repertaxina ou um derivado de Repertaxina.

15. Uso, de acordo com a reivindicação 13, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o dito antagonista de CXCR1 ou FBXO21, ou antagonista de via de sinalização de IL8-CXCR1 compreende um anticorpo ou fragmento de anticorpo.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 13, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o dito tumor compreende células tronco de câncer selecionadas a partir do grupo que consiste em: células tronco de câncer de próstata, células tronco de câncer de ovário, células tronco de câncer de mama, células tronco de câncer de pele, células tronco de câncer de pulmão de célula não-pequena, células tronco de câncer de pulmão de célula pequena e células tronco de adenocarcinoma esofagiano.

FIGURA 1

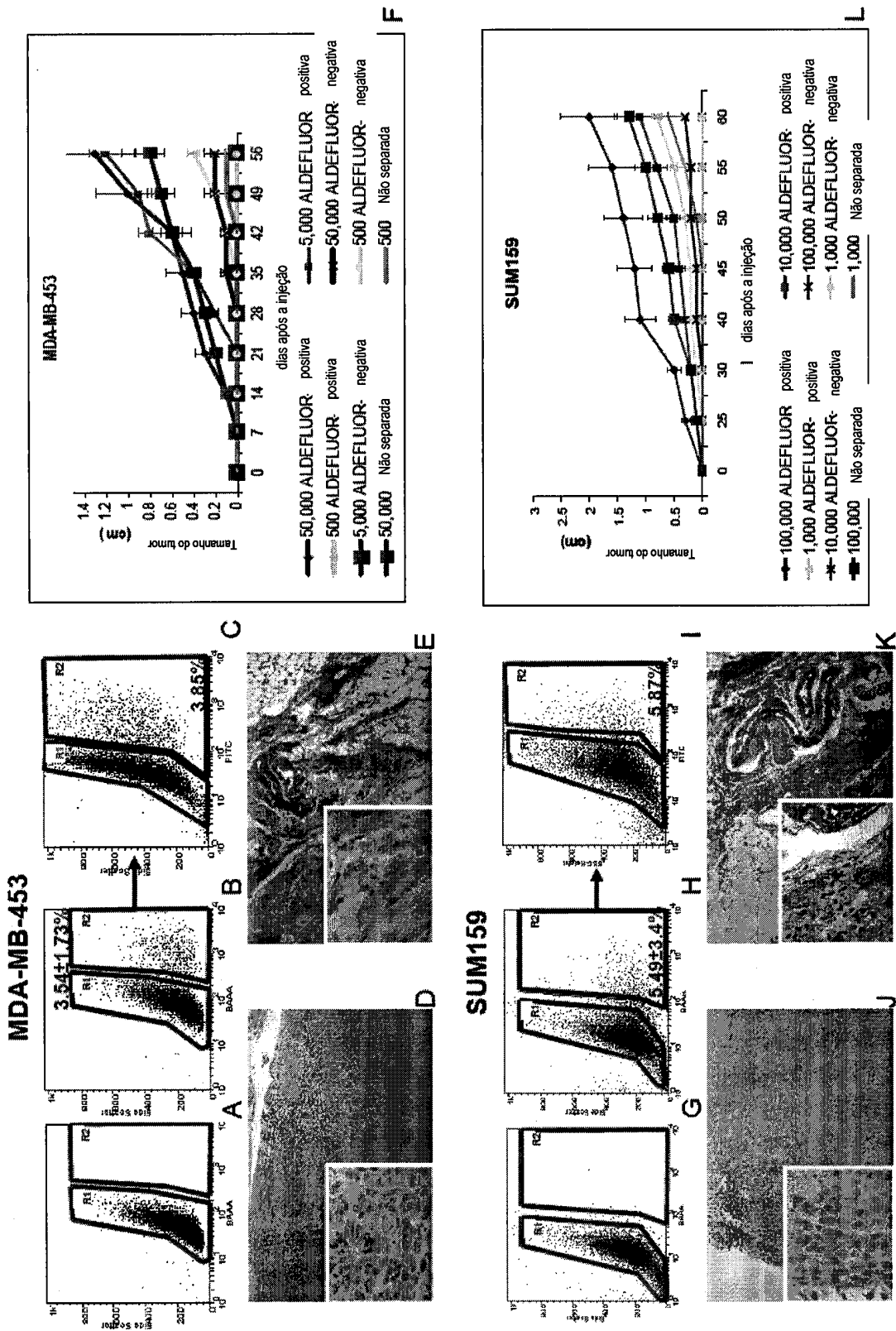


FIGURA 2

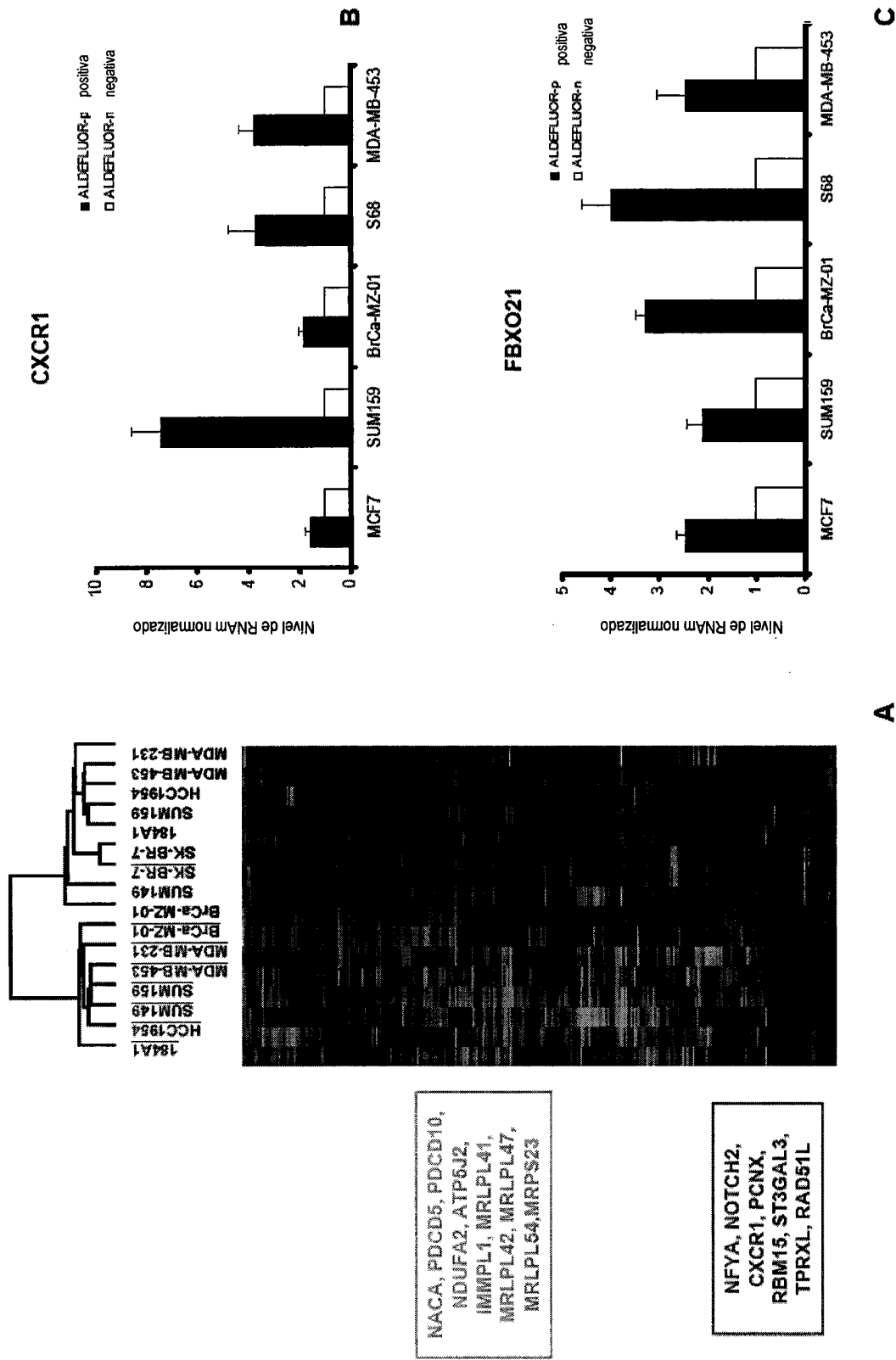
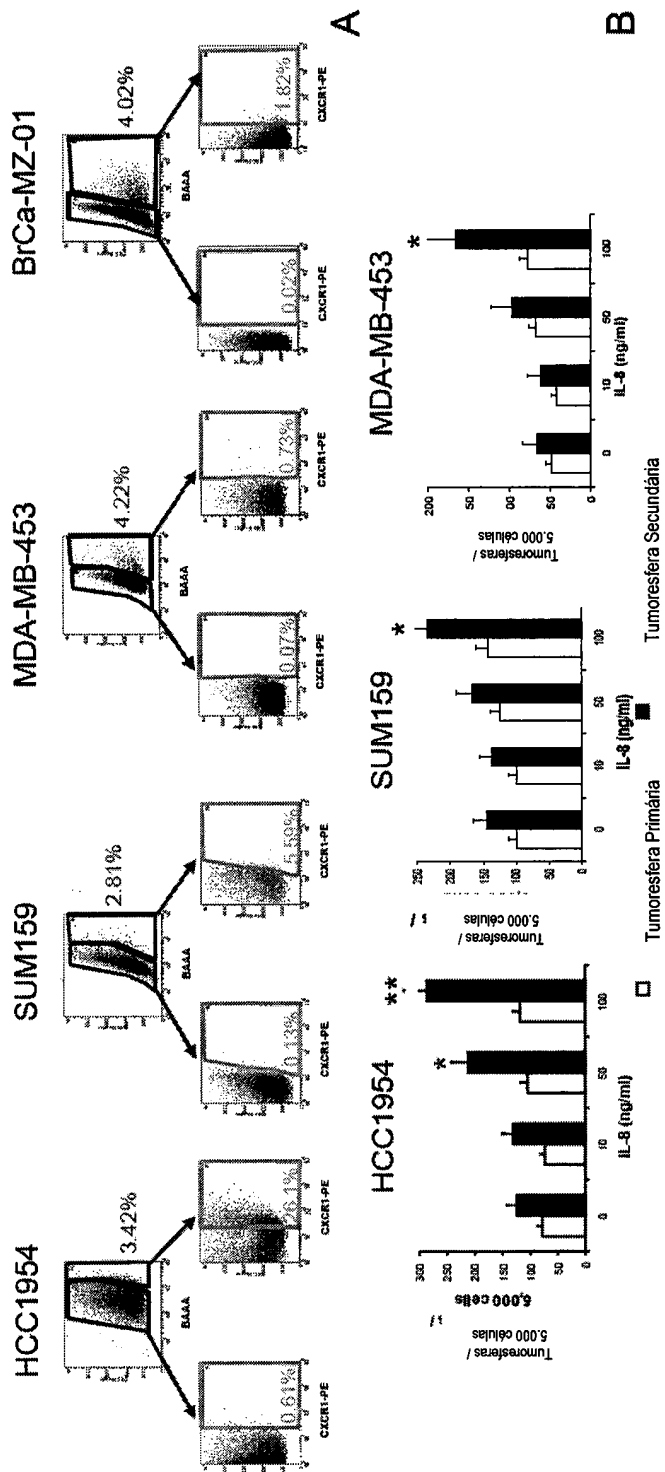


