



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1015369-1 A2



\* B R P I 1 0 1 5 3 6 9 A 2 \*

(22) Data do Depósito: 06/04/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 29/06/2021

(54) Título: AGENTES TERAPÊUTICOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS ASSOCIADAS À PROLIFERAÇÃO CELULAR INDESEJADA

(51) Int. Cl.: C07K 16/24; A61K 39/395.

(30) Prioridade Unionista: 03/04/2009 ES P200900928.

(71) Depositante(es): FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS (ICREA); FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT D'INVESTIGACIÓ ONCOLÒGICA DE VALL HEBRON (VHIO); FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT DE RECERCA HOSPITAL UNIVERSTIARI VALL HEBRON (IRHUVH).

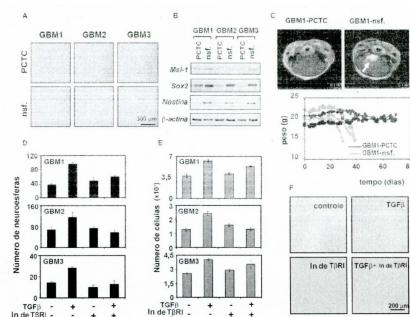
(72) Inventor(es): JOAN SEOANE SUAREZ; SILVIA PENUELAS PRIETO; JOSÉ BASELGA TORRES.

(86) Pedido PCT: PCT EP2010054499 de 06/04/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/115868 de 14/10/2010

(85) Data da Fase Nacional: 03/10/2011

(57) Resumo: AGENTES TERAPÊUTICOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS ASSOCIADAS À PROLIFERAÇÃO CELULAR INDESEJADA. A invenção é baseada na observação de que LIF é capaz de ativar auto-renovação de células-tronco tumorais em câncer, em particular gliomas, o que indica que a inibição de LIF, geralmente de citocinas do tipo IL-6, pode ser usada em composições terapêuticas para o tratamento de doenças associadas à proliferação indesejada. A invenção também se refere a um método para a identificação de compostos capazes de bloquear/inibir a proliferação de células-tronco, e a um método in vitro para o diagnóstico de doenças associadas à proliferação celular indesejada em um sujeito ou para determinar a predisposição de um sujeito de sofrer uma doença associada à proliferação celular indesejada, ou para o prognóstico e expectativa de vida média desse sujeito que sofrem de tumores



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: “AGENTES TERAPÉUTICOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS ASSOCIADAS À PROLIFERAÇÃO CELULAR INDESEJADA”

**Descrição**

5    Descrição da invenção

Campo da invenção

A presente invenção geralmente se refere a inibidores da expressão e/ou atividade de uma citocina do tipo IL-6 para o tratamento de doenças associadas à proliferação celular indesejada, mais particularmente, para câncer e células-tronco tumorais. De maneira similar, 10 um método para o diagnóstico das ditas doenças e para o prognóstico de expectativa de vida média de pacientes é também descrito.

Estado da técnica

Uma sub-população de células tumorais com propriedades semelhantes a célula-tronco foi recentemente descoberta em câncer. É considerado que esta população de 15 células, denominada como células-tronco de câncer, são responsáveis pelo aparecimento, propagação e recorrência dos tumores, indicando que as terapias mais eficazes vêm das terapias direcionadas na compartmentalização de células-tronco tumorais. Pouco é conhecido com respeito às características moleculares e mecanismos de regulação que controlam a biologia de células-tronco tumorais. Um dos tumores em que células-tronco 20 tumorais desempenham um significante papel é glioma, as assim chamadas células-tronco de glioma ou células de iniciação de glioma (CIGs).

As CIGs são caracterizadas por seu alto potencial oncogênico, sua capacidade de auto-renovação e sua capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens celulares. O número de células semelhantes a célula-tronco em um tumor é regulado por sua capacidade 25 de auto-regeneração. As CIGs e, geralmente, células-tronco de câncer passam por divisões simétricas e assimétricas por meio das quais uma célula-tronco gera duas cópias idênticas da mesma ou uma cópia da célula-tronco e uma célula mais diferenciada (divisão assimétrica). A capacidade de auto-regeneração da célula-tronco de câncer é regulada pelo equilíbrio entre as divisões simétricas e assimétricas e a desregulação de os mecanismos 30 que controlam a dita auto-renovação está mais provavelmente envolvida no aparecimento do tumor.

Glioma é o tumor primário mais comum do cérebro e pode ser classificado em quatro graus clínicos dependendo de sua histologia e prognóstico. Gliomas de grau IV (glioblastoma multiforme) são altamente agressivos e resistentes tanto a radioterapia como 35 quimioterapia. Apesar do progresso no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na gênese e progressão do glioma, o prognóstico e o tratamento deste tipo de tumor continua a ser ineficaz. O tratamento de escolha para o glioma é a intervenção

cirúrgica. Não obstante, tratamento cirúrgico é usualmente acompanhado por um tratamento adjuvante farmacológico ou por meio de radioterapia. Os fármacos de escolha para o tratamento de glioma incluem a combinação denominada como PCV que compreende procarbazina, CCNU (lomustina) e vincristina, temozolomida em combinação com 5 radioterapia.

É considerado que CIGs sejam responsáveis pelo aparecimento, propagação e recorrência de tumores, indicando que as terapias mais eficazes virão das terapias direcionadas à compartmentalização de células-tronco de glioma. Um tumor não será erradicado se CIGs não forem eliminados.

10 Portanto, é necessário ter tratamentos alternativos que previnem os inconvenientes de tratamentos conhecidos no estado da técnica e que podem eficientemente eliminar CIGs.

#### Sumário da invenção

Em um primeiro aspecto, a invenção se refere a um agente inibidor da expressão e/ou da atividade de uma citocina do tipo IL-6 para o tratamento de doenças associadas à 15 proliferação celular indesejada.

Em outro aspecto, a invenção se refere a uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente inibidor de acordo com a invenção e um transportador farmaceuticamente aceitável para o tratamento de doenças associadas à proliferação celular indesejada.

20 Em outro aspecto, a invenção se refere a um método *in vitro* para a identificação de compostos capazes de bloquear/inibir a proliferação celular de células tumorais induzida por uma citocina do tipo IL-6 ou uma variante funcionalmente equivalente da mesma que compreende as etapas de:

- (i) contatar uma célula que expressa o receptor para uma citocina do tipo IL-6 25 com uma citocina do tipo IL-6 e um composto candidato, e
- (ii) identificar aqueles compostos que bloqueiam a proliferação celular da dita célula.

Em outro aspecto, a invenção se refere a um método *in vitro* para o diagnóstico de doenças associadas à proliferação celular indesejada em um sujeito ou para determinar a 30 predisposição de um sujeito de sofrer a dita doença associada à proliferação celular indesejada, ou para determinar o estágio ou gravidade da dita doença associada à proliferação celular indesejada em um sujeito, ou para monitorar o efeito da terapia administrada a um sujeito com a dita doença associada à proliferação celular indesejada, que compreende quantificar os níveis de expressão do gene que codifica uma citocina do 35 tipo IL-6 ou da proteína codificada pelo dito gene ou variante funcionalmente equivalente da dita proteína em uma amostra biológica do dito sujeito, em que um aumento da expressão do gene que codifica uma citocina do tipo IL-6 ou da proteína codificada pelo dito gene ou

variante funcionalmente equivalente da dita proteína, com respeito à expressão do gene que codifica uma citocina do tipo IL-6 ou da proteína codificada pelo dito gene ou variante funcionalmente equivalente da dita proteína em uma amostra de controle, é indicativo de uma doença associada à proliferação celular indesejada, ou de maior predisposição do dito sujeito de sofrer de uma doença associada à proliferação celular indesejada ou da não resposta à terapia administrada ao dito sujeito.

Em outro aspecto, a invenção se refere a o uso de um kit que comprehende reagentes para a quantificação dos níveis de expressão do gene que codifica uma citocina do tipo IL-6 ou da proteína codificada pelo dito gene ou variante funcionalmente equivalente da dita proteína para o diagnóstico de câncer em um sujeito ou para determinar a predisposição de um sujeito de sofrer o dito câncer, ou para determinar o estágio ou gravidade do dito câncer em um sujeito, ou para predizer a probabilidade de sobrevivência e/ou do tempo de vida esperado médio de um sujeito que sofre do dito câncer, ou para monitorar o efeito da terapia administrada a um sujeito com o dito câncer, em que se os reagentes detectarem um aumento na expressão do dito gene ou da dita proteína ou variante funcionalmente equivalente da mesma com respeito a uma amostra de controle, então o dito sujeito poderia sofrer de uma doença associada à proliferação celular indesejada, ou apresenta uma maior predisposição de sofrer a dita doença associada à proliferação celular indesejada, ou apresenta maior gravidade da dita doença, ou a terapia administrada não estaria sendo eficaz.

#### Desenhos

##### Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1. Efeito de TGF $\beta$  sobre a auto-renovação de CIG derivada de pacientes. (A) Imagens representativas de CPCTs e neuroesferas de GBM geradas de amostras de 3 pacientes diferentes com GBM (GBM1, GBM2, GBM3). (B) *Musashi-1 (Msi-1)*, *Sox2*, *Nestina* e  $\beta$ -actina foram determinadas por meio de análise de RT-PCR de CPCTs e neuroesferas de 3 amostras de GBM humano. (C) 100.000 neuroesferas (*nsph.*) ou células de CPCT obtidas de amostras de tumores GBM1, GBM2 e GBM3 foram intracranianamente inoculadas em três camundongos Balbc *nu/nu* em cada case. Estudos de imageamento por ressonância magnética (IRM) foram realizados nos dias 30-40 em cada camundongo. As imagens representam um exemplo de camundongos inoculados com neuroesfera ou células de CPCT obtidas de GBM1. Os camundongos foram pesados duas vezes na semana. O gráfico representa camundongos inoculados com células derivadas de GBM1. (D e E) Células de neuroesfera dos GBMs indicados foram incubadas na ausência de fatores de crescimento com 100 pM de TGF $\beta$ 1 e/ou 2  $\mu$ M de inibidor de T $\beta$ RI durante 7 dias e o número de neuroesferas recém formadas (D) e o número total de células (E) foram determinados. (F) Imagens representativas de neuroesferas de GBM1 tratadas como

indicado em D e E.

Figura 2. Imunocitoquímica dos marcadores indicados em neuroesferas derivadas de GBM1, e neuroesferas diferenciadas em soro derivadas de GBM1.

Figura 3. TGF $\beta$  induz a expressão de LIF em CPCT e neuroesferas de GBM. (A) 5 células de CPCT das 11 amostras do GBM indicado (GBM1-11) foram tratadas com 100 pM de TGF $\beta$ 1 durante 3 horas em meio sem soro ou deixadas sem tratar, e os níveis de expressão de LIF foram determinadas por meio de qRT-PCR. A  $\beta$ -actina foi determinada como um controle de normalização interno. (B) células de neuroesfera de GBM foram tratadas como em A e os níveis de expressão de LIF foram determinados por meio de qRT- 10 PCR como em A. (C) neuroesferas de GBM foram incubadas com 100 pM de TGF $\beta$ 1 e/ou 2  $\mu$ M de inibidor de T $\beta$ RI durante 3 horas em meio sem soro e os níveis de mRNA de LIF foram determinados por meio de qRT-PCR como em A. (D) neuroesferas de GBM1 foram incubadas com 100 pM de TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 e TGF $\beta$ 3 durante 3 horas em meio sem soro e os 15 níveis de mRNA de LIF foram determinados por meio de qRT-PCR como em A. (E) Os níveis de proteína de LIF secretada foram determinados por meio de ELISA em neuroesferas de GBM1 após 48 horas de tratamento com 100 pM de TGF $\beta$ 1.

