



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

(21) PI 0715062-8 A2



* B R P I 0 7 1 5 0 6 2 A 2 *

(22) Data de Depósito: 26/07/2007

(43) Data da Publicação: 04/06/2013
(RPI 2213)

(51) Int.Cl.:

G01N 33/574

(54) Título: MÉTODOS PARA DETERMINAR UMA RESPOSTA DE UM INDIVÍDUO MAMÍFERO QUE TEM CÉLULAS DE TUMOR DE MELANOMA AO TRATAMENTO COM UM AGENTE INIBIDOR DE MELANOMA, PARA AVALIAR A EFICÁCIA DE UM AGENTE INIBIDOR DE MELANOMA PARA TRATAR MELANOMA EM UM INDIVÍDUO MAMÍFERO QUE TEM MELANOMA, PARA DETERMINAR SE UM PACIENTE DEVE CONTINUAR A RECEBER TRATAMENTO COM UM AGENTE INIBIDOR DE MELANOMA E PARA IDENTIFICAR AGENTE QUE TÊM UTILIDADE NO TRATAMENTO DE MELANOMA

(30) Prioridade Unionista: 28/07/2009 US 60820756

(73) Titular(es): Novartis AG

(72) Inventor(es): Carla Heise, Eleni Venetsanakos, Michael Faure, Nguyen Tan

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2007016848 de 26/07/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/013912de 31/01/2008

(57) Resumo: MÉTODOS PARA DETERMINAR UMA RESPOSTA DE UM INDIVÍDUO MAMÍFERO QUE TEM CÉLULAS DE TUMOR DE MELANOMA AO TRATAMENTO COM UM AGENTE INIBIDOR DE MELANOMA, PARA AVALIAR A EFICÁCIA DE UM AGENTE INIBIDOR DE MELANOMA PARA TRATAR MELANOMA EM UM INDIVÍDUO MAMÍFERO QUE TEM MELANOMA, PARA DETERMINAR SE UM PACIENTE DEVE CONTINUAR A RECEBER TRATAMENTO COM UM AGENTE INIBIDOR DE MELANOMA E PARA IDENTIFICAR AGENTE QUE TÊM UTILIDADE NO TRATAMENTO DE MELANOMA. A presente invenção refere-se a um método para determinar uma resposta de um indivíduo mamífero que tem células tumorais de melanoma ao tratamento com um agente inibidor de melanoma. Em um aspecto, o método compreende (a) determinar uma primeira concentração de proteína de atividade inibidora de melanoma (MIA) em uma primeira amostra biológica tomada do indivíduo mamífero antes do tratamento com o agente inibidor, de melanoma; (c) comparar a primeira e a segunda concentrações de MIA medida na segunda amostra biológica quando comparada com a primeira concentração de MIA medida na primeira amostra biológica indica uma resposta positiva ao tratamento com o agente inibidor de melanoma.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODOS PARA DETERMINAR UMA RESPOSTA DE UM INDIVÍDUO MAMÍFERO QUE TEM CÉLULAS DE TUMOR DE MELANOMA AO TRATAMENTO COM UM AGENTE INIBIDOR DE MELANOMA, PARA AVALIAR A EFICÁCIA DE UM AGENTE INIBIDOR DE MELANOMA PARA TRATAR MELANOMA EM UM INDIVÍDUO MAMÍFERO QUE TEM MELANOMA, PARA DETERMINAR SE UM PACIENTE DEVE CONTINUAR A RECEBER TRATAMENTO COM UM AGENTE INIBIDOR DE MELANOMA E PARA IDENTIFICAR AGENTE QUE TÊM UTILIDADE NO TRATAMENTO DE MELANOMA**".

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se relaciona ao uso de Proteína de Atividade inibidora de Melanoma (MIA) como um indicador precoce para resposta ao tratamento com um inibidor de célula de tumor de melanoma em indivíduos mamíferos que sofrem de melanoma.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Taxas de incidência global para melanoma são crescentes entre homens e mulheres nos Estados Unidos (veja, por exemplo, Edwards B. K. *et al.*, J. Nat. Cancer Inst. 97: 1407-1427 (2005)). Desde 1981, a taxa de aumento tem sido de cerca de 3% por ano. De acordo com as estimativas da Sociedade de Câncer Americana, houve cerca de 59.580 novos casos de melanoma nos U.S. Em 2005 e cerca de 7.700 pessoas morreram desta doença (American Cancer Society Cancer Facts and Figures 2005, Amer. Cancer Soc. 2005: 1-62). Tratamentos aprovados pelo FDA para melanoma metastático incluem os de dacarbazina, interferon-alfa e interleucina-2. Entretanto, o prognóstico de pacientes com doença disseminada permanece pobre, com uma taxa de sobrevivência em 5 anos de 16% ou menos nos U.S.. Devido à limitada eficácia de tratamentos correntes, a necessidade por novas terapias é particularmente forte. Novos tratamentos tal como agentes antiangiogênicos, inibidores de Raf quinase e vacinas estão atualmente sendo desenvolvidos e podem oferecer melhoras na sobrevivência de pacientes com esta doença (Mandara M. *et al.*, Expert Rev. Anticancer Ther. 6: 121-130

(2006)).

Dada a alta incidência de melanoma e a limitada eficácia de tratamentos correntes, são necessários um biomarcador de melanoma e ensaio para um biomarcador de melanoma que pudessem servir como um indicador precoce preciso para resposta terapêutica em um indivíduo mamífero para medir a eficácia de agentes inibidores de melanoma candidatos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com o anterior, em um aspecto, um método é provido para determinar uma resposta de um indivíduo mamífero que tem células tumorais de melanoma ao tratamento com um agente inibidor de melanoma. O método compreende: (a) determinar uma primeira concentração de proteína de atividade inibidora de melanoma (MIA) em uma primeira amostra biológica tomada do indivíduo mamífero antes do início do tratamento com um agente inibidor de melanoma; (b) determinar uma segunda concentração de MIA em uma segunda amostra biológica do indivíduo mamífero após o início do tratamento com um agente inibidor de melanoma; (c) comparar a primeira e a segunda concentrações de MIA, em que uma diminuição na segunda concentração de MIA medida na segunda amostra biológica quando comparada com a primeira concentração de MIA medida na primeira amostra biológica indica uma resposta positiva ao tratamento com o agente inibidor de melanoma.

Em outro aspecto, a invenção provê um método para avaliar a eficácia de um agente inibidor de melanoma para tratar melanoma em um indivíduo mamífero que tem melanoma. O método compreende (a) determinar uma primeira concentração de proteína de atividade inibidora de melanoma (MIA) em uma primeira amostra biológica tomada do indivíduo mamífero antes do início do tratamento com um agente inibidor de melanoma; (b) determinar uma segunda concentração de MIA em uma segunda amostra biológica do indivíduo mamífero após o início do tratamento com um agente inibidor de melanoma; (c) comparar a primeira e a segunda concentrações de MIA, em que uma diminuição na segunda concentração de MIA medida na segunda amostra biológica quando comparada com a primeira concen-

tração de MIA medida na primeira amostra biológica é indicativa da eficácia do agente inibidor para tratar melanoma.

Em outro aspecto, a invenção provê um método para determinar se um paciente deve continuar a receber tratamento com um agente inibidor de melanoma. O método compreende (a) determinar uma primeira concentração de proteína de atividade inibidora de melanoma (MIA) em uma primeira amostra biológica tomada de um indivíduo mamífero antes do início do tratamento com um agente inibidor de melanoma; (b) determinar uma segunda concentração de MIA em uma segunda amostra biológica do indivíduo mamífero após o início do tratamento com um agente inibidor de melanoma; (c) comparar as ditas primeira e segunda concentrações de MIA; (d) determinar que o paciente deva continuar a ser tratado com o agente inibidor de melanoma se a segunda concentração de MIA estiver reduzida em pelo menos 20% em comparação com a primeira concentração de MIA.

Ainda em outro aspecto, a invenção provê um método para identificar agentes que têm utilidade no tratamento de melanoma. O método compreende (a) determinar uma primeira concentração de proteína de atividade inibidora de melanoma (MIA) em uma primeira amostra tomada de uma linhagem celular mamífera de melanoma cultivada antes de administrar o agente à linhagem celular mamífera de melanoma; (b) determinar uma segunda concentração de MIA em uma segunda amostra tomada da linhagem celular mamífera de melanoma após administrar o agente à linhagem celular mamífera de melanoma; (c) comparar a primeira e a segunda concentrações de MIA; (d) determinar que o agente tenha utilidade no tratamento de melanoma se a segunda concentração de MIA estiver reduzida em pelo menos 20% em comparação com a primeira concentração de MIA.

BREVE DESCRIÇÃO DAS figuras

Os aspectos antecedentes e muitas das vantagens anexas desta invenção tornar-se-ão mais prontamente apreciadas conforme as mesmas tornarem-se melhor entendidas por referência à seguinte descrição detalhada, quando tomada em conjunto com as ilustrações acompanhantes, em que:

a figura 1A provê um alinhamento de sequência de aminoácidos de proteína MIA isolada de várias espécies de mamíferos e não-mamíferos;

a figura 1B provê um alinhamento de sequência de aminoácidos de proteína MIA isolada de primatas;

5 a figura 2 ilustra graficamente os resultados de um ensaio de ELISA de MIA demonstrando que MIA é secretada nos meios de cultura de linhagens celulares de melanoma, mas não de linhagens celulares de carcinoma de cólon, como descrito no EXEMPLO 1;

10 a figura 3 ilustra graficamente os resultados de um ensaio ELISA de MIA em camundongos não-portadores de tumor *naïve* (n=4) e camundongos *nude* atímicos implantados com células de melanoma humano A375M, que têm tumores de aproximadamente 250mm³ de volume (n=10), como descrito no EXEMPLO 2;

15 a figura 4A ilustra graficamente que níveis plasmáticos de MIA diminuem em resposta à inibição de crescimento tumoral induzida por dosagem oral de CHIR-265 no modelo de camundongo com xenoenxerto de melanoma humano A375M, como descrito no EXEMPLO 2;

20 a figura 4B ilustra graficamente que níveis plasmáticos de MIA diminuem em resposta à inibição de crescimento tumoral induzida por dosagem oral de CHIR-265 e Sorafenib no modelo de camundongo com xenoenxerto de melanoma humano MEXF 276, como descrito no EXEMPLO 2;

25 a figura 4C ilustra graficamente que níveis plasmáticos de MIA diminuem em resposta à inibição de crescimento tumoral induzida por dosagem oral de CHIR-265 e Sorafenib no modelo de camundongo com xenoenxerto de melanoma humano MEXF 1341, como descrito no EXEMPLO 2;

a figura 5A ilustra graficamente as alterações iniciais nos níveis plasmáticos de MIA em resposta ao tratamento com CHIR-258 e CHIR-265 no modelo de camundongo com xenoenxerto de melanoma humano A375M, como descrito no EXEMPLO 3;

30 a figura 5B mostra os volumes de tumor nos camundongos portadores de tumor de melanoma humano A375M antes da dosagem (dia 0) e nos dias 3, 8 e 13 após tratamento com CHIR-258 e CHIR-265 em compara-

ção com controles de veículo, como descrito no EXEMPLO 3;

a figura 6A mostra os volumes de tumor nos camundongos portadores de tumor de melanoma humano CHL-1 antes da dosagem (dia 0) e nos dias 8 e 22 após tratamento com CHIR-258 (de 30mg/kg e 80mg/kg) em
5 comparação com controles de veículo, como descrito no EXEMPLO 4;

a figura 6B ilustra graficamente as alterações iniciais em níveis plasmáticos de MIA em resposta ao tratamento com CHIR-258 (de 30mg/kg e 80mg/kg) no modelo de camundongo com xenoenxerto de melanoma humano CHL-1, como descrito no EXEMPLO 4.

10 DESCRIÇÃO DETALHADA DA MODALIDADE PREFERIDA

A menos que especificamente definido aqui, todos os termos usados aqui têm o mesmo significado como se eles teriam para alguém versado na técnica da presente invenção. As seguintes definições são providas a fim de prover clareza em relação aos termos conforme eles forem usados
15 na especificação e reivindicações para descrever a presente invenção.

Conforme aqui utilizado, o termo "resposta positiva ao tratamento no indivíduo mamífero" se refere a uma redução de volume tumoral e/ou inibição de crescimento tumoral após tratamento com um agente inibidor de melanoma.