FIGURA 3



3

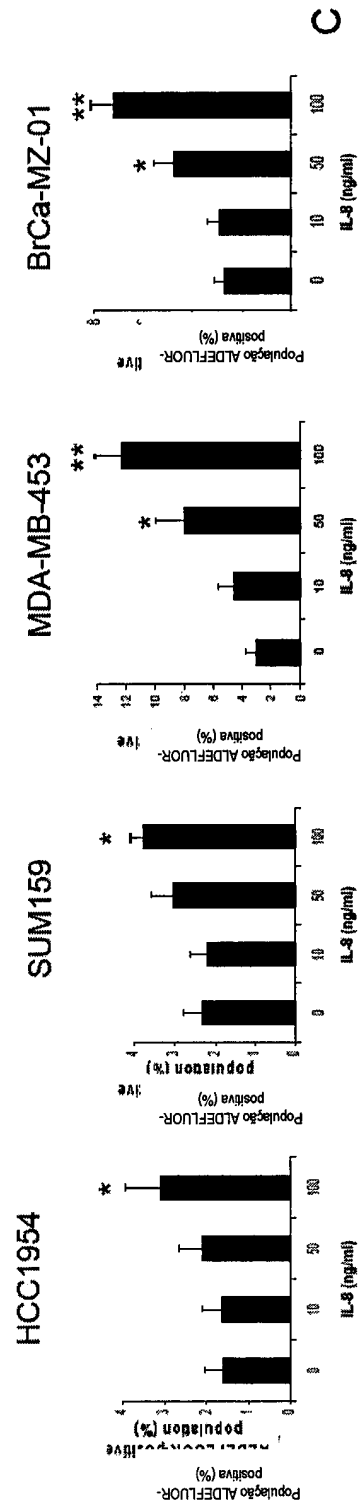


FIGURA 4

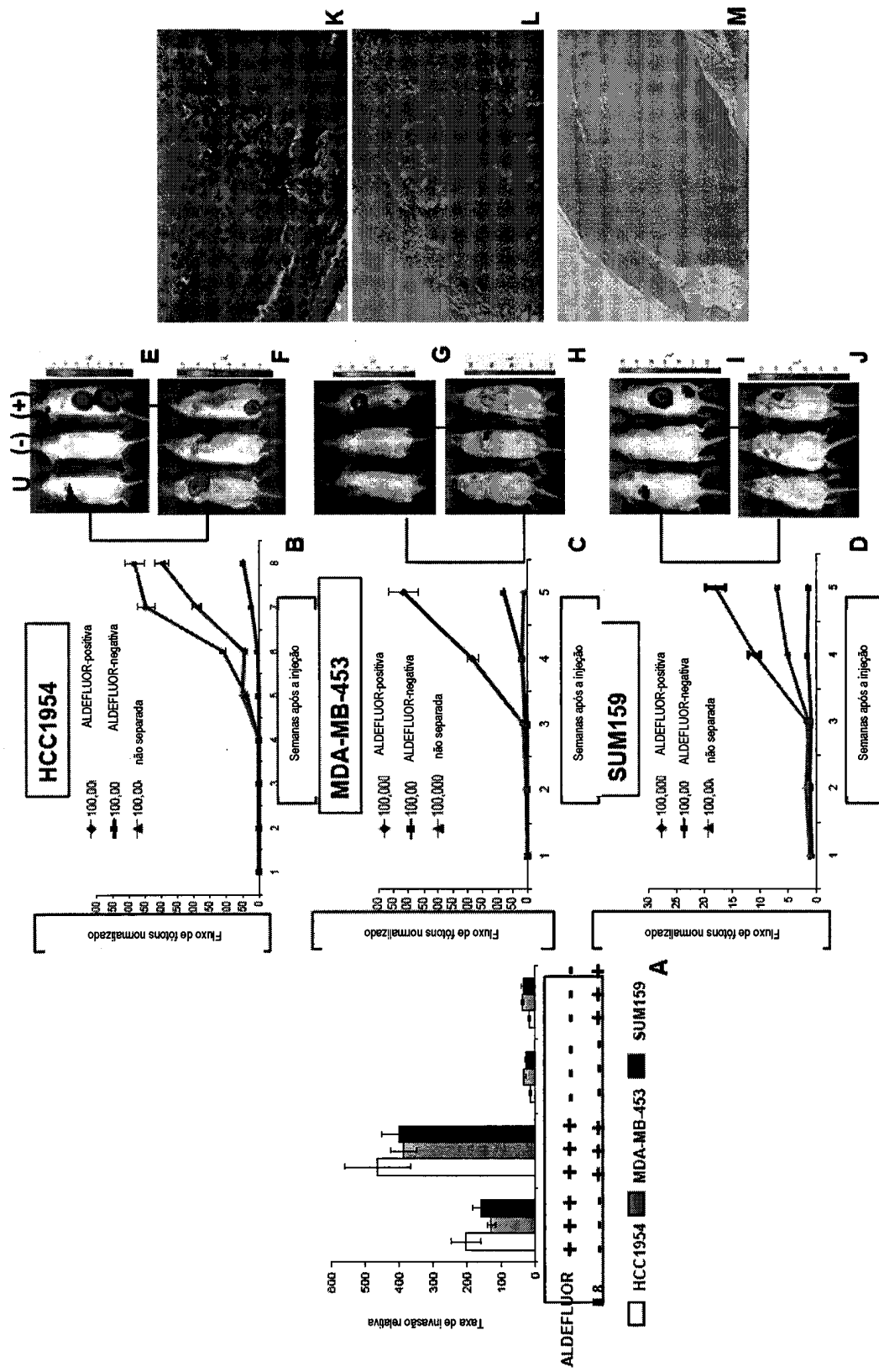
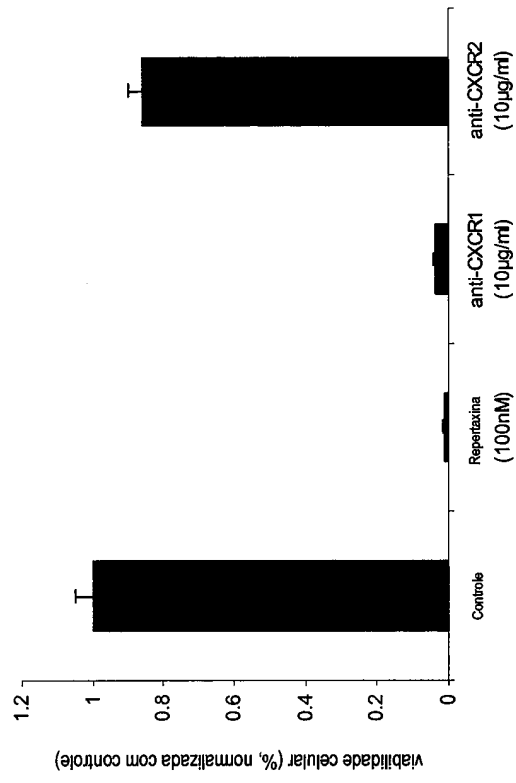


FIGURA 5

A.



B.

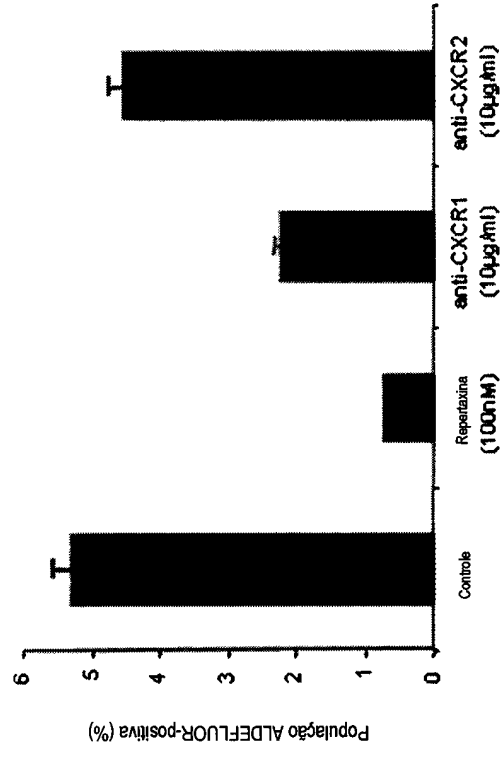


FIGURA 6

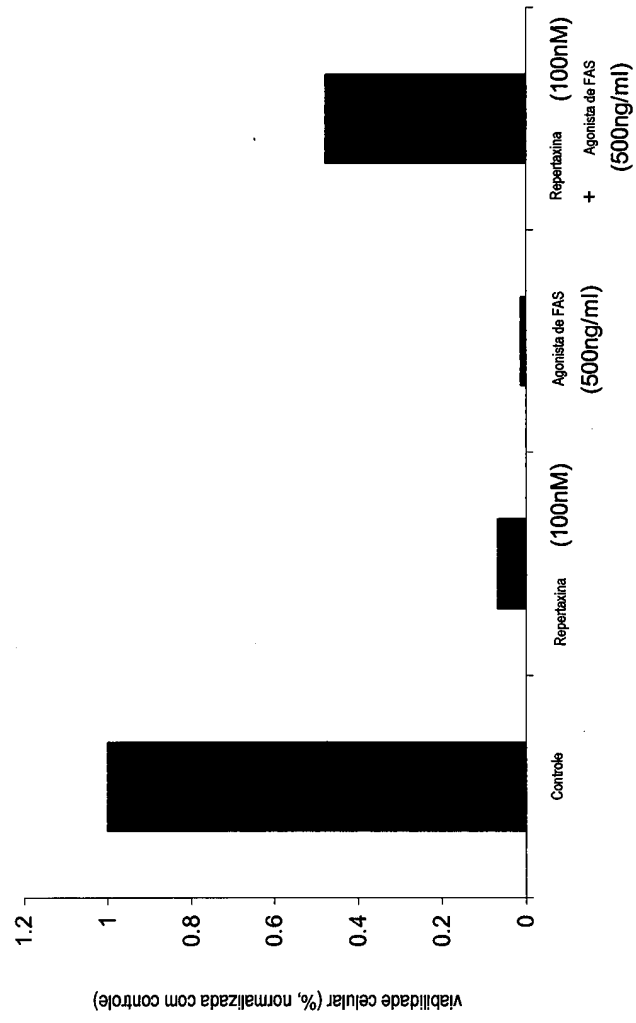


FIGURA 7

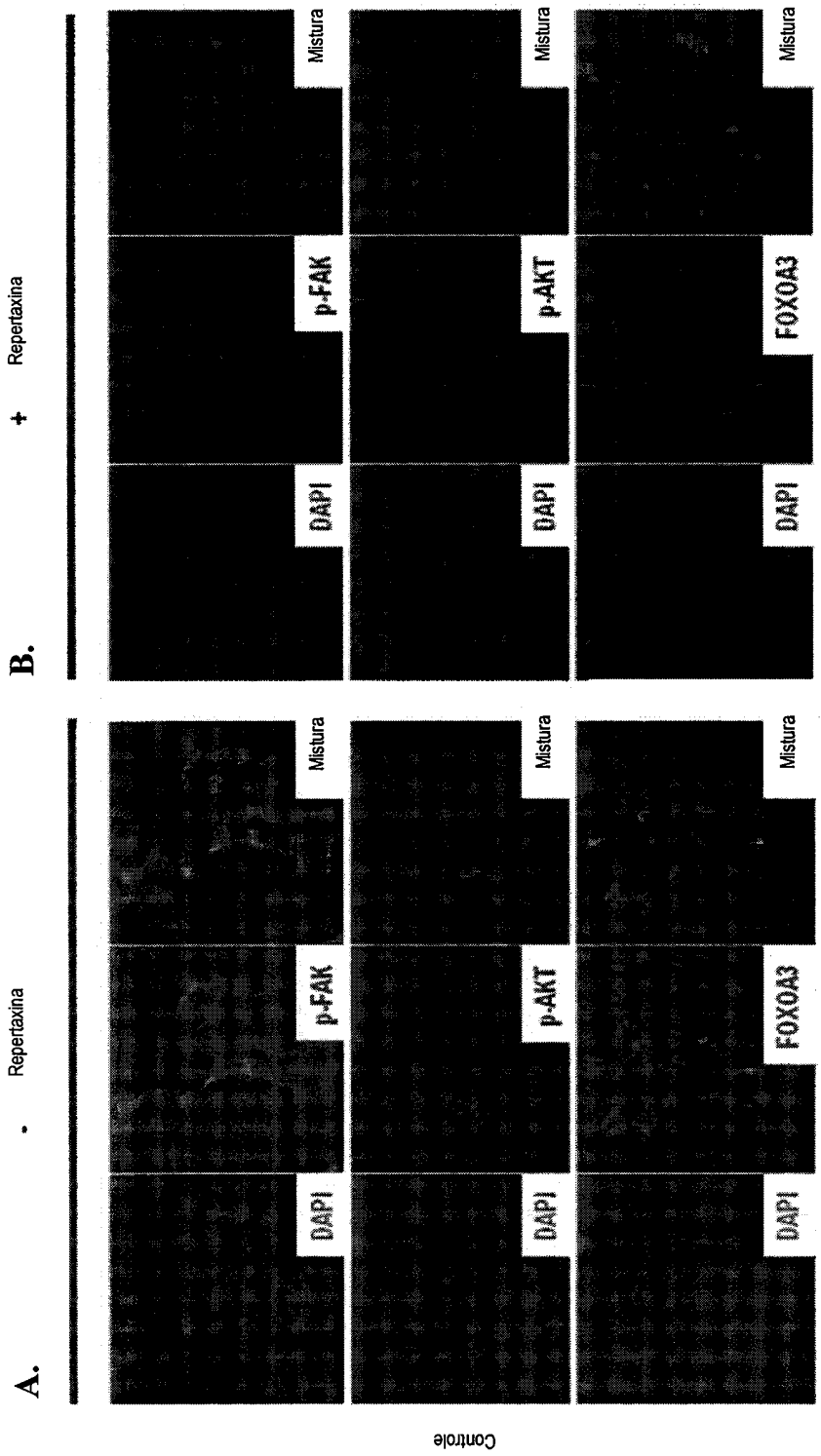
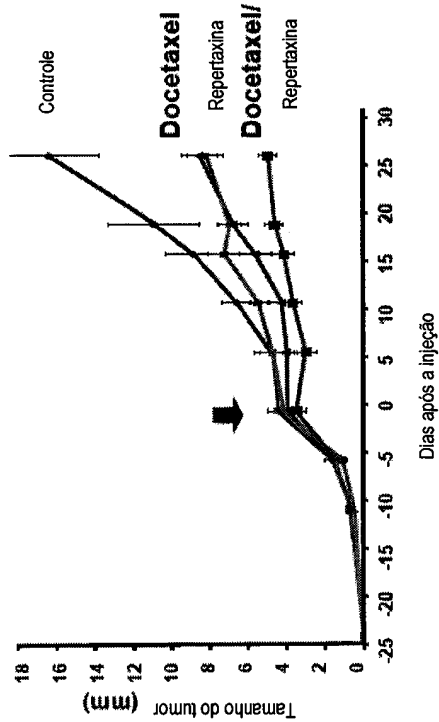
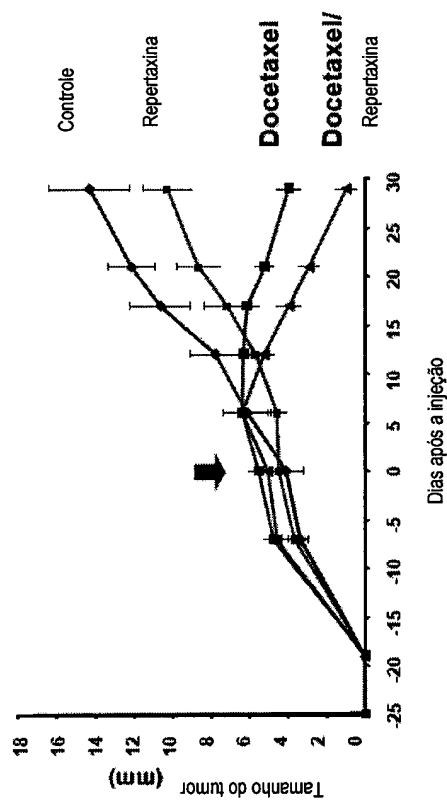


