



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

(21) PI 0713484-3 A2



(22) Data de Depósito: 21/06/2007
(43) Data da Publicação: 06/11/2012
(RPI 2183)

(51) Int.CI.:
G01N 33/574

(54) Título: EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE CITOCINA EM CÂNCER HUMANO

(30) Prioridade Unionista: 21/06/2006 EP 06 012 754.5

(73) Titular(es): Apogenix Gmbh

(72) Inventor(es): Christian Gieffers, Giorgio Stassi, Matilde Todaro, Meinolf Thiemann, Oliver Hill

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

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007005480 de 21/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/147600de 27/12/2007

(57) Resumo: EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE CITOCINA EM CÂNCER HUMANO. A presente invenção refere-se a um processo para diagnóstico de um tipo de câncer, pelo que a expressão e citocinas antiapoptóticas é determinadas nas células de tumor. O diagnóstico diferencial da presente invenção é usado para classificar distúrbios de tumor e para recomendar o tratamento requerido e para monitorar o progresso e resposta ao tratamento.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE CITOCINA EM CÂNCER HUMANO".

Descrição

A presente invenção refere-se a um processo para diagnóstico
5 de um tipo de câncer, pelo que a expressão de citocinas antiapoptóticas nas células de tumor é determinada. O diagnóstico diferencial da presente invenção é usado para classificar distúrbios de tumores e para recomendar o requerido tratamento e para monitorar o progresso e resposta ao tratamento.

O balanço entre sobrevivência de célula e morte de célula é controlado por fatores pró-apoptóticos e antiapoptóticos, cuja desregulação contribui para o desenvolvimento de várias condições patológicas, incluindo câncer. Alta expressão de fatores antiapoptóticos é comumente encontrada em cânceres humanos e contribui para ambas, expansão de célula neoplás-tica e resistência à ação terapêutica de fármacos citotóxicos. Já foi reportado
10 que produção autócrina de citocinas antiapoptóticas por células de tumor modula fortemente a suscetibilidade para o receptor e apoptose induzida por quimioterapia. Em particular, foi previamente reportado que IL-4 e IL-10 atuam como fator de crescimento autócrino em células de câncer induzindo regulação ascendente de proteínas antiapoptóticas, que protegem as células
15 de tumor da morte induzida por fármacos quimioterapêuticos (Stassi et al., Câncer Res. 63, 6784-90 (2003), Todaro et al., Câncer Res. 66, 1491-9 (2006)).

Tumores são compostos por uma combinação heterogênea de células, com diferentes características terapêuticas e diferentes potenciais
25 proliferativos. Em particular, células de câncer podem originar progénie fenotípicamente diversa de células, tanto dotadas com um definido potencial proliferativo como tendo um limitado ou nenhum potencial proliferativo.

Neste sentido recente evidência sugere que a capacidade de crescimento tumorigênico é de fato confinado a um pequeno subconjunto de
30 assim chamadas células tronco de câncer (CSC). O pedido de patente internacional PCT/IT2005/000523 mostra um processo de isolamento e cultura de células tronco a partir de tumores sólidos. Esta sub-população de células

de câncer pode auto – renovar e originar uma população de células heterogêneas que exibem diversos graus de diferenciação. Além disso, foi recentemente verificado que estas células tronco de câncer são显著mente resistentes a apoptose induzida por droga, assim escapando de terapias anti-tumor e esta sendo provavelmente a razão subjacente para ineficiência de quimioterapia.

5 Foi agora demonstrado que CSC produz predominantemente IL-4 e IL-10 e são responsáveis pela alteração mencionada acima de sensibilidade de morte de célula induzida por fármaco.

10 Foi agora verificado pelos inventores da presente invenção que tumores sólidos podem ser diferenciados em relação a nível e/ou perfil de expressão de citocina antiapoptótica. A expressão de citocinas antiapotóticas difere entre tumores individuais do mesmo órgão e mesmo dentro de células ou porções de um tumor simples. Estes resultados conduzem a novas eficientes estratégias no diagnóstico e/ou terapia de tumor.

15 Em particular, um objeto da presente invenção foi prover um processo que permite a identificação e diagnóstico de tipos de câncer e células de câncer que expressam citocinas antiapoptóticas.

20 Da mesma maneira, a presente invenção provê um processo para diagnóstico de tipos de tumores, especialmente tipos de tumores sólidos, usando citocinas antiapoptóticas como um alvo. Particularmente, a invenção refere-se a um processo para diagnóstico de um tipo de câncer compreendendo as etapas de:

25 (a) provimento de uma amostra a partir de um tumor sólido com-
preendendo células de tumor,

(b) determinação de expressão de pelo menos uma citocina antiapoptótica nas ditas células de tumor, e

(c) classificação de tumor sólido como um tumor expressando não-citocina ou como um tumor expressando citocina.

30 Portanto, a invenção refere-se a diagnóstico diferencial de tipos de cânceres através da determinação e/ou quantificação do perfil de expressão e/ou nível de citocinas antiapoptóticas na amostra de tumor. Como cito-

cinas antiapoptóticas, IL-4 e/ou IL-10, particularmente IL-4, é preferida.

O diagnóstico diferencial da invenção permite classificar tipos de tumores e identificar aqueles que mostram expressão de citocinas antiapoptóticas e que são refratários a tratamento com agentes quimioterapêuticos.

5 Portanto, a expressão de citocinas antiapoptóticas é um significante marcad-
or para classificação de tumor o que permite a seleção de estratégias tera-
pêuticas alvejadas.

Por exemplo, o processo da invenção pode ser útil para prever
se um paciente sofrendo de um certo tipo de câncer pode ser resistente ou
10 suscetível a uma certa terapia e para prover uma otimizada estratégia de
tratamento.

De acordo com a presente invenção, foi verificado que tipos de
câncer podem ser classificados como tumores expressando não-citocina ou
como tumores expressando citocina.

15 Quando determinando a expressão de IL-4 e/ou IL-10, mais par-
ticularmente, a expressão de IL-4, os tumores sólidos podem ser classifica-
dos com relação a sua expressão de tanto somente IL-4 como somente IL-
10 ou ambas IL-4 e IL-10. Por isso, o processo de acordo com a presente
invenção permite a diferenciação entre tumor sólido classificado como tumo-
res expressando IL-4 ou tumores não-expressando IL-4, tumor sólido classi-
ficado como tumores expressando IL-10 ou tumores não-expressando IL-10
20 e tumor sólido classificado como tumores expressando IL-4 e IL-10 ou tumo-
res expressando não-IL-4 e não-IL10.

O processo da presente invenção é preferivelmente realizado
25 sobre tumores sólidos e em particular sobre tumores epiteliais. Os ditos tu-
mores epiteliais podem ser escolhidos do grupo consistindo em câncer de
tiróide, mama, próstata, bexiga, cólon, gástrico, pâncreas, rim, fígado e pul-
mão. Mais preferivelmente, o tumor epitelial é um câncer de cólon, gástrico,
mama, pulmão, bexiga ou próstata.

30 O processo diagnóstico da presente invenção pode ser realizado
sobre várias amostras de células de um tumor sólido. Uma amostra teste é
preferivelmente uma amostra de células de tumor primário e/ou do ambiente

de tumor isolado de um sujeito, por exemplo, um paciente humano. Por exemplo, tecido de célula de tumor obtido por biópsia, ressecção, ou outras técnicas pode ser testado. A amostra de tumor compreende células de tumor. A expressão de citocina antiapoptótica nas células de tumor é preferivelmente determinada sobre células de tumor primário e/ou células tronco de câncer.

5 Processos para a determinação da expressão de citocina antiapoptótica nas células de tumor são bem-conhecidos na técnica. A determinação da expressão, em particular a superexpressão, da citocina antiapoptótica na célula de tumor é conduzida pela detecção da dita citocina no nível de proteína e/ou o nível de ácido nucléico.

10 A determinação de proteínas citocinas pode ser realizada nas células de tumor ou no microambiente de tumor. Processos para determinação de presença e quantidade de proteínas citocina em uma dada amostra 15 são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica e podem ser processos imuno-químicos como processos de imunohistoquímica, Western blotting, imunoprecipitação e ELISA. Ainda processos baseados em espectrometria de massa, compreendendo MALDI-MS, podem ser usados para determinar a presença e quantidade de proteínas citocinas.

20 Ácidos nucléicos citocina são detectados e quantificados aqui através de qualquer um dos meios conhecidos por aqueles versados na técnica. Técnicas de hibridização junto com opcionais processos de amplificação são frequentemente usados para detecção de ácidos nucléicos. Expressão de RNAs de citocina pode ser, por exemplo, detectada através de análise Northern blot ou por transcrição reversa e subsequente amplificação por PCR.

25 O processo de acordo com a invenção ainda pode compreender a etapa de

(d) determinação de sensitividade das células de um tumor expressando citocina contra pelo menos um agente quimioterapêutico ou pró-apoptótico na presença e/ou na ausência de um antagonista da dita citocina expressa e/ou seu receptor.

De modo a investigar a sensitividade das células de tumor expressando citocina a agentes quimioterapêuticos e/ou pró-apoptóticos, a viabilidade das células de tumor expostas aos ditos agentes quimioterapêuticos ou pró-apoptóticos na ausência e/ou presença de agentes de neutralização de citocina pode ser medida. Processos para determinação de sensitividade das células de tumor a um dado agente são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica (por exemplo, como descrito em Exemplos).

Baseado nesta determinação, o processo de acordo com a presente invenção ainda pode compreender a etapa de

10 (e) seleção de um tratamento específico para tipo de câncer.

Como já mencionado, a invenção é baseada na observação de que tumores sólidos podem ser diferenciados por sua expressão ou grau de expressão de citocinas antiapoptóticas e em particular citocinas IL-4 e IL-10. Uma vez que a expressão de citocinas antiapoptóticas IL-4 e IL-10 em tumores ou células de tumores é responsável pela refratariedade a tratamento, por exemplo, com agentes quimioterapêuticos e/ou pró-apoptóticos, as citocinas antiapoptóticas devem ser neutralizadas de modo a aumentar a sensitividade do tumor na direção de tratamento. Assim, a invenção também pode abranger um exame da sensitividade ou resistência a agentes quimioterapêuticos e/ou pró-apoptóticos em combinação com antagonistas de uma citocina expressa pelo tumor.

Em uma modalidade preferida, o ensaio de sensitividade realizado na etapa (d) do processo conduz à determinação de um agente quimioterapêutico ou pró-apoptótico contra o qual a célula dos tumores expressando citocina são particularmente sensíveis

Consequentemente, de acordo com a etapa (e) da presente invenção, um tratamento específico de tipo de tumor pode ser selecionado compreendendo a administração de uma combinação de um agente de neutralização de citocina e um agente quimioterapêutico ou pró-apoptótico.

30 Um agente de neutralização de citocina pode ser qualquer composto que reduz a quantidade e/ou atividade de uma citocina. Por exemplo, o agente de neutralização de citocina pode ser um agente que inibe um ca-

minho de transdução de sinal disparado pela citocina expressa autocrinamente pelas células de tumor. Portanto, qualquer agente é contemplado que seja capaz de modular a expressão, e/ou função de uma citocina diretamente e/ou indiretamente, por exemplo, afetando a expressão e/ou função da respectiva proteína citocina e/ou receptor de citocina.

Preferivelmente, o agente de neutralização de citocina é um agente de neutralização de IL4 e/ou IL-10, isto é, qualquer agente que seja capaz de inibir o caminho de transdução de sinal disparado pela expressão autócrina de IL-4 e/ou IL-10.

Agentes de neutralização de citocina podem ser selecionados, entre outros, de agentes que inibem e/ou reduzem a atividade de proteína citocina expressa, agentes que degradam a proteína citocina expressa e agentes que inibem a produção de citocina. Agentes que bloqueiam a atividade de citocina são, por exemplo, antagonistas que bloqueiam receptores de citocina, por exemplo, peptídeos, moléculas pequenas, variantes muteína das citocinas que mostram uma atividade antagonista comparado ao sinal original da citocina. Exemplos para tais muteínas são em particular muteínas IL-4 como Aerolast de Aerovance e Pitrakinra e BAY-36-1677 de Bayer. Ainda anticorpos contra o receptor de citocina ou anticorpos contra a proteína citocina podem ser usados. O anticorpo é preferivelmente um anticorpo contra IL-4 e/ou IL-10, por exemplo, anticorpos de Amgen e Immunex ou um anticorpo contra o receptor de IL-4 e/ou o receptor de IL-10, por exemplo, o anticorpo Pascolizumab de Glaxo. O anticorpo pode ser um anticorpo completo, por exemplo, um anticorpo IgG, ou um seu fragmento de ligação de antígeno. Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo humanizado ou quimérico monoclonal que tem domínios constantes humanos, por exemplo, domínios IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 constantes humanos. Mais preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo humanizado que adicionalmente comprehende regiões de estrutura humanas. Também são preferidos fragmentos de anticorpos, por exemplo, fragmentos de anticorpos monovalentes ou divalentes como os fragmentos F(ab)₂. Por outro lado, o anticorpo pode ser um anticorpo recombinante, por exemplo, um anticorpo de cadeia simples ou um

seu fragmento, por exemplo, um fragmento scFv.