20 Em um aspecto, é provido um método para determinar uma resposta de um indivíduo mamífero que tem células tumorais de melanoma ao tratamento com um agente inibidor de melanoma. O método compreende: (a) determinar uma primeira concentração de proteína de atividade inibidora de melanoma (MIA) em uma primeira amostra biológica tomada do indivíduo
25 mamífero antes do início do tratamento com um agente inibidor de melanoma; (b) determinar uma segunda concentração de MIA em uma segunda amostra biológica do indivíduo mamífero tomada após o início do tratamento com o agente inibidor de melanoma; (c) comparar a primeira e a segunda concentrações de MIA, em que uma diminuição na segunda concentração
30 de MIA medida na segunda amostra biológica quando comparada com a primeira concentração de MIA medida na primeira amostra biológica indica uma resposta positiva ao tratamento com o agente inibidor de melanoma.

Conforme aqui utilizado, o termo "atividade inibidora de melanoma ("MIA")" se refere a uma proteína solúvel de 12-kDa disponível publicamente no banco de dados do GenBank sob o número de acesso NP_006524, codificado pelo cDNA listado sob o número de acesso do GenBank NM_006533 e homólogos de mamíferos ou seus fragmentos compreendendo pelo menos dez resíduos consecutivos da proteína MIA. Demonstrou-se que MIA está envolvida na soltura das células de melanoma da matriz extracelular pela ligação às moléculas de fibronectina e laminina, prevenindo desse modo a interação célula-matriz (Brockez L. *et al.*, Br. J. Dermatol. 143: 256-268 (2000)). MIA foi isolada originalmente do sobrenadante da linhagem celular de melanoma HTZ-19 humana (Bogdahn U. *et al.*, Cancer Res. 49: 5358-5363 (1989)). Como mostrado na figura 1A, a proteína MIA humana tem 131 aminoácidos, em que os primeiros 24 aminoácidos compreendem uma sequência sinal que direciona a secreção de MIA no compartimento extracelular. A MIA humana secretada, madura tem 107 aminoácidos.

Como mostrado adicionalmente na figura 1A, homólogos de proteína MIA foram identificados em várias espécies de mamíferos e não-mamíferos incluindo, por exemplo, rato (r), camundongo (m), chimpanzé (chimp), macaco Rhesus (rh), cachorro (d), bovino (bov), hamster (ham) e baiacu (pf). A sequência de aminoácidos de MIA humana é provida pelo número do GenBank NP_006524; proteína MIA de camundongo é provida como número do GenBank NP_062267; proteína MIA de rato é provida como número do GenBank NP_110479, proteína MIA de hamster é provida como número do GenBank AAF76220, proteína MIA de vaca é provida como número do GenBank NP_776361, proteína MIA de macaco Rhesus é provida como número do GenBank XP_001098600, proteína MIA de cachorro é provida como número do GenBank XP_541610, proteína MIA de chimpanzé é provida como número do GenBank XP_512675 e proteína MIA de baiacu é provida como número do GenBank AAL26991, conforme acessado em 20 de julho de 2006, cada um dos quais está incorporado como referência.

Em uma modalidade, proteínas MIA úteis na prática da presente

invenção possuem pelo menos 70% de identidade (por exemplo, pelo menos 80% de identidade, ou pelo menos 90% de identidade, pelo menos 95% de identidade, pelo menos 99% de identidade) com a sequência de aminoácidos da proteína MIA humana como provido pelo número do GenBank NP_006524, mostrado na figura 1A, ou um fragmento deste compreendendo pelo menos dez resíduos consecutivos da proteína MIA.

O termo "percentual de identidade" ou "percentual idêntico" quando usado junto com a proteína MIA é definido como a porcentagem de resíduos de aminoácidos em uma sequência proteica candidata que são idênticos a uma sequência proteica submetida, após alinhamento das sequências candidata e submetida para obter a máxima identidade percentual. Por exemplo, identidade de percentual entre duas sequências proteicas pode ser determinada por comparação par a par das duas sequências usando a interface bl2seq na website do Centro Nacional para Informação em Biotecnologia (NCBI), Biblioteca Nacional dos U.S. de Medicina, 8600 Rockville Pike, Bethesda, Md. 20894, USA. A interface bl2seq permite o alinhamento de sequências usando a ferramenta BLAST descrita por Tatiana A., *et al.*, "Blast 2 sequences - A New Tool for Comparing Protein and Nucleotide Sequences", FEMS Microbiol. Lett. 174: 247-250, 1999. Os seguintes parâmetros de alinhamento são usados: Matriz = BLOSUM62; Penalidade por abertura de GAP = 11; Penalidade para ampliação de GAP = 1; Interrupção X_queda = 50; Expectativa = 10,0; Tamanho da palavra = 3 e Filtro = desligado.

A figura 1A provê um alinhamento de sequências de aminoácidos de homólogos de MIA exemplares. As identidades percentuais para os vários homólogos de MIA mostrados na figura 1A são providos abaixo na TABELA 1. Como mostrado na figura 1B e na TABELA 1 a sequência de aminoácidos de MIA de primatas é altissimamente conservada, com seres humanos e chimpanzés tendo uma sequência idêntica.

Tabela 1: Identidade Percentual de MIA

	hMIA	rhMIA	chimpMIA	mMIA	rMIA	dMIA	bovMIA	hamMIA	pfMIA
hMIA	100	96	100	81	83	88	85	73	38
rhMIA		100	96	82	83	91	87	73	38
chimpMIA			100	81	83	88	85	73	38
mMIA				100	92	84	80	66	37
rMIA					100	85	81	69	37
dMIA						100	86	70	37
bovMIA							100	67	40
hamMIA								100	56
pfMIA									100

MIA é uma proteína secretada e, portanto, ela pode ser detectada em tecidos acessíveis, tal como fluidos biológicos incluindo sangue (incluindo plasma e soro), urina e amostras de tecido tal como amostras de biópsia de tumor de melanoma. Portanto, a presença ou a concentração de MIA medida antes e após o tratamento pode ser usada para determinar uma resposta de indivíduo mamífero ao tratamento com um agente inibidor de melanoma, como descrito nos EXEMPLOS 1-2 e mostrado nas figuras 2-4. Também foi demonstrado que uma diminuição na concentração de MIA medida após o tratamento com um agente inibidor de melanoma candidato, quando comparada à concentração de MIA antes do tratamento, serve como um indicador preciso e precoce da eficácia do agente para tratar melanoma em um indivíduo mamífero, como descrito nos EXEMPLOS 3-4 e mostrado nas figuras 4-5B.

De acordo com o método deste aspecto da invenção, uma primeira amostra biológica é tomada de um indivíduo mamífero antes do início do tratamento com um agente inibidor de melanoma e uma segunda amostra biológica é tomada do indivíduo mamífero pelo menos uma vez após o início do tratamento com o agente inibidor de melanoma. Em algumas modalidades, amostras biológicas tratadas em plural do indivíduo (por exemplo, um indivíduo em um ensaio pré-clínico) são tomadas em intervalos periódicos de tempo após o início do tratamento com o agente inibidor de melanoma ter começado.

Conforme aqui utilizado o termo "tratamento" se refere à administração de um ou mais agentes inibidores de melanoma para o alívio dos sintomas associados a melanoma, ou detenção de progressão adicional ou piora desses sintomas, ou prevenção ou profilaxia de melanoma. Por exemplo, tratamento bem-sucedido pode incluir um alívio dos sintomas ou detenção da progressão da doença, como medido por uma redução na taxa de crescimento de um tumor, uma detenção no crescimento do tumor, uma redução no tamanho de um tumor, remissão parcial ou completa do melanoma, ou taxa de sobrevivência aumentada ou benefício clínico. O termo "início do tratamento" se refere ao ponto de tempo de começo da administração

do(s) agente(s) inibidor(es) de melanoma.

Por exemplo, amostras biológicas podem ser tomadas do indivíduo tratado diariamente após o início do tratamento, ou em uma base periódica após o início do tratamento com o agente inibidor de melanoma ter começado por um período de pelo menos 3 dias até pelo menos 3 meses ou mais longo. Em algumas modalidades, amostras biológicas do indivíduo tratado são tomadas antes do início do tratamento e pelo menos uma vez dentro de um período de 3 dias até 3 meses (tal como dentro de 1 semana, dentro de 2 semanas, dentro de 1 mês, dentro de 2 meses, ou dentro de 3 meses) após o tratamento começar.

Regimes de tratamento para agentes inibidores de melanoma como contemplado aqui são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, sem limitação, um agente inibidor de melanoma pode ser administrado a um paciente em necessidade deste diariamente por 7, 14, 21 ou 28 dias, seguido por 7 ou 14 dias sem administração do composto. Em algumas modalidades, o ciclo de tratamento compreende administrar a quantidade de um agente inibidor de melanoma diariamente por 7 dias, seguido por 7 dias sem administração do composto. Um ciclo de tratamento pode ser repetido uma ou mais vezes para prover uma rota de tratamento. Além disso, um agente inibidor de melanoma pode ser administrado uma vez, duas vezes, três vezes ou quatro vezes diariamente durante a fase de administração do ciclo de tratamento. Em outras modalidades, os métodos compreendem adicionalmente administrar a quantidade de um agente inibidor de melanoma uma vez, duas vezes, três vezes ou quatro vezes diariamente ou dia sim, dia não durante uma rota de tratamento.

Em algumas modalidades, os regimes de tratamento incluem adicionalmente administrar um agente inibidor de melanoma como parte de um ciclo de tratamento. Um ciclo de tratamento inclui uma fase de administração durante a qual um agente inibidor de melanoma é dado ao indivíduo em uma base regular e um feriado, durante o qual o composto não é administrado. Por exemplo, o ciclo de tratamento pode compreender administrar a quantidade de um agente inibidor de melanoma diariamente por 7, 14, 21

ou 28 dias seguidos por 7 ou 14 dias sem administração do agente. Em algumas modalidades, o ciclo de tratamento compreende administrar a quantidade de um agente inibidor de melanoma diariamente por 7 dias, seguido por 7 dias sem administração do agente. Um ciclo de tratamento pode ser repetido uma ou mais vezes para prover uma rota de tratamento. Além disso, um agente inibidor de melanoma pode ser administrado uma vez, duas vezes, três vezes ou quatro vezes diariamente durante a fase de administração do ciclo de tratamento. Em outras modalidades, os métodos compreendem adicionalmente administrar a quantidade de um agente inibidor de melanoma uma vez, duas vezes, três vezes ou quatro vezes diariamente ou dia sim, dia não durante uma rota de tratamento. Uma rota de tratamento se refere a um período de tempo durante o qual o indivíduo faz tratamento para câncer pelos presentes métodos. Assim, uma rota de tratamento pode prolongar-se por um ou mais ciclos de tratamento ou referir-se ao período de tempo durante o qual o indivíduo recebe doses diárias ou intermitentes de um agente inibidor de melanoma.

Uma amostra biológica pode ser uma amostra de tecido, ou uma amostra de fluido do indivíduo mamífero, tal como uma amostra de sangue ou urina, ou amostra clínica tal como uma amostra de biópsia de melanoma. Em algumas modalidades, a amostra biológica é uma amostra de sangue. A amostra de sangue pode ser qualquer tipo de amostra de sangue adequada para mensurar a presença de concentração de proteína MIA. Por exemplo, sangue total; plasma (por exemplo, separado por centrifugação); ou soro de plasma (por exemplo, obtido por coagulação ou tubos separadores de soro) pode ser usado na prática do método da invenção.

Os métodos da invenção podem ser praticados em qualquer indivíduo mamífero que têm células de tumor de melanoma, tal como seres humanos, macacos Rhesus, chimpanzés, camundongos, ratos, cachorros, vacas, coelhos, porquinhos-da-índia, hamsters, cabras, ovelhas ou cavalos.

A presença ou a concentração da proteína MIA em uma primeira amostra biológica tomada de um indivíduo mamífero pode ser determinada usando qualquer ensaio capaz de detectar e/ou mensurar a quantidade de

proteína MIA. Por exemplo, a presença ou a concentração de proteína MIA pode ser determinada usando marcação de imunofluorescência, citometria de fluxo, espectrometria de massas, imunocitoquímica, imunoistoquímica, imunotransferência, ou ELISA. Em uma modalidade, a concentração de proteína MIA é mensurada em uma amostra biológica de um indivíduo mamífero usando um anticorpo que se liga especificamente à MIA, tal como um ensaio de ELISA ou uma transferência de Western. Um ensaio de ELISA exemplar para detectar níveis de MIA em amostra de sangue é descrito no EXEMPLO 1.