FIGURA 8 **A.** **B.**

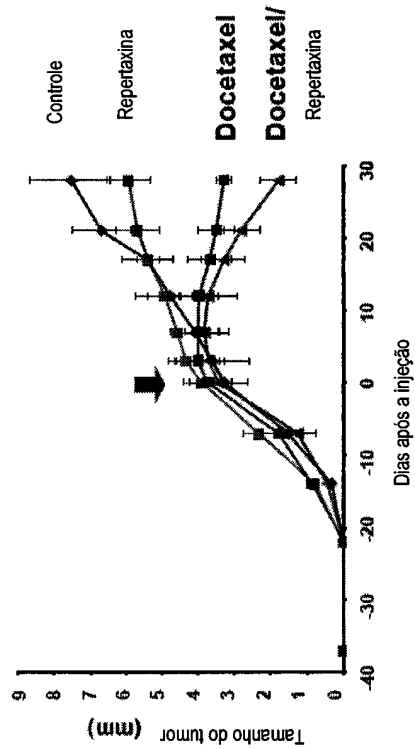
SUM159



MC1



UM2



UM3

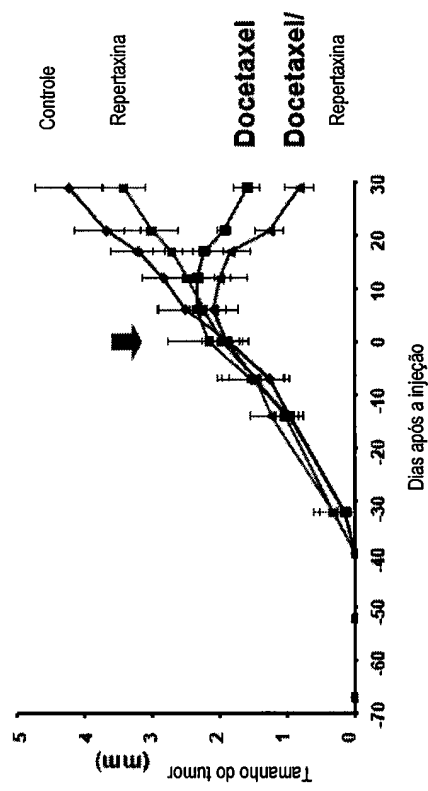
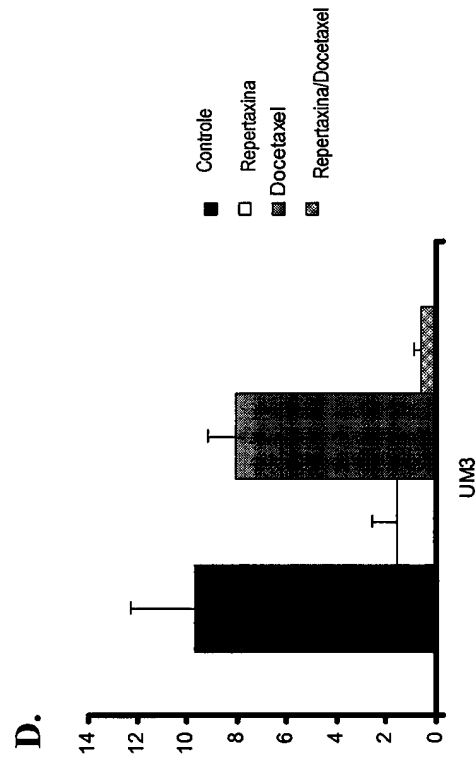
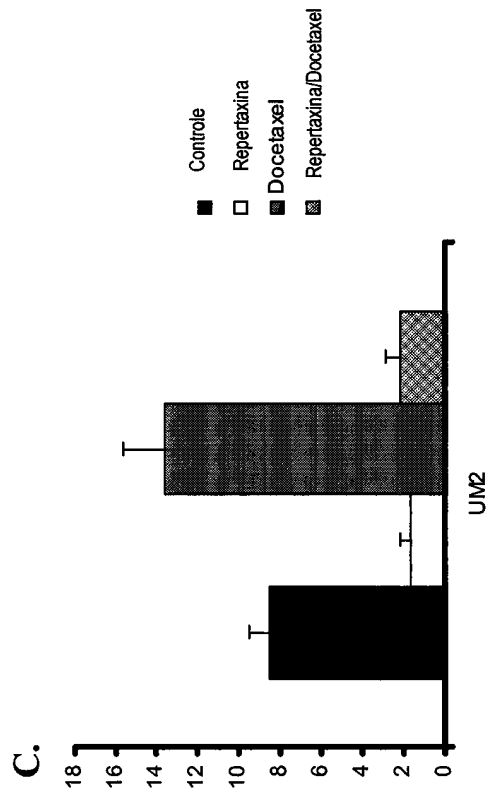
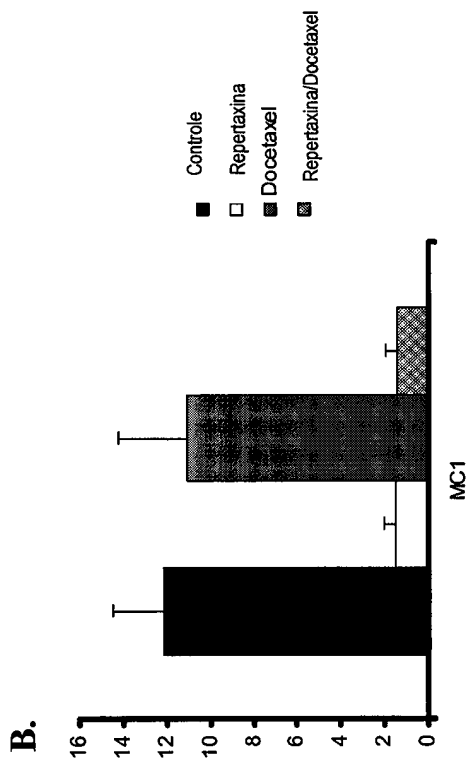
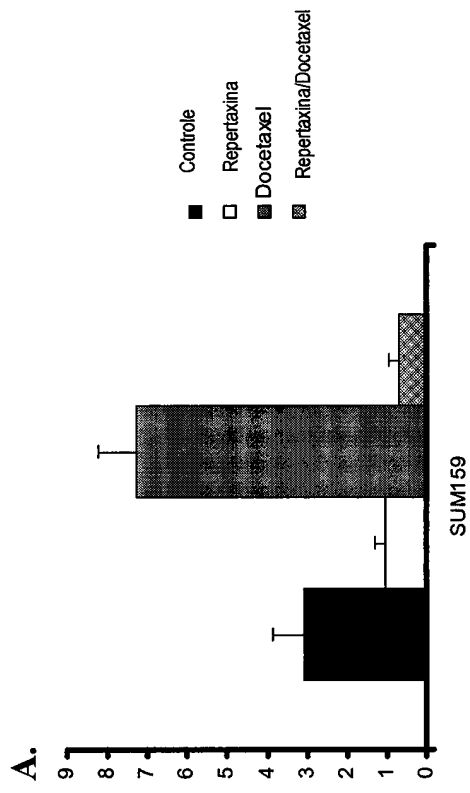


FIGURA 9



JRA 10
B.

A.

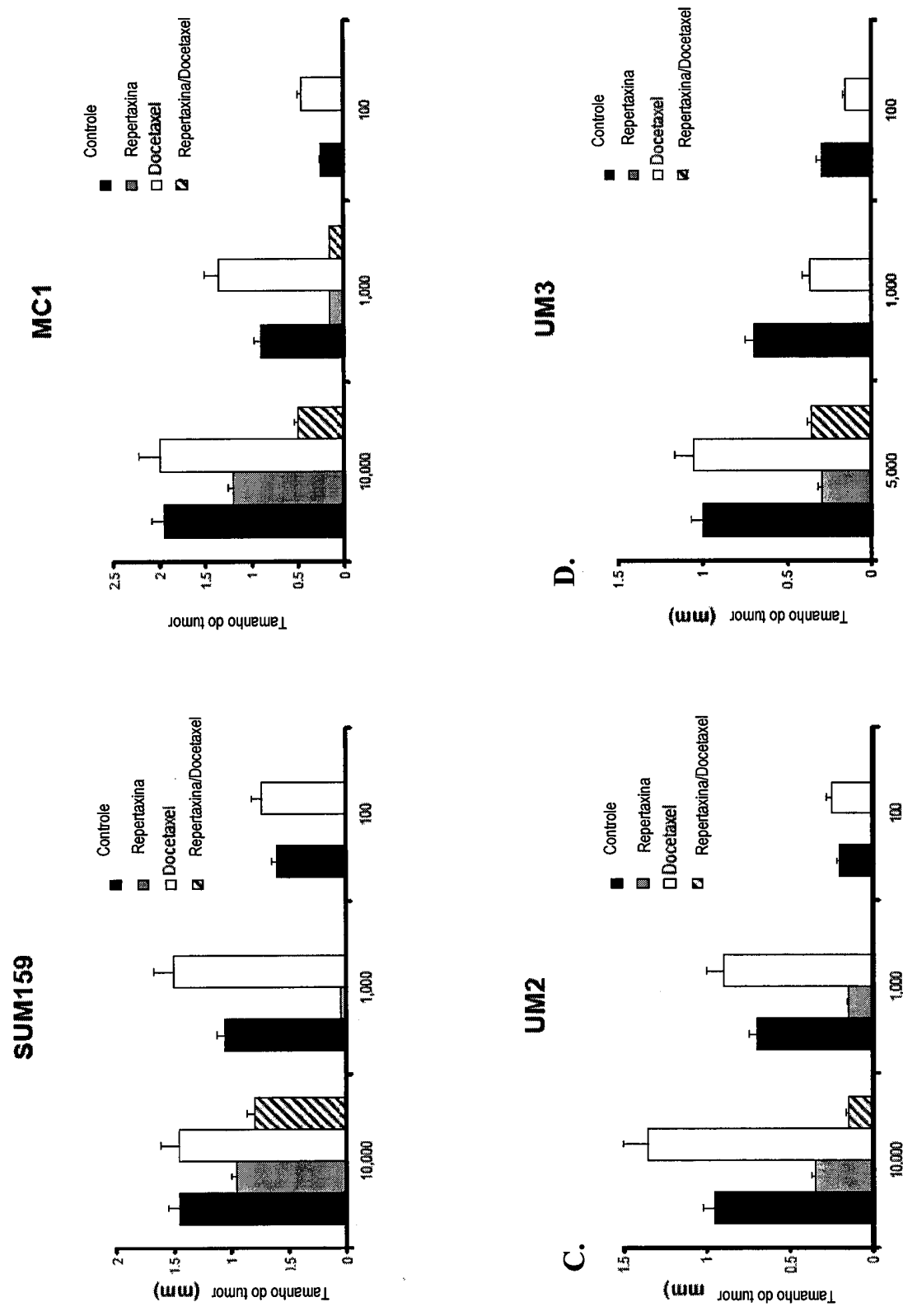


FIGURA 11

A.