Receptores de citocina solúveis, preferivelmente sem a extensão de membrana e o domínio intracelular, também podem ser usados como agentes de bloqueio de atividade de citocina. Estes receptores solúveis são, 5 por exemplo, de Regeneron, em particular proteínas de fusão IL-4R/IL-13R-Fc, e receptores solúveis de Amgen e Immunex, em particular Nuvance e Altrakincept. Exemplos específicos de receptores solúveis compreendem o domínio extracelular (ECD) de um receptor de IL-4 humana, por exemplo, um ECD encurtado de alfa aminoácido 24 de IL-4R até aminoácido 224, 225, 10 226, 227, 228, 229 ou 230, e ainda opcionalmente domínios, por exemplo, o domínio extracelular de um receptor de IL-13 humana e/ou um domínio de imunoglobulina Fc humana.

Como exemplo preferido de agentes que degradam a proteína citocina expressa proteases desenhistas podem ser mencionadas no contexto da presente invenção. A produção das proteínas citocinas pode, por outro lado, ser inibida por exemplo, por agentes atuando sobre os níveis nucléicos tal como ácidos nucléicos antissenso, moléculas de siRNA e /ou ribozimas.

Antagonistas de citocina preferidos são descritos no pedido de patente internacional WO 2004/069274. Anticorpos direcionados contra cito- 20 cinas são preferivelmente usados como agentes de neutralização de citocina. Anticorpos anti-IL-4 mostrados no pedido de patente EP-A-0 730 609 são especialmente apropriados como agentes de neutralização de citocina do processo da presente invenção. Em uma modalidade muito preferida, o anticorpo derivado do anticorpo monoclonal 6^a1 produzido por linha de célula 25 hibridoma ACC93100620 ou um seu fragmento de ligação de antígeno é usado como agente de neutralização de citocina.

O agente quimioterapêutico usado em etapas (d) e/ou (e) é selecionado de antimetabólitos, agentes de fragmentação de DNA, agentes de reticulação de DNA, agentes intercalantes, inibidores de síntese de proteína, 30 inibidores de topoisomerase I e II, agentes direcionados a microtúbulos, inibidores de cinase, hormônios e antagonistas de hormônios. Particularmente, o agente quimioterapêutico é selecionado de cisplatina, carboplatina, e oxa-

liplatina. Como agentes pró-apoptóticos preferidos, TRAIL e ligante CD95 podem ser selecionados.

Baseado nos resultados obtidos a partir da administração combinada de antagonistas de citocina anti-terapêuticos e agentes quimioterapêuticos e/ou pró-apoptóticos à célula de tumor, uma estratégia terapêutica pode ser desenvolvida baseado em uma específica combinação de fármacos que provou ser efetiva.

Ainda um objeto da presente invenção é por isso o uso de uma combinação de um agente de neutralização de citocina e um agente quimioterapêutico ou pró-apoptótico e a fabricação de um medicamento para o tratamento de tumor, tal como um tratamento de tumor de primeira linha ou como tratamento de tumor da segunda ou terceira linha, por exemplo, para o tratamento de tumores refratários, tais como tumores que se tornaram refratários contra um ou mais agentes antitumor.

Assim, ainda um aspecto da presente invenção é o uso de uma combinação de (i) pelo menos um agente de neutralização de citocina e (ii) pelo menos um agente quimioterapêutico ou pró-apoptótico para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um tipo de câncer classificado como tumor expressando citocina.

Uma das principais causas de resistência a fármaco em células de tumor é baseada na observação de que uma pequena população sobrevivente de células de tumor, e em particular de células-tronco de tumor, após uma regressão aparentemente completa ou excisão cirúrgica do tumor primário pode renovar o tumor e contribuir para a assim chamada doença residual mínima (MRD).

Neste sentido, uma vez que a terapia de combinação é particularmente apropriada para aumento de sensitividade terapêutica de células-tronco de tumor, ainda um aspecto da presente invenção é o uso de uma combinação de

(iii) pelo menos um agente de neutralização de citocina e
(iv) pelo menos um agente quimioterapêutico ou pró-apoptótico para a fabricação de um medicamento para o tratamento de doença residual

mínima.

De acordo com uma realização preferida da presente invenção, o uso de uma terapia combinada dos agentes acima (i) e (ii) ainda pode ser em combinação com cirurgia e/ou terapia de irradiação. Em particular, a combinação de medicamentos é para terapia de combinação sequencial, separada ou simultânea, com cirurgia e/ou terapia de irradiação.

De acordo com uma realização preferida da presente invenção, a administração de agente (i) e agente (ii) é iniciada simultaneamente. Alternativamente, a terapia de combinação pode ser iniciada em etapas. De acordo com esta realização preferida da invenção, o início da administração do agente de neutralização de citocina (i) é ≤ 1 semana antes de administração do agente quimioterapêutico ou pró-apoptótico (ii). A administração do agente quimioterapêutico ou pró-apoptótico (ii) por sua vez pode ser iniciada ≥ 1 semana antes de administração do agente de neutralização de citocina (i).

Ainda uma modalidade da invenção é um polipeptídeo receptor de IL-4 solúvel ou polipeptídeo de fusão compreendendo um domínio extracelular encurtado de terminal-C, por exemplo, um domínio encurtado por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais aminoácidos ou uma molécula de ácido nucléico codificando tal polipeptídeo. O domínio extracelular encurtado pode ser derivado, por exemplo, de receptor alfa de IL-4 humana acesso NCBI NP_000409 que termina com terminal-C em aminoácidos 230, 229, 228, 227, 226, 225 ou 224. Preferivelmente a extremidade terminal-C é aminoácido 224. O polipeptídeo pode compreender pelo menos ainda um domínio, por exemplo, um peptídeo sinal terminal-N, ainda um domínio efetor, por exemplo, um domínio extracelular de receptor de IL-13, um domínio imunoglobulina Fc, e/ou um domínio de purificação. Um exemplo de um polipeptídeo IL-4R encurtado é descrito no Exemplo 4. O polipeptídeo IL-4R encurtado é apropriado para aplicações farmacêuticas, por exemplo, para o tratamento de tumores, particularmente para o tratamento de tumores associados com IL-4 como descrito acima.

A invenção é ainda ilustrada pelos exemplos que se seguem.

ExemplosMateriais e ProcessosTecidos humanos.

Espécimes de câncer foram obtidos no momento de tratamento

5 cirúrgico, de acordo com os padrões éticos do comitê institucional responsável por experimentação humana. Enquanto tecidos normais foram obtidos da parte contra – lateral do tumor removido cirurgicamente. Diagnóstico histológico foi baseado nas características microscópicas comportamentais de células de carcinoma determinando o tipo histológico e grau.

10 Purificação de célula primária humana.

Tecidos normais e de câncer foram digeridos por 2 horas com colagenase (1,5 mg/mL) (Gibco BRL, Grand Island, NY) e hialuronidase (20 µg/mL) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) como previamente descrito (1).

Uma vez digeridas, células foram mantidas sobre plástico em meio DMEM

15 (EuroCLone Ltd., West York, UK) a 37°C em uma atmosfera umedecida de 5% de CO₂. Seguindo ainda 12 horas de cultura, células de câncer foram deixadas crescer em monocamadas para a imuno citoquímica ou descoladas com tripsina +EDTA para análises de níveis de transcrito de gene e expressão de proteína, funcional. Para cultura de células de cólon e gástricas, plástico

20 foi revestido com / cm² de colágeno (Calbiochem GmbH, Darmstadt, Germany). Células de câncer foram cultivadas na presença ou ausência de IL-4 recombinante humana (20ng/mL), IL-10 (40ng/mL) (Euroclone, Paignton, US), anticorpos neutralizantes contra IL-4 humana (10 µ/mL) (R&D Systems, Europe, Ud) por 48 horas). Anti-CD95 (mAb CH-11; Upstate Biotechnology Inc.) ou IgM controle (Sigma) ou TRAIL zipper isoleucina (iz-TRAIL;

25 200 ng/mL) foram usados para determinar sensitividade a apoptose induzida por TRAIL ou CD95 em células de câncer. Além disso, seguindo exposição a anti-IL-4 e anti-IL-10 células de câncer foram tratadas com oxaliplatina (100 µM) ou doxorrubicina (5 µM) ou cisplatina (300 ng/mL), ou taxol (5 µM) (Sigma)

30 ou etoposide (1 µM; Biomol, Plymouth Meeting, PA).

Ensaios de Sobrevida e Morte.

Para avaliar eventos apoptóticos as análises de citometria de

fluxo e manchamento de DNA foram realizadas. A porcentagem de núcleos hipodiplóides foi avaliada como descrito em Stassi et al., Câncer Res. 2003, 63 (20):6784-90. Alternativamente, células humanas purificadas de câncer foram revestidas em placas de 96 cavidades em triplicata em 1500 células /

5 cavidade e cultivadas. O número de células viáveis foi detectado por CellTiter Aqueous Assay Kit (Promega Corporation, WI, USA) seguindo as instruções do fabricante. Células HuT78 revestidas em 2x150mmL e tratadas com anticorpo de ativação – CD95 CH11 (200 ng/mL) foram usado como um controle positivo para medição de morte de células.

10 Análises Imuno Histoquímicas.

Imuno histoquímica foi realizada sobre seções de amostra de tumor e normal de cólon, gástrica, próstata, mama, pulmão, fígado, pâncreas, rim e bexiga embutidas em parafina de 5µm de espessura. Seções que tiveram a cera retirada foram tratadas por 10 minutos em forno de microondas em tampão citrato 0,1M. Então, seções foram incubadas por 10 minutos com solução salina Tampão Tris (TBS) contendo soro humano AB 10% para bloquear o manchamento não-específico. Após eliminação de excesso de soro, seções foram expostas por toda noite a 4°C a anticorpos específicos contra IL-4 (B-S4 camundongo IgG1, Caltag Laboratories, Burlingame, CA), IL-10 (IgG_{2a}, camundongo B-N10, caltag), IL-4Ralpha (IgG coelho C-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), IL-10R (IgG coelho C-20, Santa Cruz Biotechnology), TRAIL-R1 (IgG1 camundongo HS101, Aléxis Biochemicals, Lausen, CH), TRAIL-R2 (IgG1 camundongo HS201, Alexis) ou controles emparelhados – isotipo em apropriadas diluições. Segundo exposição a anticorpo primário células foram tratadas com imunoglobulinas anti-camundongo ou anticoelho biotiniladas, lavadas em TBS e então incubadas com streptavidina peroxidase (Dako LSAB 2 Kit, Dako Corporation Carpinteria CA, USA). Manchamento foi detectado usando 3-amino-9-etil carbazol (AEC) como um substrato colorimétrico. Contra – manchamento de células foi realizado usando hematoxilina aquosa.

30 Análises RT-PCR.

RNA total foi preparado a partir de células cultivadas usando o

Rneasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Germany) de acordo com instruções do fabricante. Amplificação PCR e transcrição reversa para cada preparação com 1 µg de RNA total foram realizadas usando OneStep RT-PCR Kit (Qiagen). Dois iniciadores específicos para a sequência codificando IL-4 5'-CCA CGG

5 ACA CAA GTG CGA TA nucleotídeos 436-455 (exon 1) e 5'-CCT TGC AGA AGG TTT CCT TCT-3' complementares para nucleotídeos 564-584 (exon 3) (número de acesso GenBank NM 000589.2) foram selecionados para especificamente amplicarem IL-4.

Gene GAPD foi amplificado a partir das mesmas preparações de

10 RNA como controle doméstico (sequência controle 5'-TGA CAT CAA GAA GGT GGT GA-3' nucleotídeos 843-863 e 5'-TCC ACC CTG TTG CTG TA-3' complementares para nucleotídeos 1033-1053; número de acesso NM-002046). Trinta e cinco ciclos foram realizados, cada um consistindo nas

15 seguintes condições: 94°C, 230 segundos; 598°C, 30 segundos; 72°C, 30 segundos.

Isolamento de proteína e análises de western blotting.

Péletes de células foram ressuspensas em tampão de lise NP-40 resfriado com gelo (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, NP-40 1%) contendo inibidores de protease como descrito em Stassi et al.

20 Nature Immunology 2000, 1, 1-6. Imuno-manchamento para actina (Ab-1, IgM de camundongo, Calbiochem, Darmstadt, Germany), CD95L (G247-4, IGG1 camundongo, PharMingen, san Diego), CD95 (C-20, Santa Cruz Biotechnology), cFLIP (IgG1 camundongo NF6, Alexis Biochemicals, Switzerland), PED/PEA-15 (IgG coelho gentilmente provida por G. Condorelli), CI-2

25 (124, IgG1 camundongo, Upstate Biotechnology Inc.) e Bcl-X_I (H-5, IgG1 camundongo, Santa Cruz Blotechnology) foi detectado por anticamundongo ou anticoelho Abs conjugado com HRP (Amersham Biosciences UK Limited, England) e visualizado com o sistema de detecção de quimioluminescência (SuperSignal West Dura Extended duration Substrate, Pierce, Illinois, USA).