Em outra modalidade, a concentração da proteína MIA é mensurada em uma amostra biológica usando análise de Western blot, como descrito no EXEMPLO 1.

Em outra modalidade, a concentração da proteína MIA é mensurada em uma amostra biológica usando procedimentos de imunoistoquímica. Por exemplo, uma amostra biológica tal como sedimentados de célula de melanoma humano impregnadas com parafina, xenoenxerto de melanoma e tecidos cutâneos normais e de melanoma isolados de pacientes podem ser usados para avaliar o nível de expressão de MIA por meio de imunoistoquímica. Tais procedimentos de imunoistoquímica podem ser efetuados usando métodos conhecidos por aqueles versados na técnica, por exemplo, a detecção de MIA pode ser obtida no automarcador Ventana Discovery (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) usando protocolo-padrão 1 de condicionamento celular para recuperação antigênica. Secções de tecido são incubadas sem aquecimento por 30-120 minutos com anticorpos para MIA humana e controles de IgG pré-imune (Novartis AG, Emeryville, CA) a 1-20µg/mL. Secundário Universal Ventana (Ventana Medical Systems, Inc.) e adicionado às secções de tecido e incubado por 10-60 minutos, seguido por Ventana DABMap (Ventana Medical Systems, Inc.) para detecção. Hematoxilina Ventana e Reagente Bluing (Ventana Medical Systems, Inc.) podem ser usados como um corante para contador. Secções são desidratadas em alcoóis graduados, clarificadas em xileno e cobertas com lamínula usando meios de montagem sintéticos.

De acordo com o método deste aspecto da invenção, uma diminuição em uma segunda concentração de MIA medida em uma segunda amostra biológica tomada de um indivíduo após início do tratamento com o agente inibidor de melanoma quando comparada com uma primeira concentração de MIA medida em uma primeira amostra biológica tomada de um indivíduo antes do início do tratamento (ou em comparação a um nível de referência predeterminado), é indicativa de uma resposta positiva no indivíduo ao tratamento com o agente inibidor. Como mostrado nos EXEMPLOS 3 e 4, foi observada uma correlação entre uma diminuição estatisticamente significativa na concentração de MIA em uma amostra biológica de um indivíduo mamífero após tratamento com um agente inibidor de melanoma e uma diminuição correspondente no peso de tumor de melanoma no indivíduo mamífero quando comparado a um indivíduo mamífero que tem células tumorais de melanoma e que não recebe tratamento com o agente inibidor.

Em algumas modalidades do método, uma diminuição na concentração de MIA em uma amostra biológica tomada em um ponto de tempo precoce após tratamento com um agente inibidor de melanoma, tal como de 3 até 8 dias após o tratamento ter começado, é um indicador precoce (por exemplo, preditivo) de uma redução no peso de tumor no indivíduo mamífero tratado. Em algumas modalidades, a redução no peso de tumor é devido à regressão de volume de tumor quando comparado ao volume de tumor no começo do tratamento, indicando desse modo que o agente inibidor é citotóxico às células cancerosas de melanoma. Em outras modalidades, a redução em peso de tumor é devido à inibição de crescimento de tumor quando comparada a de um indivíduo mamífero controle que não recebe o agente inibidor de melanoma, indicando desse modo que o agente inibidor é citostático às células cancerosas de melanoma.

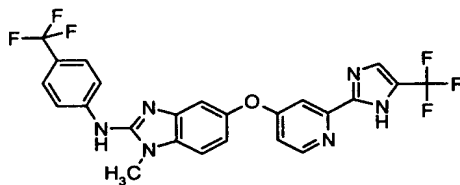
Em algumas modalidades, uma diminuição no nível de MIA de pelo menos 20% medida em uma amostra biológica tomada do indivíduo mamífero dentre de 3 meses após o tratamento em comparação com uma amostra biológica tomada de um indivíduo não tratado indica uma resposta positiva ao agente inibidor de melanoma. Em algumas modalidades, uma

diminuição no nível de MIA de pelo menos 20% medida em uma amostra biológica tomada do indivíduo mamífero dentre 3 dias após o tratamento em comparação com uma amostra biológica tomada de um indivíduo não tratado indica uma resposta positiva ao agente inibidor de melanoma.

5 Os métodos deste aspecto da invenção podem ser praticados para determinar uma resposta de indivíduo mamífero ao tratamento com qualquer agente inibidor de melanoma, tal como uma pequena molécula, terapêutico proteico, anticorpo, molécula de ácido nucleico. Conforme aqui utilizado, um agente inibidor de melanoma é qualquer agente que causa ini-
10 bição de crescimento de células de melanoma, *in vitro* em células cultivadas e/ou *in vivo* em um indivíduo mamífero. Exemplos de agentes inibidores de melanoma úteis na prática da invenção incluem, mas não estão limitados a CHIR-265, sorafenib, CHIR-258, Dacarbazina (DTIC, DTIC-Dome®), Temo-
zolomida (Temodar®), Carmusina (BCNU, BiCNU®), Lomustina (CeeNU®),
15 IL-2(Proleukin®) e Interferon alfa-2b (IntonA®).

Em uma modalidade, os métodos da invenção são usados para determinar uma resposta de um indivíduo mamífero que tem células tumorais de melanoma ao tratamento com um agente inibidor de melanoma selecionado do grupo que consiste em CHIR-265, sorafenib e CHIR-258, como
20 descrito em maiores detalhes nos EXEMPLOS 2-4.

CHIR-265, atualmente conhecido como RFB-265, é o composto {1-metil-5-[2-(5-trifluormetil-1H-imidazol-2-il)-piridin-4-ilóxi]-1H-benzoimidazol-2-il}-(4-trifluormetil-fenil)-amina que tem a estrutura:



CHIR-265 é um novo inibidor de Raf/VEGFR como descrito em
25 Venetsanakos E. *et al.*, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 2006: 47: Resumo 4854; Amiri P. *et al.*, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 2006: 47: Resumo 4855; e Stuart D. *et al.*, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 2006: 47: Resumo 4856, todos os quais são incorporados por meio deste como referência.

CHIR-258, atualmente conhecido com TKI258, é o composto 4-amino-5-flúor-3-[5-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, como descrito na Patente U.S. Nº. 6.774.237. CHIR-258 é um inibidor de RTK multidirecionado como descrito em Lopes de Menezes DE *et al.*, Clin. Cancer Res. 2005: 11: 5281-5291 e Lee SH *et al.*, Clin. Cancer Res. 2005: 11: 3633-3641, todos os quais são incorporados por meio deste como referência. Sorafenib (também conhecido como "BAY 43-9006") é um inibidor de Raf e de Receptor de Tirosina Quinase (RTK) como descrito em Wilhelm S. M. *et al.*, Cancer Res. 64: 7099-7109 (2004), incorporada por meio deste como referência.

Em uma modalidade, os métodos da invenção são usados para determinar uma resposta de um indivíduo mamífero que tem células tumorais de melanoma com CHIR-265. De acordo com esta modalidade, foi observado que níveis de MIA diminuíram rapidamente em amostras biológicas obtidas de animais portadores de tumor de melanoma dosados oralmente com CHIR-265 a 100mg/kg dia sim, dia não. Como mostrado na figura 5A e descrito no EXEMPLO 3, níveis de MIA (começando em um nível médio de 27,8 ng/mL) diminuíram no dia 3 em animais tratados com CHIR-265 (100mg/kg) até um nível médio de 10,4 ng/mL (uma redução de 62%) que foi associado com regressão tumoral de 29% como medido no dia 3 (veja a figura 5B).

Em outra modalidade, os métodos da invenção são usados para determinar uma resposta de um indivíduo mamífero que tem células de tumor de melanoma ao tratamento com CHIR-258. De acordo com esta modalidade, foi observado que níveis de MIA diminuíram em amostras biológicas obtidas de animais portadores de tumor de melanoma dosados oralmente com CHIR-258 a 60 mg/kg com 10 doses por um período de 13 dias. Como mostrado na figura 4A, uma diminuição estatisticamente significativa em MIA foi observada no dia 3 em animais tratados com CHIR-258 (60 mg/kg), a qual foi associada com inibição de crescimento tumoral como medido no dia 8 (veja a figura 5B).

Em algumas modalidades, uma diminuição na concentração de

MIA em uma segunda amostra biológica obtida de um indivíduo humano após tratamento, tal como soro sanguíneo, em comparação com a concentração de MIA em uma primeira amostra biológica obtida do indivíduo humano antes do tratamento é utilizada como um desfecho de eficácia precoce para prever a eficácia de um agente inibidor de melanoma na redução de peso de tumor em indivíduos inscritos em um ensaio clínico.

Os métodos da invenção podem ser usados para determinar uma resposta de um indivíduo mamífero ao tratamento com um agente inibidor de melanoma administrado através de qualquer via adequada de administração. O agente inibidor de melanoma pode ser administrado em uma composição farmacêutica. Métodos convencionais, conhecidos por aqueles versados na técnica de medicina, podem ser usados para administrar a composição farmacêutica ao indivíduo mamífero através de vias convencionais (por exemplo, vias orais, subcutânea, intrapulmonar, transmucosa, intraperitoneal, intrauterina, sublingual, intratecal ou intramuscular) por métodos-padrão. Por exemplo, um agente inibidor de melanoma pode ser combinado ou administrado com um carreador, veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável, o qual pode tomar uma ampla variedade de formas dependendo da forma de preparação desejada para administração. Por exemplo, na preparação das composições na forma de dosagem oral, quaisquer dos meios farmacêuticos usuais podem ser empregados, tal como, por exemplo, água, glicóis, óleos, alcoóis e similares.

Os métodos da invenção podem ser usados para determinar uma quantidade eficaz de um agente inibidor de melanoma para administrar a um indivíduo mamífero. Uma quantidade eficaz significa uma quantidade ou dose geralmente suficiente para efetuar o benefício terapêutico desejado em indivíduos mamíferos fazendo tratamento. Quantidades ou doses eficazes de um agente inibidor de melanoma podem ser determinadas por métodos de rotina tal como modelagem, estudos de escalação de dose ou ensaios clínicos e por levar em consideração os fatores de rotina, tal como o modo ou via de administração ou distribuição de fármaco, a farmacocinética do agente, a gravidade e a rota do melanoma, a terapia prévia ou em andamen-

to do indivíduo, o estado de saúde e a resposta a fármacos do indivíduo. Uma dose exemplar está na faixa de cerca de 0,001 até cerca de 200 mg por kg de peso corporal do indivíduo por dia, de preferência cerca de 0,05 até 100 mg/kg/dia, ou cerca de 1 até 35 mg/kg/dia. Senão, dosagens podem
5 ser administradas em uma base periódica, tal como uma vez um dia sim, um dia não (por exemplo, de 0,05 até 100 mg/kg um dia sim, um dia não).

Em outro aspecto, a invenção provê um método para determinar se um indivíduo mamífero deve continuar a receber tratamento com um agente inibidor de melanoma. Os métodos deste aspecto da invenção com-
10 preendem (a) determinar uma primeira concentração de proteína de atividade inibidora de melanoma (MIA) em uma primeira amostra biológica tomada de um indivíduo mamífero antes do início do tratamento com um agente inibidor de melanoma; (b) determinar uma segunda concentração de MIA em uma segunda amostra biológica do indivíduo mamífero após o início do tra-
15 tamento com o agente inibidor de melanoma; (c) comparar as ditas primeira e segunda concentrações de MIA; (d) determinar que o paciente deva continuar a ser tratado com o agente inibidor de melanoma se a segunda concentração de MIA estiver reduzida em pelo menos 20% em comparação com a primeira concentração de MIA. Os métodos de acordo com este aspecto da
20 invenção podem ser praticados usando qualquer agente inibidor de melanoma, incluindo aqueles descritos aqui. Em algumas modalidades, a segunda amostra biológica é tomada do indivíduo antes do início do tratamento e pelo menos uma vez dentro de um período de 3 dias até 3 meses (tal como dentro de 1 semana, dentro de 2 semanas, dentro de 1 mês, dentro de 2 meses, ou dentro de 3 meses) após o tratamento começar.
25

Em outro aspecto, a invenção provê um método para avaliar a eficácia de um agente inibidor de melanoma para tratar melanoma em um indivíduo mamífero que tem melanoma. O método compreende (a) determi-
30 nar uma primeira concentração de proteína de atividade inibidora de melanoma (MIA) em uma primeira amostra biológica tomada do indivíduo mamífero antes do início do tratamento com um agente inibidor de melanoma; (b) determinar uma segunda concentração de MIA em uma segunda amostra

biológica do indivíduo mamífero tomada após o início do tratamento com o agente inibidor de melanoma; (c) comparar a primeira e a segunda concentrações de MIA, em que uma diminuição na segunda concentração de MIA medida na segunda amostra biológica quando comparada com a primeira
5 concentração de MIA medida na primeira amostra biológica é indicativa da eficácia do agente inibidor para tratar melanoma.