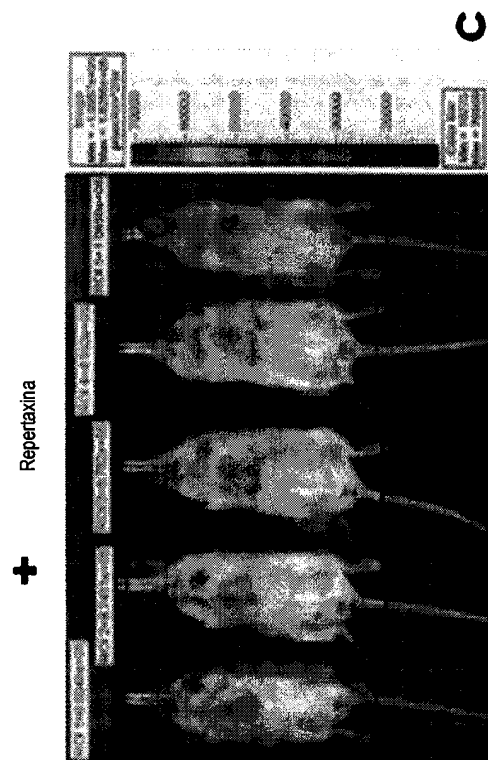
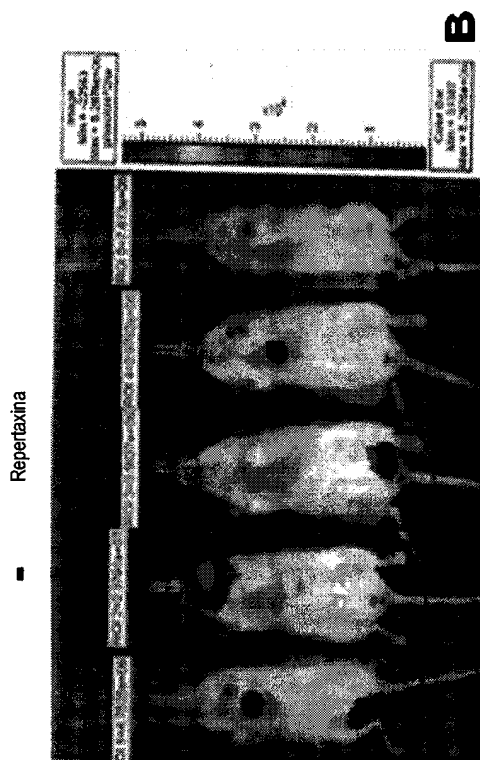
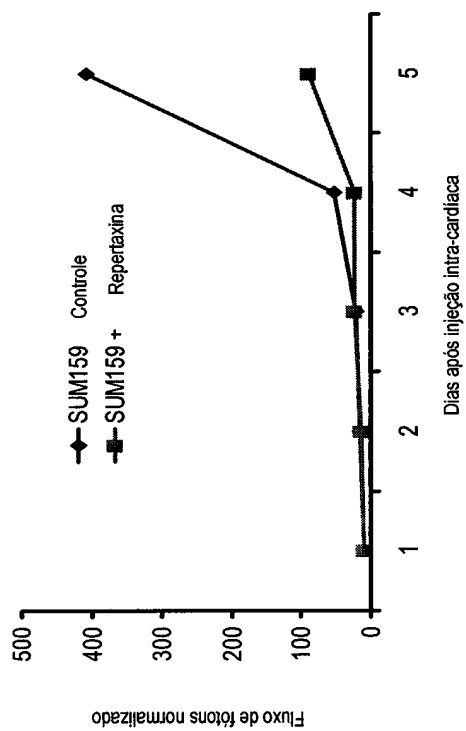