30 Exemplo 1

Produção autócrina de IL-4 em células de câncer

De modo a investigar se o microambiente de tumor influência

fenótipo e função de célula de câncer, a presença de IL-4 e IL-10 previamente verificada ser produzida autocrinamente por tirócitos de câncer foi avaliada. Análises de imuno histoquímica demonstraram que todos os histotipos de tumor sólido investigados expressaram altos níveis de IL-4, enquanto IL-10 foi menos detectável. Resultados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Expressão de citocina em células de câncer

| Câncer | IL-4 | IL-10 |
|--------------|-------|-------|
| PTC | ++++ | +++ |
| FTC | ++++ | +++ |
| UTC | ++++ | ++++ |
| Côlon | ++++ | + |
| Gástrico | +++++ | - |
| Pulmão | ++++ | + |
| Pâncreas | + | + |
| Glioblastoma | +++ | ++ |
| Próstata | ++ | + |
| Mama | ++++ | + |
| Bexiga | ++++ | + |
| Fígado | + | + |
| Rim | ++ | ++ |

Interessantemente, a reatividade contra IL-4 localizada para células de colon, mama, pulmão, gástricas, fígado, próstata, pâncreas, rim e bexiga, sugerindo que células neoplásicas são a fonte de alta produção para IL-4 e menos para IL-10 (Tabela 1 e Fig. 1a). Para excluir a possibilidade de que a reatividade observada em células de tumor foi exclusivamente devido à liberação de citocinas tipo 2 através de infiltração de células T, células de câncer de cólon, mama, gástricas e de pulmão recentes foram analisadas por RT-PCR. Em concordância com resultados de imunohistoquímica, níveis de expressão de RNAm IL-4 de células de câncer purificadas foram altamente aumentados comparados a células normais relacionadas (Fig. 1b), demonstrando que produção autócrina de IL-4 não é restrita a células de câncer de tireoide mas também ocorre em outras células malignas epiteliais de tumores sólidos que produzem consideráveis quantidades de IL-4.

Células de câncer epiteliais expressam altos níveis de proteínas antiapoptóticas.

Células de câncer de cólon, mama, gástrico e pulmão são resistentes a morte de célula induzida por quimioterapia e por ligante. Para determinar o mecanismo responsável por essa refratariedade, foi investigado se expressão aberrante de fatores antiapoptóticos pode estar implicada no prejudicado caminho de sinal apoptótico "extrínseco" e "intrínseco" gerado por ligantes de morte ou quimioterapia. Foi verificado por imuno histoquímica e análises de Western blot que células de carcinoma epitelial expressam CD95, TRAIL-R1 e TRAIL-R2 (Fig. 2a e b). Por isso, os inventores da presente invenção avaliaram a presença e mediram os níveis de expressão de cFLIP, PED/PEA-15, Bcl-xL e Bcl-2 em células de câncer e normais de cólon, mama, gástricas e pulmão. Enquanto níveis de cFLIP e PED/PEA-15 foram aproximadamente três vezes maiores em células de câncer recentemente purificadas, comparadas com células normais de cólon, mama e pulmão (Fig. 2a), níveis de Bcl-xL foram quatro vezes maiores. Níveis de expressão Bcl-2 foram somente duas vezes maiores em todas as células de câncer analisadas, comparadas com células normais. Assim, regulação ascendente de genes antiapoptóticos em células de câncer de cólon, mama, gástrico e pulmão pode conferir resistência a apoptose induzida por quimioterapia e TRAIL- CD95.

IL-4 aumenta sobrevivência, crescimento de células neoplásicas epiteliais. A expressão de receptor de IL-4 em ambas células normais e neoplásicas foi avaliada. Imuno histoquímica sobre seções embutidas em parafina mostraram que receptor de IL-4 foi expresso em todos os tecidos de câncer analisados. Os resultados são mostrados na seguinte Tabela 2 e na Fig. 3a.

Tabela 2. Expressão de IL-4R em células de câncer

| Câncer | IL-4R |
|--------|-------|
| PTC | ++++ |
| FTC | ++ |
| UTC | +++ |

| Câncer | IL-4R |
|--------------|-------|
| Côlon | ++ |
| Gástrico | +++ |
| Pulmão | +++++ |
| Pâncreas | +++ |
| Glioblastoma | ++ |
| Próstata | ++ |
| Mama | +++ |
| Bexiga | ++++ |
| Figado | +++ |
| Rim | +++ |

De modo a investigar o possível envolvimento de IL-4 sobre sobrevivência de célula de tumor, células normais de cólon, mama, gástricas e de pulmão foram expostas a 20 ng/mL de IL-4 e analisadas para crescimento de célula. IL-4 aumentou显著mente a taxa de crescimento de células normais de cólon, mama, e pulmão (Fig. 3b). Além disso, para determinar o envolvimento de IL-4 na refratariedade de células de câncer a agentes CD95, TRAIL e quimioterapêuticos, células normais de cólon, mama, gástricas e de pulmão foram pré-incubadas com IL-4 e então analisadas para expressão daquelas proteínas antiapoptóticas implicadas na resistência de morte de célula por quimioterapia e ligantes de morte. IL-4 aumentou os níveis de proteína de cFLIP, PED/PEA-15, Bcl-xL e Bcl-2 em células normais de cólon, mama (Fig. 3C) e gástricas e de pulmão, sugerindo que produção de IL-4 autócrina pode proteger células de câncer de estimulação de receptor de morte e quimioterapia, regulando ascendentemente fatores antiapoptóticos.

Neutralização de IL-4 promove impedimento de crescimento e morte de célula induzida por CD95, TRAIL e quimioterapia em células de câncer

Para demonstrar diretamente que produção autócrina de IL-4 confere proteção de morte de célula induzida por CD95, TRAIL e quimioterapia, foram investigados os efeitos de neutralização de IL-4 em células de câncer de cólon, mama, e pulmão. Exposição de células de câncer de cólon, mama, gástrico e de pulmão recentemente purificadas a anticorpos neutralizantes de IL-4 resultou em aumento significativo da morte de célula induzida por CD95, TRAIL e quimioterapia.

zantes contra IL-4 por 48 horas sensibilizou células de câncer para morte de célula induzida por receptor e morte por quimioterapia confirmando o papel antiapoptótico de IL-4 em câncer sólido. Os resultados são mostrados nas Figuras 4a-c.

5 Além disso, neutralização de IL-4 bloqueou crescimento de célula de tumor de cólon, mama, gástrico e pulmão até 15 dias (Fig. 5) e modulou descendente mente os níveis de expressão de proteína de cFLIP, PED/PEA-15, Bcl-xL e Bcl-2. Estes dados indicam que produção autócrina de IL-4 pode desempenhar um papel importante em controle de crescimento
10 e é especificamente requerida para sobrevivência de células de câncer.

Espécimes de tecido de pacientes de tumor operados recentemente foram selecionados para expressão de IL-4 e IL-10 através de uma variedade de processos padrões como RT-PCR, western blots e imuno histocímica. Da mesma maneira, a expressão de seus respectivos receptores
15 foi analisada através dos mesmos processos. Células de câncer purificadas foram então testadas para sua sensitividade contra agentes quimioterapêuticos tais como, por exemplo, etoposide, doxorrubicina, oxaliplatina e indutores de apoptose como TRAIL e ligante CD95. Os resultados são mostrados na seguinte Tabela 3.

20 Tabela 3. Sensibilização a morte de célula induzida por quimioterapia e receptores de morte

| Espécimes | Número | Tratamento anti IL-4 | | | | |
|-----------|--------|----------------------|--------------------|---------------|-------|-------|
| | | Expressão de IL-4 | Expressão de IL-10 | Quimioterapia | TRAIL | CD95 |
| Tiróide | 75 | 75 | 75 | 2/20 | N.D. | 5/20 |
| Côlon | 85 | 68 | 68 | 16/20 | 15/20 | 16/20 |
| Gástrico | 21 | 14 | 14 | 9/10 | 10/10 | 7/10 |
| Mama | 25 | 16 | 16 | 8/10 | 6/10 | 9/10 |
| Pulmão | 9 | 5 | 5 | 4/2 | 4/2 | 3/3 |
| Próstata | 12 | 10 | 10 | 4/5 | N.D. | 3/5 |
| Pâncreas | 6 | 6 (baixo) | 6 (baixo) | N.D. | N.D. | N.D. |
| Bexiga | 12 | 12 | 12 | 3/4 | N.D. | 2/4 |
| Fígado | 4 | 4 (baixo) | 4 (baixo) | N.D. | N.D. | N.D. |

| | | | | Tratamento anti IL-4 | | |
|-----------|-------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-------|------|
| Espécimes | Nú- mero | Expressão de IL-4 | Expressão de IL-10 | Quimio- terapia | TRAIL | CD95 |
| Rim | 3 | 3 (baixo) | 3 (baixo) | N.D. | N.D. | N.D. |

Como mostrado a partir dos resultados na Tabela 3, foi surpreendentemente verificado que células de tumor primário normalmente resistentes expressando IL-4 e/ou IL-10 tornaram-se sensíveis contra os agentes quimioterapêuticos testados e/ou os agentes pró-apoptóticos quando incubadas na presença de um anticorpo IL-4 de modo que mais que 90% das células morreram em um par de dias. Particular sensibilização significante para morte de célula induzida por quimioterapia e receptores de morte foi mostrada para células de câncer de cólon, gástrico, mama, pulmão, próstata e bexiga.

10 Exemplo 2

Os dados reportados neste exemplo revelam que células tronco de câncer de cólon purificadas produzem altos níveis de IL-4 e que a exposição das células de câncer a anticorpos neutralizantes contra IL-4 sensibilizaram células para apoptose induzida por TRAIL e fármaco citotóxico. Ainda, os dados que se seguem mostram que um tratamento combinado de tumores de cólon com agentes quimioterapêuticos e agentes anti-IL-4 reduz significantemente crescimento de tumor.

Para investigar a sensitividade de CSC de cólon a fármacos quimioterapêuticos, a viabilidade de esferoides CSC de cólon expostos a cisplatinum (300 ng/mL) e oxaliplatina (100 µM) foi medida, doses equivalentes àquelas atingidas durante tratamento de câncer *in vivo*. Em adição, CSC de cólon foram tratadas com o ligante de morte de indução de apoptose TRAIL (200 ng/mL). Células primárias (aderentes) de espécimes de câncer de cólon humano mostraram alguma sensitividade *in vitro* a todos os três fármacos testados, enquanto CSC de cólon foram显著mente resistentes, confirmado que CSC são relativamente inertes para apoptose induzida por fármacos (Fig. 6a). Isto sugere que CSC pode escapar de terapias anti-tumor e pode ser a razão subjacente para ineficiência de quimioterapia.

Para provar formalmente que produção de IL-4 em CSC de có-

Ion é responsável por regulação ascendente de proteínas antiapoptóticas e por isso refratariedade a terapia, CSC foram pré-tratadas por dois dias com anticorpos neutralizantes de IL-4 e então medida morte de células e expressão antiapoptótica. Níveis de proteínas de c-FLIP, Bcl-xL e PED, proteínas

5 antiapoptóticas previamente mostradas serem reguladas por IL-4 em câncer, diminuíram por ~duas vezes em CSC expostas a anti-IL-4 (Fig. 6b-c). Mais importante, seguindo bloqueio de IL-4 morte de células CSC foi significantemente aumentada através de tratamento com fármacos quimioterapêuticos ou TRAIL (Fig. 6d-e).

10 Para demonstrar diretamente que IL-4 protege câncer de cólon gerado por CSC de fármacos quimioterapêuticos, os efeitos de neutralização de IL-4 in vivo foram investigados. Tumores foram deixados crescer por 10 dias (tamanho ~0,2cm³) e então tratados intratumoralmente com anticorpos neutralizantes contra IL-4 ou IgG controle suas vezes por semana por 3 se-
15 manas. Embora tratamento intraperitoneal (i.p.) com oxaliplatina, uma vez por semana por 4 semanas, combinado com IgG controle tenha reduzido tamanho de tumor em camundongos, a eficácia de tratamento de quimioterapia foi significantemente aperfeiçoada por anticorpo neutralizante de IL-4 (Fig. 7a e 7b).

20 Exemplo 3

Construção de um polipeptídeo de fusão IL4RIL13R-Fc

O peptídeo sinal e o domínio extracelular de receptor alfa de IL-4 (aa1-aa231 de acesso NCBI NP_000409) foram fundidos terminalmente-N ao domínio extracelular de receptor alfa de IL13 (aa27-aa343 de acesso NCBI NP_001551). Mutações de dois pontos foram introduzidas na sequência de IL4R-alfa1 (Gly2 → Val2 e Cys207 → Ser207) e uma mutação de ponto simples foi introduzida na sequência de IL13R-alfa1 (Cys46 → Ala46). A numeração das mutações de ponto também refere-se a entradas de base de dados –NCBI NP_000409 para IL4R-alfa1 e NP_001551 para IL13R-alfa1.