Em algumas modalidades, o método deste aspecto da invenção compreende adicionalmente medir o volume de pelo menos um tumor de melanoma no indivíduo mamífero antes do tratamento com o agente inibidor
10 e pelo menos uma vez após a administração do agente inibidor e comparar as médias de volume de tumor tomadas antes do início do tratamento e após o tratamento para determinar se o volume do tumor diminuiu. Em algumas modalidades deste aspecto da invenção, uma diminuição na concentração de soro de MIA em um tempo antes da detecção de uma diminuição mensu-
15 rável no volume de tumor se correlaciona positivamente com a eficácia do agente inibidor para o tratamento de melanoma. Por exemplo, como descrito no EXEMPLO 3, foi observado em um modelo de camundongo com xenoenxerto de melanoma que tratamento com um agente inibidor de melanoma CHIR-258 (60 mg/kg) resultou em uma diminuição estatisticamente significativa na concentração plasmática de MIA no dia 3, que precedeu, e previu, a
20 detecção de uma redução estatisticamente significativa em peso de tumor quando comparada a de indivíduos tratados com veículo observados no dia 8 (veja figura 5A e 5B). Além disso, o grau de redução de tumor resultando do tratamento com diferentes agentes inibidores de melanoma correlaciona-
25 dos aos níveis plasmáticos de MIA, por exemplo, tratamento com CHIR-265 (MIA abaixo do nível de detecção de 3 ng/mL, >97% de inibição de crescimento de tumor); tratamento com sorafenib (MIA 28,9 ng/mL, 69% de inibição de crescimento de tumor).

Volume de tumor em um indivíduo mamífero pode ser medido
30 usando qualquer método reconhecido na técnica. Por exemplo, medições por compasso de calibre podem ser usadas para estimar volume de tumor usando a fórmula: $(a \times b^2) \times 0,5$, onde "a" é o maior diâmetro e "b" é o com-

primento perpendicular ao diâmetro, como descrito no Exemplo 2. Outras técnicas úteis para detectar retração de tumor em indivíduos mamíferos, tal como seres humanos incluem técnicas de visualização tal como varredura por tomografia computadorizada (CT), e ressonância magnética (MRI). Retração de tumor em conjunto com técnicas de visualização é tipicamente avaliada usando os critérios dos Critérios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos (RECIST) como descrito em Jour. Natl. Cancer Instit. 92: 205-216 (2000), incorporada aqui como referência. Outras técnicas podem ser usadas para avaliar atividade metabólica de tumor *in vivo* incluindo tomografia por emissão de pósitron (PET), Fluordesoxiglicose (FDG-PET) e a síntese de DNA pode ser avaliada usando Fluordesoxitimidina (FLT-PET). Para modelos pré-clínicos, podem ser usadas técnicas adicionais que envolvem o uso de células de tumor de melanoma geneticamente modificadas com genes marcadores tal como o gene da luciferase.

Os métodos da invenção podem ser usados para avaliar a eficácia de um ou mais agentes inibidores de melanoma candidatos em um modelo animal, tal como em um ensaio pré-clínico. Por exemplo, a prática de uma modalidade do método da invenção é descrita usando um modelo de tumor de xenoenxerto de melanoma humano no EXEMPLO 2 abaixo.

Ainda em um outro aspecto, a invenção provê um método para identificar agentes que têm utilidade no tratamento de melanoma. O método compreende (a) determinar uma primeira concentração de proteína de atividade inibidora de melanoma (MIA) em uma primeira amostra biológica tomada de uma linhagem celular mamífera de melanoma cultivada antes de administrar o agente à linhagem celular mamífera de melanoma; (b) determinar uma segunda concentração de MIA em uma segunda amostra tomada da linhagem celular mamífera de melanoma após administrar o agente à linhagem celular mamífera de melanoma; (c) comparar a primeira e a segunda concentrações de MIA; (d) determinar que o agente tenha utilidade no tratamento de melanoma se a segunda concentração de MIA estiver reduzida em pelo menos 20% em comparação com a primeira concentração de MIA.

Os métodos deste aspecto da invenção podem ser praticados usando qualquer tipo de agente que é um agente inibidor de melanoma candidato para uso terapêutico no tratamento de um indivíduo mamífero que sofre de melanoma. Por exemplo, o agente pode ser uma pequena molécula, terapêutico proteico, anticorpo, molécula de ácido nucleico. Em algumas modalidades, os métodos são praticados para identificar um ou mais agentes de uma pluralidade de agentes, tal como uma biblioteca combinatória de pequenas moléculas. O agente pode ser administrado à célula mamífera de melanoma cultivada de uma maneira adequada ao tipo de agente, usando métodos bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Em algumas modalidades, os métodos podem ser praticados com um agente inibidor de melanoma de controle positivo, tal como CHIR-265, sorafenib ou CHIR-258, como descrito aqui. Os métodos podem ser praticados usando qualquer linhagem celular mamífera de melanoma, tal como, por exemplo, uma linhagem celular mamífera de melanoma humano selecionada do grupo que consiste em G361, SKMEL-28, A375M e CHL-1, como descrito adicionalmente no EXEMPLO 1.

Embora a modalidade preferida da invenção tenha sido ilustrada e descrita, será apreciado que várias alterações podem ser feitas a esse respeito sem divergir do espírito e escopo da invenção.

EXEMPLO 1

Este Exemplo demonstra que MIA é expressa em e secretada de linhagens celulares de melanoma humano e não é expressa em linhagens celulares de câncer colorretal humano.

25 Métodos:

Linhagens celulares: As linhagens celulares de melanoma humano, G361, SKMEL-28 e CHL-1; e linhagem celular de carcinoma de cólon, HCT-116, foram obtidas da Coleção de Cultura Tipo Americana (ATCC) (Manassas, VA). A linhagem celular de melanoma humano A375M e a linhagem celular de carcinoma de cólon humano HT-29P foram obtidas na Universidade do Texas, Centro de Câncer M. D. Anderson (Houston, TX).

Cultura de células: As linhagens celulares G361, A375M e HT-

29P foram cultivadas em meio 5A de McCoy; a linhagem celular SKMEL-28 foi mantida em Meio Essencial Mínimo (MEM); a linhagem celular CHL-1 foi crescida em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM); e a linhagem celular HCT-116 foi cultivada em meio RPMI 1640. Todos os meios de cultura celular foram suplementados com 10% de soro bovino fetal, 2mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, vitaminas de MEM 1X, aminoácidos de MEM 1X e aminoácidos não essenciais de MEM 1X. Todas as linhagens foram mantidas a 37°C em uma atmosfera umidificada com CO₂ a 5%.

Análise por Western blot: Linhagens celulares de melanoma humano (A375M, G361, SKMEL-28 e CHL-1) e linhagens celulares de carcinoma de cólon humano (HT-29P e HCT-116) foram lavadas duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS, Mediatech, Inc., Herndon, VA) e lisadas em tampão RIPA (50 mM Tris HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2mM de ortovanadato de sódio, 20 mM de pirofosfato, 1% de Triton X-100; 1% de desoxicolato de sódio e 0,1% de SDS), contendo 1mM de fenilmetilsulfonilfluoreto fresco, comprimido de Minicoquetel de Inibidor de Protease Completo (2 comprimidos/25 mL de tampão de lise) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) e Coquetel de Inibidor de Fosfatase II 1X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), por 20 minutos no gelo. Lisados foram coletados em tubos de centrifuga, centrifugados rapidamente a 14K RPM a 4°C por 20 minutos e filtrado através de tubos *QIAshredder* (QIAGEN, Inc., Valencia, CA). Concentrações proteicas foram determinadas usando o ensaio BCA de acordo com o protocolo do fabricante (Pierce, Rockford, IL). Amostras foram processadas para transferência de Western por métodos padrões usando Novex® gel de Tris-Glicina a 18% (Invitrogen, Carlsbad, CA). MIA foi detectada com um anticorpo policlonal de cabra (R&D Systems, Minneapolis, MN), diluído 1:1000 em TBST (solução salina tampoadada por Tris contendo 0,1% de Tween®20, Fisher Scientific, Hampton, NH) contendo 5% de leite em pó e incubado durante a noite a 4°C. O anticorpo secundário foi um anticorpo anticabra ligado à peroxidase de rábano-silvestre (Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluído 1:5000. Bandas de proteína foram visualizadas usando Quimioluminescência Acentuada (Amer-

sham Bioscience, Piscataway, NJ). Carregamento e transferência equitativos foram confirmados por detecção de β -actina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Proteínas MIA recombinantes humanas (PM 12-kDa) de duas fontes comerciais foram usadas como controle positivo (Axxora, LLC, San Diego, CA e ProSpec-Tany TechnoGene, LTD, Rehovot, Israel).

Ensaio de ELISA de MIA: Números iguais de células de melanoma humano e de carcinoma colorretal (~250.000 células para cada linhagem celular) foram semeadas em placas de cultura de tecidos e o meio de cultura para cada linhagem celular foi coletado 48h após. Níveis de MIA em meios de cultura ou plasma foram medidos por um kit de ELISA de etapa única comercial de acordo com o protocolo do fabricante (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN). Concentrações de MIA em amostras testes foram calculadas usando uma curva-padrão na faixa de 3-37 ng/mL. Quando a concentração de MIA excedia a concentração-padrão mais alta, as amostras eram diluídas 1:5 e avaliadas novamente para ter os resultados caindo dentro da faixa de linearidade da curva-padrão. Dados foram avaliados usando o teste *t* de Student (distribuição bilateral, variância desigual de duas amostras), usando $P \leq 0,05$ como o nível de significância.

Resultados: Níveis detectáveis de proteína MIA foram observados em um Western blot para todas as linhagens celulares de melanoma humano testadas (A375M, G361, SKMEL-28 e CHL-1) e não em linhagens celulares de carcinoma de cólon humano (HT-29P e HCT-116) (dados não mostrados). A proteína MIA observada nas linhagens celulares de melanoma comigrou com a proteína MIA recombinante de controle positivo (PM 12kDa). Carregamento e transferência equitativos em Western blot foram confirmados por detecção de β -actina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

A figura 2 mostra os resultados do ensaio de ELISA medindo a secreção de MIA nos meios de cultura das linhagens celulares de melanoma e carcinoma de cólon. Como mostrado na figura 2, a secreção de MIA foi detectada em linhagens celulares de melanoma A375M, G361, SKMEL-28 e CHL-1, mas não foi detectada nas linhagens celulares de carcinoma de cólon HT-29P e HCT-116. A linha tracejada (---) indica o limite de detecção do

ensaio (3ng/mL).

Esses resultados demonstram que MIA é expressa e secretada por linhagens celulares de melanoma e não por linhagens celulares de carcinoma de cólon.

5 EXEMPLO 2

Este Exemplo demonstra que MIA pode ser usada como um marcador substituto para peso de tumor em camundongos portadores de tumor de melanoma humano.

Métodos:

10 *Modelos animais:*

Um estudo de xenoenxerto de melanoma humano A375 foi efetuado com camundongos *nu/nu* atímicos fêmeas (8-12 semanas de idade) adquiridos de Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células foram implantadas subcutaneamente (s.c.) na região dos flancos traseiros dos camundongos. Amostras de plasma foram coletadas quando os tumores atingiram um tamanho médio de 250 mm^3 ($n=10$) e estocadas a -80°C antes da análise de MIA. A dosagem começava tipicamente quando os tumores atingiam um tamanho médio de 250 mm^3 . Amostras de plasma de camundongos ($n=4$) portadores de tumor (naïve) também foram coletadas para comparação, como mostrado na figura 3. Medições de compasso de calibre foram realizadas duas vezes semanalmente para estimar o volume do tumor usando a fórmula: $(a \times b^2) \times 0,5$, onde "a" é o maior diâmetro e "b" é o comprimento perpendicular ao diâmetro.