Figura 4. TGF $\beta$  induz a transcrição de LIF através de um complexo Smad ativado. (A) Diagramas das construções de indicador de LIF de luciferase. (B) células de glioma A172 foram transfetadas com construções de indicador de luciferase LIF (-634/+32), (-20 276/+32), (-276/+32) mutSBE ou (-73/+32). 16 horas após transfecção, as células foram tratadas com 100 pM de TGF $\beta$ 1 durante 20 horas e foram analisadas para atividade de luciferase. (C) células U373MG foram tratadas com 100 pM de TGF $\beta$ 1 durante 3 horas, e ensaios ChIP foram realizados com os anticorpos indicados e os primers de PCR indicados. (D, E) Os níveis de LIF foram determinados por meio de análise de qRT-PCR em U373MG 25 (D) ou neuroesferas de GBM (E) tratadas com 100 pM de TGF $\beta$ 1 durante 3 horas após silenciamento mediado por siRNA dos membros indicados da família Smad indicada. Western blotting foi realizado usando anticorpos específicos para Smads ou qRT-PCR de Smad4. A  $\beta$ -actina foi determinada como um controle de normalização interno.

Figura 5. TGF $\beta$  induz a via LIF-JAK-STAT em neuroesferas de GBM derivadas de 30 pacientes. (A) Os níveis de p-STAT3 e STAT3 foram determinados por meio de Western blotting de neuroesferas da amostra de GBM1 tratadas com 20 ng/ml de LIF para os períodos de tempo indicados. (B) As neuroesferas da amostra de GBM1 foram tratadas com 20 ng/ml de LIF e/ou 0,5  $\mu$ M de P6 durante 15 minutos e os níveis de STAT3 e p-STAT3 total foram determinados por meio de Western blotting. (C) As neuroesferas da amostra de 35 GBM1 foram tratadas com 100 pM de TGF $\beta$ 1 ou 2  $\mu$ M de inibidor de T $\beta$ RI durante 4 horas na ausência de EFG e FGF e os níveis de p-STAT3, STAT3, p-Smad2, Smad2 e  $\alpha$ -tubulina foram determinados por meio de Western blotting. (D) as neuroesferas da amostra de GBM1

foram tratadas com 100 pM de TGF $\beta$ 1, 0,5  $\mu$ M de P6 ou o anticorpo de bloqueio contra LIF durante 4 horas na ausência de EGF e FGF e os níveis de STAT3 e p-STAT3 total foram determinados por meio de Western blotting.

Figura 6. LIF media o aumento de auto-renovação de CIG por TGF $\beta$ . (A, B) células de neuroesfera de GBM1, GBM2 e GBM3 foram tratadas com 100 pM de TGF $\beta$ 1, 20 ng/ml de LIF e/ou anticorpo de neutralização anti-LIF e 0,5  $\mu$ M de P6 na ausência de EGF e FGF e o número de neuroesferas recém formadas (A) ou o número total de células (B) foi determinado. (C) Imagens representativas de neuroesferas de GBM1 tratadas como indicado em Um e B.

Figura 7. TGF $\beta$  e LIF previnem a diferenciação de neuroesferas de GBM. (A) Imunocitoquímica das proteínas indicadas foi realizada em neuroesferas derivadas de GBM1 tratadas com 100 pM de TGF $\beta$ 1 ou 20 ng/ml de LIF durante 7 dias na ausência de fatores de crescimento e os últimos 3 dias em lâminas revestidas com poli-L-lisina. (B) Os níveis de mRNA de *Musashi-1* (*Msi-1*), *Sox2* e *Nestina* foram determinados em neuroesferas de GBM1 após 7 dias dos tratamentos indicados sem fatores de crescimento. Os níveis de RNA de 18S foram usados como um controle de normalização interno.

Figura 8. Efeito de TGF $\beta$  sobre a capacidade de auto-renovação de neuroprogenitores humanos normais. (A) Imunocitoquímica dos marcadores indicados foi realizada em neuroesferas de neuroprogenitor humano. (B) Neuroesferas da amostra de GBM1 e de neuroprogenitores humanos foram incubadas com os membros indicados de 100 pM da família de TGF $\beta$  durante 3 horas e os níveis de mRNA de LIF foram determinados. (C, D) Células de neuroesfera de neuroprogenitores humanos normais foram incubadas nas mesmas condições que foram descritas acima na Figura 1D na presença de 100 pM de TGF $\beta$ 1 ou 20 ng/ml de LIF durante 7 dias e o número de neuroesferas recém formadas (C) e o número total de células (D) foram determinados.

Figura 9. Expressão de LIF em tumores de glioma humano. (A) aquelas dos transcritos de *LIF*, *TGF $\beta$ 2*, *Musashi-1* (*Msi-1*), *Sox2* e *Nestina* foram determinadas por meio de análise de qRT-PCR em 39 amostras derivadas de pacientes de glioma humano. (B) Correlações entre *LIF* e *TGF $\beta$ 2*, *Musashi-1* (*Msi-1*), *Sox2* ou *Nestina*. Coeficiente de correlação de posição de Spearman (*Rho*), significância bicaudada. (C) TGF $\beta$  fomenta a auto-renovação de GSC por meio da indução de LIF aumentando a quantidade do grupo de células semelhantes a célula-tronco dentro da massa tumoral

Figura 10. Níveis de mRNA de LIF de pacientes com glioma são ligados a expectativa de vida média. As curvas de Kaplan-Meier mostrando que a sobrevivência global de pacientes com glioma com níveis de mRNA de LIF supra-regulado  $\geq$  2 vezes é significantemente menor que o resto dos pacientes ( $p = 7,2E-8$ ) pelo teste log-rank. Dados obtidos de programa REPOSITORY for Molecular BRAIN Neoplasia Data (REMBRANDT) do

*National Cancer Institute.*

Figura 11. Níveis de mRNA de LIF de pacientes com glioblastoma (GBM) são ligados a expectativa de vida média. As curvas de Kaplan-Meier mostrando que a sobrevivência global de pacientes com GBM com níveis de mRNA de LIF supra-regulado  $\geq 9$  vezes é significantemente menor que o resto dos pacientes ( $p = 6,9E-4$ ) pelo teste log-rank. Dados obtidos de programa *REpository for Molecular BRAin Neoplasia Data* (REMBRANDT) do *National Cancer Institute*.

Figura 12. Alguns pacientes de certos tipos de tumor têm níveis aberrantemente altos de LIF. Os níveis de mRNA de LIF em tipos diferentes de tumor mostrando que alguns pacientes (círculos) têm níveis aberrantemente altos de LIF. Dados obtidos da equipe de bioinformática de GeneSapiens ([www.genesapiens.org](http://www.genesapiens.org)). Os números representam: 1) leucemia linfoblástica aguda de célula pré-B (B-ALL); 2) leucemia linfoblástica aguda de célula pré-T (T-ALL); 3) leucemia linfática crônica de célula B (B-CLL); 4) leucemia mielóide aguda (AML); 5) Leucemia de célula plasmática; 6) Mieloma; 7) linfoma de célula B; 8) linfoma de Burkitt; 9) linfoma de célula T; 10) Condrossarcoma; 11) Osteossarcoma; 12) sarcoma de Ewing; 13) Sarcoma sinovial; 14) Leiomiossarcoma; 15) Rabdomiossarcoma; 16) Lipossarcoma; 17) Sarcoma, não especificado de outra maneira (NSO); 18) Pele, carcinoma de célula escamosa; 19) Melanoma; 20) Glioma; 21) Neuroblastoma; 22) Tumores Malignos da Bainha do Nervo Periférico (TMBNP); 23) Cordoma; 24) Carcinoma de célula escamosa oral; 25) Carcinoma de célula escamosa da larinfofaringe; 26) Glândula parótida, carcinoma; 27) Adenocarcinoma de pulmão; 28) Pulmão, câncer de célula grande; 29) Pulmão, câncer de célula pequena; 30) Pulmão, carcinoma de célula escamosa; 31) Pulmão, tumor carcinóide; 32) Mesotelioma; 33) Adenocarcinoma de esôfago; 34) Adenocarcinoma gástrico; 35) tumores estromais gastrointestinais (TEGI); 36) Intestino delgado, adenocarcinoma; 37) Carcinoma colorrectal; 38) Câncer de fígado; 39) Câncer pancreático; 40) Tumores adrenais; 41) Carcinoma da tireoide; 42) Oncocitoma renal; 43) Câncer renal; 44) Nefroblastoma; 45) Câncer de bexiga; 46) Testículo, seminoma; 47) Testículo, não-seminoma; 48) Adenocarcinoma de próstata; 49) Câncer ductal de mama; 50) Câncer lobular de mama; 51) Câncer medular de mama; 52) Câncer de mama, outros; 53) Carcinoma de mama, NSO; 54) Ovariano, carcinoma de célula clara; 55) Ovariano, carcinoma endometrióide; 56) Ovariano, tumor de célula germinativa; 57) Ovariano, carcinoma mucinoso; 58) Ovariano, carcinoma seroso; 59) Adenocarcinoma ovariano, não especificado de outra maneira (NSO); 60) Tumor ovariano, outros; 61) Adenocarcinoma do peritônio; 62) Sarcoma uterino; 63) adenocarcinoma Uterino; 64) Carcinoma de célula escamosa uterino; 65) Uterino, Tumor mülleriano; 66) Adenocarcinoma cervical; 67) Carcinoma de célula escamosa cervical; 68) carcinoma de Vagina/Vulva.

Descrição Detalhada da Invenção

### Métodos terapêuticos da invenção

Os autores da presente invenção encontraram que, de maneira surpreendente, uma citocina do tipo IL-6, mais especificamente LIF, está envolvida na ativação da cascata JAK-STAT mediada por TGF $\beta$ , assim induzindo o processo de proliferação celular e o aumento 5 de células-tronco tumorais (células-tronco de câncer). Com base neste fato, os inventores abriram uma nova janela terapêutica para o tratamento de doenças associadas à proliferação celular indesejada, tal como câncer, por exemplo, e especialmente para o tratamento de câncer causado por alta atividade da via de sinalização JAK-STAT, a dita terapia sendo baseada no uso de inibidores de citocinas do tipo IL-6. A identificação de LIF 10 como um elemento a jusante de TGF $\beta$  na ativação de JAK-STAT adicionalemente permite uma inibição mais eficaz da dita cascata JAK-STAT porque previne sua ativação não somente quando é ativado por TGF $\beta$ , mas também por qualquer outro estímulo, tal como interleucinas, eritropoietina, hormônio de crescimento, prolactina e similares.

Portanto, em um aspecto, a invenção se refere a um agente inibidor da expressão 15 e/ou da atividade de uma citocina do tipo IL-6 para o tratamento de doenças associadas à proliferação celular indesejada.

Sem querer estar vinculado por qualquer teoria, é pensado que o efeito de LIF e de seus inibidores sobre a proliferação de tumores esteja situado na capacidade de LIF de promover a proliferação de células-tronco tumorais. O tratamento com inibidores de LIF 20 seria, portanto especialmente indicado em aqueles tumores em que existe uma alta expressão de citocina do tipo IL-6, e mais especificamente em LIF. Seria também interessante para o tratamento de tumores resistentes a quimioterapia dada a capacidade conhecida de células-tronco tumorais de serem resistentes a quimioterapia. Finalmente, dado que as células-tronco tumorais parecem ser responsáveis pelas recaídas, o uso de 25 inibidores de LIF para o tratamento de doenças associadas à proliferação celular indesejada seria particularmente adequado para prevenir a ocorrência de recaídas.

Portanto, em um primeiro aspecto a invenção se refere a um agente inibidor da expressão e/ou da atividade de uma citocina do tipo IL-6 para o tratamento de doenças associadas à proliferação celular indesejada.

30 Em outro aspecto, a invenção se refere a um método para o tratamento de doenças associadas à proliferação celular indesejada que compreende a administração de um agente inibidor da expressão e/ou da atividade de uma citocina do tipo IL-6.

Em outro aspecto, a invenção se refere a um agente inibidor da expressão e/ou da atividade de uma citocina do tipo IL-6 para a produção de uma composição farmacêutica 35 para o tratamento de doenças associadas à proliferação celular indesejada.

No contexto da presente invenção, "citocina do tipo IL-6" é entendida como um membro da citocina da família de IL-6, que compreende IL-6, IL-11, fator inibitório de

leucemia (LIF), oncostatina M (OSM), cardiotrofina-1 (CT-1), fator neurotrófico ciliar (CNTF) e citocina semelhante a cardiotrofina (CLC) e ativar a via de sinalização de Jak-STAT. Estas citocinas compartilham o mesmo complexo de receptor em que a subunidade do receptor da glicoproteína-130 (gp-130) é um constituinte comum.