30 Esta sequência de proteína IL4RIL13R foi fundida à parte-Fc de IGHG1 humana (aa254-aa479 de acesso NCBI AAH69020). Adicionalmente, um elemento ligante flexível e um motivo Flexstreptag-II (SSSSSSAW-

SHPQFEK) foi adicionado terminalmente-C. A sequência de aminoácidos do constructo IL4RIL13R-Fc resultante como mostrado abaixo foi contra – traduzida em uma sequência de DNA sintética e sua utilização de códon otimizada para expressão baseada em célula mamífera. Síntese de gene foi feita por ENTELECHON GmbH (Regensburg, Germany). O cassete de expressão final foi subclonado em pCDNA4-HisMax-cadeia principal, usando os únicos sítios Hid-III e Not-I do plasmídeo.

SEQ ID NO: 1

| | | |
|----|---------------|---|
| 10 | SEQ | IL4RIL13R-Fc.PRO |
| | PALAVRA CHAVE | PROTEÍNA |
| | ORIGEM | |
| | 1 | MVWLCSGLLF PVSCLVLLQV ASSGNMKVLQ EPTCVSDYMS ISTCEWKMNG |
| | PTNCSTELRL | LYQLVFLNSE AHTCIPENNG GAGCVCHLLM DDVVSADNYT LDLWAGQQLL |
| 15 | 61 | VKPRAPGNLT VHTNVSDTLL LTWSNPYPPD NYLYNHLTYA VNIWSENDPA |
| | WKGSFKPSEH | EPSLRRIAAT LKSGISYRAR VRAWAQSYNT TWSEWSPSTK WHNSYREPFE |
| | 121 | TNLSVSIVENL ATVIWTWNPP EGASSNCSLW YFSHFGDKQD KKIAPETRRS |
| | DFRIYNVTYL | LQVGSQLCSTN ESEKPSILVE KCISPPEGDP ESAVTELQCI WHNLSYMKCS |
| | 181 | TNYTLYYWHR SLEKIHQcen IFREGQYFGC SFDLTKVKDS SFEQHSVQIM |
| 20 | QAPTETQPPV | SFNIVPLTSR VKPDPPHIKN LSFHNDDLYV QWENPQNFI S RCLFYEVENV |
| | 241 | YVQEAKCENP EFERNVENTS CFMVPGVLPD TLNTVRIRVK TNKLCYEDDK |
| | IEVPLNERIC | IGKKRNSTGD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC |
| | 301 | EVKFNWYVDG VEVHNAKTP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC |
| | WLPGRNTSPD | IEKTISKAKG QPREPOVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW |
| | 361 | KTTPPLVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL |
| 25 | VKDAGKIKP | SAWSHQPFEK |
| | 421 | peptídeo sinal |
| | NSQTETHNVF | IL-4R-afal ECD |
| | 481 | IL13R-afal ECD |
| | LWSNWSQEMS | parte Fc de IGHG1 |
| | 541 | Flexstreptag-II |
| | VVVDVSHEDP | |
| | 601 | |
| | KVYNKALPAP | |
| | 661 | |
| 30 | ESNGQPENNY | |
| | 721 | |
| | SLSPGSSSSS | |
| | 781 | |
| | aa1-aa23: | |
| | aa24-aa231: | |
| | aa232-aa548: | |
| | aa549-aa775: | |
| | aa786-aa790: | |

Modificações do polipeptídeo de fusão IL4R-IL13R-Fc podem ser

45 como se segue:

- ausência do peptídeo sinal ou presença de um peptídeo sinal

heterólogo;

- presença de um ECD IL-4R diferente, por exemplo, encurtado,

por exemplo, sem ou com diferentes mutações, particularmente mutações de ponto,

- presença de um domínio efetor diferente,
- presença de um domínio Fc diferente, e/ou
- 5 - ausência do domínio de purificação terminal-C (particularmente para aplicações farmacêuticas).

Exemplo 4

Construção de um polipeptídeo de fusão IL4R-Fc

O peptídeo sinal e um domínio extracelular encurtado de receptor alfa de IL-4 (aa1-aa224 de acesso NCBI NP_000409) foram fundidos terminalmente-N à parte Fc de IGHG1 humana (aa250-aa479 de acesso NCBI AAH69020). Duas mutações de ponto foram introduzidas na sequência de IL4R-alfa1 (Gly2 → Val2 e Cys207 → Ser207). Uma glicina simples foi inserida entre os dois domínios e Lys251 de IGHG1 humana na região articularada sofreu mutação para arginina. A numeração das mutações descritas também refere-se a entradas de base de dados NCBI NP_000409 para IL4R-alfa1 e acesso NCBI AAH69020 para IGHG1).

Adicionalmente, um elemento ligante flexível e um motivo Flexstreptag-II (SSSSSSAWSHPQFEK) foi adicionado terminalmente-C. A sequência de aminoácidos da resultante constructo IL4R-Fc como mostrada abaixo foi contra – traduzida em uma sequência de DNA sintético e sua utilização de códon otimizada para expressão baseada em célula mamífera. Síntese de gene foi feita por ENTELECHON GmbH (Regensburg, Germany). O cassete de expressão final foi subclonado em pCDNA4-HisMax-cadeia principal, usando os únicos sítios Hind-III e Not-I do plasmídeo.

SEQ ID NO:2

SEQ IL4RA-Fc.PRO

PALAVRA CHAVE PROTEÍNA

CORES

30 sequência = 1
características = 0

ORIGEM

1 MVWLCSGLLF PVSCLVLLQV ASSGNMKVLQ EPTCVSDYMS ISTCEWKMNG

PTNCSTELRL

35 61 LYQLVFLLSE AHTCIPENNG GAGCVCHLLM DDVVSADNYT LDLWAGQQLL

WKGSFKPSEH

121 VKPRAPGNLT VHTNVSDTLL LTWSNPYPBD NYLYNHLTYA VNIWSENDPA

DFRIYNVTYL
 181 EPSLRIAAST LKSGISYRAR VRAWAQS~~S~~YNT TWSEWSPSTK WHNSGS~~R~~SCD
 KTHTCPPCPA
 241 PELLGGPSVF LFPPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
 5 VEVHNAKTKP
 301 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
 QPREPQVYTL
 361 PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQOPENNY KTPPPVLDSD
 GSFFFLYSKLT
 10 421 VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGSSSS SAWSHPQFEK
 Aa1-aa23: peptídeo sinal IL4R-alfa1
 Aa24-aa224: ECD IL4R-alfa1
 Aa225-aa455: parte Fc de IGHG1
 Aa456-aa470: Flexstreptag-II

15 Modificações do polipeptídeo de fusão IL-4R podem ser como se segue:

- ausência de um peptídeo sinal ou presença de um peptídeo sinal heterólogo;
- presença do diferente, por exemplo, ECD IL-4R encurtado, por exemplo, sem ou com diferentes mutações, particularmente mutações de ponto,
- presença de um domínio Fc diferente,
- uma diferente região de fusão entre o ECD IL-4R e o domínio Fc, por exemplo, supressão de um ou mais aminoácidos da sequência RSC (posições 227-229), e/ou
 - ausência do domínio de purificação terminal-C (particularmente para aplicações farmacêuticas).

Exemplo 5

Expressão e purificação de proteínas ligando – IL4, IL4R-Fc e IL4R-IL13R-

30 Fc

Células Hek 293T crescidas em DMEM + GlutaMAX (Gibco) suplementado com FBS10%, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL S-treptomicina foram transientemente transfetadas com plasmídeos codificando IL4R-Fc e IL4R-IL13R-Fc, respectivamente. Sobrenadantes de cultura de células contendo proteínas recombinantes foram colhidos três dias após transfeção e clareados por centrifugação em 300g seguido por filtração através de um filtro estéril de 0,22 µm. Para purificação por afinidade Strectactin Sepharose foi empacotada para uma coluna (leito de gel 1 mL), equilibrada com 15mL de tampão (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM pH 8,0) e o

respectivo sobrenadante de cultura de célula foi aplicado à coluna com uma taxa de fluxo de 4 mL/minuto. Subsequentemente, a coluna foi lavada com tampão W e IL4R-Fc ou IL4R-IL13R-Fc ligada foi eluída em etapas através de adição de 6x1mL de tampão E (Tris HCl 100 mM, NaCl 150 mM, Desthiobiotin 2,5 mM pH 8,0). A quantidade de proteína das frações de eluato foi quantificada e frações de pico foram concentradas por ultrafiltração e ainda purificadas por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC). Uma SDS-PAGE da purificação de afinidade de Streptactina de IL4R-IL13R-Fc seguida por manchamento com prata é mostrada na Figura 8A.

SEC foi realizada sobre uma coluna Superdex 200 usando um sistema de cromatografia Äkta (GE-Healthcare). A coluna foi equilibrada com solução salina tamponada com fosfato e as IL4R-Fc ou IL4R-IL13R-Fc, respectivamente, purificadas com streptactina, concentrada, foram carregadas sobre a coluna SEC em uma taxa de fluxo de 0,5 mL / minuto. O perfil de eluição monitorado por absorbância em 280 nm mostrou um proeminente pico de proteína em 10,31 mL para IL4R-IL13R-Fc (Figura 8B) e 12,97mL para IL4R-Fc (Figura 9A). Frações SEC para IL4R-Fc foram adicionalmente analisadas sob condições desnaturantes por SDS-PAGE e manchamento com prata (Figura 9B).

Para determinação do peso molecular aparente sob condições nativas uma coluna Superdex 200 foi carregada com proteínas padrão de peso molecular conhecido. Baseado no volume de eluição das proteínas padrão foi calculada uma curva de calibração e o peso molecular aparente de IL4R-Fc purificada foi determinado ser 137 kDa que se adapta bem ao peso molecular observado por SDS-PAGE. O peso molecular teórico baseado na sequência de aminoácidos de IL4R-Fc é de 52,8 kDa para a proteína monomérica. Baseado na análise bioquímica, IL4R-Fc muito provavelmente é expressa como um dímero proteína.

Para IL4R-IL13R-Fc o peso molecular aparente baseado em SEC foi calculado ser cerca de 600 kDa. Baseado em análise SDS-PAGE a proteína corre como uma banda simples com cerca de 250 kDa. O peso molecular teórico baseado na sequência de aminoácidos de IL4R-IL13R-Fc é

de 87,7 KDa. Em princípio a construção da molécula deve resultar em uma proteína dimérica estável com um peso molecular teórico de cerca de 180 Kda. O alto peso molecular aparente visto por SEC por isso tanto indica um incomum comportamento em SEC como ainda oligomerização da proteína.

5 Ensaio de degradação de IL-4

Para testar específica ligação de IL4 de IL4R-Fc e IL4R-IL13R-Fc, 4 µg de ambas proteínas, respectivamente, foram imobilizados para Streptactina Sepharose via seus Strep-Tag. As proteínas imobilizadas foram subsequentemente incubadas por 60 minutos com 400 ng de interleucina humana expressa recombinantemente (IL4) em um volume total de 400 µL de solução salina tamponada com fosfato. Subsequentemente as pérolas foram lavadas e proteínas ligadas foram especificamente eluídas com destiobiotina em um volume total de 40 µL de tampão de eluição. Proteínas eluídas foram finalmente analisadas via SDS-PAGE e manchamento com prata.

10 Como mostrado na Figura 10 ambas IL4R-Fc e IL4R-IL13R-Fc mostram ligação específica de IL4 humana indicada pela presença de proteína IL4 (12KDa) que não pode ser vista em experimentos controles.

15 Exemplo 6

Eficácia in vitro sobre células tronco de câncer e células de tumor primário

20 Para testar a habilidade de IL4R-Fc e IL4R-IL13R-Fc para induzir apoptose, ambas proteínas foram adicionadas ao meio de crescimento de células tronco de câncer de mama tanto sozinhas como em combinação com doxorrubicina. A Figura 11A mostra a análise de imunofluorescência de esferas de câncer de mama pré-tratadas com PBS (w/o) ou 10 µg de IL4R-Fc, 25 IL4R-IL13R-Fc ou anticorpo-IL4 por 24 horas e sucessivamente expostas por outras 24 horas a doxorrubicina 5 µM. As células foram manchadas com laranja acridina / brometo de ethidium (vermelho: células mortas; verde: células viáveis). Em comparação com o tratamento simples (Doxorrubicina sozinha) a combinação de doxorrubicina com tanto IL4R-Fc como IL4R-IL13R-Fc, 30 respectivamente, claramente aumentou a quantidade de células tronco de câncer de mama apoptóticas. Uma contagem de células diferenciando células apoptóticas e vivas, subsequentemente plotada para a porcentagem

de viabilidade de célula também demonstra a eficácia do tratamento de combinação para a indução de apoptose (Figura 11B). Importantemente, ambas IL4R-Fc e IL4R-IL13R-Fc são capazes de sensibilizar células tronco de câncer de mama para apoptose induzida por doxorrubicina na mesma faixa como mostrada para um anticorpo específico IL4, que foi usado como um controle positivo neste experimento.