Um estudo de xenoenxerto de explante de tumor de melanoma humano MEXF 276 e um estudo de xenoenxerto de explante de tumor de melanoma humano MEXF 1341 foram efetuados como se segue. As células tumorais de melanoma humano MEXF 276 e as células de explante tumoral de melanoma humano MEXF 1341 foram originalmente derivadas de espécimes cirúrgicos isolados de diferentes pacientes com melanoma (obtidos de Oncotest GmbH, Instituto para Oncologia Experimental, Friburg, Alemanha) e propagadas como xenoenxertos em camundongos *nude*. Após a remoção de tumores de camundongos doadores, amostras foram cortadas em frag-

mentos (de 1-2 mm de diâmetro) e colocadas em meio RPMI 1640 antes do implante subcutâneo em camundongos *nu/nu* NMRI machos receptores (de 6-8 semanas de idade). A dosagem começava tipicamente quando os tumores atingiam um tamanho médio de 6-8 mm de diâmetro. Animais foram mantidos sob condições de sala limpa em jaulas de topo com filtro estéreis e receberam comida para roedores estéril e água *ad libitum*.

Agentes Terapêuticos: Compostos de molécula pequena CHIR-265, sorafenib e CHIR-258 foram sintetizados por Chiron Corporation (Emeryville, CA). CHIR-265 e sorafenib foram formulados em tampão de PEG400; CHIR-258 foi dissolvido em água. CHIR-265 é um novo inibidor de Raf/VEGFR (veja Venetsanakos E. *et al.*, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 2006: 47: Resumo 4854; Amiri P. *et al.*, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 2006: 47: Resumo 4855; Stuart D. *et al.*, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 2006: 47: Resumo 4856). CHIR-258 é um inibidor de RTK multidirecionado (veja Lopes de Menezes DE *et al.*, Clin. Cancer Res. 2005: 11: 5281-5291; Lee SH *et al.*, Clin. Cancer Res. 2005: 11: 3633-3641). Sorafenib é um inibidor de Raf e de Receptor de Tirosina Quinase (RTK) (veja Wilhelm S. M. *et al.*, Cancer Res. 64: 7099-7109 (2004)).

Tratamento com agentes terapêuticos:

Em um primeiro experimento, camundongos portadores de tumor de melanoma humana A375M (n=5) foram tornados aleatórios e dosados oralmente com CHIR-265 a 100 mg/kg (n=5) ou com veículo (n=5) uma vez dia sim, dia não. Animais portadores de tumor tratados apenas com tampão PEG400 foram usados como controle de veículo. A porcentagem da inibição de crescimento de tumor (TGI) após tratamento com fármaco foi calculada como $100 \times [1 - (\text{volume de tumor médio}_{\text{tratado com fármaco}} / \text{volume de tumor médio}_{\text{tratado com veículo}})]$. Amostras de plasma foram coletadas 48 horas após a quarta dose (dia 10) para análise de MIA por ELISA. Os resultados dos ensaios de ELISA de MIA são mostrados na figura 4A.

Em um segundo experimento, camundongos portadores de tumor de melanoma humano MEXF 276 foram tornados aleatórios e dosados oralmente com CHIR-265 (100 ou 10 mg/kg) ou com sorafenib (100 mg/kg)

n=4/grupo. O primeiro dia de dosagem foi designado como Dia 0. Como tal, o plano de dosagem para CHIR-265 foi 10 mg/kg nos Dias 0, 2, 4, 6, 14, 16 e 20. Para CHIR-265 o plano de dosagem foi 100 mg/kg nos Dias 0, 2, 14, 16 e 20. Finalmente, o plano de dosagem para sorafenib e veículo PEG400 foi 100 mg/kg todo dia nos Dias 0-20. Volumes de tumor foram medidos duas vezes por semana e a porcentagem da inibição de crescimento de tumor foi determinada como descrito acima. As medições de volume de tumor são mostradas na TABELA 2. Amostras de plasma foram coletadas 4 h após a última dose no Dia 20 e estocadas a -80°C antes da análise de MIA. Níveis plasmáticos de MIA foram determinados por um ensaio de ELISA efetuado como descrito no EXEMPLO 1. Os resultados dos ensaios de ELISA de MIA são mostrados na figura 4B.

Em um terceiro experimento, camundongos portadores de tumor de melanoma humano MEXF 1341 foram tornados aleatórios e dosados oralmente com CHIR-265 (100 ou 10 mg/kg) ou com sorafenib (100 mg/kg) n=4/grupo. O primeiro dia de dosagem foi designado como Dia 0. Como tal, o plano de dosagem para CHIR-265 (10 mg/kg) foi 10 mg/kg nos Dias 0, 2, 4, 6, 14, 16 e 20. Para CHIR-265 (100 mg/kg) o plano de dosagem foi 100 mg/kg nos Dias 0, 2, 14, 16 e 20. Finalmente, o plano de dosagem para sorafenib e veículo PEG400 foi 100 mg/kg todo dia nos Dias 0-20. Volumes de tumor foram medidos duas vezes por semana e a porcentagem da inibição de crescimento de tumor foi determinada como descrito acima. As medições de volume de tumor são mostrados na TABELA 2. Amostras de plasma foram coletadas 4 h após a última dose no Dia 20 e estocadas a -80°C antes da análise de MIA. Níveis plasmáticos de MIA foram determinados por um ensaio de ELISA efetuado como descrito no EXEMPLO 1. Os resultados dos ensaios de ELISA de MIA são mostrados na figura 4C.

Resultados:

A figura 3 mostra os resultados de um ensaio de ELISA de MIA em camundongos não-portadores de tumor *naïve* (n=4) e camundongos *nude* atímicos que sofreram implante de células de melanoma humano A375M, que têm tumores de aproximadamente 250 mm³ de volume (n=10). Como

mostrado na figura 3, níveis plasmáticos de MIA que variam de 16 até 48 ng/mL (mediana = 31 ng/mL) foram detectados em camundongos portadores de tumor de melanoma. Em contraste, valores obtidos de ensaio de ELISA de MIA em animais naïve estavam abaixo do limite de detecção do ensaio (3ng/mL como indicado pela linha tracejada na figura 3). Esses resultados demonstram que MIA é secretada *in vivo* em camundongos portadores de células de melanoma humano e pode ser detectada em plasma por ELISA.

TABELA 2: Volume de Tumor após Tratamento com Inibidores de Tumor de Melanoma

Modelo de Xenoenxerto de camundongo	Volume de Tumor (mm ³)			
	Veículo	CHIR-265 (100mg/kg)	CHIR-265 (10mg/kg)	Sorafenib
A375M	dia 10: 436±69,5	dia 10: 133±14,1	nd	nd
MEXF 276	dia 20: 2902±374	dia 20: 19±2,9	dia 20: 58±15,2	dia 20: 887±196
MEXF 1341	dia 20: 1895±535	dia 20: 575±214	dia 20: 1190±291	dia 20: 1338±264

A figura 4A ilustra graficamente que níveis plasmáticos de MIA diminuem em resposta à inibição de crescimento de tumor induzido por dosagem oral de CHIR-265 no modelo de camundongo de xenoenxerto de melanoma de A375M. Cada ponto no gráfico representa dados de um animal individual. $P \leq 0,05$ para níveis plasmáticos de MIA em uma comparação com tratamentos com veículo X com CHIR-265 como determinado pelo teste-t de Student. A linha tracejada do gráfico indica o limite de detecção do ensaio (3 ng/mL). Como mostrado acima na TABELA 2, os volumes de tumor médios no dia 10 para grupo tratados com veículo e com CHI-265 foram 436±69,5 e 133±14,1 mm³, respectivamente (±SE) ($P < 0,02$). Portanto, CHIR-265 dosado oralmente a 100 mg/kg dia sim, dia não causou regressão de tumor significativa em quase 50% após quatro doses quando comparado ao volume de tumor inicial (250 mm³). Isto correspondeu a inibição de crescimento de tumor de 70% quando comparado ao tratamento com veículo ($p < 0,02$). Como mostrado na figura 4A, uma diminuição significativa em níveis plasmáticos de MIA foi associada a esta regressão de tumor. Níveis de MIA em todos os animais tratados com fármaco estavam próximos do limite inferior de detecção (4 ng/mL) após quatro doses de CHIR-265. Em contras-

te, camundongos tratados com veículo tivera uma concentração de MIA mediana de 69,2 ng/mL (que varia de 21 ng/mL até 119 ng/mL) que estava 17 vezes mais alta que em camundongos tratados com CHIR-265 ($n = 5/\text{grupo}$) ($P \leq 0,05$).

5 A figura 4B ilustra graficamente que níveis plasmáticos de MIA diminuem em resposta à inibição de crescimento de tumor induzido por dosagem oral de CHIR-265 e sorafenib no modelo de camundongo de xenoinxerto de melanoma de MEXF 276. Como mostrado acima na TABELA 2, os volumes de tumor médios medidos no dia 20 para veículo ($2902 \pm 374 \text{ mm}^3$),
 10 CHI-265 a 100 mg/kg ($19 \pm 2,9 \text{ mm}^3$), CHI-265 a 10 mg/kg ($58 \pm 15,2 \text{ mm}^3$) e sorafenib ($887 \pm 196 \text{ mm}^3$) ($\pm \text{SE}$) ($P < 0,007$ para todos os grupos tratados com fármaco X grupo veículo). Portanto, foi observado que tratamentos com CHIR-265 e sorafenib causaram inibição de crescimento de tumor significativa no modelo de melanoma de MEXF 276 com $> 97\%$ de inibição de crescimento de tumor induzida por CHIR-265 em ambas as doses e 69% de inibição
 15 de crescimento de tumor com tratamento de sorafenib. Como mostrado na figura 4B, essas respostas de inibição de tumor foram associadas com uma diminuição significativa nos níveis plasmáticos de MIA nos animais tratados. As concentrações de MIA plasmática medianas de grupos tratados com veículo (113,5 ng/mL) em comparação com grupos tratados com sorafenib (28,9 ng/mL). Níveis plasmáticos de MIA de grupos tratados com CHIR-265 estavam abaixo do limite de detecção ($P < 0,04$ para todos os tratamentos com fármaco versus veículo). Além disso, o grau de redução de tumor que resultando dos diferentes tratamentos estava correlacionado com níveis
 20 plasmáticos de MIA, por exemplo, tratamento com CHIR-265 (MIA não-detectada, $> 97\%$ de inibição de crescimento de tumor); tratamento com sorafenib (MIA a 28,9 ng/mL, 69% de inibição de crescimento de tumor).

 A figura 4C ilustra graficamente que os níveis plasmáticos de MIA diminuem em resposta à inibição de crescimento de tumor induzido por
 30 dosagem oral de CHIR-265 e sorafenib no modelo de camundongo de xenoinxerto de melanoma de MEXF 1341. Como mostrado acima na TABELA 2, os volumes de tumor médios medidos no dia 20 para veículo (1895 ± 535

mm³), CHIR-265 a 100 mg/kg (575±214 mm³), CHIR-265 a 10 mg/kg (1190±291 mm³) e sorafenib (1338±264 mm³) (±SE) (P< 0,08 para todos os grupos tratados com fármaco X grupo veículo). Portanto, foi observado que tratamentos com CHIR-265 e sorafenib não causaram inibição de crescimento de tumor significativa no modelo de melanoma de MEXF 276 com 37% até 70% de inibição de crescimento de tumor induzida por CHIR-265 em ambas as doses. Como mostrado na figura 4C, apesar de um nível mais baixo de MIA plasmática basal em xenoenxertos de MEXF 1341 quando comparado a MEXF 276, uma redução significativa (de 2 vezes) em MIA foi detectada em resposta a ambos os tratamentos CHIR-265 (P<0,02). O tratamento com sorafenib também reduziu níveis plasmáticos de MIA (P > 0,17). Consistente com os resultados observados nos modelos de xenoenxerto de A375M e MEXF276, o grau de redução de tumor no modelo de xenoenxerto de MEXF1341 que resulta de diferentes tratamentos correlacionados a níveis de MIA plasmática. Os resultados dos modelos de xenoenxerto MEXF276 e MEXF1341 são preditivos para tumores humanos porque as células tumorais foram isoladas de um paciente com melanoma humano e passados serialmente em camundongos *nude*. Devido a essas células tumorais não terem sido cultivadas em cultura, elas se parecem mais estreitamente com as características do tumor original no indivíduo humano.

Esses resultados indicam que níveis plasmáticos de MIA servem como um marcador substituto sensível para peso de tumor e resposta a tratamento com agentes inibidores de melanoma em animais portadores de tumores de melanoma.