FIGURA 12

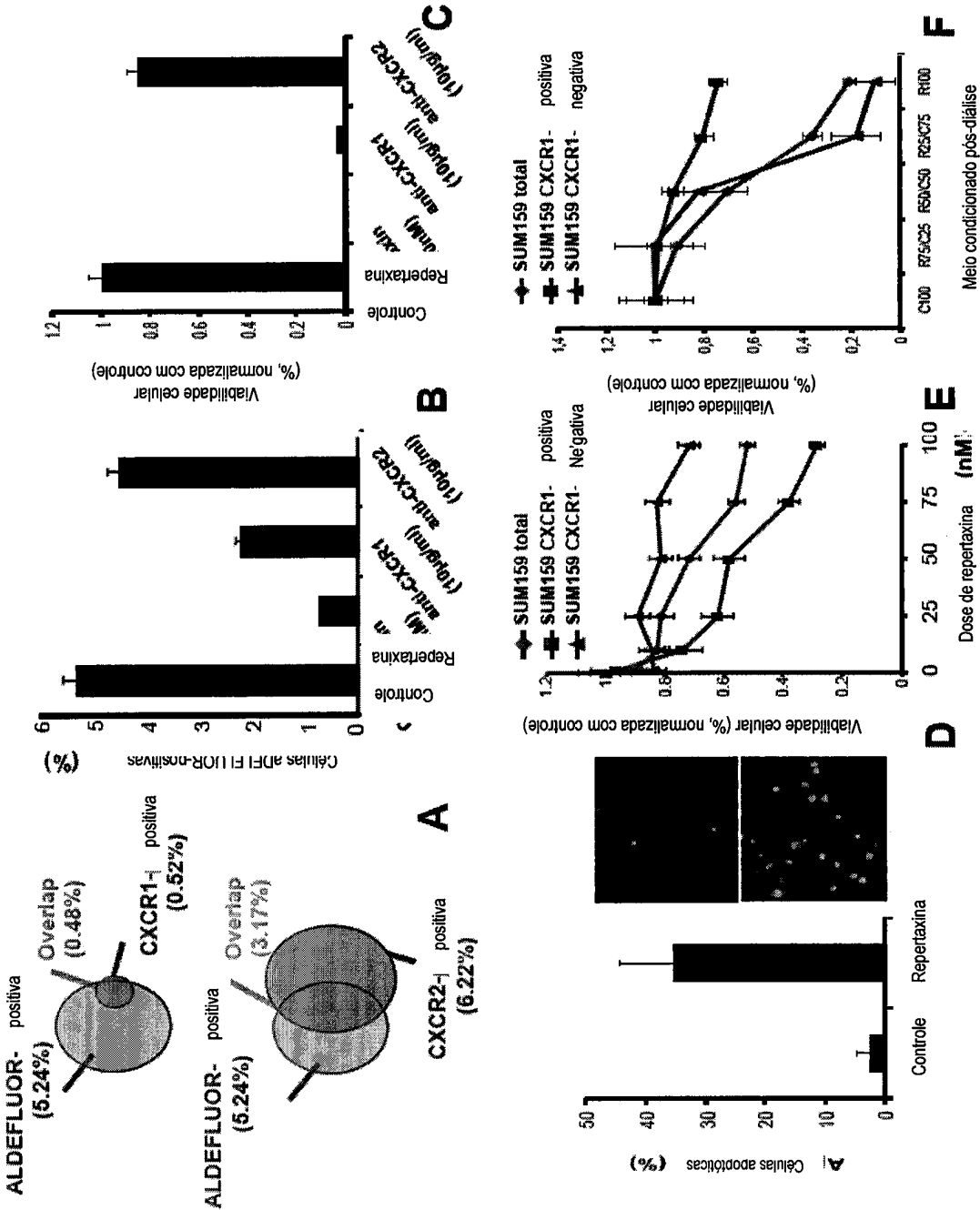


FIGURA 13

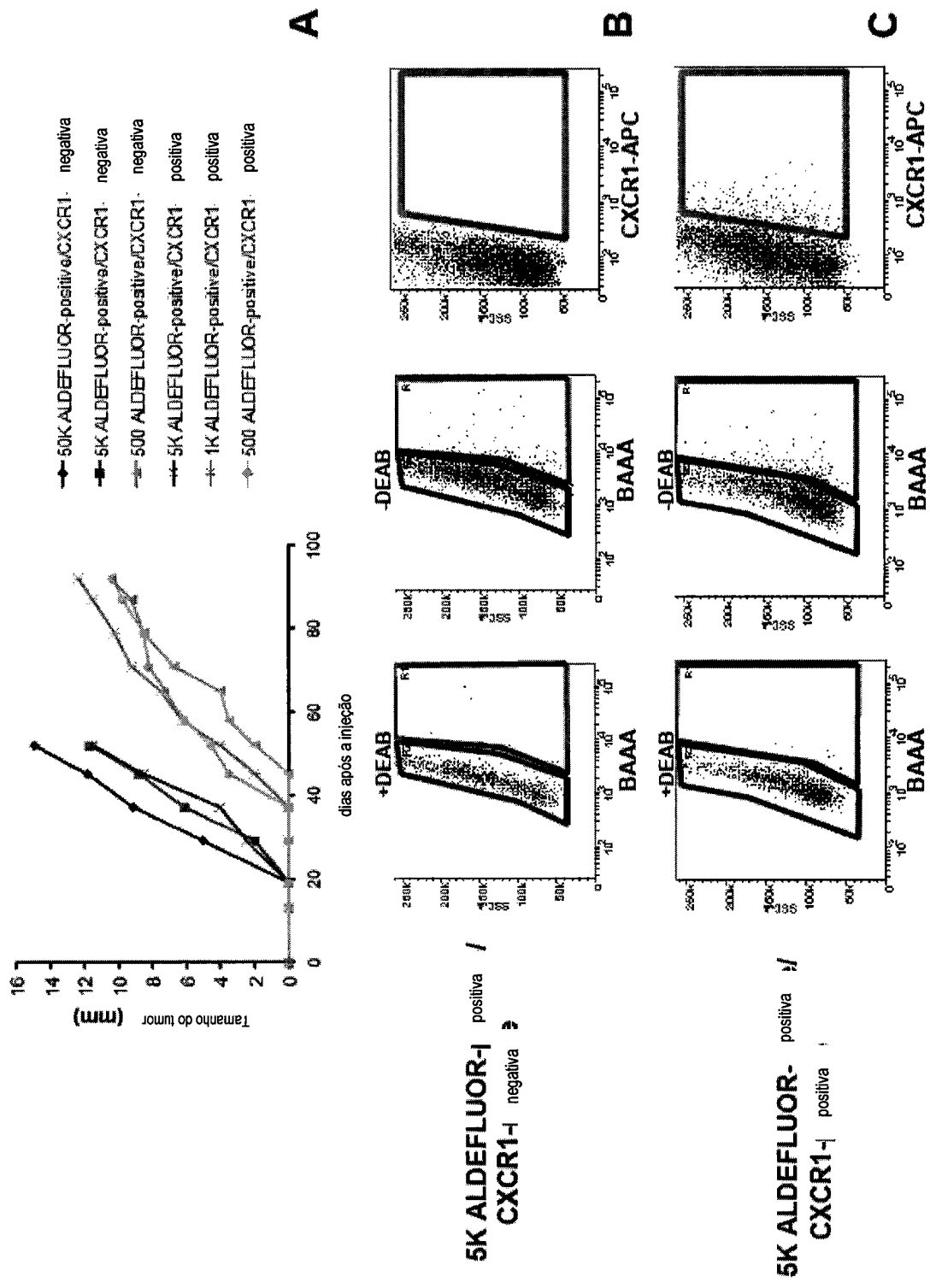


FIGURA 14

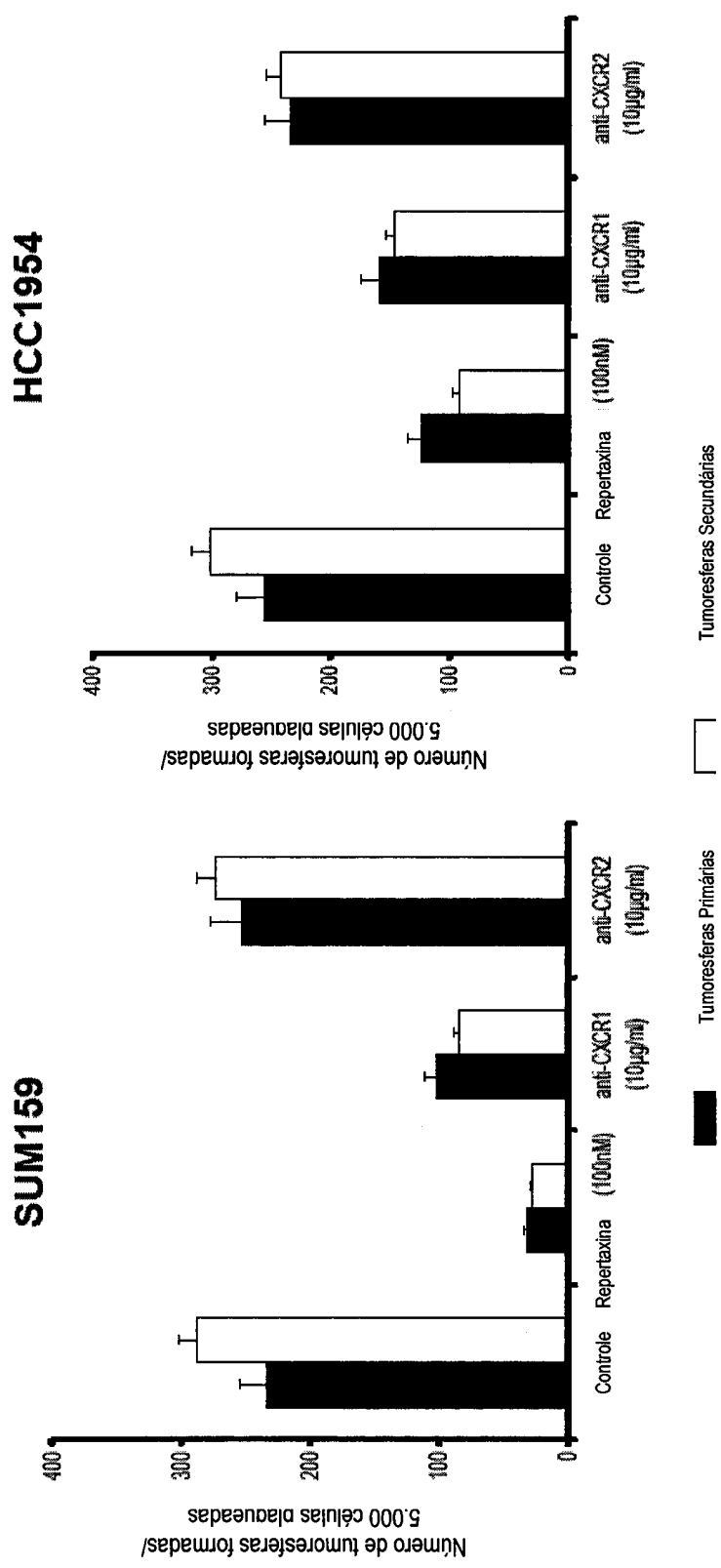


FIGURA 15

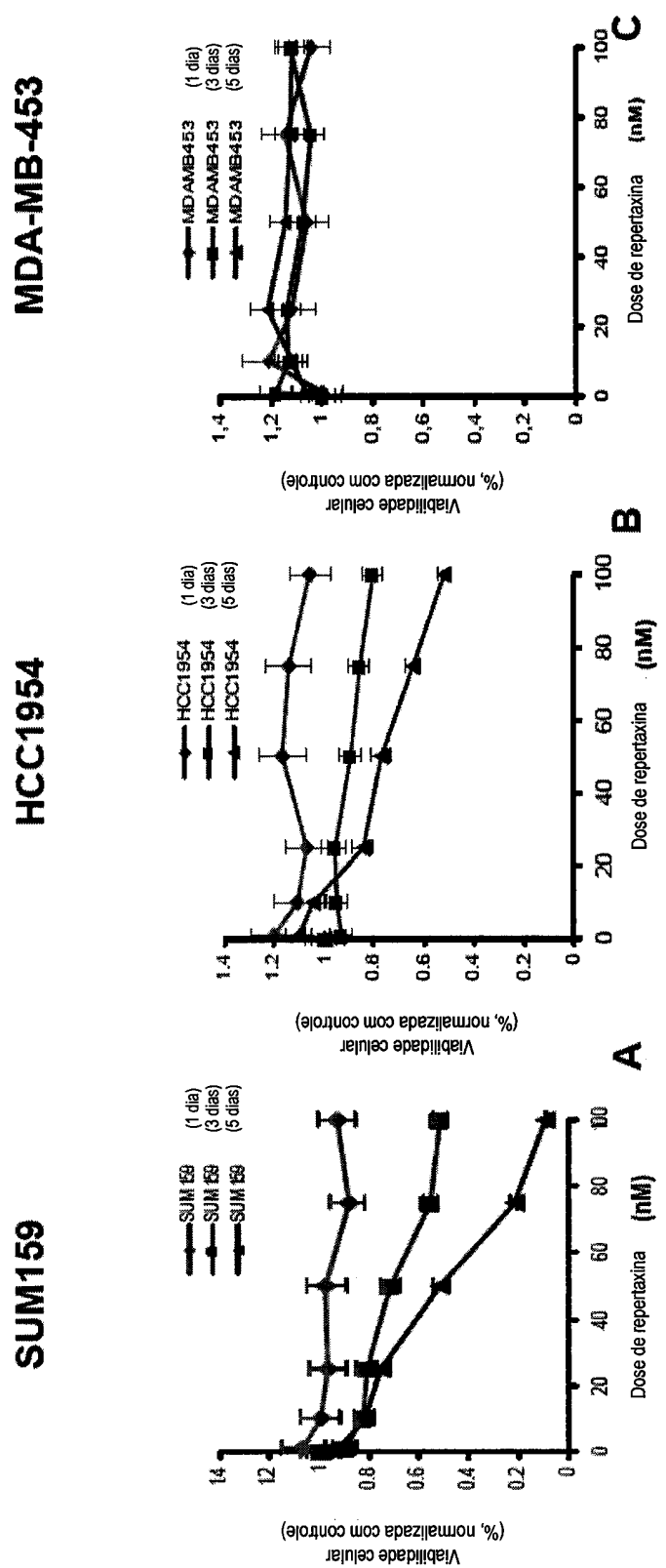


FIGURA 16