5 Portanto, em uma modalidade particular da invenção, a citocina do tipo IL-6 é selecionada de LIF, IL-6, IL-11, oncostatina M, cardiotrofina-1, CNTF e CLC. Em ainda outra modalidade mais particular, as citocinas do tipo IL-6 é LIF.

No contexto da presente invenção “agente inibidor” é entendido como qualquer substância ou composto que é capaz de prevenir ou bloquear a transcrição e a tradução de 10 um gene que codifica uma citocina do tipo IL-6 (isto é, prevenir ou bloquear a expressão do dito gene), ou que é capaz de prevenir que a proteína codificada pelo dito gene realize sua função (atividade), isto é, prevenir que uma citocina do tipo IL-6 seja capaz de induzir a ativação da via de sinalização JAK-STAT. Os ensaios para determinar se um composto é 15 um agente inibidor de uma citocina do tipo IL-6 são bem conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, Mezt S. et al. (J. Biol. Chem, 2007, vol. 282:1238-1248) descrevem um ensaio baseado na capacidade do inibidor de bloquear a expressão de um gene repórter que está sob o controle de um promotor sensível a uma citocina IL-6. No caso específico de LIF, os 20 ensaios para a identificação de agentes inibitórios incluem a inibição da diferenciação de célula de leucemia mielóide murina M1 na ausência de LIF (WO2005/30803), inibição da estimulação de a liberação de cálcio a partir de células Jurkatt (US5980894), medição de fosforilação de STAT-3 pela citocina do tipo IL-6 (ver Exemplo 2, seção 2.4 dos exemplos do 25 presente relatório descritivo), etc.

Por meio de ilustração, os agentes inibitórios da expressão de LIF adequados para seu uso na presente invenção são, por exemplo, oligonucleotídeos antisenso, RNAs 25 interferentes (siRNAs), RNAs catalíticos ou ribozimas específicas, RNA com atividade de isca, isto é, com capacidade de se ligar especificamente a um fator (geralmente proteináceo) importante para a expressão do gene, etc. De maneira similar, os agentes inibitórios capazes de prevenir que a proteína codificada pelo dito gene que codifica uma citocina do tipo IL-6 realize sua função são, por exemplo, peptídeos inibidores da proteína, anticorpos 30 direcionados especificamente contra epítopos da proteína essencial para levar a cabo sua função, ou contra receptores de citocina do tipo IL-6, etc.

Portanto, em uma modalidade particular da invenção, o agente inibidor é selecionado do grupo que consiste em siRNAs, oligonucleotídeos antisenso, ribozimas específicas, anticorpos, polipeptídeos e inibidores da citocina do tipo IL-6 receptor.

35 siRNA

RNAs interferentes pequenos, ou siRNAs, são agentes que são capazes de inibir a expressão de um gene alvo por meio de interferência de RNA. Um siRNA pode ser

quimicamente sintetizado, pode ser obtido por meio de transcrição *in vitro* ou pode ser sintetizado *in vivo* na célula alvo. siRNA tipicamente consiste em RNA de fita dupla de entre 15 e 40 nucleotídeos de comprimento e pode conter uma região de protusão 3' e/ou 5' de 1 a 6 nucleotídeos. O comprimento da região de protusão é independente do comprimento total da molécula de siRNA. siRNAs agem por meio de degradação ou silenciamento pós-transcricional do mensageiro alvo.

Os siRNAs podem ser chamados shRNA (RNA em forma de um curto grampo de cabelo [do inglês *short hairpin*]) caracterizados pelo fato de que as fitas anti-paralelas que formam o siRNA são conectadas por uma região de *loop* ou *hairpin*. Estes siRNAs são compostos de uma curta seqüência antisenso (desde 19 até 25 nucleotídeos), seguido por um *loop* de entre 5 e 9 nucleotídeos que é seguido pela fita senso. Os shRNAs podem ser codificados por plasmídeos ou vírus, particularmente retrovírus e, mais particularmente, retrovírus e podem estar sob o controle de promotores tais como o promotor U6 da polimerase III de RNA.

Os siRNAs da invenção são substancialmente homólogos ao mRNA do gene que codifica uma citocina do tipo IL-6 ou à seqüência genômica que codifica a dita proteína. "Substancialmente homólogo" é entendido como tendo uma seqüência que é suficientemente complementar ou similar ao mRNA alvo tal que o siRNA é capaz de causar a degradação do último por interferência de RNA. Os siRNAs adequados para causar a dita interferência incluem siRNA formado por RNA, bem como siRNA que contém modificações químicas diferentes tais como:

- siRNA em que as ligações entre os nucleotídeos são diferentes daquelas encontradas naturalmente, tais como ligações fosforotioato.
- conjugados da fita de RNA com um reagente funcional, tal como um fluoróforo.
- Modificações das extremidades das fitas de RNA, particularmente a extremidade 3' por meio da modificação com grupos funcionais diferentes da hidroxila na posição 2'.
- Nucleotídeos com açúcares modificados tais como resíduos O-alquilados na posição 2' tal como 2'-O-metilribose p 2'-O-fluororibose.
- Nucleotídeos com bases modificadas tais como bases halogenadas (por exemplo, 5-bromouracil e 5-iodouracil), bases alquiladas (por exemplo, 7-metilguanosina).

O siRNA e shRNA da invenção podem ser obtidos usando uma série de técnicas conhecidas pelo técnico no assunto. Por exemplo, o siRNA pode ser quimicamente sintetizado de ribonucleosídeos protegidos com fosforamiditas em um sintetizador de DNA/RNA convencional. Alternativamente, o siRNA pode ser produzido de uma maneira

recombinante de plasmídeo e vetores virais em que caso a região que codifica a fita ou fitas que formam o siRNA está sob o controle operativo de promotores de polimerase III de RNA. Nas células, o Dicer RNase processa o shRNA em siRNA funcional.

A região da seqüência de nucleotídeos que é tomada como uma base para desenhar 5 siRNA não é limitante e pode conter um região da seqüência codificante (entre o códon de início e o códon de fim), ou pode alternativamente conter seqüências da região não traduzida 5' ou 3', preferivelmente entre 25 e 50 nucleotídeos de comprimento e em qualquer posição na posição 3' com respeito ao códon de início. Uma maneira de desenhar 10 um siRNA envolve a identificação dos motivos AA(N<sub>19</sub>)TT em que N pode ser qualquer nucleotídeo na seqüência que codifica uma citocina do tipo IL-6 e selecionar aqueles que têm um alto conteúdo de G/C. Se o dito motivo não é encontrado, é possível identificar o motivo NA(N<sub>21</sub>) em que N pode ser qualquer nucleotídeo.

#### Oligonucleotídeos antisenso

Um aspecto adicional da invenção se refere ao uso de ácidos nucleicos "antisenso" 15 isolados para inibir a expressão, por exemplo, inibir a transcrição e/ou tradução de um ácido nucleico que codifica citocina do tipo IL-6, cuja atividade é para ser inibida. Os ácidos nucleicos antiseno podem se ligar ao potencial alvo de fármaco por meio de complementariedade de base convencional, ou, por exemplo, no caso de ligação a DNA de fita dupla, através de interações específicas na ranhura principal da dupla hélice. Estes 20 métodos geralmente se referem à série de técnicas geralmente usadas na área, e incluem qualquer método que é baseado na ligação específica a seqüências de oligonucleotídeo.

Uma construção antiseno da presente invenção pode ser distribuída, por exemplo, como um plasmídeo de expressão que, quando transcrito na célula, produz RNA complementar a pelo menos uma única parte do mRNA da célula que codifica uma citocina 25 do tipo IL-6. Alternativamente, a construção antiseno é uma sonda de oligonucleotídeo, que é gerada *ex vivo* e que, quando introduzida na célula, produz a inibição da expressão pela hibridização com o mRNA e/ou seqüências genômicas de um ácido nucleico alvo. Tais sondas de oligonucleotídeo são preferivelmente oligonucleotídeos modificados que são resistentes a nucleases endógenas, por exemplo, exonucleases e/ou endonucleases, e que 30 são, portanto estáveis *in vivo*. Moléculas de ácido nucleico exemplares para seu uso como oligonucleotídeos antiseno são análogos de DNA de fosforamidato, fosfotionato e metilfosfonato (também ver documentos de patente US 5.176.996; 5.264.564; e 5.256.775). Abordagens gerais para construir oligômeros úteis em terapia antiseno têm adicionadamente 35 sido revistas, por exemplo, em Van der Krol *et al.*, BioTechniques 6: 958-976, 1988; e Stein *et al.*, Cancer Res 48: 2659-2668, 1988.

Com respeito a DNA antiseno, as regiões de oligodesoxirribonucleotídeos derivados do sítio de iniciação de tradução, por exemplo, entre -10 e +10 do gene alvo, são preferidas.

Abordagens antisenso envolvem o desenho de oligonucleotídeos (DNA ou RNA) que são complementares ao mRNA que codifica o polipeptídeo alvo. Os oligonucleotídeos antisenso se ligarão aos transcritos de mRNA e prevenirão a tradução. Complementariedade absoluta não é requerida, embora seja preferida. No caso de ácidos nucleicos antisenso de fita dupla, 5 uma única fita dos DNAs de fita dupla pode assim ser ensaiada, ou a formação de DNAs de tripla fita pode ser ensaiada. A capacidade de hibridização dependerá tanto do grau de complementariedade como do comprimento do ácido nucleico antiseno. Geralmente, quanto mais longa a hibridização de ácido nucleico, mais erros de emparelhamento de RNA poderão conter e ainda forma um duplex estável (ou tríplex, como seja o caso). O técnico no 10 assunto pode determinar um grau tolerável de erros de emparelhamento por meio do uso de processos padrão para determinar o ponto de fusão do complexo hibridizado.

Os oligonucleotídeos que são complementares à extremidade 5' do mRNA, por exemplo, a seqüência 5' não traduzida até e incluindo o códon de início AUG, precisam funcionar tão efetivamente quanto possível com a finalidade de inibir a tradução. No entanto, 15 foi recentemente mostrado que as seqüências complementares às seqüências 3' não traduzidas de mRNA são também efetivas para inibir a tradução de mRNAs (Wagner, Nature 372: 333, 1994). Portanto, oligonucleotídeos complementares às regiões 5' ou 3' não traduzidas, não codificantes de um gene poderiam ser usados em uma abordagem antiseno para inibir a tradução desse mRNA. Os oligonucleotídeos complementares à 20 região 5' não traduzida do mRNA deveriam incluir o complemento do códon de início AUG. Os oligonucleotídeos complementares às regiões codificantes de mRNA são inibidores menos efetivos de tradução, mas poderiam também ser usados de acordo com a invenção. Se desenhados para hibridizar com a região 5', 3' ou codificante de mRNA, ácidos nucleicos antiseno deveriam ter pelo menos seis nucleotídeos de comprimento, e preferivelmente ter 25 menos de aproximadamente 100 e mais preferivelmente menos de aproximadamente 50, 25, 17 ou 10 nucleotídeos de comprimento.

É preferido que estudos *in vitro* sejam conduzidos primeiro para quantificar a capacidade dos oligonucleotídeos antiseno de inibir expressão do gene. É preferido que estes estudos usem controles distinguindo entre inibição do gene antiseno e efeitos 30 biológicos não específicos dos oligonucleotídeos. É também preferido que estes estudos comparem os níveis de RNA ou proteína alvo com esses de um controle de proteína ou RNA interno. Os resultados obtidos usando oligonucleotídeos antiseno podem ser comparados com esses obtidos usando um oligonucleotídeo de controle. É preferido que o oligonucleotídeo de controle seja do mesmo comprimento que o oligonucleotídeo a ser 35 ensaiado e que a seqüência de oligonucleotídeos difira da seqüência antiseno não mais que a que é necessária para prevenir hibridização específica à seqüência alvo.

Os oligonucleotídeos antiseno podem ser de DNA ou RNA ou misturas químicas

ou derivados modificados ou versões dos mesmos, fita simples ou fita dupla. O oligonucleotídeo pode ser modificado no grupo de base, o grupo de açúcar, ou a estrutura principal de fosfato, por exemplo, para melhorar a estabilidade da molécula, hibridização etc.