25 **EXEMPLO 3**

Este exemplo demonstra que MIA é um indicador precoce e preciso para atividade de fármaco antitumor em modelos de melanoma pré-clínico.

Métodos: A cinética de concentrações de MIA em plasma após tratamento com fármaco foi investigada como se segue. Camundongos portadores de tumor A375M foram dosados oralmente com CHIR-265 (100 mg/kg), CHIR-258 (60 mg/kg) ou veículo (n=10/grupo). Amostras de plasma

foram coletadas antes de a dosagem ser iniciada e novamente nos dias 3, 8 e 13. Volumes de tumor foram medidos nos mesmos pontos de tempo, usando métodos descritos no EXEMPLO 2.

Resultados: A figura 5A ilustra graficamente as alterações precoces e significativas nos níveis plasmáticos de MIA em resposta ao tratamento com CHIR-258 e CHIR-265 no modelo de xenoenxerto de melanoma humano A375M. * $P < 0,05$ para todas as comparações versus veículo. Barras de erro indicam erros-padrão (SE). A linha tracejada indica o limite de detecção do ensaio.

A figura 5B mostra os volumes de tumor nos camundongos portadores de tumor de melanoma humano nos dias 3, 8 e 13 após tratamento com CHIR-258 ou CHIR-265 em comparação a controles de veículo. * $P < 0,01$ para CHIR-265 versus veículo, $P < 0,005$ para CHIR-258 versus veículo. Barras de erro indicam erros-padrão (SE).

Os resultados nas figuras 5A e 5B mostram que tanto CHIR-258 como CHIR-265 causaram diminuições estatisticamente significativas na concentração plasmática de MIA no dia 3, que continuou a diminuir durante o tratamento ($P < 0,05$). A concentração de MIA de linha basal medida no dia 0 foi de 27,8 ng/kg. A redução na concentração plasmática de MIA foi mais pronunciada com tratamento com CHIR-265, que induziu regressão de tumor, quando comparada a de CHIR-258 a qual resultou em inibição de tumor, mas não-regressão. Após tratamento com CHIR-265, as concentrações de MIA diminuíram até 10,4 ng/mL no dia 3, uma redução de 62% na concentração de MIA que foi associada a 29% de regressão de tumor (FIGURA 5A). No dia 13, as concentrações de MIA estavam indetectáveis no grupo tratado com CHIR-265. O tratamento com CHIR-258 resultou em inibição de crescimento de tumor, entretanto, regressões não foram observadas. Contudo, níveis de MIA estavam reduzidos no dia 3 a níveis menores estatisticamente significativos em comparação a veículo e estavam reduzidos em 63% no dia 13 comparados à linha basal.

Esses dados demonstram que MIA é um indicador precoce para atividade de fármaco e que alterações detectadas por ELISA em níveis de

MIA circulantes precedem alterações volumétricas observáveis em peso de tumor. Tratamento com os compostos CHIR-265 e CHIR-258 resultou em vários graus de inibição de crescimento de tumor e/ou regressão de tumor e concomitante a esses efeitos em peso de tumor, houve uma diminuição significativa e correlata em níveis plasmáticos de MIA. Por exemplo, tratamento com CHIR-265 induziu regressão de tumor com uma diminuição rápida e significativa nos níveis de MIA, enquanto tratamento com CHIR-258 resultou em inibição de crescimento de tumor com uma redução menos dramática em níveis de MIA.

Outra observação significativa foi a de que níveis de MIA diminuíram mais cedo e com maior amplitude que os volumes de tumor diminuíram. Isto foi exemplificado por diminuições significativas em níveis de MIA nos pontos de tempo precoce nos planos de dosagem. Mesmo quando o volume de tumor estabilizou-se, como observado com tratamento com CHIR-258, os níveis de MIA continuaram a diminuir. Embora não desejando estar ligado por teoria, este efeito pode ser atribuído à presença de células necróticas e moribundas que contribuíram com o volume de tumor, mas que não mais secretam MIA.

Com base nesses resultados pré-clínicos, estudos clínicos em seres humanos podem mostrar níveis de MIA diminuídos antes da resposta do tumor poder ser medida, provendo assim uma indicação precoce de que há uma resposta positiva no indivíduo humano em resposta a um agente inibidor de melanoma. Além disso, os dados descritos aqui sugerem que MIA pode ser útil em ensaios clínicos humanos de agentes que são citostáticos assim como para agentes que são citotóxicos.

EXEMPLO 4

Este Exemplo demonstra que MIA pode ser usada como um marcador substituto para peso de tumor em camundongos portadores de tumor de melanoma humano de CHL-1.

Métodos:

Modelos animais:

Um estudo de xenoenxerto de melanoma humano de CHL-1 foi

efetuado com camundongos *nu/nu* atímicos fêmeas (de 8-12 semanas de idade) adquiridos de Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Aproximadamente 5×10^6 células de tumor em Matrigel® foram implantadas subcutaneamente (s.c.) na região dos flancos traseiros dos camundongos. A dosagem começou quando os tumores atingiram um tamanho médio de 200mm³. Medições de compasso de calibre foram realizadas duas vezes semanalmente para estimar o volume do tumor usando a fórmula: $(a \times b^2) \times 0,5$, onde "a" é o maior diâmetro e "b" é o comprimento perpendicular ao diâmetro.

10 *Agentes Terapêuticos:* Composto de molécula pequena CHIR-258 foi preparado como descrito no EXEMPLO 2.

Tratamento com Agentes Terapêuticos: Camundongos portadores de tumor de melanoma humano CHL-1 foram tornados aleatórios e dosados oralmente com CHIR-258 a 30mg/kg e 80 mg/kg (n=10/grupo) uma vez por dia. O primeiro dia de dosagem foi designado como dia 0. Amostras de plasma foram coletadas antes da dosagem e no dia 8 e dia 22. Um grupo de controle de veículo também foi usado no estudo (n=10).

Resultados: A figura 6A ilustra graficamente o volume de tumor em camundongos portadores de célula de tumor de melanoma humano de CHL-1 após tratamento com CHIR-258 ou controle de veículo. * $P < 0,03$ para ambos os tratamentos de CHIR-258 versus veículo. Barras de erro indicam erros-padrão (SE). Como mostrado na figura 6A, CHIR-258 dosado a 30 mg/kg ou 80 mg/kg uma vez diariamente causou inibição de crescimento de tumor significativa ($P < 0,03$) no dia 8 quando comparado ao tratamento com veículo.

 A figura 6B ilustra graficamente o efeito de tratamento com CHIR-258 na concentração plasmática de MIA. * $P < 0,05$ para todas as comparações versus veículo. Barras de erro indicam erros-padrão (SE). A linha tracejada indica o limite de detecção do ensaio. Como mostrado na figura 6B, CHIR-258 inibiu significativamente a secreção de MIA quando administrado tanto na dosagem de 30 mg/kg como na de 80 mg/kg. Como mostrado adicionalmente na figura 6B, níveis plasmáticos de MIA em todos os grupos

de camundongos antes da dosagem estavam próximos do limite de detecção do ensaio. É interessante notar que níveis de MIA em xenoenxertos de CHL-1 antes da dosagem (2,6 ng/mL) estavam mais baixos que níveis de MIA em camundongos com xenoenxerto de melanoma humano de A375M (31 ng/mL como descrito no EXEMPLO 2), ainda que os volumes de tumor de partida médios antes da dosagem estivessem em faixa similar (200 X 250 mm³, respectivamente). O nível de MIA plasmática mediano no grupo controle do estudo de xenoenxerto de CHL-1 foi de aproximadamente 7,7 ng/mL no dia 8, enquanto níveis de MIA de ambos os grupos tratados com CHIR-258 não estavam detectáveis no dia 8 e subsequentes pontos de tempo (veja figura 6B).

Esses resultados sugerem que embora tratamento com CHIR-258 tenha causado inibição de crescimento de tumor e não regressão, o fármaco foi eficaz em reduzir significativamente níveis de MIA plasmática. Esses resultados são consistentes com as descobertas no modelo de xenoenxerto de melanoma de A375M, como descrito no EXEMPLO 2. Embora não desejando estar ligado por teoria, este efeito pode ser atribuído à presença de células necróticas e moribundas que contribuíram com o volume de tumor, mas que não mais secretam MIA. Os resultados sustentam adicionalmente o uso de MIA como um indicador precoce para resposta a fármaco e eficácia no tratamento de melanoma.

Embora a modalidade preferida da invenção tenha sido ilustrada e descrita, será apreciado que várias alterações podem ser feitas a esse respeito sem divergir do espírito e escopo da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para determinar uma resposta de um indivíduo mamífero que tem células de tumor de melanoma ao tratamento com um agente inibidor de melanoma, caracterizado pelo fato de que compreende:

- 5 (a) determinar uma primeira concentração de proteína de atividade inibidora de melanoma (MIA) em uma primeira amostra biológica tomada de um indivíduo mamífero antes do início do tratamento com um agente inibidor de melanoma;
- 10 (b) determinar uma segunda concentração de MIA em uma segunda amostra biológica do indivíduo mamífero após o início do tratamento com o agente inibidor de melanoma e
- (c) comparar a primeira e a segunda concentrações de MIA, em que uma diminuição na segunda concentração de MIA
- 15 medida na segunda amostra biológica quando comparada com a primeira concentração de MIA medida na primeira amostra biológica indica uma resposta positiva ao tratamento com o agente inibidor de melanoma.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
20 fato de que o agente inibidor de melanoma é uma molécula pequena selecionada do grupo que consiste em CHIR-265, sorafenib e CHIR-258.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
fato de que uma diminuição na segunda concentração de MIA na segunda
amostra biológica medida dentre de 3 meses após o início do tratamento
25 indica uma resposta positiva ao tratamento com o agente inibidor de melanoma.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
fato de que uma diminuição na segunda concentração de MIA na segunda
amostra biológica medida dentre de 1 semana após o tratamento indica uma
30 resposta positiva ao tratamento com o agente inibidor de melanoma.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
fato de que uma diminuição de pelo menos 20% na segunda concentração

de MIA na segunda amostra biológica quando comparada à primeira concentração de MIA na primeira amostra biológica se correlaciona à inibição de crescimento de tumor no indivíduo mamífero.

5 6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que uma diminuição na segunda concentração de MIA é usada como um desfecho de eficácia para avaliar a resposta do indivíduo mamífero ao tratamento com um agente inibidor de melanoma.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica é uma amostra de sangue.

10 8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a concentração de MIA na amostra biológica é determinada usando um anticorpo que se liga especificamente a MIA.

15 9. Método para avaliar a eficácia de um agente inibidor de melanoma para tratar melanoma em um indivíduo mamífero que tem melanoma, caracterizado pelo fato de que compreende:

20 (a) determinar uma primeira concentração de proteína de atividade inibidora de melanoma (MIA) em uma primeira amostra biológica tomada de um indivíduo mamífero antes do início do tratamento com um agente inibidor de melanoma;

 (b) determinar uma segunda concentração de MIA em uma segunda amostra biológica do indivíduo mamífero tomada após o início do tratamento com o agente inibidor de melanoma e

25 (c) comparar a primeira e a segunda concentrações de MIA, em que uma diminuição na segunda concentração de MIA medida na segunda amostra biológica quando comparada com a primeira concentração de MIA medida na primeira amostra biológica é indicativa da eficácia do agente inibidor para tratar melanoma.

30

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que compreendendo ainda:

medir o volume de pelo menos um tumor de melanoma no indivíduo mamífero antes do início do tratamento com o agente inibidor; e pelo menos uma vez após o início do agente inibidor e comparar as médias de volume de tumor tomadas antes do tratamento e após o tratamento para determinar se o volume do tumor diminuiu.

11. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o indivíduo mamífero está em um ensaio pré-clínico.

12. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a segunda amostra biológica é tomada dentro de 3 meses após o início do tratamento com o agente inibidor.

13. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a segunda amostra biológica é tomada dentro de uma semana após o início do tratamento com o agente inibidor.

14. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que uma diminuição na segunda concentração de MIA medida em um tempo antes da detecção de uma diminuição mensurável no volume de tumor é indicativa da eficácia do agente inibidor para o tratamento de melanoma.

15. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o agente inibidor de melanoma é uma molécula pequena selecionada do grupo que consiste em CHIR-265, sorafenib e CHIR-258.