Sobre células de cólon primário as construções de IL4R-Fc e IL4R-IL13R-Fc foram testadas em combinação com tratamento com oxaliplatina. Células de câncer de cólon primário pré-tratadas com PBS (w/o) ou 10 µg de IL4R-Fc, IL4R-IL13R-Fc ou anticorpo anti-IL4 por 24 horas e sucessivamente expostas por outras 24 horas a oxaliplatina 100 µM. Os gráficos mostram a porcentagem de viabilidade de célula medida por análise MTS (CellTiter 96, Aquos, Promega). Como mostrado na Figura 11C, ambas construções são capazes de sensibilizar células de câncer de cólon primário para apoptose induzida por oxaliplatina, indicado por uma reduzida viabilidade de célula em comparação com tratamento com oxaliplatina sozinha.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para diagnóstico de um tipo de câncer comprendendo as etapas de:
 - (a) provimento de uma amostra a partir de um tumor sólido com-
5 preendendo células de tumor,
 - (b) determinação de expressão de pelo menos uma citocina antiapoptótica nas ditas células de tumor, e
 - (c) classificação de tumor sólido como um tumor expressando não-citocina ou como um tumor expressando citocina.
- 10 2. Processo de acordo com a reivindicação 1, onde a citocina antiapoptótica é IL-4 e/ou IL-10, preferivelmente IL-4.
- 15 3. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 2, onde o tumor sólido é classificado como um tumor não-expressando IL-4 ou um expressando IL-4.
4. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 2, onde o tumor sólido é classificado como um tumor não-expressando IL-10 ou um expressando IL-10.
- 20 5. Processo de acordo com as reivindicações 1 a 4 onde o tumor sólido é classificado como um tumor expressando uma IL-4 e IL-10 ou como um tumor expressando não-IL-4 e não-IL-10.
6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, onde o tumor sólido é um tumor epitelial.
- 25 7. Processo de acordo com a reivindicação 6, onde o tumor epitelial é selecionado do grupo consistindo em câncer de tireóide, mama, próstata, bexiga, cólon, gástrico, pâncreas, rim, fígado e pulmão.
8. Processo de acordo com a reivindicação 7, onde o tumor preferivelmente é um câncer de cólon, gástrico, mama, pulmão, bexiga, ou próstata.
- 30 9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, onde as células de tumor são células de tumor primário e/ou células tronco de câncer.
10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações

precedentes, onde detecção de expressão de citocina antiapoptótica nas células de tumor compreende uma detecção no nível proteína e/ou no nível de ácido nucléico.

11. Processo de acordo com a reivindicação 10, onde a detecção no nível de proteína compreende a detecção da citocina antiapoptótica, preferivelmente com processos imunoquímicos e/ou espectrométricos de massa.

12. Processo de acordo com a reivindicação 10, onde a determinação no nível de ácido nucléico compreende determinação de níveis de expressão de RNAm de citocina antiapoptótica com hibridização de ácido nucléico e opcionalmente processos de amplificação, preferivelmente com processos de RT-PCR.

13. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, ainda compreendendo as etapas de

15 (d) determinação de sensitividade das células a um tumor expressando citocina contra pelo menos um agente quimioterapêutico ou pró-apoptótico na presença e/ou na ausência de um antagonista da dita citocina expressa, e/ou seu receptor e

20 (e) opcionalmente selecionando um tratamento específico de tipo de câncer.

14. Processo de acordo com a reivindicação 13, onde na etapa (d) um agente quimioterapêutico ou pró-apoptótico é determinado contra o qual as células do tumor expressando citocina são sensíveis.

15. Processo de acordo com a reivindicação 13 ou 14, onde, na etapa 25 13(e), um tratamento é selecionado compreendendo a administração de uma combinação de um agente de neutralização de citocina e um agente quimioterapêutico ou pró-apoptótico.

16. Processo de acordo com a reivindicação 14 ou 15, onde o agente quimioterapêutico é selecionado de antimetabólitos, agentes de fragmentação de DNA, agentes de reticulação de DNA, agentes intercalantes, inibidores de síntese de proteína, inibidores de topoisomerase I e II, agentes direcionados a microtúbulos, inibidores de cinase, hormônios e anta-

gonistas de hormônios.

17. Processo de acordo com a reivindicação 16, onde o agente quimioterapêutico é selecionado de cisplatina, carboplatina e oxaliplatina.

18. Processo de acordo com a reivindicação 14 ou 15, onde o agente pró-apoptótico é selecionado de TRAIL e ligante CD95.

19. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 18, onde o agente de neutralização de citocina é um anticorpo, preferivelmente um anticorpo anti-IL-4 e/ou um anticorpo anti-IL-10 ou um seu fragmento de ligação de antígeno.

10 20. Processo de acordo com a reivindicação 19, onde o anticorpo anti-IL-4 é um anticorpo derivado da célula hibridoma ECACC 93100620 ou um seu fragmento de ligação de antígeno.

15 21. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 18, onde o agente de neutralização de citocina é um polipeptídeo receptor de IL-4 solúvel ou polipeptídeo de fusão.

22. Uso de uma combinação de
(i) pelo menos um agente de neutralização de citocina e
(ii) pelo menos um agente quimioterapêutico ou pró-apoptótico para a fabricação de um medicamento para o tratamento de doença residual 20 mínima.

23. Uso de uma combinação de
(i) pelo menos um agente de neutralização de citocina e
(ii) pelo menos um agente quimioterapêutico ou pró-apoptótico para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um tipo de câncer classificado como tumor expressando citocina.

24. Uso de uma combinação de
(i) pelo menos um agente de neutralização de citocina e
(ii) pelo menos um agente quimioterapêutico ou pró-apoptótico para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um tipo de câncer classificado como tumor expressando citocina em combinação com cirurgia e/ou terapia de irradiação.

30 25. Uso de acordo com a reivindicação 24, onde o medicamento

é para terapia de combinação simultânea, separada ou sequencial com cirurgia e/ou terapia de irradiação.

26. Uso de uma combinação de

(i) pelo menos um agente de neutralização de citocina e

5 (ii) pelo menos um agente quimioterapêutico ou pró-apoptótico para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um tipo de câncer classificado como tumor expressando citocina onde a administração de (i) e (ii) é iniciada simultaneamente.

27. Uso de uma combinação de

10 (i) pelo menos um agente de neutralização de citocina e

(ii) pelo menos um agente quimioterapêutico ou pró-apoptótico para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um tipo de câncer classificado como tumor expressando citocina onde a administração de (i) e (ii) é iniciada em etapas.

15 28. Uso de acordo com a reivindicação 27, onde o início de administração de (i) é ≥ 1 semana antes de (ii) ou onde o início de administração de (ii) é ≥ 1 semana antes de (i).

29. Polipeptídeo receptor de IL-4 solúvel compreendendo um domínio receptor de IL-4 extracelular encurtado terminalmente-C.

20 30. Polipeptídeo da reivindicação 29 que é um polipeptídeo de fusão.