O oligonucleotídeo pode incluir outros grupos de ligação tais como peptídeos (por exemplo,

5 para direcionar os mesmos para receptores de célula hospedeira), ou agentes para tornar o transporte através da membrana celular mais fácil (ver, por exemplo, Letsinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556, 1989; Lemaitre *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652, 1987; publicação de PCT Nº WO88/09810) ou a barreira hematoencefálica (ver, por exemplo, publicação de PCT Nº WO89/10134), agentes de clivagem desencadeados por

10 hibridização (ver, por exemplo, Krol *et al.*, BioTechniques 6: 958-976, 1988), agentes de intercalação (ver, por exemplo, Zon, Pharm. Res. 5: 539-549, 1988). Para este propósito, o oligonucleotídeo pode ser conjugado a outra molécula, por exemplo, um peptídeo, um agente de ligação cruzada desencadeado por hibridização, um agente transportador, um agente de clivagem desencadeado por hibridização, etc.

15 Os oligonucleotídeos antisenso podem compreender pelo menos um grupo de base modificado que é selecionado do grupo incluindo, mas não limitado a 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-clorouracil, 5-iodouracil, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxietil) uracil, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracil, dihidouracil, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracil, 5-metoxiaminometil-2-tiouracil, beta-D-mannosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracil, 5-metoxiuracil, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracil, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracil, 2-tiouracil, 4-tiouracil, 5-metiluracil, éster metílico do ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracil, (acp3)w, e 2,6-diaminopurina.

O oligonucleotídeo antiseno pode também compreender pelo menos um grupo de açúcar modificado selecionado do grupo incluindo, mas não limitado a arabinose, 2-fluoroarabinose, xilulose, e hexose. O oligonucleotídeo antiseno pode também conter uma estrutura principal similar a peptídeo neutro. Tais moléculas são denominadas como oligômeros de ácido nucleico peptídico (PNA) e são descritos, por exemplo, em Perry-O'Keefe *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 14670, 1996, e em Eglom *et al.*, Nature 365: 566, 1993. Uma vantagem de oligômeros de PNA é sua capacidade de se ligar a DNA complementar de uma maneira essencialmente independente da força iônica do meio devido à estrutura principal neutra de DNA. Em ainda outra modalidade, o oligonucleotídeo antiseno compreende pelo menos uma estrutura principal de fosfato modificada

selecionado do grupo que consiste em um fosforotioato, um fosforoditioato, um fosforamidotioato, um fosforamidato, um fosforodiamidato, um metilfosfonato, um fosfotriéster de alquila, e um formacetal ou análogo dos mesmos.

Em ainda outra modalidade, o oligonucleotídeo antisenso é um oligonucleotídeo alfa-anomérico. Um oligonucleotídeo alfa-anomérico forma híbridos de fita dupla específicos com RNA complementar em que, em contraste com a orientação antiparalela típica, as fitas são paralelas uma à outra (Gautier *et al.*, Nucl. Acids Res. 15: 6625-6641, 1987). O oligonucleotídeo é um 2'-O-metil-ribonucleotídeo (Inoue *et al.*, Nucl. Acids Res. 15: 6131-6148, 1987) ou um análogo químérico RNA-DNA (Inoue *et al.*, FEBS Lett. 215: 327-330, 1987).

Enquanto oligonucleotídeos antisenso complementares à região codificante da seqüência de mRNA alvo podem ser usados, aqueles complementares à região transcrita não traduzida podem também ser usados.

Em alguns casos, pode ser difícil alcançar concentrações intracelulares do antisenso suficiente para suprimir a tradução dos mRNAs endógenos. Portanto, uma abordagem preferida usa uma construção de DNA recombinante em que o oligonucleotídeo antisenso é colocado sob o controle de um promotor pol III ou pol II forte. O uso de tal construção para transfectar células alvo resultará na transcrição de quantidades suficientes de RNAs de fita simples que formarão pares de base complementares com os potenciais transcritos endógenos alvo de fármacos e prevenirão, portanto a tradução. Por exemplo, um vetor pode ser introduzido tal que é capturado por uma célula e direciona a transcrição de um RNA antisenso. Tal vetor pode permanecer episomal ou ser integrado no cromossomo, ao mesmo tempo em que pode ser transcrito para produzir o RNA antiseno desejado. Tais vetores podem ser construídos por meio de métodos de tecnologia de DNA recombinante padrão na área. Os vetores podem ser plasmídeos virais, ou outros plasmídeos conhecidos na técnica usada para a replicação e expressão em células de mamíferos. A expressão das seqüências que codificam o RNA antiseno pode ser por meio de qualquer promotor conhecido na área que age sobre células de mamíferos, preferivelmente células humanas. Tais promotores podem ser induzíveis ou constitutivos. Tais promotores incluem, mas não são limitados a: promotor da região precoce de SV40 (Bernoist e Chambon, Nature 290: 304-310, 1981), o promotor contido em terminal de repetição longo 3' do vírus do sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.*, Cell 22: 787-797, 1980), o promotor da timidina quinase do herpes (Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441-1445, 1981), as seqüências regulatórias do gene da metalotioneína (Brinster *et al.*, Nature 296: 39-42, 1982), etc. Qualquer tipo de plasmídeo, cosmídeo, YAC ou vetor viral pode ser usado para preparar a construção de DNA recombinante, que pode ser introduzido diretamente no sítio do tecido.

A expressão do gene alvo pode alternativamente ser expressa pelo direcionamento

das seqüências de desoxirribonucleotídeo complementares à região regulatória do gene (isto é, o promotor e/ou melhoradores) para formar estruturas de tripla hélice prevenindo a transcrição do gene nas células alvo no corpo (ver, geralmente, Helene, Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84, 1991; Helene *et al.*, Ann. N.E. Acad. Sci., 660: 27-36, 1992; e Maher, 5 Bioassays 14(12): 807-15, 1992).

As moléculas de ácido nucleico que serão usadas na formação de triplas hélices para a inibição de transcrição são preferivelmente de fita simples e formadas por desoxirribonucleotídeos. A composição de base destes oligonucleotídeos precisa melhorar a formação de triplas hélices através das regras de emparelhamento de base Hoogsteen, que 10 geralmente requerem a presença de seções razoavelmente grandes de purinas ou pirimidinas em uma fita de um duplex. As seqüências de nucleotídeos podem ser baseadas em pirimidinas, que resultarão em triplets TAT e CGC através das três fitas associadas da tripla hélice resultante. As moléculas ricas em pirimidina proporcionam complementariedade de base a uma região rica em purinas de fita simples do duplex em uma orientação paralela 15 à dita fita. Além disso, as moléculas de ácido nucleico que são ricas em purinas, por exemplo, que contêm uma seção de resíduos G, podem ser escolhidas. Estas moléculas formarão uma tripla hélice com um DNA de fita dupla que é rico em pares GC, em que a maioria dos resíduos de purina está localizada em uma única fita do duplex alvo, resultando 20 em triplets CGC através das três fitas no triplo.

As potenciais seqüências alvo que podem ser selecionadas para a formação de triplas hélices podem alternativamente ser aumentadas, criando uma molécula de ácido nucleico denominada "em forma de grampo de cabelo". As moléculas em forma de grampo de cabelo são sintetizadas em uma forma 5'-3',3'-5' alternada, tal que formam um primeiro par de base com uma fita de um duplex e então com a outra, eliminando a necessidade da 25 presença de uma seção bem grande de purinas ou pirimidinas em uma fita de um duplex.

Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos antisenso são morfolinas antisenso. As morfolinas são moléculas sintéticas que são o produto de um redesenho da estrutura de ácido nucleico natural. Tipicamente 25 bases de comprimento se ligam a seqüências de RNA complementar por meio de emparelhamento de bases de ácido nucleico padrão. Em 30 termos de estrutura, a diferença entre morfolinas e DNA é que mesmo embora morfolinas tenham bases de ácido nucleico padrão, estas bases se ligam a anéis de morfolina ao invés de anéis de desoxirribose, e ligam-se por meio de grupos fosforodiamidato ao invés de fosfatos. Trocar fosfatos aniónicos com grupos fosforodiamidato neutros elimina a ionização no intervalo de pH fisiológico normal, tal que morfolinas em células ou organismos são 35 moléculas não carregadas. As morfolinas não são oligos quiméricos; a estrutura principal inteira de uma morfolina é feita destas subunidades modificadas. As morfolinas são mais comumente usadas como oligos de fita simples, embora heteroduplexes de uma fita de

morfolina e uma fita de DNA complementar possam ser usados em combinação com reagentes catiônicos com distribuição citosólico.

Ao contrário de muitos tipos estruturais antisenso (por exemplo, fosforotioatos), morfolinas não degradam suas moléculas de RNA alvo. Em contraste, as morfolinas agem 5 por meio de “obstrução estérica”, ligando-se a uma seqüência alvo em um RNA e simplesmente sendo colocadas no caminho de moléculas que poderiam de outro modo interagir com o RNA. Oligos de morfolina são comumente usados para investigar o papel de um transcrito de mRNA específico em um embrião, tal como ovos, ou embriões de peixe-zebra, rãs-de-unhas-africanas (*Xenopus*), galinhas, e ouriços-do-mar, que produzem 10 embriões “morfantes”. Com sistemas de distribuição citosólicos adequados, as morfolinas são efetivas em cultura celular.

As morfolinas foram desenvolvidas como fármacos sob o nome “NeuGenes” por AVI BioPharma Inc. Foram usadas em mamíferos, desde camundongos até seres humanos, e algumas estão atualmente sendo testadas em ensaios clínicos.

15 Ligadas à região 5' não traduzida de um RNA mensageiro (mRNA), as morfolinas podem interferir com a progressão do complexo de iniciação de ribossoma desde a capa 5' ao códon de início. Isto previne a tradução da região codificante do transcrito alvo (chamada “silenciamento” da expressão do gene). As morfolinas proporcionam um meio adequado para silenciar a expressão da proteína e aprender como esta diminuição muda células ou 20 organismos. Algumas morfolinas silenciam a expressão tão efetivamente que após a degradação das proteínas pré-existentes, as proteínas alvo se tornam indetectáveis por Western blotting.

As morfolinas podem também interferir com as etapas para processar o pré-mRNA, tipicamente prevenindo que os complexos de RNPnp que direcionam o excisão se liguem a 25 seus alvos nas bordas de ítron em uma hélice de pré-RNA. Prevenindo que a ligação de U1 (no lado do doador) ou ligação de U2/U5 (no grupo polipirimidina e sítio de aceitação) possa causar a excisão modificada, tipicamente levando à exclusão de exons de mRNA maduro. Direcionar alguns alvos de excisão produz a inclusão de ítrons, enquanto a ativação de sítios de excisão crípticos pode levar a inclusões ou exclusões parciais. Os 30 alvos de RNPnp U11/U12 podem também ser bloqueados. A modificação da excisão pode ser adequadamente ensaiada por meio de reação em cadeia de polimerase-transcriptase reversa (RT-PCR) e é vista como uma migração na banda após eletroforese em gel dos produtos de RT-PCR.

As morfolinas foram também usadas para bloquear atividade de miRNA, atividade de 35 ribozima, silenciadores de excisão de ítron, e melhoradores de excisão. As funções de U2 e U12 RNPnp foram inibidas com morfolinas. As morfolinas direcionadas contra seqüências de RNA “escorregadias” dentro das regiões codificantes de proteínas podem induzir

mudanças no quadro de leitura da tradução. As atividades de morfolinas contra esta variedade de alvos sugerem que as morfolinas podem ser usadas como uma ferramenta geral de propósitos múltiplos para bloquear as interações de proteínas ou ácidos nucleicos com mRNA.

- 5 Os exemplos de oligonucleotídeos antisenso específicos ao LIF são descritos em Kamohara *et al.* (Int J Oncol, 2007, 30:977-983) e Cheng *et al.* (Biol Reprod, 2004, 70:1270-1276).