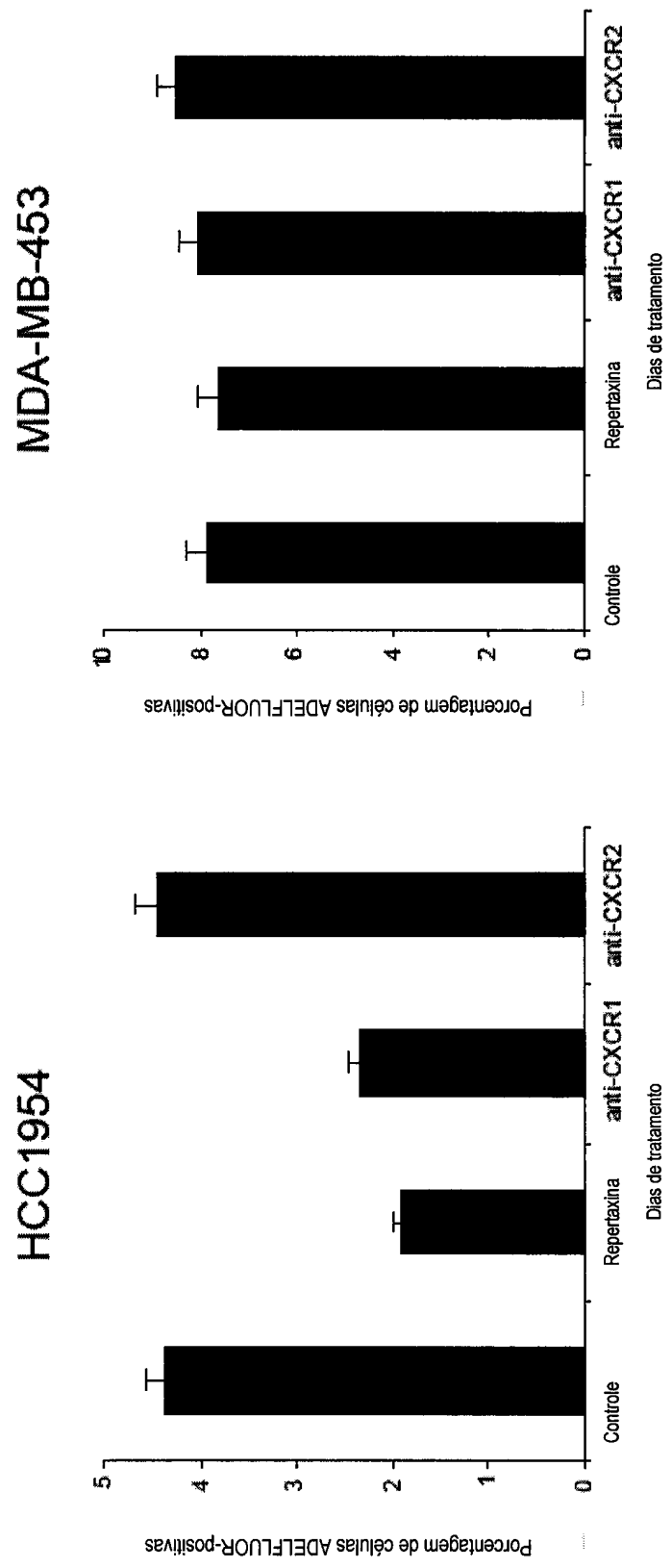


FIGURA 17

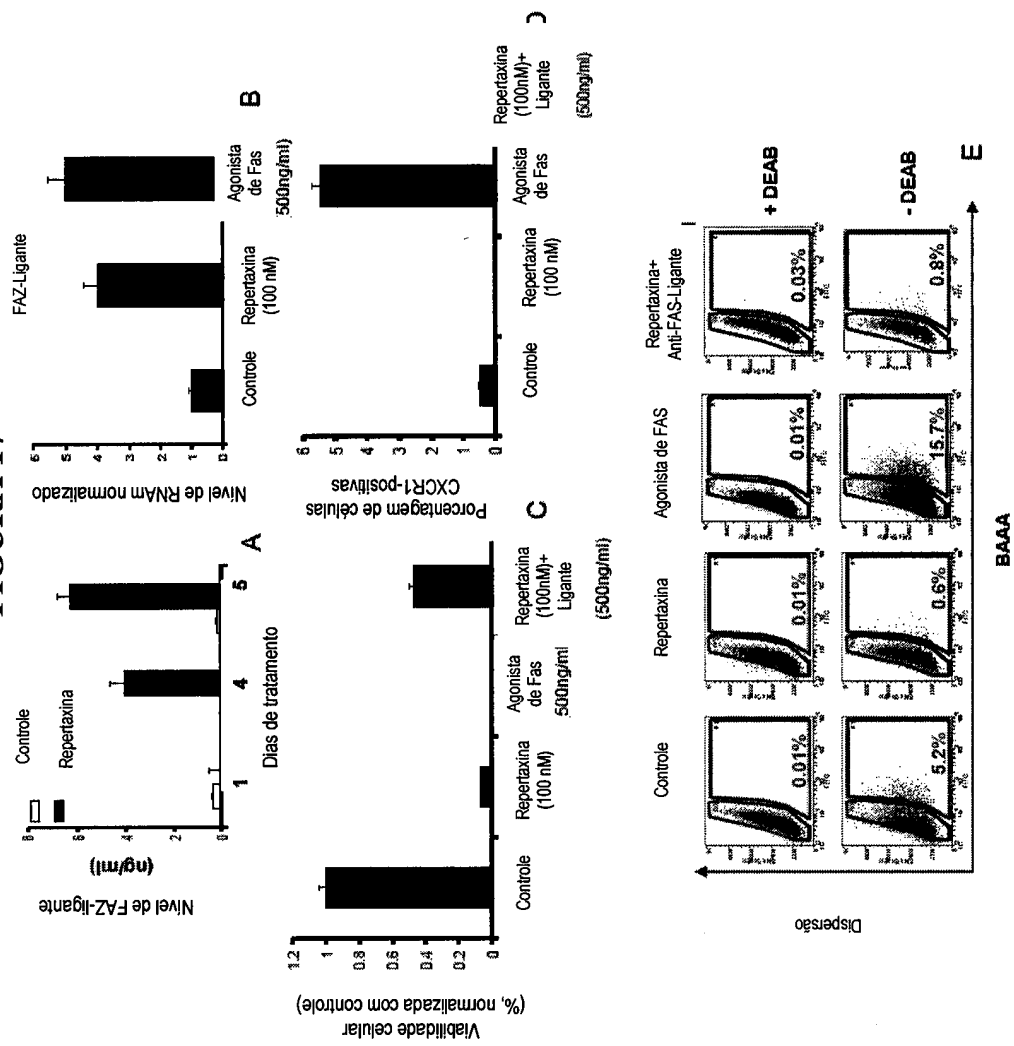


FIGURA 18

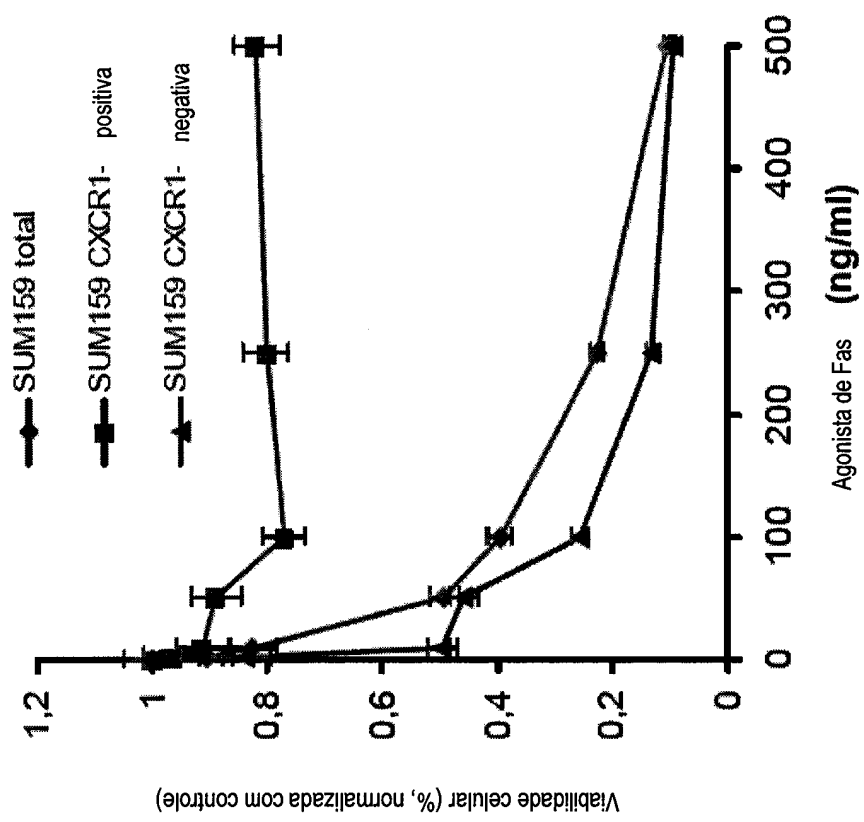


FIGURA 19

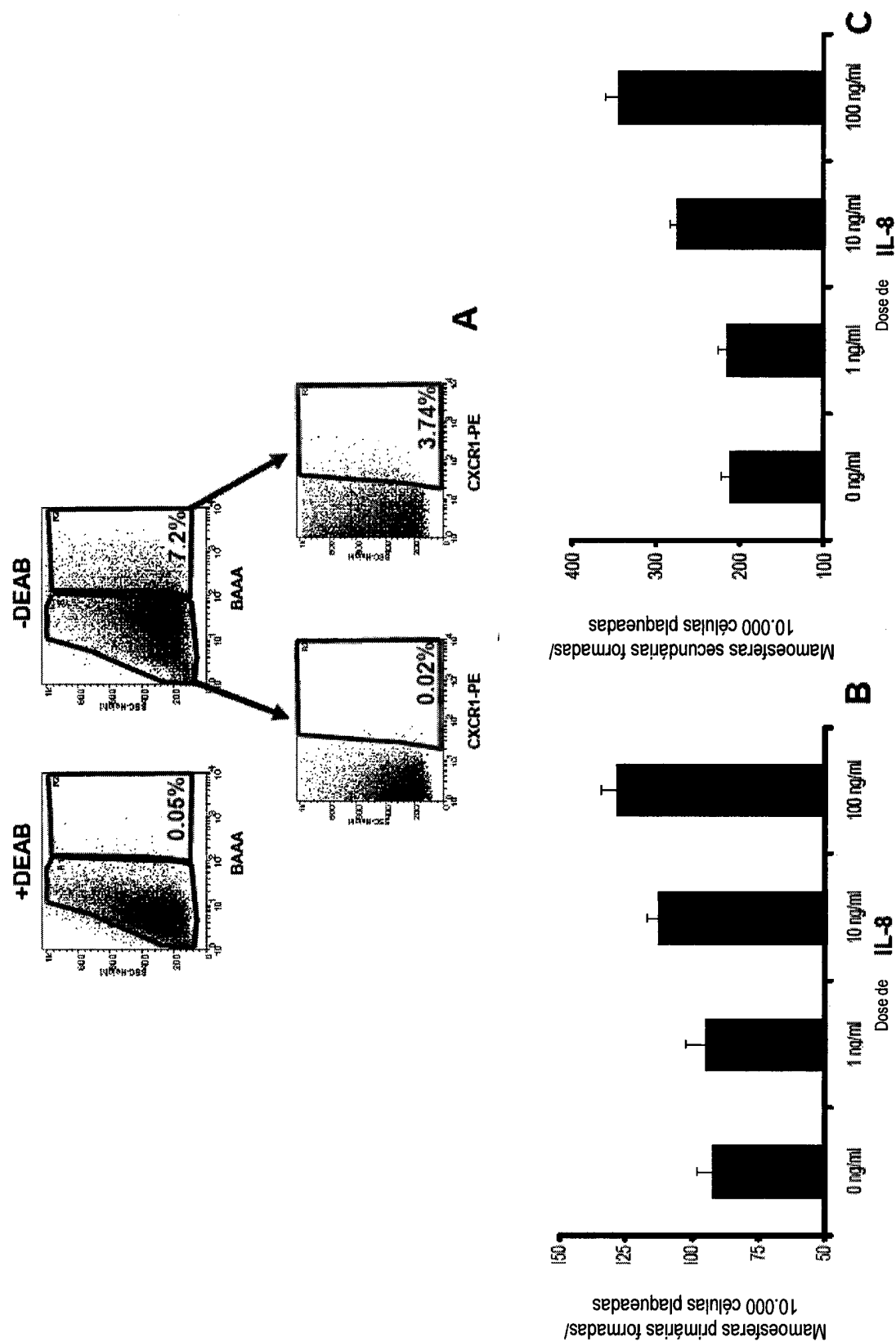


FIGURA 20

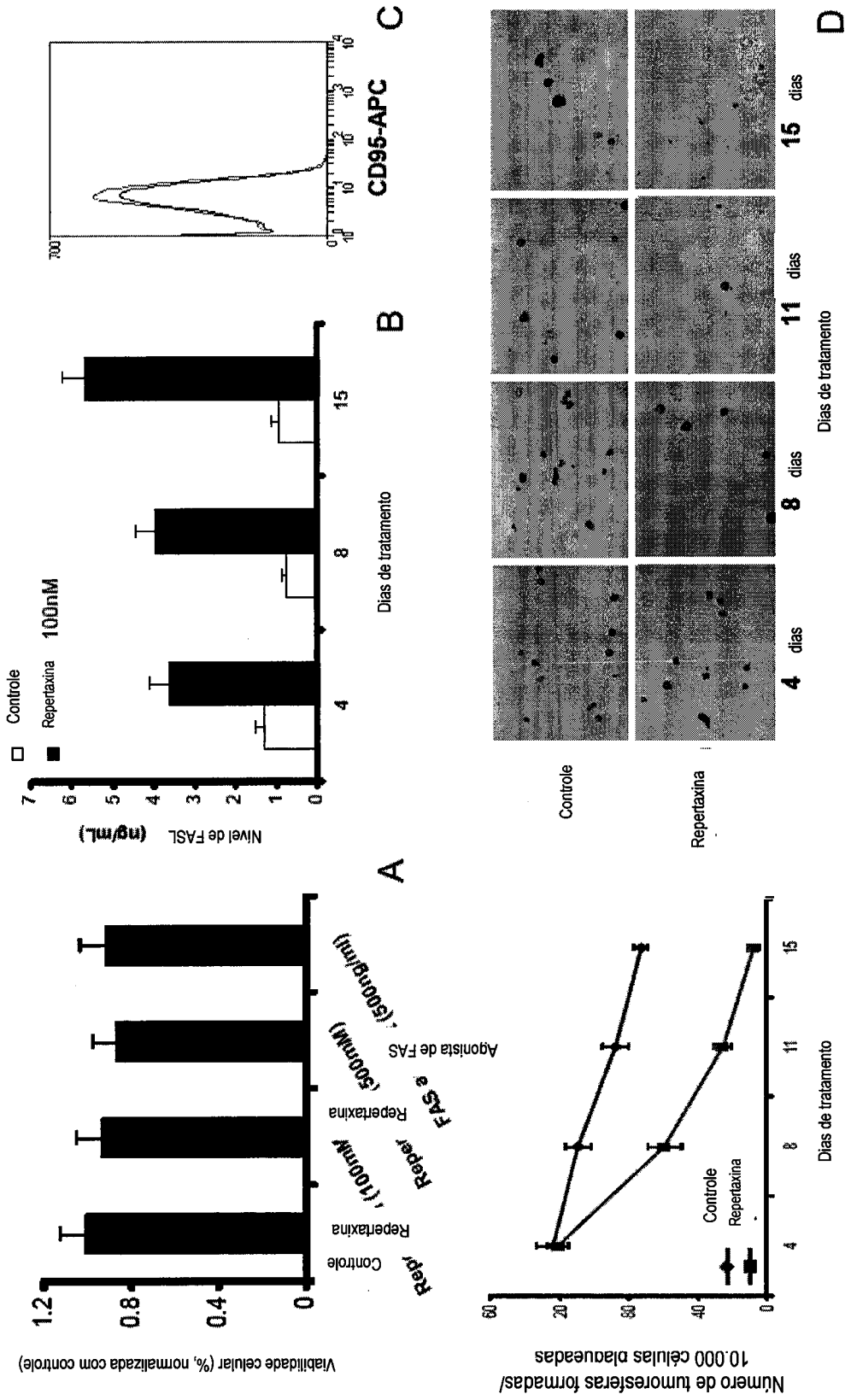


FIGURA 21