31. Molécula de ácido nucléico codificando o polipeptídeo como definido na reivindicação 29 ou 30.

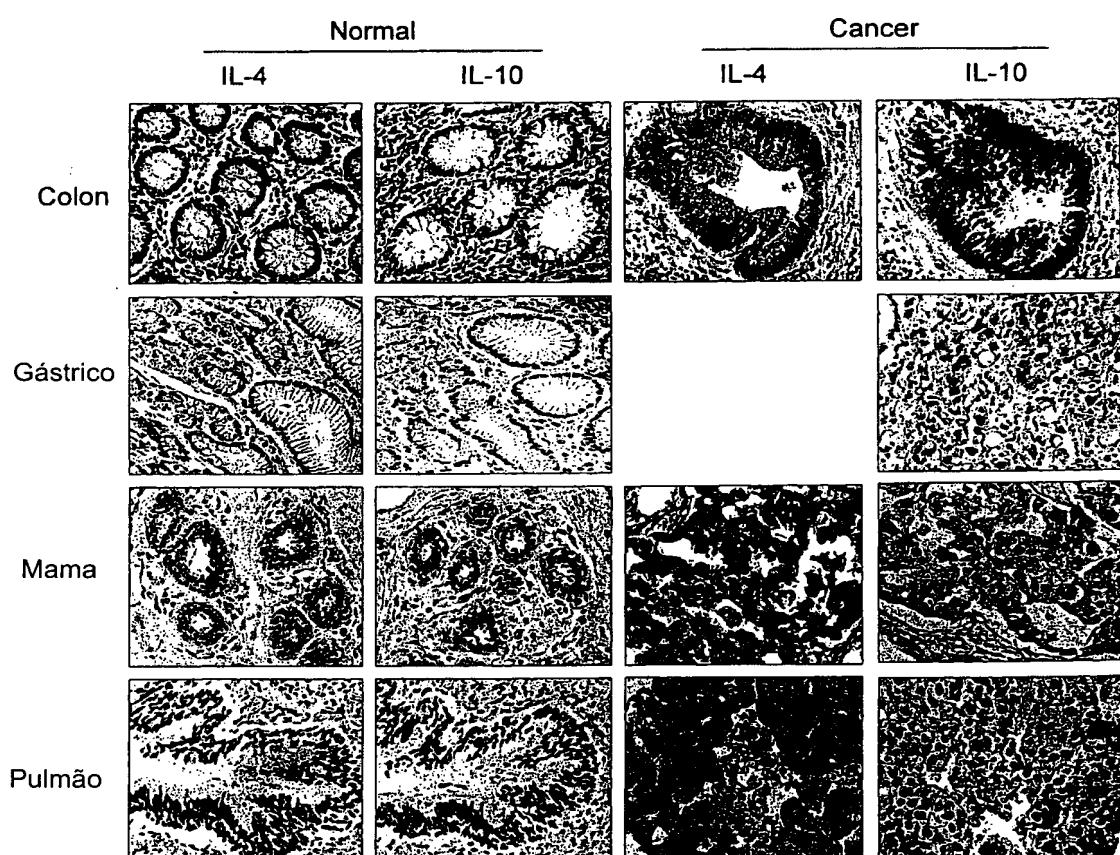
Fig. 1a

Fig. 1b

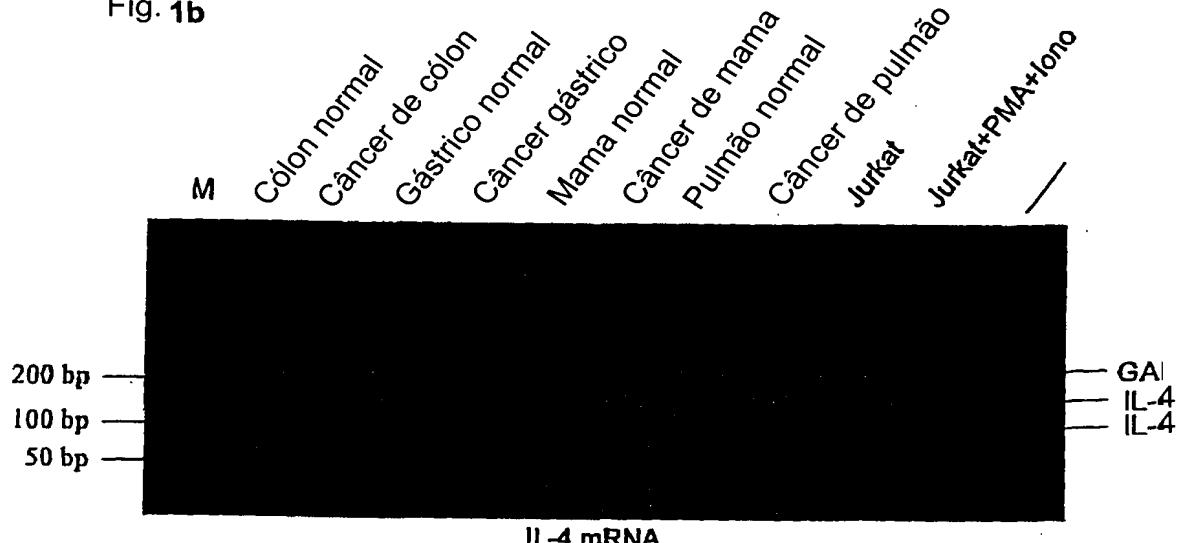


Fig. 2a

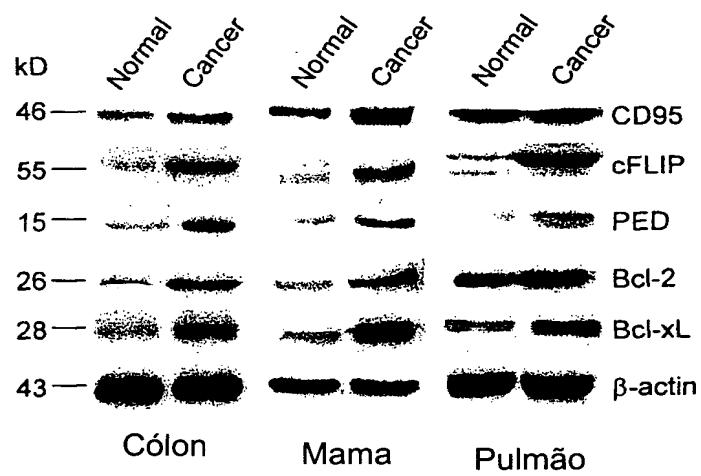


Fig. 2b

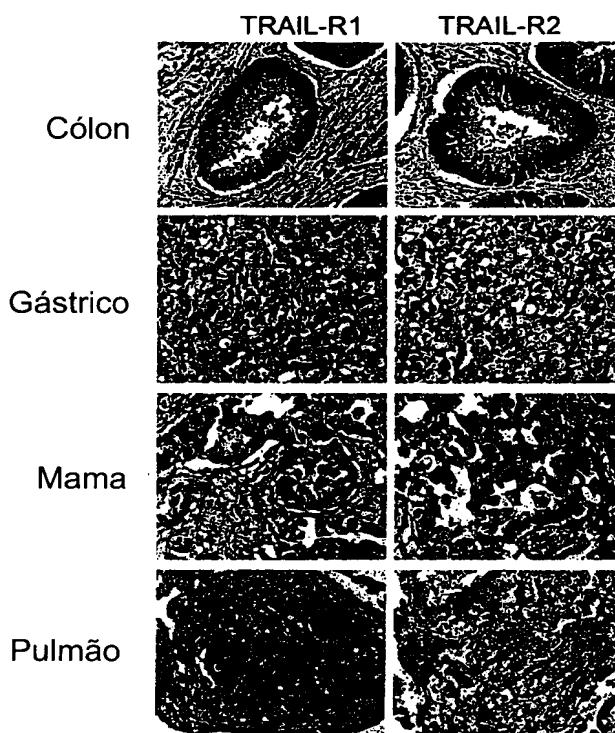


Fig. 3a

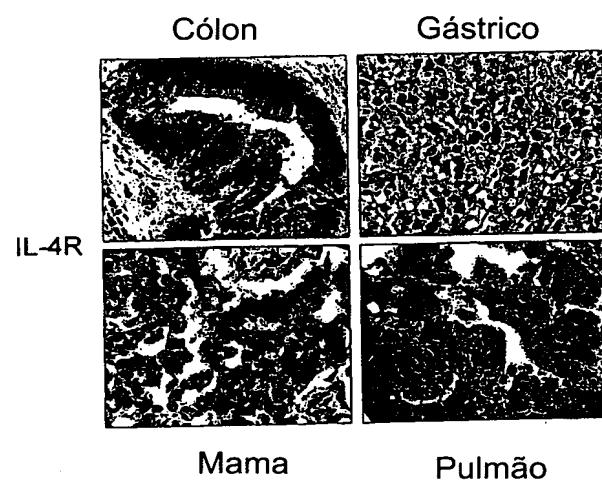


Fig. 3b

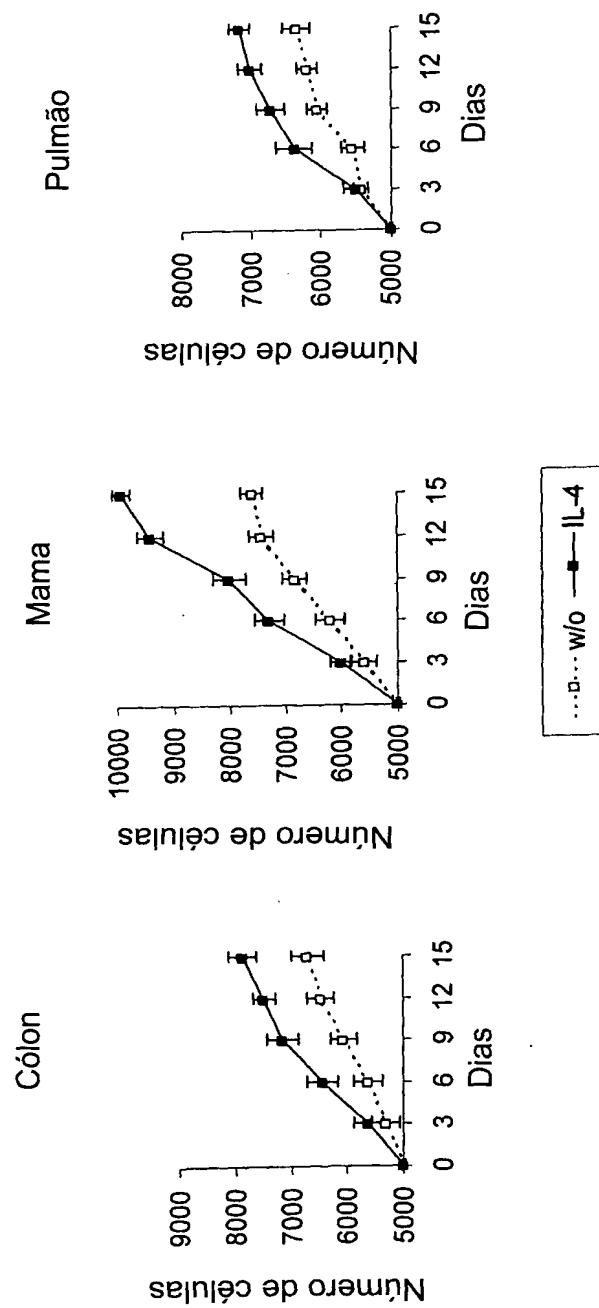


Fig. 3c

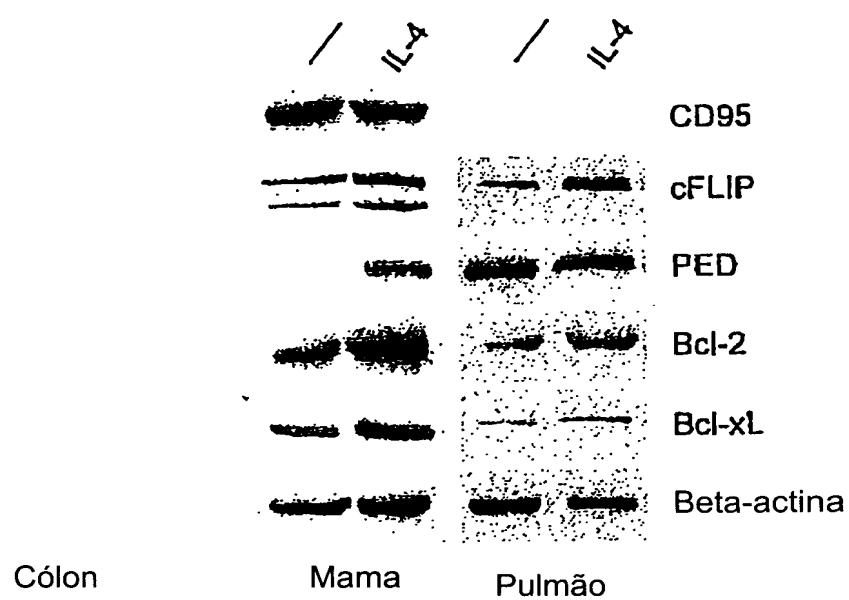


Fig. 4a

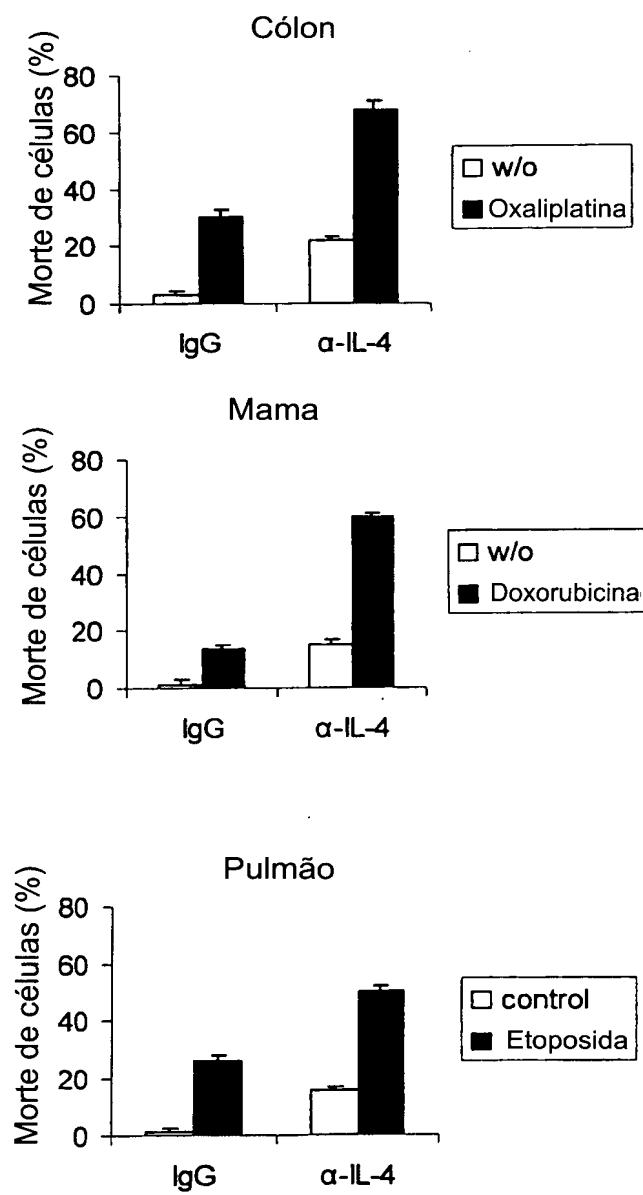


Fig. 4b

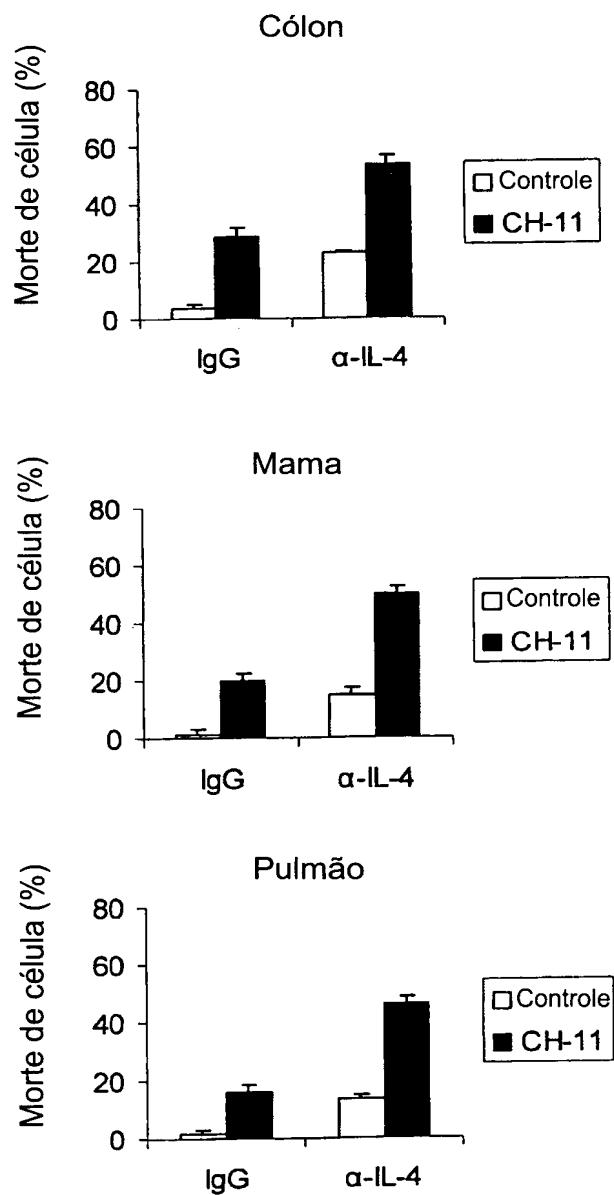


Fig.4c

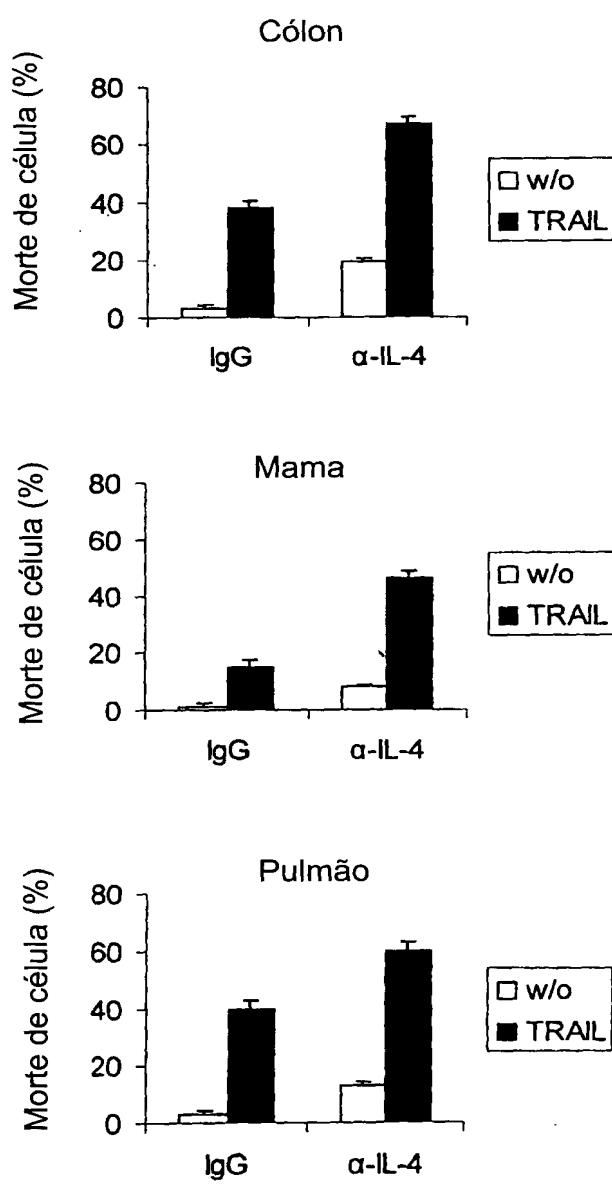