#### Enzimas de DNA

Outro aspecto da invenção se refere ao uso de enzimas de DNA para inibir a expressão de genes que codificam a citocina do tipo IL-6 da invenção. As enzimas de DNA incorporam algumas das características mecânicas de ambas as tecnologias de ribozimas e antiseno. As enzimas de DNA são desenhadas tal que reconhecem uma seqüência de ácido nucleico alvo particular, similar ao oligonucleotídeo antiseno, no entanto como as ribozimas, são catalíticas e especificamente clivam o ácido nucleico alvo.

15 Existem atualmente dois tipos de enzimas de DNA, e ambos foram identificados por Santoro e Joyce (ver, por exemplo, patente US 6.110.462). A enzima de DNA 10-23 compreende uma estrutura de *loop* que conecta dois braços. Os dois braços proporcionam especificidade pelo reconhecimento de uma seqüência de ácido nucleico alvo particular enquanto a estrutura de *loop* proporciona a função catalítica em condições fisiológicas.

20 De maneira breve, para desenhar uma enzima ideal de DNA que especificamente reconhece e cliva um ácido nucleico alvo, o técnico no assunto precisa primeiro identificar a seqüência alvo única. Isto pode ser feito usando a mesma abordagem que essa descrita para oligonucleotídeos antiseno. Preferivelmente, a seqüência única ou substancialmente única é rica em G/C de aproximadamente 18 a 22 nucleotídeos. O alto conteúdo em G/C ajuda em assegurar uma interação mais forte entre a enzima de DNA e a seqüência alvo.

25 Quando a enzima de DNA é sintetizada, a seqüência de reconhecimento antiseno específica que direcionará a enzima ao mensageiro é dividida tal que compreende os dois braços da enzima de DNA, e o loop da enzima de DNA está localizado entre os dois braços específicos.

30 Os métodos para fabricar e administrar enzimas de DNA podem ser encontrados, por exemplo, na patente US 6.110.462. De maneira similar, os métodos para a transmissão de ribozimas de DNA *in vitro* ou *in vivo* incluem os métodos para a transmissão de ribozimas de RNA, como explicado em detalhe acima. Adicionalmente, o técnico no assunto reconhecerá que, como o nucleotídeo antiseno, as enzimas de DNA podem opcionalmente ser modificadas para melhorar a estabilidade e para melhorar resistência a degradação.

35 DNA e RNA antiseno, ribozimas, iRNA e moléculas de tripla hélice da invenção podem ser preparados por meio de qualquer método conhecido na área para a síntese de

moléculas de DNA e RNA. Estes incluem métodos para sintetizar quimicamente oligodesoxirribonucleotídeos e oligoribonucleotídeos bem conhecidos no estado da técnica, tais como a síntese química de fosforamidita em fase sólida, por exemplo. Alternativamente, as moléculas de RNA podem ser geradas por meio de transcrição *in vitro* e *in vivo* de seqüências de DNA que codificam a molécula de RNA antisenso. Tais seqüências de DNA podem ser incorporadas em uma ampla variedade de vetores que incorporam promotores de polimerase de RNA adequados, tal como promotores de polimerase T7 ou SP6. Alternativamente, as construções de cDNA antisenso constitutivamente ou induzivelmente sintetizando RNA antisenso, dependendo do promotor usado, podem ser estavelmente introduzidas em linhagens celulares. Além disso, diversas modificações bem conhecidas podem ser introduzidas nas moléculas de ácido nucleico como um meio para aumentar estabilidade intracelular e meia-vida. As modificações possíveis incluem, mas não são limitadas à adição de seqüências flanqueantes de ribonucleotídeo ou desoxirribonucleotídeo nas extremidades 5' e/ou 3' da molécula ou ao uso de ligações fosforotioato ou 2'-O-metila ao invés de fosfodiesterase na estrutura principal do oligodesoxirribonucleotídeo.

#### Ribozimas

As moléculas de ribozima desenhadas para clivar cataliticamente transcritos de um mRNA alvo podem também ser usadas para prevenir a tradução dos mRNAs que codificam a citocina do tipo IL-6 cuja atividade é para ser inibida. As ribozimas são moléculas de RNA enzimáticas capazes de catalisar clivagem de RNA específica. (Para uma revisão, ver, Rossi, Current Biology 4: 469-471, 1994). O mecanismo de ação de ribozima envolve hibridização específica a seqüência da molécula de ribozima a um RNA alvo complementar, seguido por um evento de clivagem endonucleolítico. A composição das moléculas de ribozima preferivelmente inclui um ou mais seqüências complementares ao mRNA alvo, e a seqüência bem conhecida responsável pela clivagem do mRNA ou uma seqüência funcionalmente equivalente (ver patente US 5.093.246, por exemplo, no presente documento incorporado por referência em sua totalidade).

Enquanto ribozimas clivam mRNA em seqüências de reconhecimento específicas a sítio podem ser usadas para destruir mRNA alvos, o uso de ribozimas de cabeça-de-martelo é preferido. Ribozimas de cabeça-de-martelo clivam o mRNA em localizações comandadas pelas regiões flanqueantes que formam pares de base complementares com aquelas do mRNA alvo. Preferivelmente, o mRNA alvo tem a seguinte seqüência de duas bases: 5'-UG-3'. A construção e produção de ribozimas de cabeça-de-martelo são bem conhecidas na área e completamente descritas em Haseloff e Gerlach, Nature 334: 585-591, 1988; e ver pedido de patente PCT WO89/05852, cujo conteúdo é incorporado no presente documento por referência. As seqüências da ribozima cabeça-de-martelo pode ser incrustada em RNA estável, tal como RNA de transferência (tRNA) para aumentar a eficácia da clivagem *in vivo*.

(Perriman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 6175-79, 1995; de Feyter, e Gaudron, Methods in Molecular Biology, Vol. 74, Capítulo 43, "Expressing Ribozymes in Plants", Editado por Turner, P. C, Human Press Inc., Totowa, N.J.). Particularmente a expressão de ribozimas de fusão com tRNA mediada por polimerase III de RNA é bem conhecida na área 5 (ver, Kawasaki *et al.*, Nature 393: 284-9, 1998; Kuwabara *et al.*, Nature Biotechnol. 16: 961-5, 1998; e Kuwabara *et al.*, Mol. Cell. 2: 617-27, 1998; Koseki *et al.*, J Virol 73: 1868-77, 1999; Kuwabara *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 96: 1886-91, 1999; Tanabe *et al.*, Nature 406: 473-4, 2000). Existe tipicamente um número de potencial sítios de clivagem de 10 ribozimas de cabeça-de-martelo em uma seqüência de cDNA alvo. A ribozima é preferivelmente manipulada tal que o sítio de reconhecimento de clivagem está localizado próximo à extremidade 5' do mRNA alvo – para aumentar a eficácia e minimizar acumulação intracelular de transcritos não funcionais de mRNA. Além disso, o uso de qualquer sítio de 15 reconhecimento de clivagem localizado na seqüência alvo que codifica diferentes partes de domínios de aminoácido C-terminal de, por exemplo, formas longas e curtas do alvo, permitiriam direcionar seletivamente qualquer forma do alvo, e assim ter um efeito seletivo 20 sobre uma forma do produto de gene alvo.

Ribozimas direcionadas contra genes necessariamente contêm uma região de hibridização complementar a duas regiões, cada uma de pelo menos 5 e preferivelmente 25 cada uma de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de comprimento de um mRNA alvo, tal como um mRNA de uma seqüência representada em quaisquer das proteínas RAP80 humanas. Além disso, as ribozimas têm atividade de 30 endonuclease muito específicas que autocataliticamente cliva o mRNA alvo codificante. A presente invenção se estende a ribozimas que hibridizam com um mRNA codificante que codifica um gene alvo tal como um gene alvo candidato de um fármaco terapêutico, portanto 35 a hibridização com o mRNA codificante e clivando o mesmo, tal que não é mais capaz de ser traduzido para sintetizar um produto de polipeptídeo funcional.

As ribozimas usadas nas composições da presente invenção também incluem RNA de endoribonuclease (no presente documento a seguir "ribozimas do tipo Cech") tal como essa encontrada naturalmente em *Tetrahymena thermophila* (conhecida como IVS, ou L-19 40 IVS RNA), que foi extensivamente descrita por Thomas Cech *et al.* (Zaug *et al.*, Science 224:574-578, 1984; Zaug *et al.*, Science 231: 470-475, 1986; Zaug *et al.*, Nature 324: 429-433, 1986; pedido de patente internacional publicado número WO88/04300 de University 45 Patents Inc.; Been, *et al.*, Cell 47: 207-216, 1986). As ribozimas do tipo Cech têm um sítio ativo com oito pares de base que hibridiza com uma seqüência de RNA alvo, onde a 50 clivagem do RNA alvo ocorre depois. A invenção compreende aquelas ribozimas do tipo Cech que têm como uma seqüência alvo que tem um sítio ativo com oito pares de base que 55 são apresentados em um gene alvo ou seqüência de ácido nucleico.

As ribozimas podem ser formadas por oligonucleotídeos modificados (por exemplo, para melhorar a estabilidade, orientação, etc.) e deveriam ser distribuídas a células que expressam o gene alvo *in vivo*. Um método preferido para a distribuição envolve usar uma construção de DNA “que codifica” a ribozima sob o controle de um forte promotor constitutivo de pol III ou pol II, tal que as células transfetadas produzirão suficientes quantidades da ribozima para destruir os mensageiros alvo endógenos e inibir a tradução. Uma vez que as ribozimas são catalíticas, ao contrário de outras moléculas antisenso, uma concentração intracelular mais baixa é requerida para as mesmas para serem efetivas.

Em certas modalidades, uma ribozima pode ser desenhada por primeiro identificar uma parte de uma seqüência suficiente para causar uma eficácia diminuída por meio de iRNA. A mesma parte da seqüência pode ser depois incorporada em uma ribozima. Neste aspecto da invenção, as partes da ribozima ou iRNA que são direcionadas contra os genes são substancialmente a mesma seqüência de pelo menos 5 e preferivelmente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 ou mais nucleotídeos contíguos de um ácido nucleico alvo, tal como o ácido nucleico de qualquer das seqüências RAP80 humanas. Em uma fita longa de alvo RNA, um significante número de sítios alvo não pode ser acessado pela ribozima porque estão ocultos nas estruturas secundária e terciária (Birikh et al., Eur J Biochem 245: 1-16, 1997). Para superar o problema de acessibilidade ao RNA alvo, predições de estrutura secundária geradas por computador são tipicamente usadas para identificar os alvos que mais provavelmente serão de fita simples ou terão uma configuração “aberta” (ver Jaeger et al., Methods Enzymol 183: 281-306, 1989). Outras abordagens usam uma abordagem sistemática para predizer estrutura secundária que envolve um grande número de moléculas de oligonucleotídeos candidatos a serem hibridizadas (ver Milner et al., Nat Biotechnol 15: 537-41, 1997; e Patzel e Sczakiel, Nat Biotechnol 16: 64-8, 1998).

Adicionalmente, a patente US 6.251.588, cujo conteúdo é no presente documento incorporado por referência, descreve métodos para avaliar seqüências de sonda de oligonucleotídeo para predizer o potencial para hibridização de uma seqüência de ácido nucleico alvo. O método da invenção proporciona o uso de tais métodos para selecionar segmentos preferidos de uma seqüência de mRNA alvo que é predita para ser de fita simples e, além disso, para o uso oportuno da mesma ou uma seqüência substancialmente idêntica de mRNA alvo, preferivelmente que compreende aproximadamente 10-20 nucleotídeos consecutivos do mRNA alvo, no desenho de ambos oligonucleotídeos iRNA e ribozimas da invenção.

#### Peptídeos inibidores

Como é usado no presente documento, o termo “peptídeo inibidor” se refere a aqueles peptídeos capazes de ligação a uma citocina do tipo IL-6 e inibição de sua atividade como foi explicado acima, isto é, prevenir que a citocina do tipo IL-6 seja capaz de induzir a

ativação da via de sinalização JAK-STAT.

Um exemplo de um peptídeo inibidor são as variantes pegiladas de LIF descritas em White *et al.* (J. Biol. Chem., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104: 19357-19362).