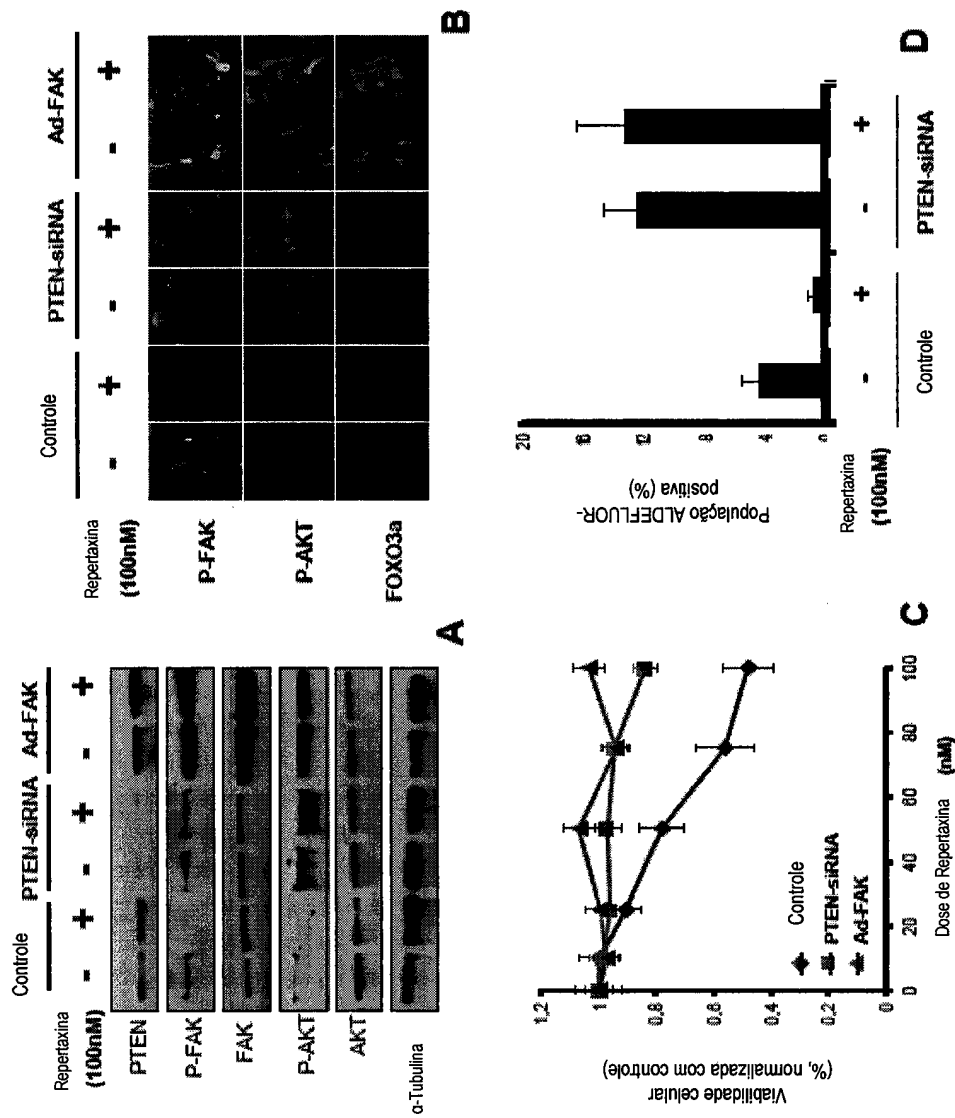


FIGURA 22

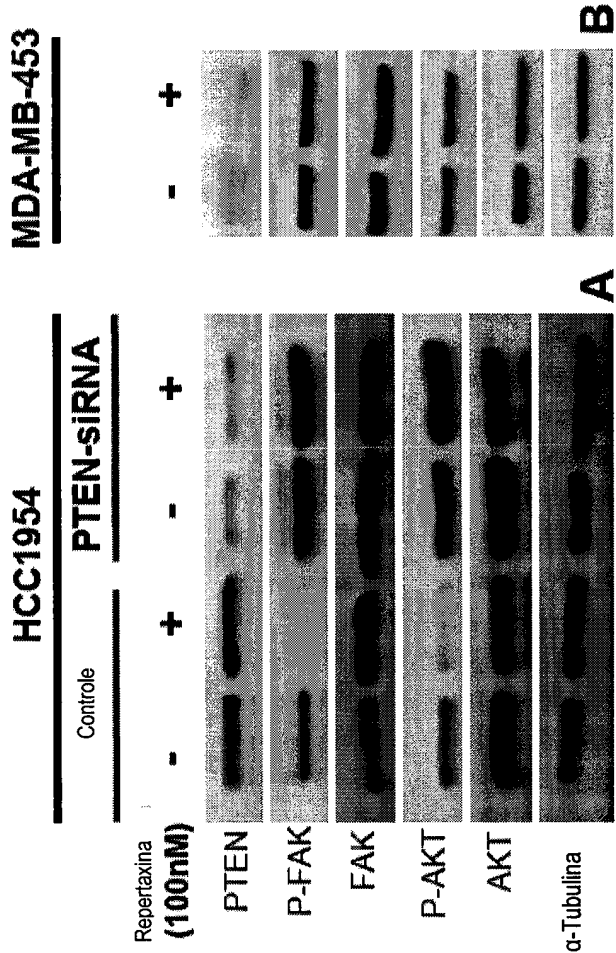
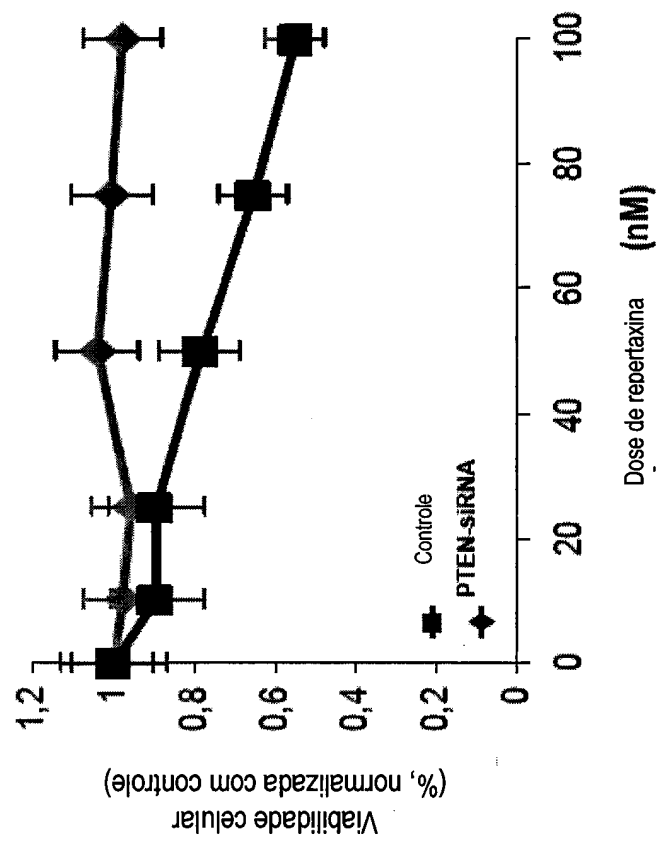


FIGURA 23

HCC1954

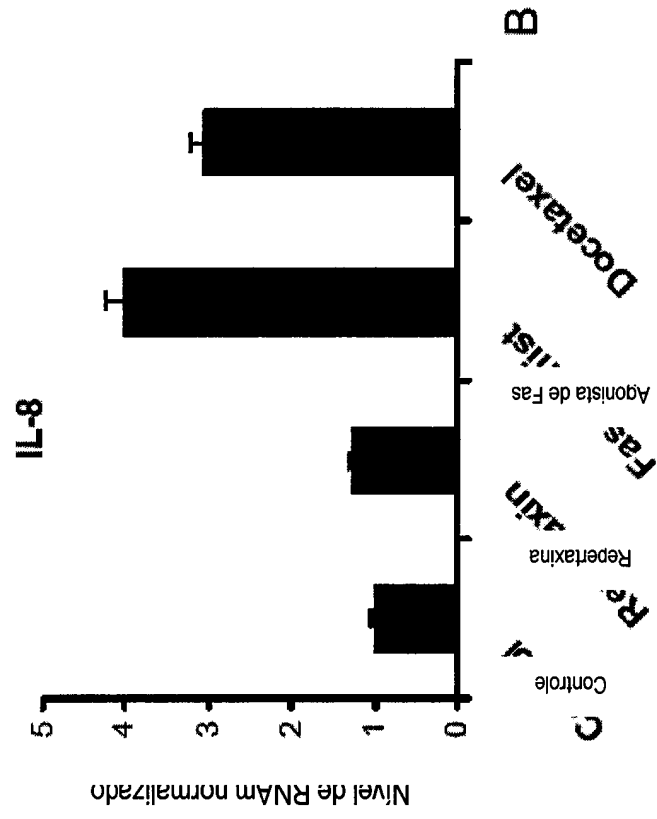
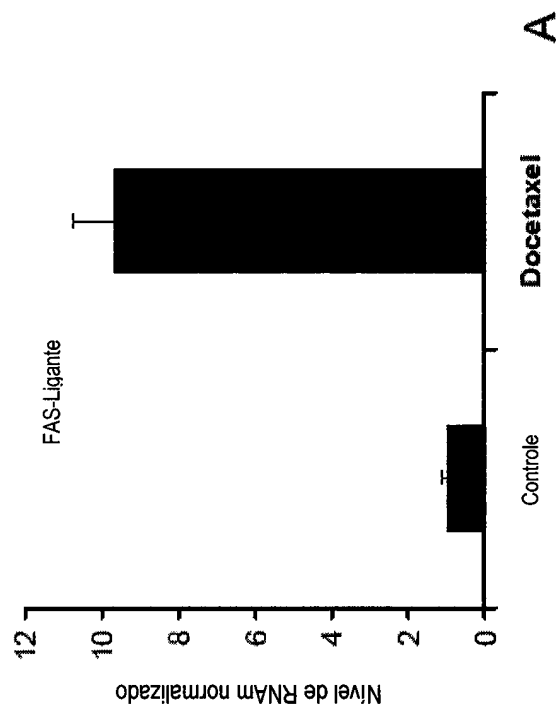