Fig. 5a

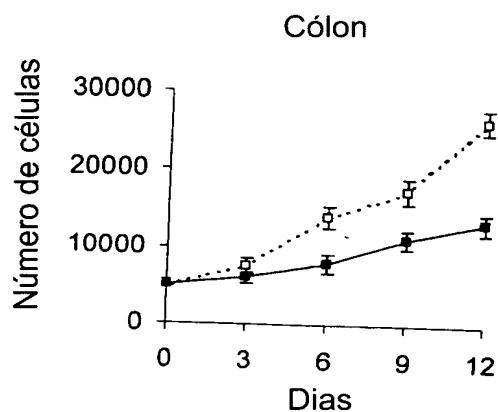


Fig. 5b

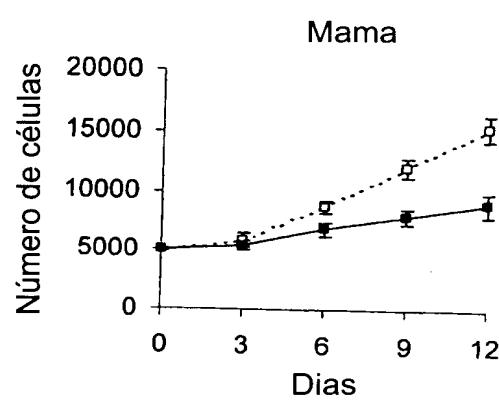


Fig. 5c

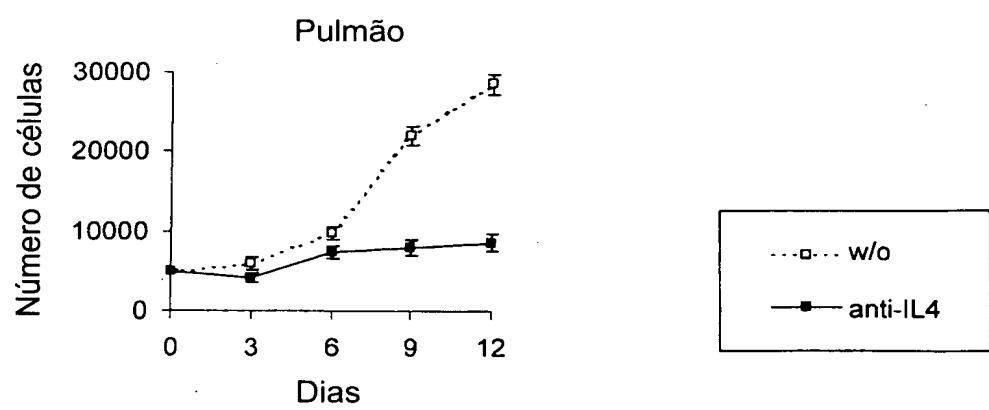


Fig. 6a

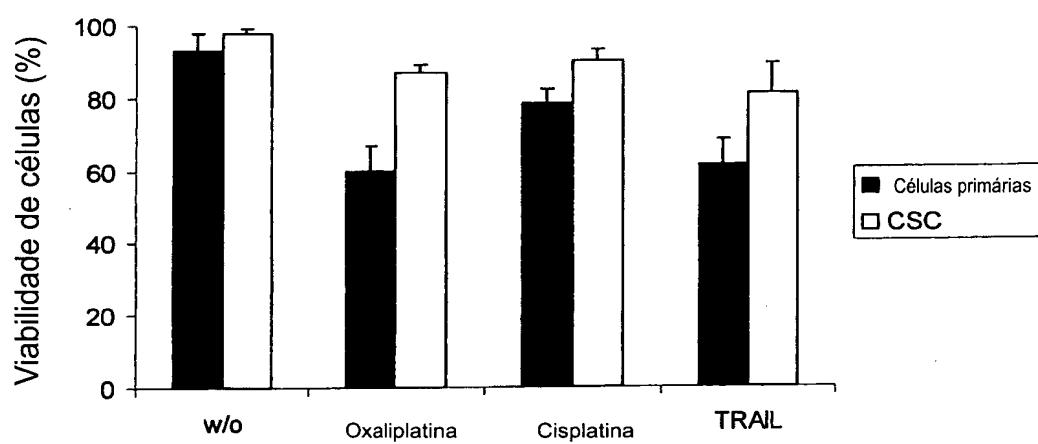


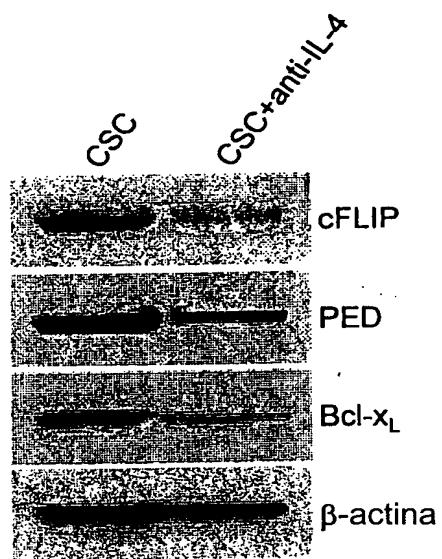
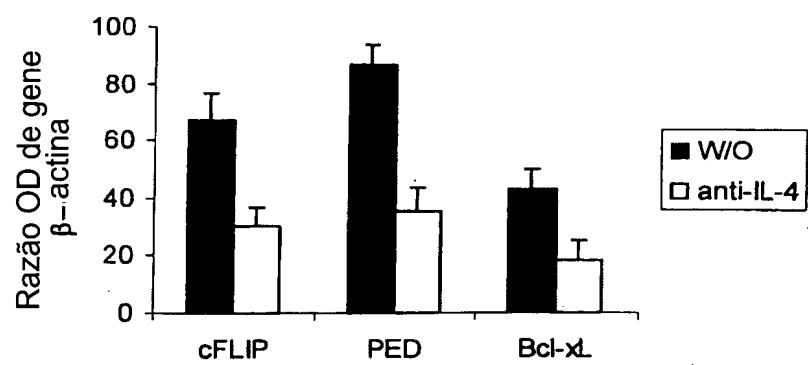
Fig. 6b**Fig. 6c**

Fig. 6d

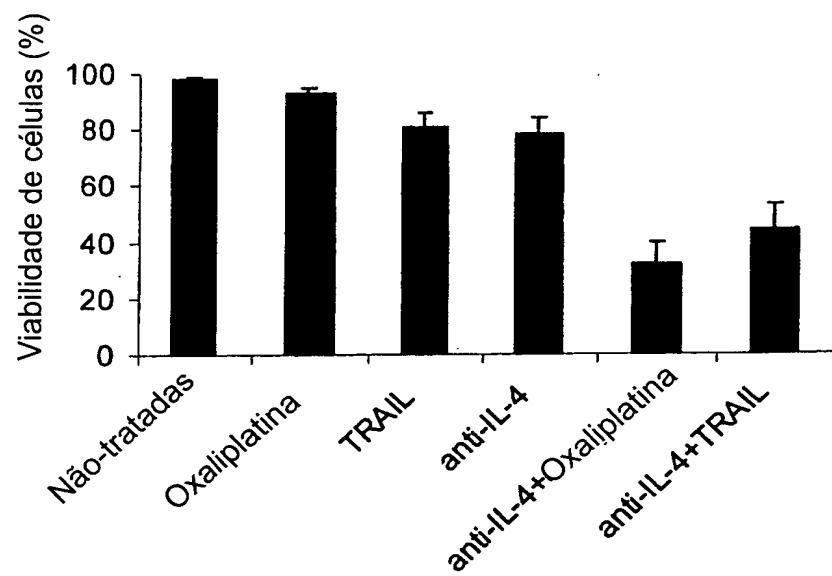


Fig. 6e

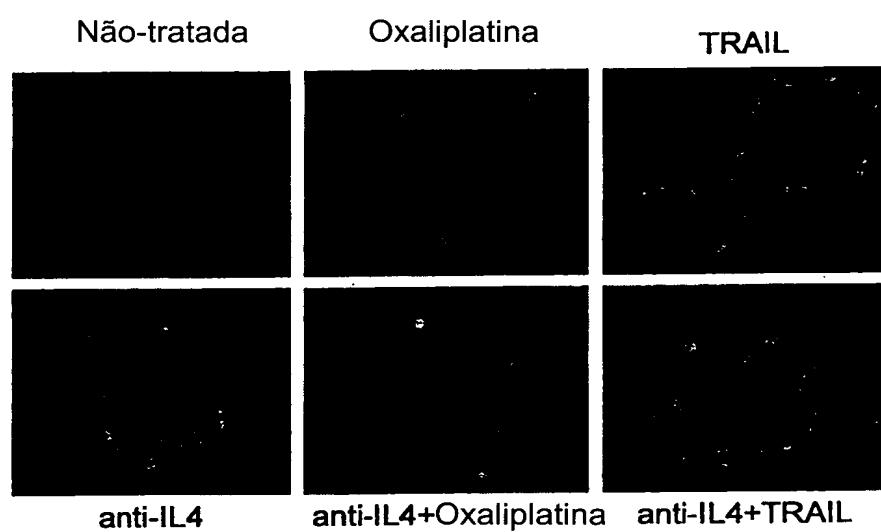


Fig. 7a

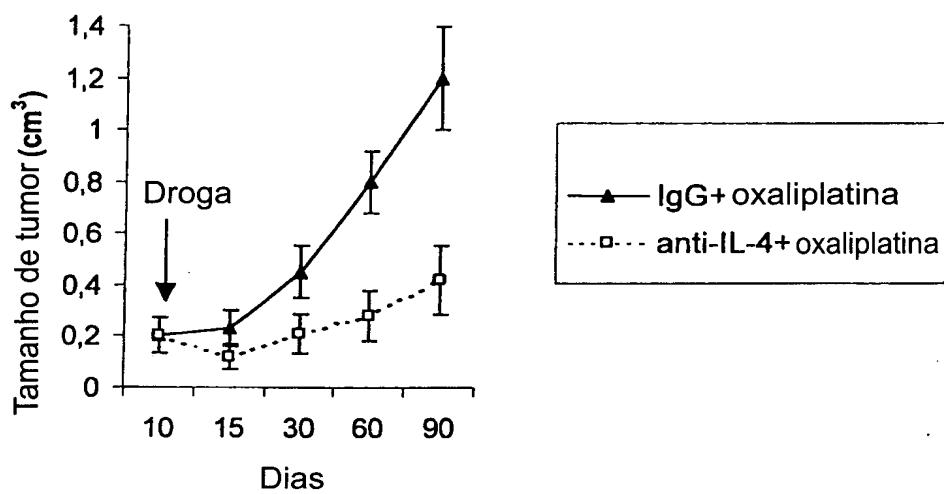


Fig. 7b

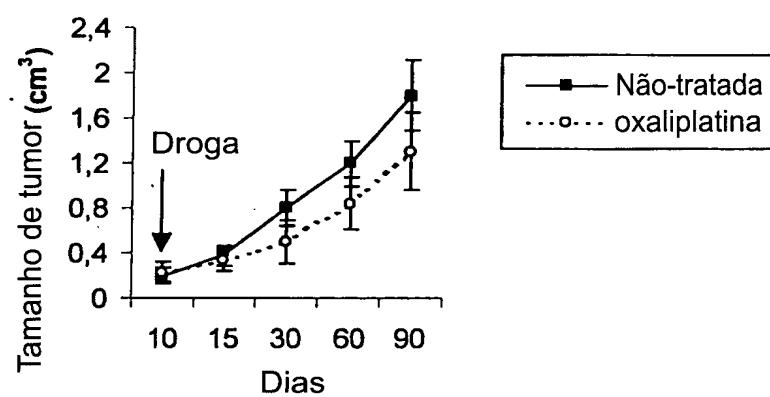


Fig. 8A

SDS-PAGE Mancha – Prata de afinidade de streptactina
Frações purificadas de IL4R-IL13R-Fc