#### Inibidores de ligação a receptor de citocina

5 Como é usada no presente documento, a expressão "inibidores de ligação a receptor de citocina" indica qualquer composto que mostra afinidade para a citocina do tipo IL-6 e é, portanto capaz de sequestrar a citocina e prevenir a ligação da mesma a seus receptores fisiológicos. O polipeptídeo inibidor é preferivelmente uma forma solúvel do receptor da citocina do tipo IL-6 (os assim chamados receptores isca). No caso particular de LIF, é  
10 possível usar uma variante solúvel do receptor de LIF ou a proteína de ligação a LIF (PLL), uma forma solúvel do alfa receptor de LIF encontrada naturalmente e que foi encontrada como sendo capaz de efetivamente prevenir os efeitos de LIF sobre o metabolismo de proteoglicanas em explantes de cartilagem de articulação (Bell *et al.*, 1997, J. Rheumatol. 24:2394)

15 Anticorpos inibidores

"Anticorpo inibidor" é entendido no contexto da presente invenção como qualquer anticorpo que é capaz de ligação a uma citocina do tipo IL-6 ou aos receptores das ditas citocinas do tipo IL-6, prevenir que a dita citocina do tipo IL-6 seja capaz de induzir a ativação da via de sinalização JAK-STAT. Os anticorpos podem ser preparados usando 20 quaisquer dos métodos que são conhecidos para o técnico no assunto. Assim, os anticorpos policlonais são preparados por meio de imunização de um animal com a proteína a ser inibida. Os anticorpos monoclonais são preparados usando o método descrito por Kohler, Milstein *et al.* (Nature, 1975, 256: 495). Uma vez que os anticorpos com capacidade de ligação a citocina do tipo IL-6 ou com a capacidade de se ligar aos receptores das ditas 25 citocinas sejam identificados, aqueles que são capazes de inibir a atividade desta proteína serão selecionados usando o ensaio para a identificação de agentes inibidores descritos acima (Metz, 2007 mencionado acima).

Portanto, em uma modalidade mais particular, os anticorpos são anticorpos inibidores específicos às ditas citocinas do tipo IL-6 ou anticorpos que bloqueiam os 30 receptores de citocina do tipo IL-6.

Os anticorpos específicos para LIF são descritos no documento US 5.654.157A, Kim *et al.*, (J. Immunol. Met., 156: 9-17, 1992), Alphonso *et al.*, (J. Leukocyte Biology (Resumos do 28th National Meeting of the Society for Leukocyte Biology, vol. 0, nº SP.2 (1991) (NI, N.E., p. 49) (Mabs D4.16.9, D25.1.4, e D62.3.2).

35 Na presente invenção, o termo "anticorpo" precisa ser interpretado amplamente e inclui anticorpos policlonal, monoclonal, multiespecífico e fragmentos dos mesmos (F(ab')2, Fab), etc. contanto que sejam capazes de especificamente reconhecer o antígeno de

interesse, que no contexto da presente invenção é uma citocina do tipo IL-6 ou os receptores das ditas citocinas do tipo IL-6. Os exemplos de anticorpos que podem ser usados no contexto da presente invenção são, como exemplos não limitantes, anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, anticorpos recombinantes, anticorpos quiméricos, 5 anticorpos humanizados, anticorpos completamente humanos, etc.

Os anticorpos policlonais são originalmente misturas heterogêneas de moléculas de anticorpo produzidas no soro de animais que foram imunizados com um antígeno. Também incluem anticorpos policlonais monoespecíficos obtidos das misturas heterogêneas, por exemplo, por meio de cromatografia em coluna com peptídeos de um epítopo único do 10 antígeno de interesse.

Um anticorpo monoclonal é uma população homogênea de anticorpos específicos para um único epítopo do antígeno. Estes anticorpos monoclonais podem ser preparados por meio de técnicas convencionais já descritas, por exemplo, em Köhler e Milstein [Nature, 1975; 256:495-397] ou Harlow e Lane ["Using Antibodies. A Laboratory Manual" de E. 15 Harlow e D. Lane, Editor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque; 1998 (ISBN 978-0879695439)].

Um anticorpo químérico é um anticorpo monoclonal construído por meio da clonagem ou recombinação de anticorpos de diferentes espécies animais. Em uma configuração típica, mas não limitativa da invenção, o anticorpo químérico inclui parte de um anticorpo monoclonal, geralmente o fragmento variável (Fv) incluindo os sítios para o reconhecimento e ligação a antígeno, e a outra parte correspondente a um anticorpo humano, geralmente a parte incluindo a região constante e a região constante adjacente.

Um anticorpo completamente humano é um anticorpo ou anticorpos que foram produzidos em animais transgênicos com um sistema imune humano ou por imunização *in vitro* de células imunes humanas (incluindo tanto a imunização genética como a tradicional com ou sem adjuvantes e antígeno puro ou não puro; ou por meio de qualquer método de exposição do antígeno ao sistema imune) ou por meio de bibliotecas nativas/sintéticas produzidas de células imunes humanas. Estes anticorpos podem ser obtidos e selecionados de animais transgênicos (por exemplo, camundongos) em que genes da imunoglobulina 20 humana foram clonados e que são imunizados com o antígeno alvo (na presente invenção o dito antígeno é uma citocina do tipo IL-6 ou os receptores das ditas citocinas do tipo IL-6). Estes anticorpos podem ser obtidos por meio da seleção de fragmentos variáveis de fita simples humanas (scFv) ou fragmentos de ligação a antígeno (Fab) apresentados em 25 apresentações em fago e subsequente clonagem e enxerto em um anticorpo humano ou por meio de qualquer outra produção e método de apresentação conhecido pelo técnico no assunto, das bibliotecas geradas pela clonagem dos fragmentos variáveis de ambas fitas e 30 subsequente combinação/mutação da mesma para gerar as bibliotecas de anticorpo.

Um anticorpo humanizado é um anticorpo monoclonal construído por meio da clonagem e enxerto das regiões de determinação de complementariedade (CDR) hipervariáveis de um anticorpo monoclonal murino em um anticorpo humano em substituição de suas próprias regiões CDR hipervariáveis.

5        Além disso, no contexto da presente invenção, o termo "anticorpo" também inclui variantes com um padrão de glicosilação alterado, bem como fragmentos de anticorpo glicosilados ou não glicosilados, obtidos da proteína ou por meio de tecnologia recombinante, que pode consistir em (i) zonas variáveis dos anticorpos ligadas uma à outra por um peptídeo de ligação (scFv), (ii) a zona variável juntamente com a constante CH1 da  
10 cadeia pesada (Fd) ligada à cadeia leve por meio de cisteínas ou por meio de peptídeos de ligação e ligação dissulfeto (scFab), (iii) novas variantes, tais como cadeias pesadas individuais, ou (iv) qualquer modificação feita aos fragmentos de anticorpo para o propósito de tornar os mesmos mais similares, menos imunogênicos (humanizados) ou mais estáveis em fluidos biológicos e que no contexto da presente invenção, têm a capacidade para  
15 prevenir que as citocinas do tipo IL-6 realizem sua função (atividade), isto é, induzindo a ativação da via de sinalização JAK-STAT.

Como o técnico no assunto entenderá, os anticorpos podem ser obtidos por meio de técnicas de engenharia genética ou recombinantes convencionais, técnicas de produção de anticorpo, técnicas para extração e purificação dos fluidos biológicos ou tecidos, ou por  
20 qualquer outra técnica convencional para obter proteínas e anticorpos que são amplamente conhecidas pelo técnico no assunto. Os exemplos ilustrativos não limitantes de técnicas para a produção de anticorpos são: técnicas de imunização em animais, incluindo animais transgênicos para genes da imunoglobulina humana, produção de anticorpos monoclonais por meio de hibridomas, produção por meio de bibliotecas de anticorpo, que podem ser  
25 nativas, sintéticas ou derivadas de organismos imunizados contra o antígeno de interesse e que poderia ser selecionado por meio de métodos de apresentação muito diferentes (apresentação em fago, apresentação em ribossoma, etc.) e subsequentemente, por meio de técnicas de engenharia genética poderiam ser redesenhas e expressas em vetores desenhados para a produção de anticorpos recombinantes de diferentes tamanhos,  
30 composição e estrutura. Uma revisão dos métodos principais para a produção e purificação de anticorpos pode ser encontrada, por exemplo, em:

- "Handbook of Therapeutic Antibodies", por S. Dübel. Editor: Wiley-VCH, 2007, Vol: I ao III (ISBN 978-3527314539);
- "Antibodies: Volume 1: Production and Purification" por G. Subramanian Ed., Editor: Springer, 1<sup>a</sup> Ed, 2004 (ISBN 978-0306482458);
- "Antibodies: Volume 2: Novel Technologies and Therapeutic Use", por G. Subramanian Ed., Editor: Springer, primeira edição, 2004 (ISBN 978-0306483158);

- "Molecular Cloning: a Laboratory manual", por J. Sambrook and D.W. Russel Eds., Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press, terceira edição, 2001 (ISBN 978-0879695774).

Outros compostos que inibem a atividade de uma citocina do tipo IL-6

5 Outros compostos com a capacidade para inibir a expressão de uma citocina do tipo IL-6 incluem aptâmeros e spiegelmers, que são ácidos nucleicos D ou L de fita simples ou fita dupla que se ligam especificamente à proteína resultante de uma modificação da atividade biológica da mesma. Aptâmeros e spiegelmers têm um comprimento de entre 15 e 80 nucleotídeos, e preferivelmente entre 20 e 50 nucleotídeos.

10 Polipeptídeos com atividade inibitória de citocinas do tipo IL-6

Especificamente, antagonistas de LIF (uma citocina do tipo IL-6) que poderiam ser úteis no contexto da presente invenção são:

- variantes de LIF que apresentam mutações em sítios de ligação a receptor que mostram uma afinidade reduzida para o mesmo ou que são capazes de ligação a somente umas das cadeias do receptor. Os exemplos dos ditos mutantes incluem:
    - o Os mutantes descritos por Hudson *et al.* (J. Biol. Chem., 1996, 271:11971-11978),
    - o As variantes de LIF descritas no documento WO05030803 que têm uma ou mais mutações selecionadas do grupo de Q29A, G124R e N128A e que mostram uma afinidade reduzida para o receptor de LIF e para gp130. Um antagonista de LIF de alta potência é a variante que compreende MH35-BD/Q29A+G124R descrita por Fairlie, W.D. *et al.* (J. Biol. Chem., 2004, 279:2125-2134).
    - o Os mutantes descritos no documento WO9601319 caracterizados por ter uma ou mais substituições nas regiões de ligação a receptor e, especificamente, nas posições 25-38, 150 a 160 ou 161 a 180 com respeito à numeração de LIF humano.
  - As variantes solúveis do receptor de LIF baseadas na estrutura primária e com a capacidade de ligação a LIF e de prevenir que o mesmo interaja com seu receptor nativo na superfície da célula, tal como proteínas de fusão que compreendem parte da região extracelular do receptor de LIF e o domínio de ligação do ligando de gp130, como descritas por Metz; S. *et al.* (J. Biol. Chem., 2008, 283:5985-5995).
- Como foi expresso no começo da descrição, os inventores abriram uma nova janela terapêutica no tratamento de doenças associadas à proliferação celular indesejada, tal como câncer, especialmente para o tratamento de câncer causado por alta atividade a via de sinalização JAK-STAT, com a invenção no presente documento descrito.

No contexto da presente invenção, uma "doença associada à proliferação celular indesejada" inclui o crescimento, progressão e a metástase de câncer e tumores. Os exemplos de doenças associadas à proliferação celular indesejada que podem ser tratadas de acordo com os métodos descritos na presente invenção são câncer, reestenose, 5 arteriosclerose, doenças angiogênicas, fibrose, doenças dermatológicas e doenças inflamatórias.

Em uma modalidade particular da invenção, a doença associada à proliferação celular indesejada é câncer.