FIGURA 24

FIGURA 25

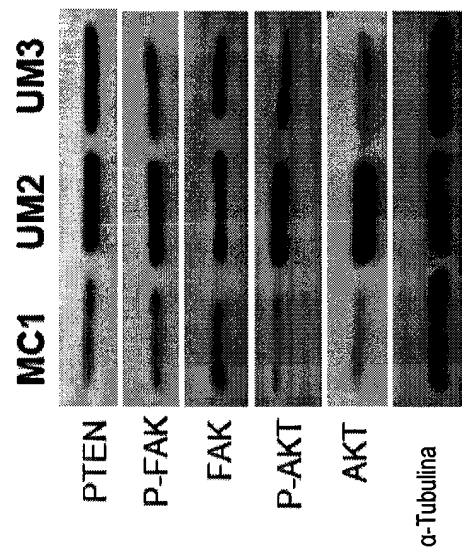


FIGURA 26

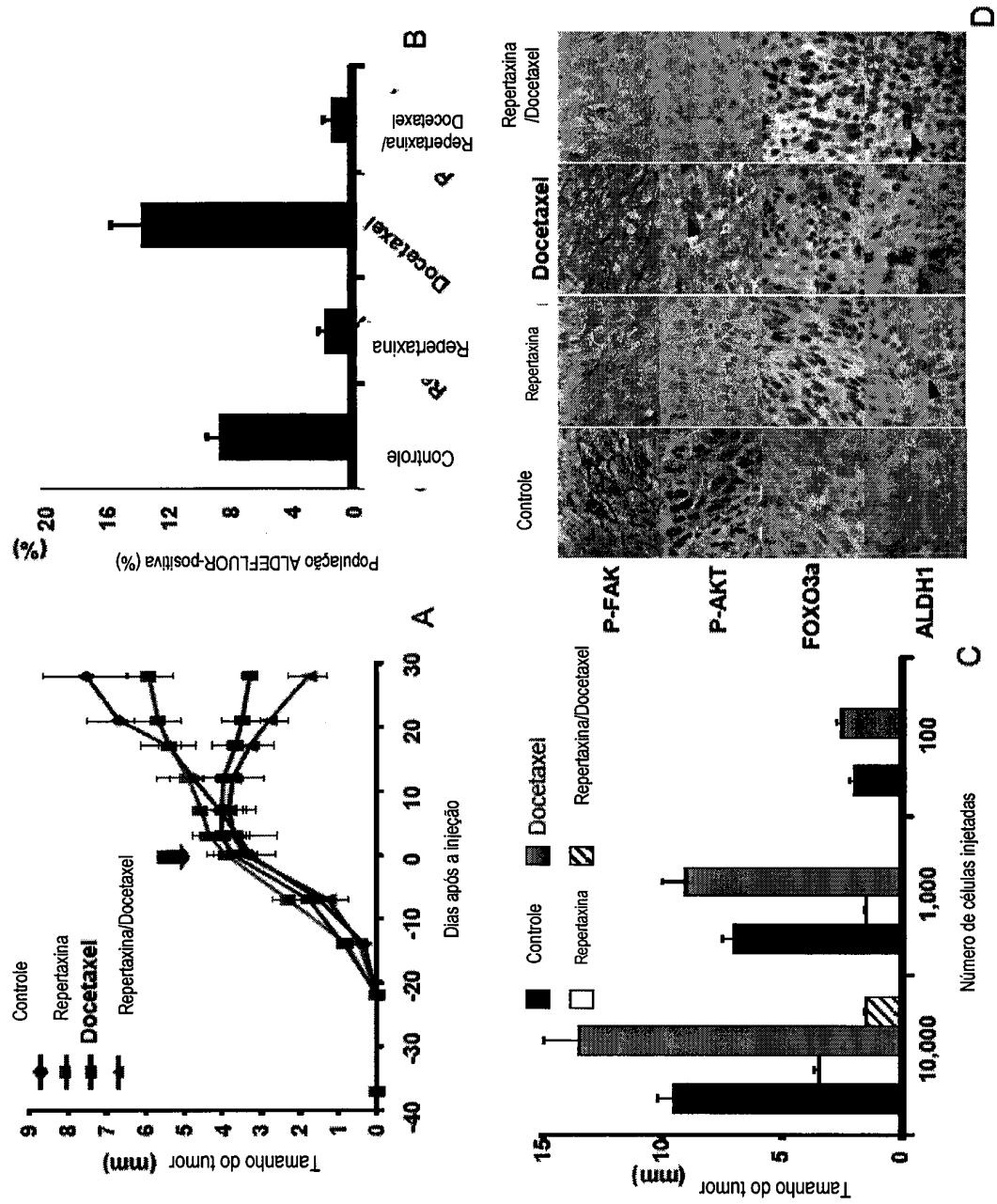


FIGURA 27

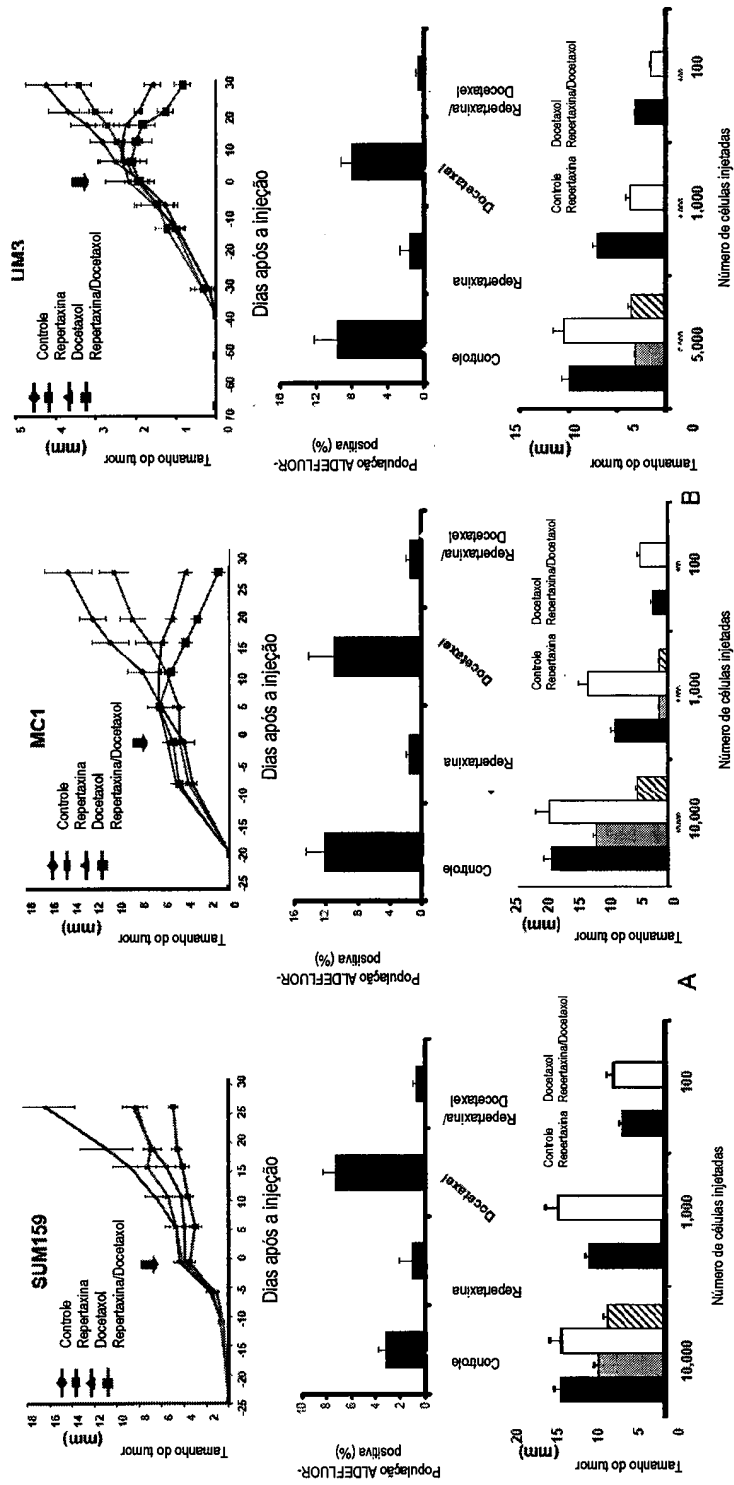


FIGURA 28

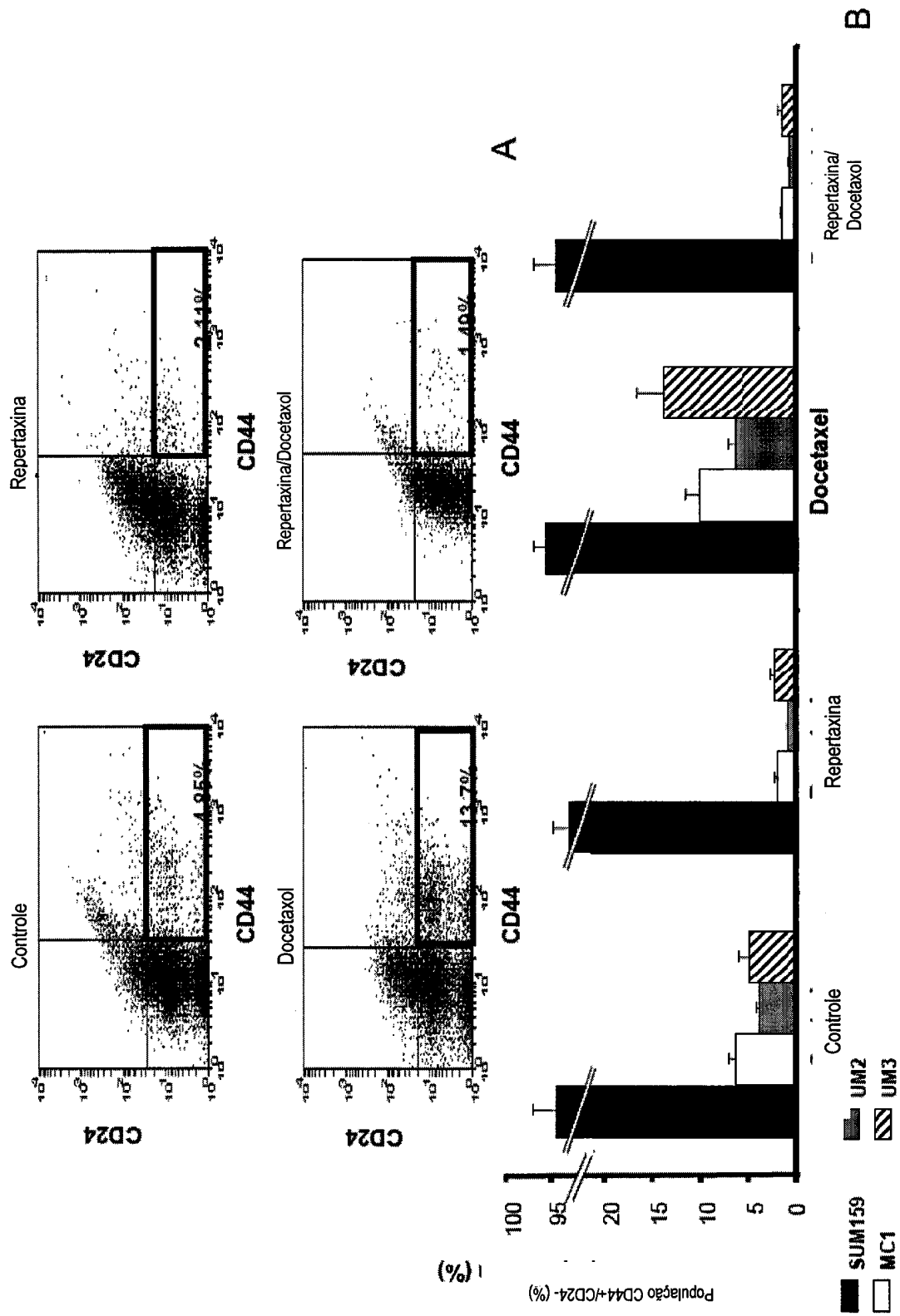


FIGURA 29

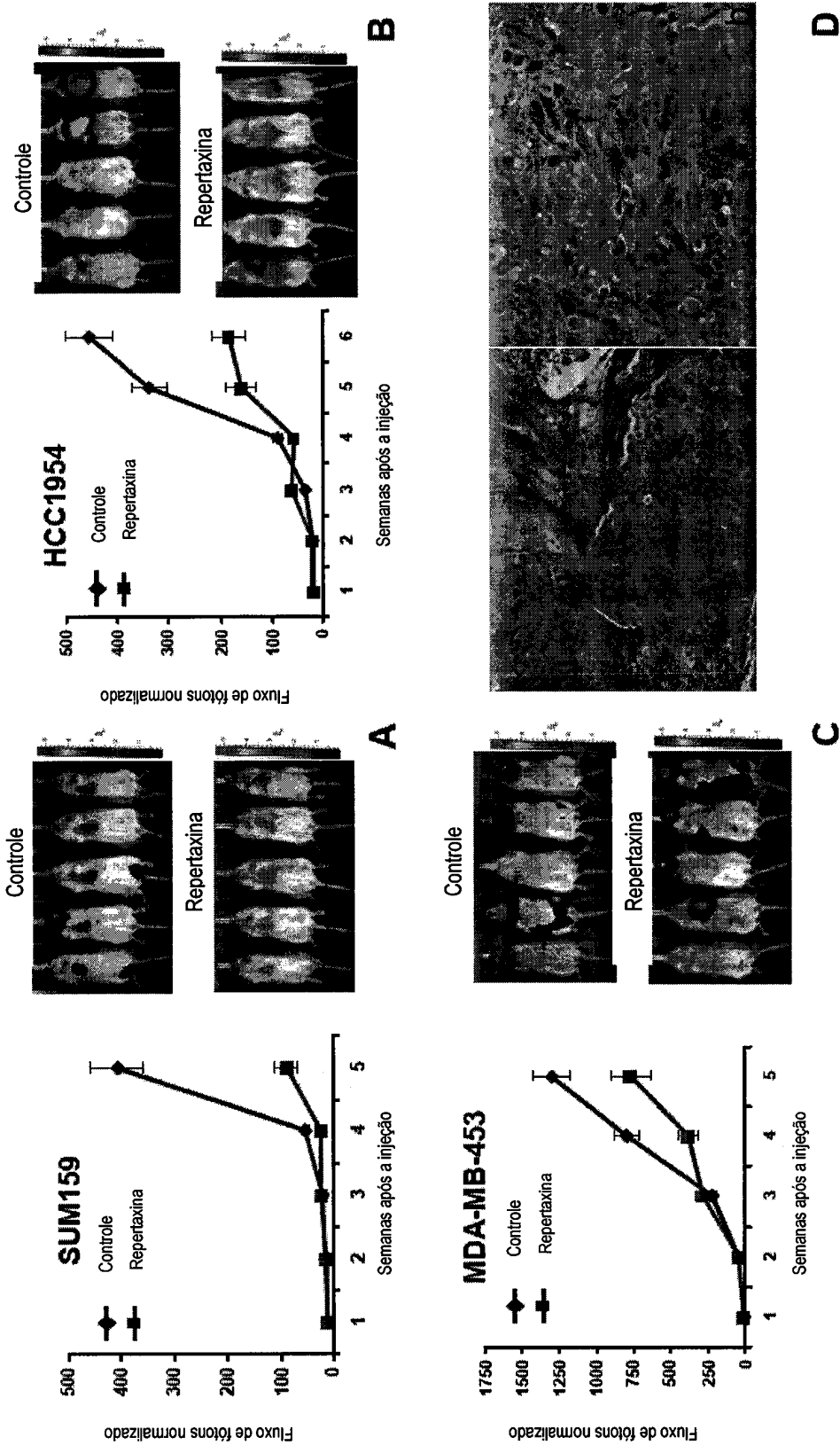
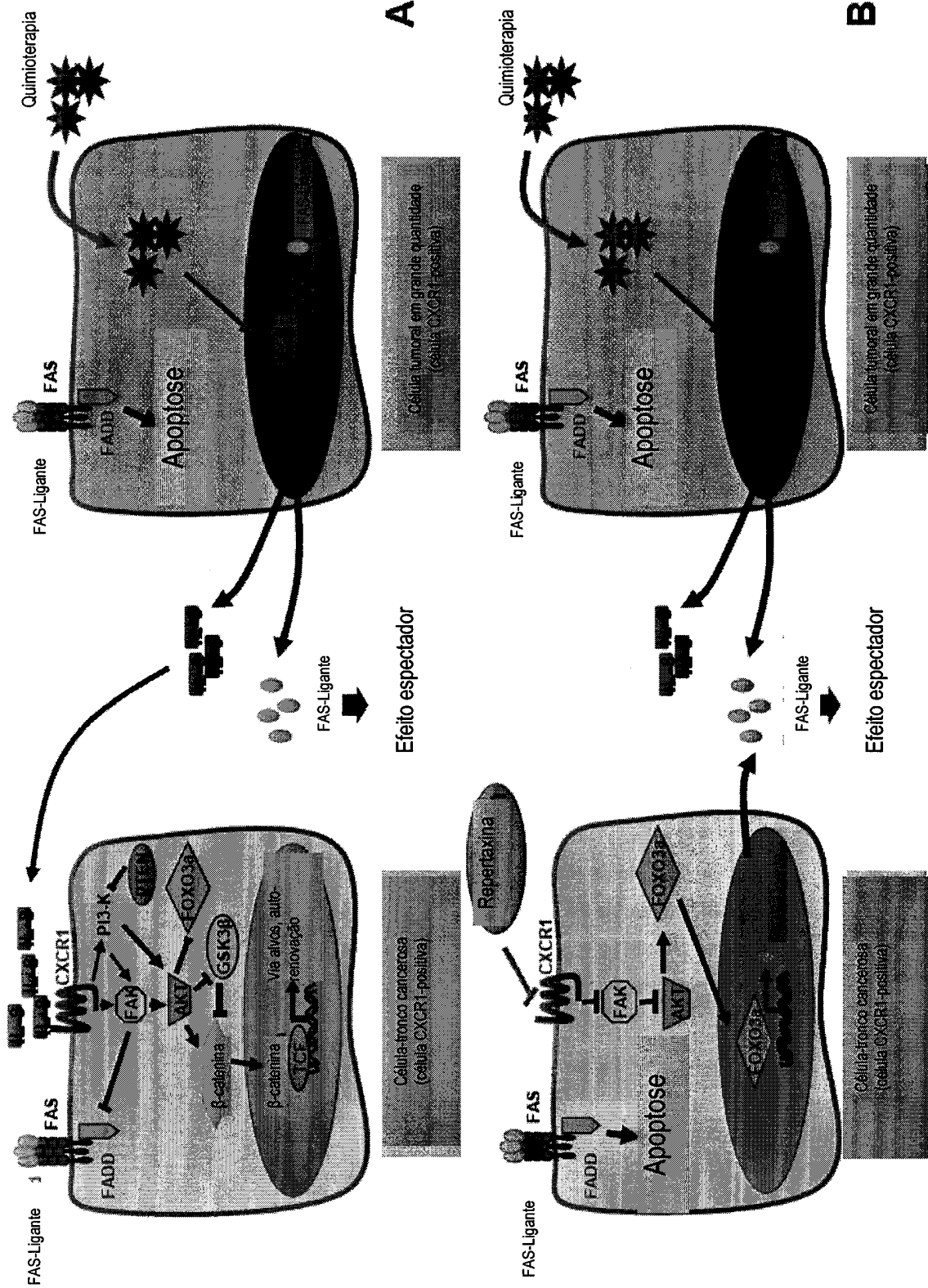


FIGURA 30



RESUMO

“MÉTODOS E COMPOSIÇÕES ANTI-CXCR1”

5 Trata-se de métodos de tratamento de câncer mediante a administração de um inibidor da via de IL8-CXCR1 (por exemplo, um anticorpo anti-CXCR1 ou Repertaxina) sozinho ou em combinação com um agente quimioterápico adicional, de tal modo que as células de câncer não-tumorigênicas e tumorigênicas em um indivíduo sejam exterminadas. A presente invenção também fornece composições e métodos para a detecção da presença de e o isolamento de células tronco de tumor sólido em um paciente (por exemplo, com base na presença de CXCR1 ou FBXO21).