16. Método para determinar se um paciente deve continuar a receber tratamento com um agente inibidor de melanoma, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) determinar uma primeira concentração de proteína de atividade inibidora de melanoma (MIA) em uma primeira amostra biológica tomada de um indivíduo mamífero antes do início do tratamento com um agente inibidor de melanoma;

(b) determinar uma segunda concentração de MIA em uma segunda amostra biológica do indivíduo mamífero tomada após o início do tratamento com o agente inibidor de mela-

noma;

(c) comparar as ditas primeira e segunda concentrações de MIA; e

5

(d) determinar que o paciente deva continuar a ser tratado com o agente inibidor de melanoma se a segunda concentração de MIA estiver reduzida em pelo menos 20% em comparação com a primeira concentração de MIA.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o agente inibidor de melanoma é uma molécula pequena selecionada do grupo que consiste em CHIR-265, sorafenib e CHIR-258.

18. Método para identificar agente que têm utilidade no tratamento de melanoma, caracterizado pelo fato de que compreende:

15

(a) determinar uma primeira concentração de proteína de atividade inibidora de melanoma (MIA) em uma primeira amostra tomada de uma linhagem celular de melanoma cultivada antes de administrar um agente à linhagem celular de melanoma cultivada;

20

(b) determinar uma segunda concentração de MIA em uma segunda amostra tomada da linhagem celular de melanoma após administrar o agente à linhagem celular de melanoma cultivada;

25

(c) comparar as ditas primeira e segunda concentrações de MIA; e
(d) determinar que o agente tenha utilidade no tratamento de melanoma se a segunda concentração de MIA estiver reduzida em pelo menos 20% em comparação com a primeira concentração de MIA.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a linhagem celular de melanoma é uma linhagem celular de melanoma humano selecionada do grupo que consiste em G361, SKMEL-28, A375M e CHL-1.

Fig. 1A

Alinhamento de Sequências de MIA

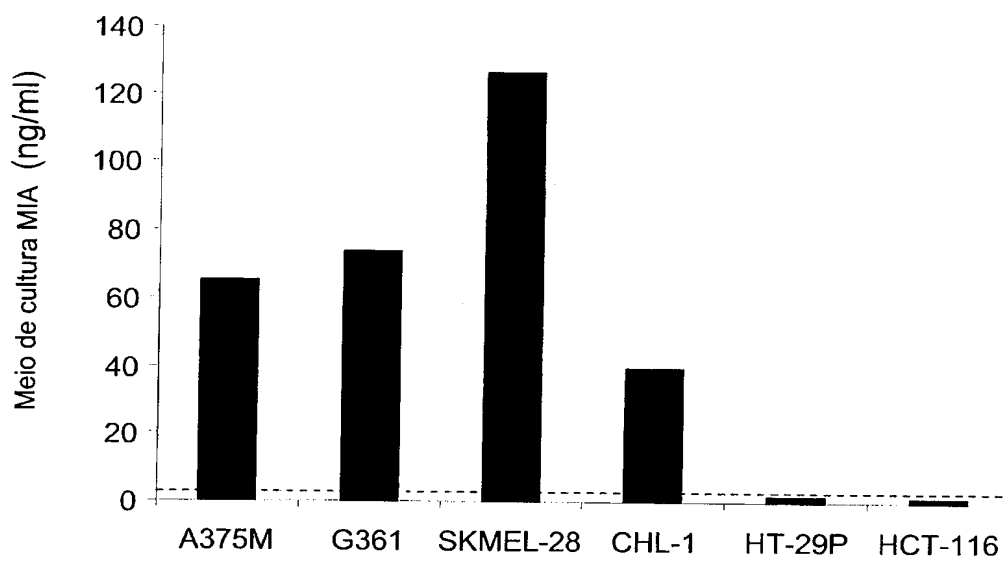
[illegible]

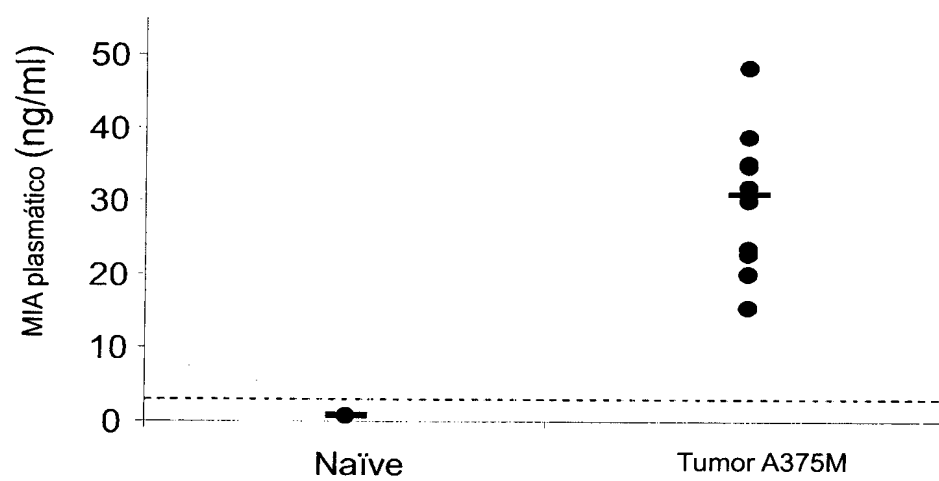
	71	132
hMIA	(71) Y	Y
rhMIA	(71) Y	Y
chimpMIA	(71) Y	Y
mMIA	(70) Y	Y
rMIA	(70) Y	Y
dMIA	(71) Y	Y
bovMIA	(70) Y	Y
hamMIA	(42) Y	Y
pfMIA	(29) Y	Y

Fig. 1B

Alinhamento de Sequências de MIA de primatas:

hMIA	(1)	MA	1	MA	70
chimpMIA	(1)	MA		MA	
rhMIA	(1)	MA		MA	
hMIA	(71)	YVFSKLKGRGRLFWGGSVQGDYYGDLAARLGYFPSSIVREDQTLKPGKVDVKTDKWD	71	YVFSKLKGRGRLFWGGSVQGDYYGDLAARLGYFPSSIVREDQTLKPGKVDVKTDKWD	131
chimpMIA	(71)	YVFSKLKGRGRLFWGGSVQGDYYGDLAARLGYFPSSIVREDQTLKPGKVDVKTDKWD		YVFSKLKGRGRLFWGGSVQGDYYGDLAARLGYFPSSIVREDQTLKPGKVDVKTDKWD	
rhMIA	(71)	YVFSKLKGRGRLFWGGSVQGDYYGDLAARLGYFPSSIVREDQTLKPGKVDVKTDKWD		YVFSKLKGRGRLFWGGSVQGDYYGDLAARLGYFPSSIVREDQTLKPGKVDVKTDKWD	

***Fig. 2***

**Fig. 3**

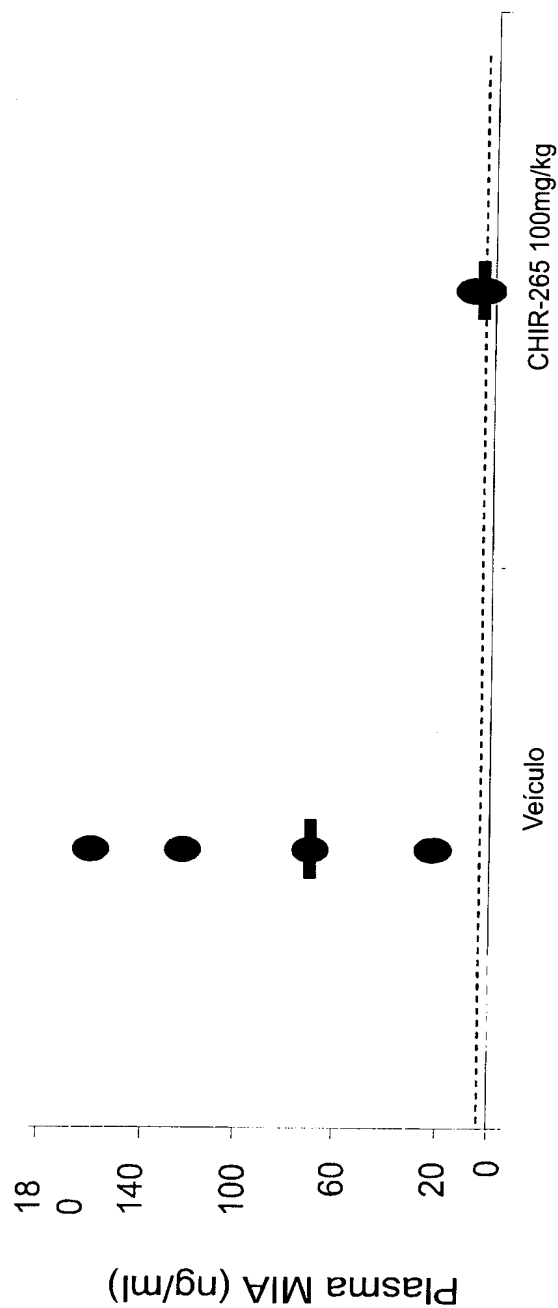
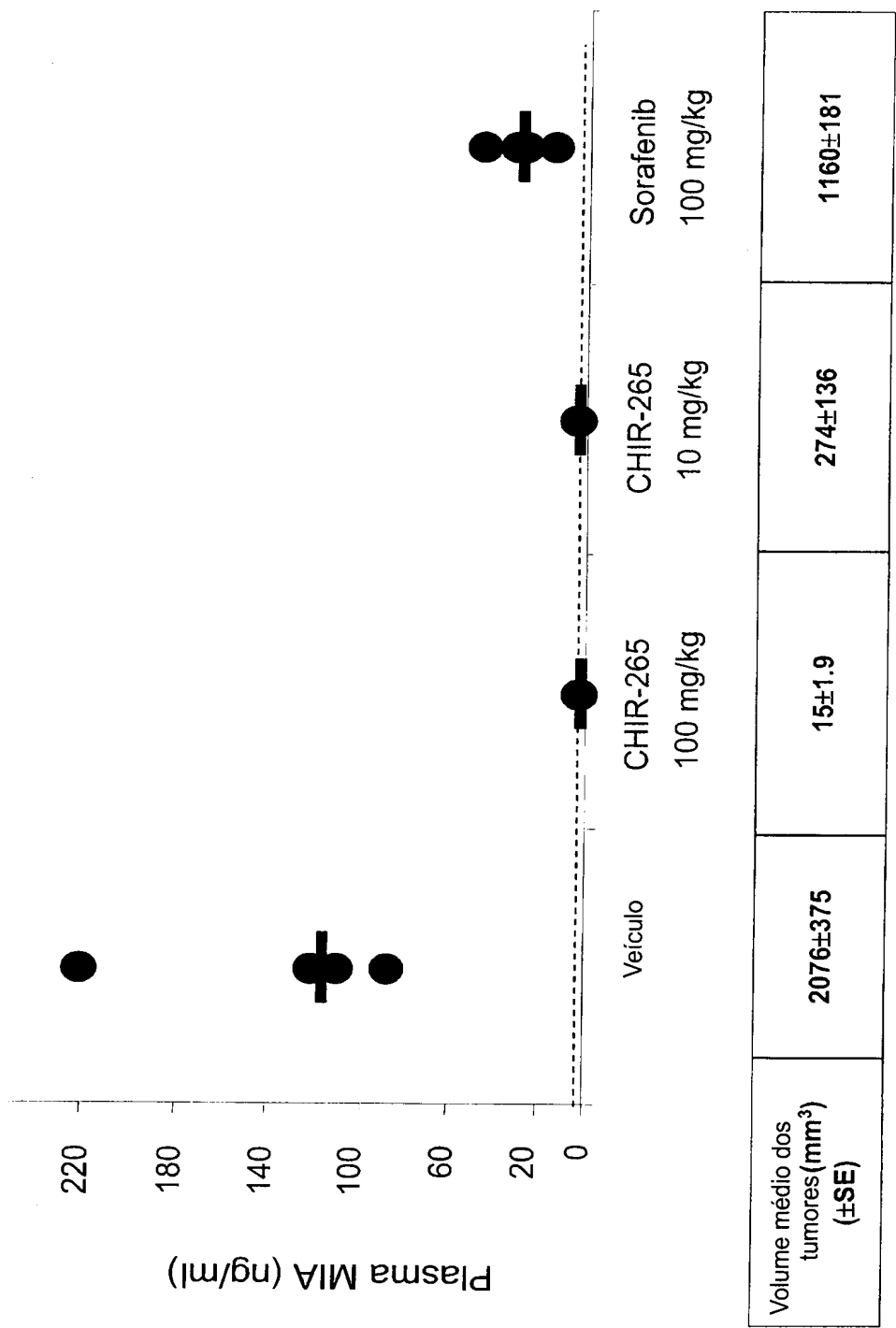