Os termos "câncer" e "tumor" se referem à condição fisiológica em mamíferos 10 caracterizada pelo te crescimento celular desregulado. Os compostos da presente invenção são úteis para o tratamento de tumores de mama, coração, pulmão, intestino delgado, cólon, baço, rim, bexiga, cabeça, pescoço, ovários, próstata, cérebro, pancreático, pele, ósseo, medula óssea, sangue, timo, uterino, testicular e fígado. Particularmente, os tumores que podem ser tratados com os compostos da invenção incluem adenoma, angiossarcoma, 15 astrocitoma, carcinoma epitelial, germinoma, glioblastoma, glioma, hemangioendotelioma, hemangiossarcoma, hematoma, hepatoblastoma, leucemia, linfoma, meduloblastoma, melanoma, neuroblastoma, osteossarcoma, retinoblastoma, rhabdomiossarcoma, sarcoma e teratoma. Particularmente, o tumor/câncer é selecionado do grupo de melanoma lentiginoso acral, queratose actínica, adenocarcinoma, carcinoma cístico adenóide, adenomas, 20 adenossarcoma, carcinoma adenoescamoso, tumores astrocíticos, carcinoma da glândula de Bartholin, carcinoma de célula basal, carcinoma de glândula brônquica, carcinóide capilar, carcinoma, carcinossarcoma, colangiocarcinoma, condrossarcoma, cistadenoma, tumor do seio endodérmico, hiperplasia endometrial, sarcoma estromal endometrial, adenocarcinoma endometrióide, sarcoma ependimal, sarcoma de Swing, hiperplasia nodular 25 focal, gastronoma, tumores de linhagem germinativa, glioblastoma, glucagonoma, hemangioblastoma, hemangioendotelioma, hemangioma, adenoma hepático, adenomatose hepático, carcinoma hepatocelular, insulinita, neoplasia intraepitelial, neoplasia de célula escamosa intraepitelial, carcinoma de célula escamosa invasivo, carcinoma de célula grande, lipossarcoma, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leiomiossarcoma, 30 melanoma, melanoma maligno, tumor mesotelial maligno, tumor da bainha do nervo, meduloblastoma, meduloeptelioma, mesotelioma, carcinoma mucoepidermóide, leucemia mielóide, neuroblastoma, adenocarcinoma neuroepitelial, melanoma nodular, osteossarcoma, carcinoma de ovários, adenocarcinoma seroso papilar, tumores da pituitária, plasmacitoma, pseudossarcoma, blastoma pulmonar, carcinoma de célula renal, 35 retinoblastoma, rhabdomiossarcoma, sarcoma, carcinoma seroso, carcinoma de célula escamosa, carcinoma de célula pequena, carcinoma de tecido mole, tumor de secreção da somatostatina, carcinoma escamoso, carcinoma de célula escamosa, carcinoma não

diferenciado, melanoma uveal, carcinoma verrucoso, carcinoma da vagina/vulva, VIPpoma, tumor de Wilm. Ainda mais preferivelmente, o tumor/câncer a ser tratado com os compostos da invenção inclui câncer do cérebro, câncer de cabeça e pescoço, carcinoma colorretal, leucemia mielóide aguda, leucemia linfoblástica aguda de célula pré-B, câncer de bexiga, 5 astrocitoma, preferivelmente astrocitoma de grau II, III ou IV, glioblastoma, preferivelmente glioblastoma multiforme, câncer de célula pequena, e câncer de células não-pequenas, preferivelmente câncer de pulmão de células não-pequenas, melanoma metastático, câncer de próstata metastático independente de andrógeno, câncer de próstata metastático dependente de andrógeno e câncer de mama, preferivelmente câncer ductal de mama ou 10 carcinoma de mama.

Em uma modalidade particular da invenção, o câncer ou as células que formam os tumores que ocorrem no câncer é caracterizado por apresentar altos níveis da citocina do tipo IL-6. No contexto da presente invenção, com "altos níveis" de uma citocina do tipo IL-6, é entendido que as concentrações da citocina são maiores que aquelas que ocorrem em 15 uma amostra de controle em pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 100%, pelo menos 110%, pelo menos 120%, pelo menos 130%, 20 pelo menos 140%, pelo menos 150% ou mais.

A amostra de controle é entendida como uma amostra que tem níveis de citocina do tipo IL-6 que são usados como uma referência para a determinação dos níveis relativos da dita citocina em uma amostra de teste. As amostras de referência são tipicamente obtidas de pacientes que são bem documentados desde o ponto de vista clínico, e que não 25 apresentam a doença. Nas ditas amostras, a concentração de biomarcador pode ser determinada, por exemplo, por meio da determinação da concentração média em uma população de referência. Na determinação da concentração de referência para um certo marcador, é necessário levar em consideração algumas características do tipo de amostra, tal como idade, sexo, o estado físico e similares do paciente. Por exemplo, a amostra de 30 referência pode ser obtida de quantidades idênticas de um grupo de pelo menos 2, pelo menos 10, pelo menos 100 a mais de 1000 indivíduos, tal que a população é estatisticamente significante.

A concentração de citocina do tipo IL-6 pode ser determinada intracelularmente, no espaço intersticial ou em extratos em que ambas a proteína intracelular e aquela encontrada 35 no espaço intersticial. Os níveis de citocina IL-6 podem ser determinados por meio da medição da atividade da dita citocina usando ensaios adequados para esse propósito, ou por meio da medição da quantidade de proteína usando métodos imunológicos ou por meio

da medição do mRNA correspondente à citocina do tipo IL-6.

Em outra modalidade particular, o câncer é causado pela alta atividade da via de sinalização JAK-STAT que, em outra modalidade ainda mais particular, é um glioma, preferivelmente glioma de grau IV.

5        Como mencionado anteriormente, o agente inibidor da invenção é capaz de inibir a proliferação de células-tronco tumorais, tal que seu uso é particularmente útil para o tratamento de doenças que podem se beneficiar da inibição da proliferação de células-tronco. Assim, em uma modalidade preferida, os agentes inibidores agem através da auto-regeneração de células-tronco tumorais.

10      O termo "arteriosclerose" se refere ao espessamento e endurecimento da parede arterial. Um tipo específico de arteriosclerose é aterosclerose, que é a causa da maioria das doenças de artéria coronária, de aneurisma aórtico e de doença arterial dos membros inferiores, e, além disso, contribui a doença cerebrovascular. Uma artéria normal tipicamente tem uma parte interior (a intima) formada por uma única camada de células endoteliais.

15      Sobreposta sobre esta camada está a assim chamada camada média que contém somente células de músculo liso. A camada exterior, por sua vez, é a adventícia. Com o envelhecimento, a largura da intima continuamente aumenta parcialmente como um resultado da migração e proliferação das células de músculo liso. Um aumento similar também ocorre na largura da intima como um resultado de diversos episódios traumáticos ou intervenções, tais como aqueles que ocorrem quando um processo dilatação causa dano à parede dos vasos. Os compostos usados na presente invenção são potencialmente úteis para inibir a proliferação de células endoteliais, células de músculo liso e fibroblastos. Conseqüentemente, os compostos diterpenóides do tipo labdano descritos na invenção podem também ser usados para o tratamento de condições arterioscleróticas. "Condições arterioscleróticas" são entendidas como aterosclerose clássica, aterosclerose acelerada e qualquer outra condição arteriosclerótica caracterizada pela proliferação indesejada de células musculares endoteliais e/ou vasculares lisas, incluindo complicações vasculares de diabetes e glomerulosclerose diabética.

20      O termo "reeslenose" é entendido como essa doença que apresenta proliferação e migração excessiva de células como um resultado da liberação de fatores de crescimento causada por dano mecânico às células endoteliais que formam as artérias coronárias.

25      "Doença angiogênica" é entendida como uma doença ou condição médica que apresenta neovascularização anormal. Tais doenças ou condições incluem retinopatia diabética, glaucoma neovascular, artrite reumatóide e alguns cânceres, tais como hemangioendoteliomas, hemangiomas e sarcoma de Kaposi. A proliferação de células endoteliais e de células de músculo vascular liso é a característica principal de neovascularização. Os compostos descritos na presente invenção são úteis para inibir a dita

proliferação e, consequentemente, para inibir a progressão da condição angiogênica que depende de toda ou em parte da dita neovascularização.

O termo "fibrose" se refere a uma formação ou desenvolvimento excessivo de tecido conjuntivo fibroso em um órgão ou tecido. Fibrose inclui, por exemplo, fibrose 5 endomiocárdica, fibrose pulmonar idiopática, enfisema, fibrose pulmonar (levando a uma doença pulmonar obstrutiva crônica), doença de Peyronie, escleroderma, doença difusa do parênquima pulmonar, quelóides, fibrose mediastinal, fibrose massiva progressiva, fibrose proliferativa, fibrose neoplásica, fibrose renal intersticial, fibrose hepática, cicatrizes cirúrgicas ou queimaduras.

10 O termo "doenças dermatológicas" é entendido como doenças da pele que apresentam a proliferação celular associada a qualquer disfunção proliferativa. Estas disfunções incluem, por exemplo, quelóides, cicatrizes de queimadura hipertrópica, queratose seborreica, infecção por vírus papiloma, queratose de actina e eczema.

15 O termo "doenças inflamatórias" é entendido como doenças que causam inflamação como o resultado de proliferação celular associada a qualquer disfunção proliferativa. Incluem, por exemplo, glomerulonefrite proliferativa, lúpus eritematoso, escleroderma, artrite temporária, tromboangiite e síndrome de nódulo linfático mucocutâneo.

20 Em outro aspecto, a invenção se refere a uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente inibidor de acordo com a presente invenção juntamente com um transportador farmaceuticamente aceitável para o tratamento de doenças associadas à proliferação celular indesejada. Os exemplos de doenças associadas à proliferação celular indesejada foram mencionados acima no relatório descritivo.

25 No contexto da presente invenção, "quantidade terapeuticamente eficaz" é entendida como a quantidade de agente que inibe a expressão e/ou atividade de uma citocina do tipo IL-6 que é necessária para alcançar o efeito desejado que, neste caso específico, é o tratamento de doenças associadas à proliferação celular indesejada. Geralmente, a quantidade terapeuticamente eficaz do agente inibidor de acordo com a presente invenção para ser administrada dependerá, entre outros fatores, do indivíduo a ser tratado, da 30 gravidade da doença que o dito indivíduo sofre, da forma farmacêutica escolhida, etc. Por esta razão, as doses mencionadas nesta invenção precisam ser consideradas somente como uma diretriz para o técnico no assunto, e o último precisa ajustar as doses de acordo com as variáveis mencionadas anteriormente. Não obstante, um agente inibidor de acordo com a presente invenção pode ser administrado uma ou mais vezes ao dia, por exemplo, 1, 35 2, 3 ou 4 vezes ao dia, em uma quantidade diária total típica compreendida entre 0,1 e 1000 mg/kg de massa corporal/dia, preferivelmente 10 mg/kg de massa corporal/dia.

No contexto deste relatório descritivo, o termo "tratamento" ou "tratar" significa a

administração de um agente inibidor de acordo com a invenção para prevenir, aliviar ou eliminar a doença ou um ou mais sintomas associados à dita doença associada à proliferação celular indesejada. "Tratamento" também inclui prevenir, aliviar ou eliminar as seqüelas fisiológicas da doença. No contexto desta invenção, o termo "aliviar" é entendido 5 que signifique qualquer melhora da situação do paciente tratado – ambos subjetivamente (sensações de ou sobre o paciente) e objetivamente (parâmetros medidos).

O termo "veículo, adjuvante e/ou transportador" se refere a entidades moleculares ou substâncias com as quais o ingrediente ativo é administrado. Tais veículos, adjuvantes ou transportadores farmacêuticos podem ser líquidos estéreis, tais como águas e óleos, 10 incluindo aqueles de petróleo ou de uma origem animal, vegetal ou sintética, tal como óleo de amendoim, óleo de semente de soja, óleo mineral, óleo de gergelim e similares, excipientes, agentes desintegrantes, agentes umectantes ou diluentes. Transportadores farmacêuticos adequados são descritos em "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin.

15 No contexto da presente invenção, o termo "farmaceuticamente aceitável" se refere a entidades moleculares e composições que são fisiologicamente toleráveis e não causam tipicamente uma reação alérgica ou uma reação adversa similar, tal como transtorno gástrico, tontura e similares, quando são administrados a um ser humano. O termo "farmaceuticamente aceitável" preferivelmente significa aprovado por uma agência 20 regulatória governamental estadual ou federal, ou incluído na *US Pharmacopoeia* ou outra farmacopéia geralmente reconhecida para uso em animais, e mais particularmente em seres humanos.