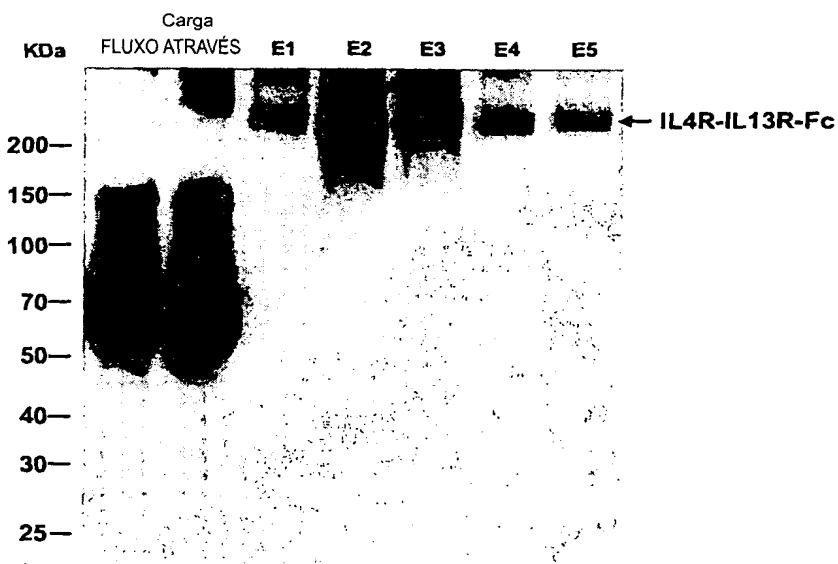


Fig. 8B

Perfil de eluição SEC de IL4R-IL13R-Fc sobre Superdex 200

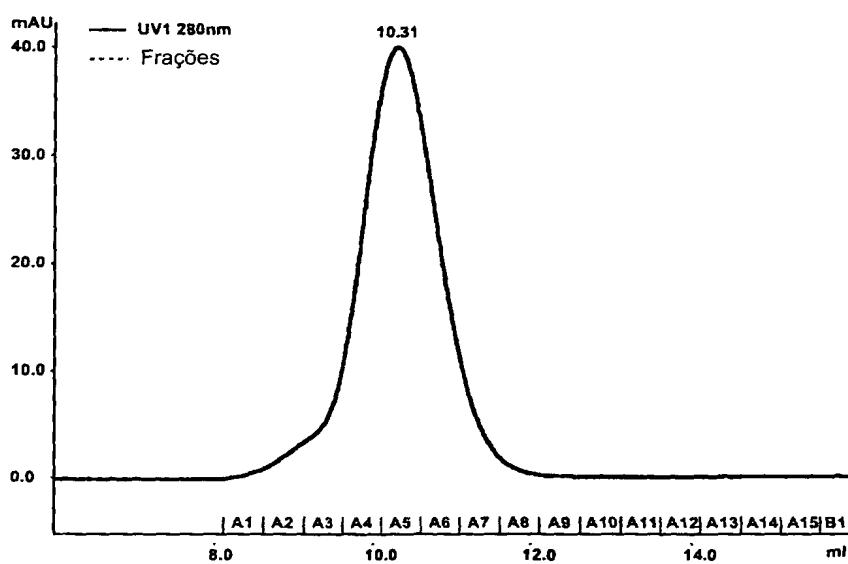


Fig. 9A

Perfil de eluição SEC de IL4R-Fc sobre Superdex 200

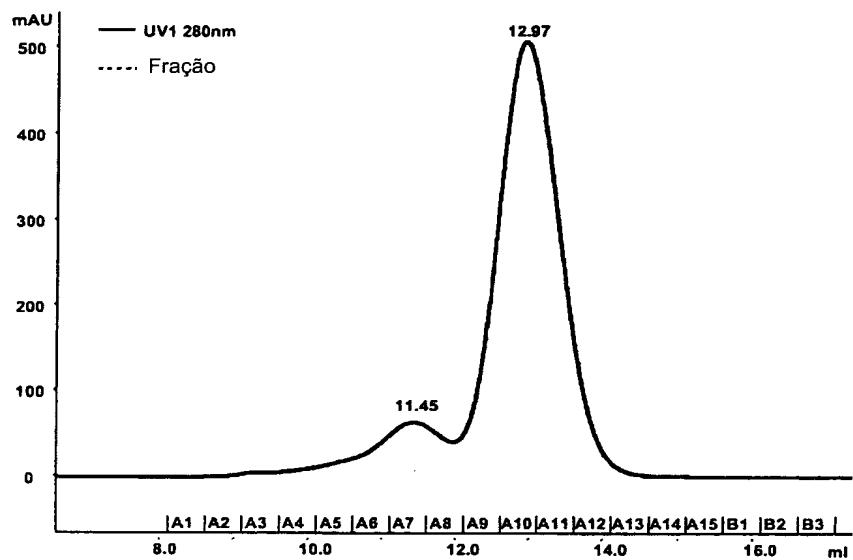


Fig. 9B

SDS-PAGE Mancha – Prata de frações –SEC de IL4R-Fc

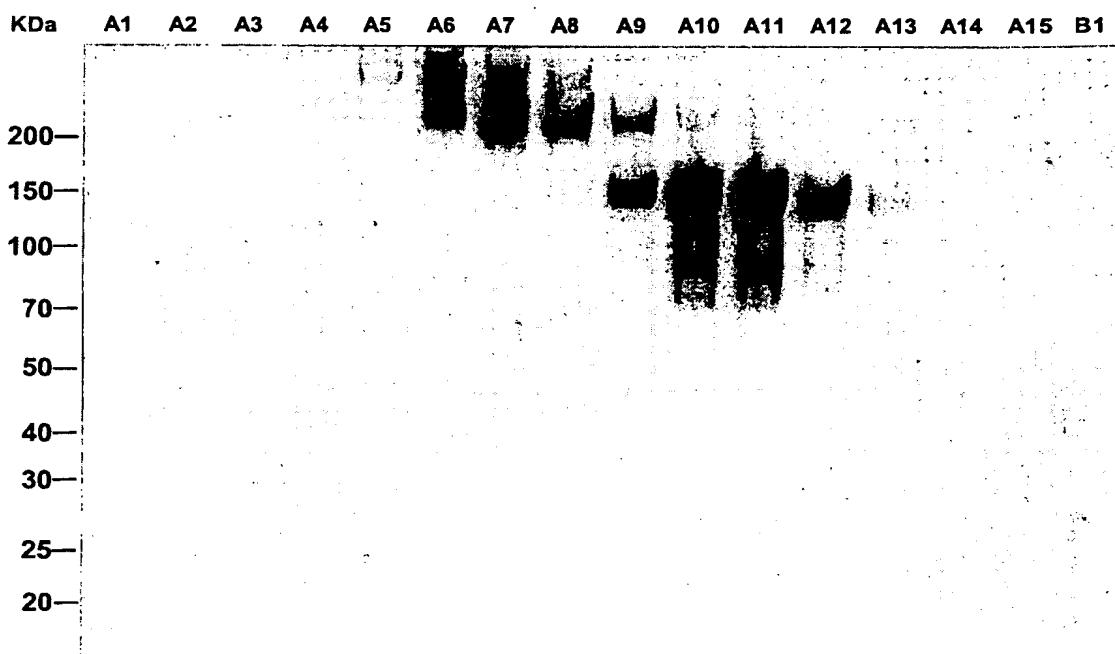


Fig.10

Ligação específica de IL4 a ambas, IL4R-Fc e IL4R-IL13R-Fc
Análise de mancha de prata SDS-PAGE de ensaio de degradação de IL4

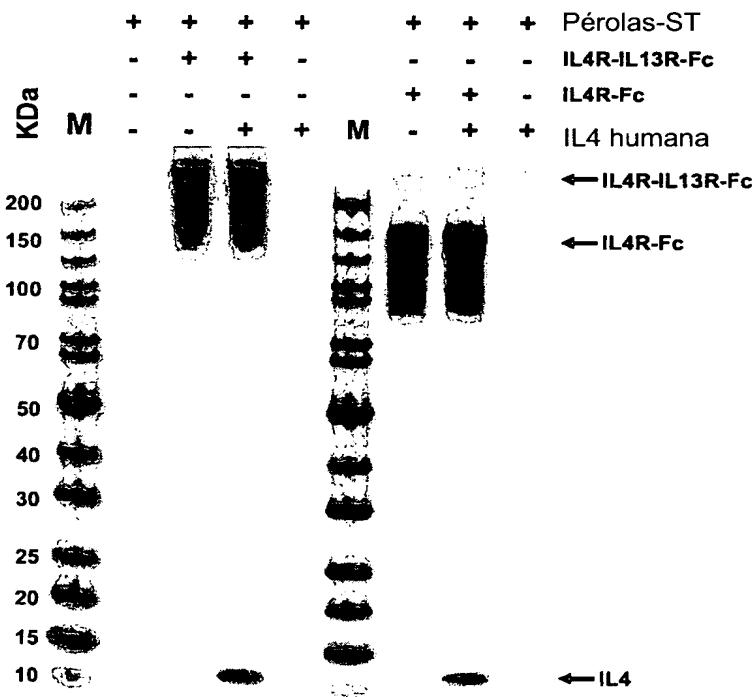
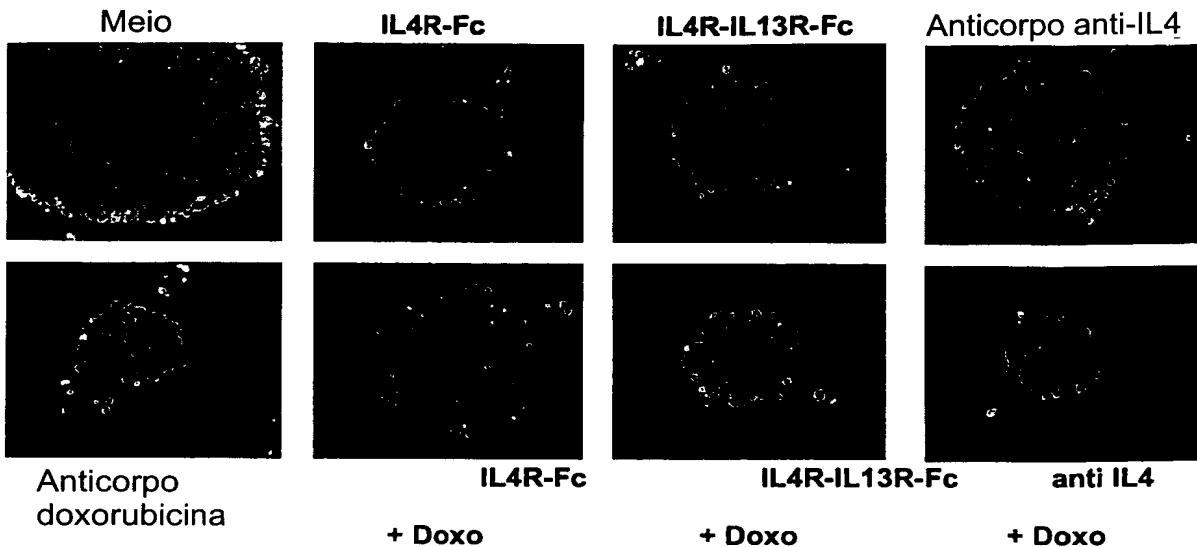
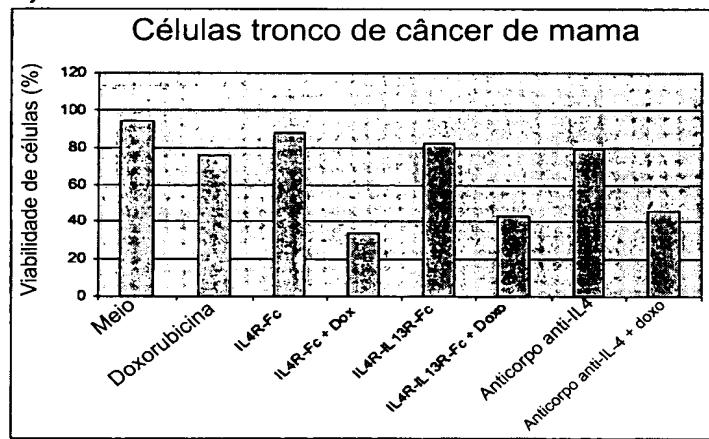


Fig. 11

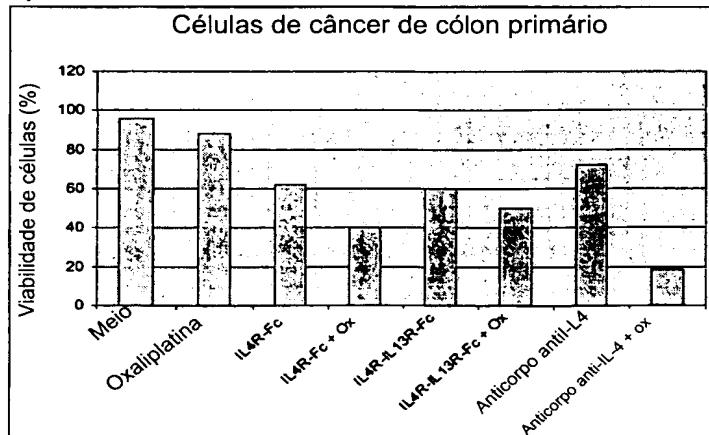
(A) células tronco de câncer de mama



B)



C)



RESUMO

Patente de Invenção: "EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE CITOCINA EM CÂNCER HUMANO".

A presente invenção refere-se a um processo para diagnóstico de um tipo de câncer, pelo que a expressão de citocinas antiapoptóticas é determinada nas células de tumor. O diagnóstico diferencial da presente invenção é usado para classificar distúrbios de tumor e para recomendar o tratamento requerido e para monitorar o progresso e resposta ao tratamento.