Fig. 4A



(----) Limite de detecção

Fig. 4B

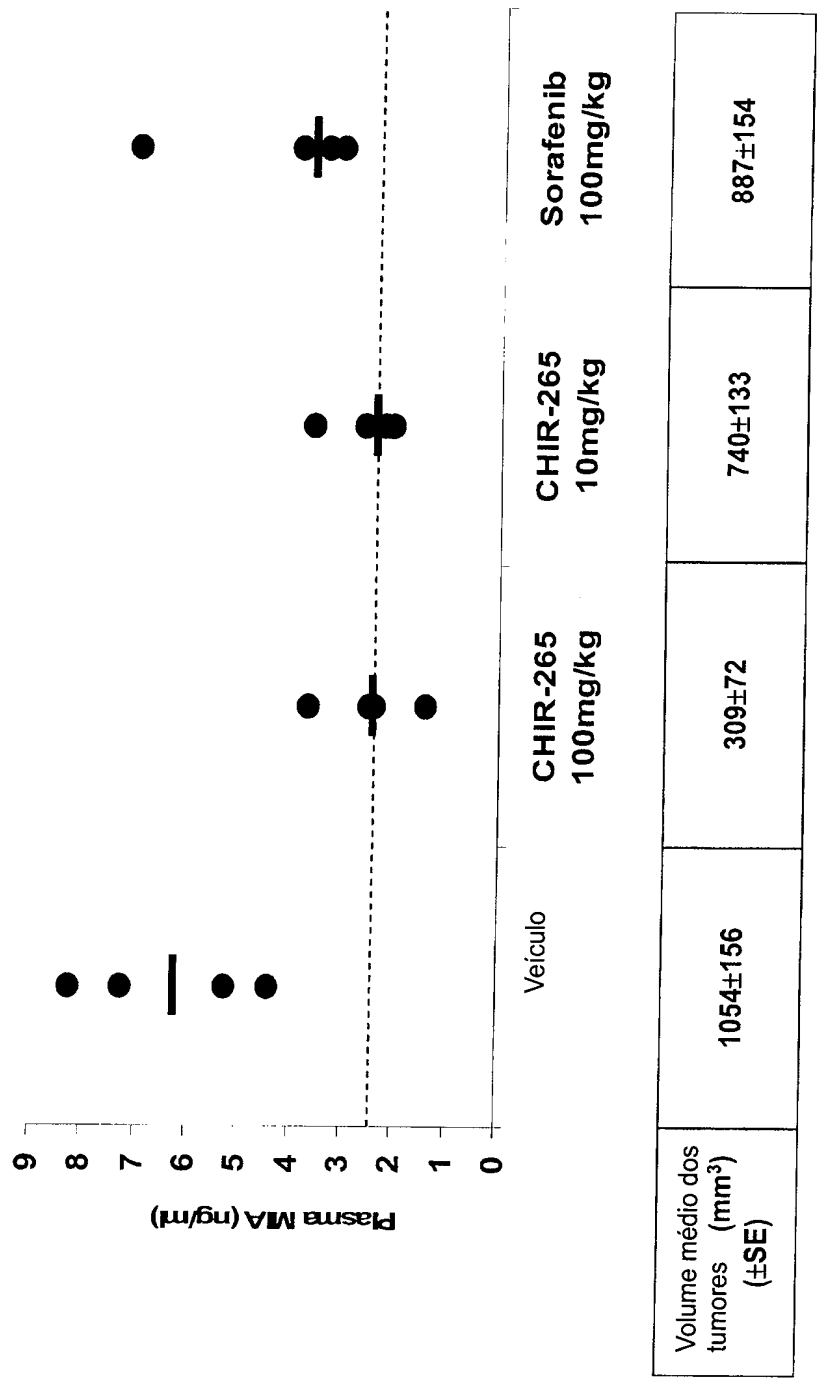
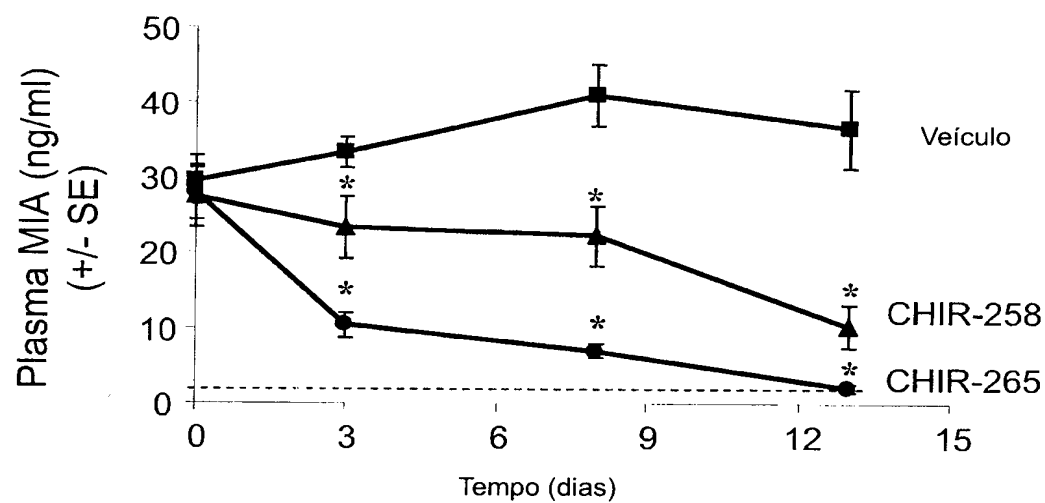
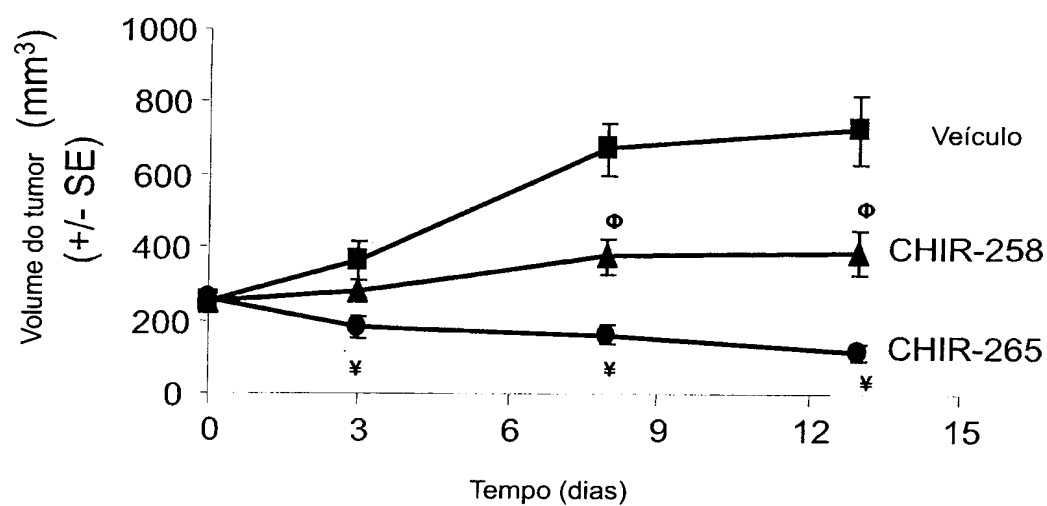
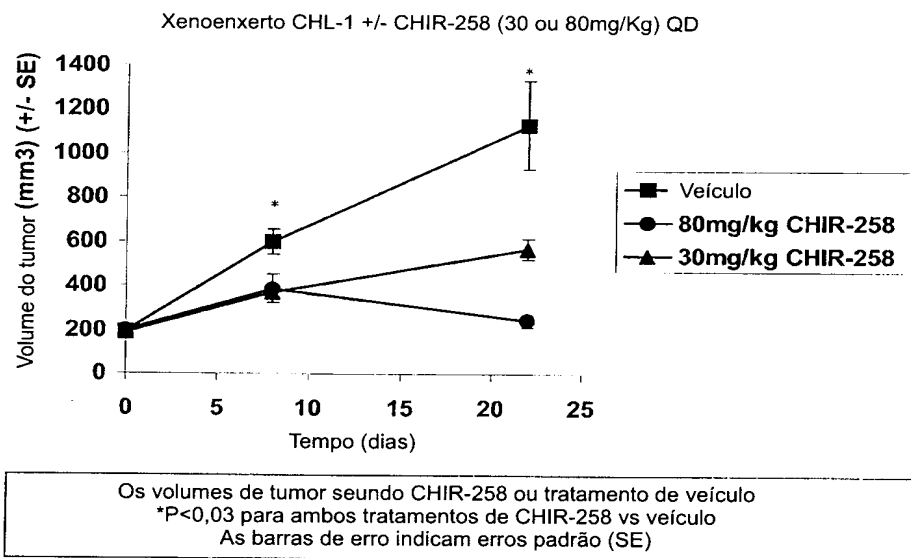
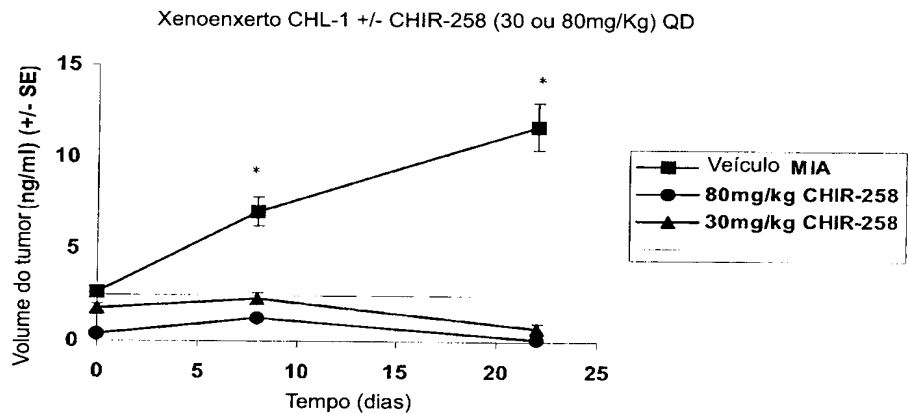


Fig. 4C

(----) Limite de detecção

**Fig. 5A****Fig. 5B**

**Fig. 6A**



O CHIR-258 significativamente inibiu a secreção de MIA. Camundongos portadores de tumor melanoma humano CHL-1 foram dosados oralmente com CHIR-258 (30 ou 80 mg/Kg) ou veículo (n=10/grupo). As amostras de plasma e dados de volume do tumor coletados antes da dosagem, dia 8 e 22 após o tratamento. * $P < 0,05$ para todas as comparações vs veículo. As barras de erro indicam erros padrão (SE). A linha tracejada (---) indica o limite de detecção do ensaio.

Fig. 6B

RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODOS PARA DETERMINAR UMA RESPOSTA DE UM INDIVÍDUO MAMÍFERO QUE TEM CÉLULAS DE TUMOR DE MELANOMA AO TRATAMENTO COM UM AGENTE INIBIDOR DE MELANOMA, PARA AVALIAR A EFICÁCIA DE UM AGENTE INIBIDOR DE MELANOMA PARA TRATAR MELANOMA EM UM INDIVÍDUO MAMÍFERO QUE TEM MELANOMA, PARA DETERMINAR SE UM PACIENTE DEVE CONTINUAR A RECEBER TRATAMENTO COM UM AGENTE INIBIDOR DE MELANOMA E PARA IDENTIFICAR AGENTE QUE TÊM UTILIDADE NO TRATAMENTO DE MELANOMA".

A presente invenção refere-se a um método para determinar uma resposta de um indivíduo mamífero que tem células tumorais de melanoma ao tratamento com um agente inibidor de melanoma. Em um aspecto, o método compreende (a) determinar uma primeira concentração de proteína de atividade inibidora de melanoma (MIA) em uma primeira amostra biológica tomada do indivíduo mamífero antes do tratamento com o agente inibidor de melanoma; (b) determinar uma segunda concentração de MIA em uma segunda amostra biológica do indivíduo mamífero tomada após tratamento com o agente inibidor, de melanoma; (c) comparar a primeira e a segunda concentrações de MIA, em que uma diminuição na segunda concentração de MIA medida na segunda amostra biológica quando comparada com a primeira concentração de MIA medida na primeira amostra biológica indica uma resposta positiva ao tratamento com o agente inibidor de melanoma.