O agente inibidor da expressão e/ou da atividade de uma citocina do tipo IL-6, bem 25 como as composições farmacêuticas que contém o mesmo, pode ser usado juntamente com outros fármacos adicionais úteis no tratamento de doenças associadas à proliferação celular indesejada. Os ditos fármacos adicionais podem formar parte da mesma composição farmacêutica ou podem alternativamente ser proporcionados na forma de uma composição separada para sua administração que pode ou pode não ser simultânea a essa da composição farmacêutica que compreende o dito agente inibidor da expressão e/ou da 30 atividade de uma citocina do tipo IL-6.

Os exemplos de outros fármacos adicionais úteis no tratamento de doenças associadas à proliferação celular indesejada incluem, mas não são limitados a agentes alquilantes tais como, por exemplo, ciclofosfamida, carmustina, daunorubicina, mecloretamina, clorambucil, nimustina, melfalan e similares; antraciclinas, tais como, por 35 exemplo, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona, valrubicina e similares; compostos de taxano, tais como, por exemplo, paclitaxel, docetaxel e similares; inibidores de topoisomerase tais como, por exemplo, etopósido, tenipósido, tulipósido,

irinotecan e similares; análogos de nucleotídeo tais como, por exemplo, azacitidina, azatioprina, capecitabina, citarabina, doxifluridina, fluorouracil, gemcitabina, mercaptopurina, metotrexato, tioguanina, fторafur e similares; agentes à base de platina tais como, por exemplo, carboplatina, cisplatina, oxaliplatina e similares; agentes antineoplásicos tais como, por exemplo, vincristina, leucovorina, lomustina, procarbazina e similares; 5 moduladores de hormônio tais como, por exemplo, tamoxifen, finasterida, inibidores de 5- $\alpha$ -reductase e similares; alcalóides de vinca tais como, por exemplo, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina e similares. Agentes quimioterapêuticos adequados são descritos em mais detalhe na literatura, tal como em The Merck Index em CD-ROM, 13<sup>a</sup> edição.

10 A composição farmacêutica da invenção pode ser administrada por qualquer via de administração adequada, por exemplo, via oral, parenteral (por exemplo, subcutânea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, etc.), retal, etc., tipicamente, por via oral devido à natureza crônica da doença a ser tratada.

15 Os exemplos ilustrativos de formas de dosagem farmacêuticas administradas por via oral incluem comprimidos, cápsulas, granulados, soluções, suspensões, etc., e podem conter excipientes convencionais, tais como ligantes, diluentes, agentes desintegrantes, lubrificantes, agentes umectantes, etc., e podem ser preparados por métodos convencionais. As composições farmacêuticas podem também ser adequadas para sua administração parenteral, na forma de, por exemplo, soluções estéreis, suspensões ou 20 produtos liofilizados, na forma farmacêutica adequada; neste caso, as ditas composições farmacêuticas incluirão os excipientes adequados, tais como tampões, reagentes, etc. Em qualquer caso, os excipientes serão escolhidos de acordo com a forma de dosagem farmacêutica escolhida.

25 Uma revisão das diferentes formas de dosagem farmacêuticas de fármacos e de sua preparação pode ser encontrada no livro "Tratado de Farmacia Galénica", por C. Faulí i Trillo, 10<sup>a</sup> Edição, 1993, Luzán 5, S. A. de Ediciones.

Como o técnico no assunto entenderá, quando o agente inibidor da expressão e/ou da atividade de uma citocina do tipo IL-6 de acordo com a invenção compreende uma seqüência de nucleotídeos, tal como, por exemplo, oligonucleotídeos antisenso, RNAs 30 interferentes (siRNAs), RNAs catalíticos ou ribozimas específicas, RNA com atividade de isca, etc., a composição farmacêutica da invenção pode ser formulada na forma de uma composição destinada a seu uso em terapia genética; por meio de ilustração não limitativa, neste caso, a composição farmacêutica da invenção pode conter um vetor viral ou não viral, que compreende a dita seqüência de nucleotídeos ou um construção de gene que 35 compreende a seqüência mencionada. Por meio de ilustração não limitativa, os ditos vetores podem ser vetores virais, por exemplo, baseados em retrovírus, adenovírus, etc., ou não virais tais como complexos de DNA-lipossoma, DNA-polímero, DNA-polímero-lipossoma,

etc. [ver "Nonviral Vectors for Gene Therapy", editado por Huang, Hung e Wagner, Academic Press (1999)]. Os ditos vetores podem ser administrados diretamente ao corpo humano ou animal por métodos convencionais e podem alternativamente ser usados para transformar, transfectar ou infectar células, por exemplo, células de mamíferos, incluindo 5 células humanas, *ex vivo*, e subsequenteamente implantar as mesmas no corpo humano ou animal para obter o efeito terapêutico desejado. Para sua administração ao corpo humano ou animal, as ditas células serão formuladas em um meio adequado que não afeta adversamente a viabilidade das ditas células.

#### Métodos de Seleção da invenção

10 O achado feito pelos autores da presente invenção e descrito no presente relatório descritivo não somente se aplica no tratamento de doenças associadas à proliferação celular indesejada ou o diagnóstico das ditas doenças, mas também o envolvimento de LIF na ativação da cascata de JAK/STAT pode também ser usado no desenvolvimento de um método de seleção para a identificação de compostos capazes de bloquear/inibir a 15 proliferação celular de células tumorais induzida por uma citocina do tipo IL-6 ou uma variante funcionalmente equivalente da mesma.

Portanto, em outro aspecto, a invenção se refere a um método *in vitro* para a identificação de compostos capazes de bloquear/inibir a proliferação celular de células tumorais induzida por uma citocina do tipo IL-6 ou uma variante funcionalmente equivalente 20 da mesma que compreende as etapas de:

- (i) contatar uma célula que expressa o receptor para uma citocina do tipo IL-6 com uma citocina do tipo IL-6 e um composto candidato, e
- (ii) identificar aqueles compostos que bloqueiam a proliferação celular da dita célula.

25 Em uma primeira etapa, o método da invenção envolve contatar uma célula que expressa o receptor para uma citocina do tipo IL-6 com uma citocina do tipo IL-6 com a presença de um composto candidato em qualquer grau de pureza.

No contexto da presente invenção, "célula" é entendida como qualquer célula que expressa um receptor para uma citocina do tipo IL-6. Células em que receptores de citocinas 30 do tipo IL-6 são expressos e que podem ser usadas nos métodos da presente invenção incluem células derivadas de tumores sólidos, tais como células de câncer de mama, células de câncer de bexiga, células de melanoma, células de câncer de ovários, células de câncer pancreático, células de câncer de próstata, células de câncer de cólon, células de câncer de pulmão e similares, bem como células derivadas de tumores líquidos, tais como leucemia e 35 células de linfoma. Em uma modalidade particular, a célula que expressa o receptor para uma citocina do tipo IL-6 é uma célula de glioma, preferivelmente, uma célula de iniciação de glioma (CIG).

- Os exemplos de receptores para citocinas do tipo IL-6 podem ser encontrados em Auernhammer e Melmed, 2000 (Endocrine reviews, vol. 21(3): 313-345), tal como o receptor de LIF (LIFR), receptor da Oncostatina M (OMSR) etc. Assim, as células objeto de estudo incluem células eucarióticas superiores, preferivelmente células de mamíferos.
- 5 Preferivelmente, as células que são usadas na presente invenção são aquelas em que os receptores para citocinas do tipo IL-6 são constitutivamente expressos. Alternativamente, as linhagens celulares convencionais podem também ser usadas diretamente se for encontrado que expressam adequadamente os receptores para citocinas do tipo IL-6 ou após a anterior transfecção de construções de DNA que permitem a expressão dos ditos receptores.
- 10 Células adequadas para este propósito incluem células das linhagens CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK 293, 3T3, WI38 e similares. Em uma modalidade preferida, a célula que é usada no método da invenção é uma célula de glioma, preferivelmente, uma célula de glioma de grau IV.

O técnico no assunto observará que, dependendo do tipo de receptores que são expressos na célula usada no método de seleção da invenção, será necessário usar a citocina correspondente. A citocina é preferivelmente selecionada do grupo de LIF, IL-6, IL-11, oncostatina M, cardiotrofina-1, CNTF e CLC.

Contatar a célula com o composto candidato pode ser feito usando qualquer método conhecido para o técnico no assunto, incluindo diretamente contatar a célula que expressa o receptor para uma citocina do tipo IL-6, a dita célula estando em cultura, com a citocina do tipo IL-6 e o composto candidato em um solvente adequado para a interação do mesmo, tal como DMSO e similares.

De acordo com a presente invenção, "contatar" uma célula com o composto candidato inclui qualquer maneira possível de transportar o composto candidato à proximidade de sua célula alvo, na superfície da célula ou ao interior da mesma. Assim, no evento de que o composto candidato seja uma molécula de baixo peso molecular, é suficiente adicionar a dita molécula ao meio de cultura. No evento de que o composto candidato seja uma molécula de alto peso molecular (por exemplo, polímeros biológicos tais como um ácido nucleico ou uma proteína, anticorpos ou polipeptídeos), é necessário fornecer os meios para esta molécula acessar o interior da célula. No evento de que a molécula candidata seja um ácido nucleico (por exemplo, oligonucleotídeos antisenso, RNAs interferentes (siRNAs), RNAs catalíticos ou ribozimas específicas, RNA com atividade de isca), métodos de transfecção convencionais podem ser usados para a introdução da construção de DNA. No evento de que o composto candidato seja uma proteína, a célula pode contatar tanto com a proteína diretamente como com o ácido nucleico que codifica a mesma acoplado a elementos que permitem sua transcrição / tradução uma vez que estão no interior da célula. Para essa finalidade, quaisquer dos métodos mencionados

anteriormente podem ser usados para permitir sua entrada no interior da célula. Alternativamente, é possível contatar a célula com uma variante da proteína a ser estudada que foi modificada com um peptídeo capaz de promover a translocação da proteína ao interior da célula, tal como o peptídeo Tat derivado da proteína HIV-1 TAT, a terceira hélice 5 do homeodomínio da proteína Antennapedia de *D. melanogaster*, a proteína do vírus da herpes simplex VP22 e oligômeros de arginina (Lindgren, A. et al., 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:99-103, Schwarze, S.R. et al., 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:45-48, Lundberg, M et al., 2003, *Mol. Therapy* 8:143-150 e Snyder, E.L. e Dowdy, S.F., 2004, *Pharm. Res.* 21:389-393).

10 Preferivelmente, o composto candidato não é isolado, mas ao invés disso forma parte de uma mistura mais ou menos complexa derivada de uma fonte natural, ou forma parte de uma biblioteca de compostos. Os exemplos de bibliotecas de compostos que podem ser ensaiados de acordo com o método da presente invenção incluem, mas não são limitados a, bibliotecas de peptídeos incluindo tanto peptídeos como análogos de peptídeo 15 que compreendem D-aminoácidos ou peptídeos que compreendem ligações não peptídicas, bibliotecas de ácidos nucleicos incluindo ácidos nucleicos com ligações não-fosfodiéster do fosforotioato ou tipo peptídico de ácido nucleico, bibliotecas de anticorpos, de carboidratos, de compostos de baixo peso molecular, preferivelmente moléculas orgânicas, de peptidomiméticos, e similares. No evento de que uma biblioteca de compostos orgânicos de 20 baixo peso molecular seja usada, a biblioteca poderia ser pré-selecionada de modo que contém compostos que podem mais prontamente acessar o interior da célula. Assim, os compostos podem ser selecionados com base em determinados parâmetros tais como tamanho, lipofilicidade, hidrofilicidade, capacidade de formar ligações de hidrogênio.

25 Alternativamente, os compostos candidatos podem formar parte de um extrato obtido de uma fonte natural. A fonte natural pode ser animal, vegetal obtida de qualquer ambiente, incluindo, mas não limitado a extratos de organismos terrestres, aéreos, marinhos e similares.

30 Em uma segunda etapa, a invenção comprehende identificar aqueles compostos que bloqueiam a proliferação celular da célula que expressa um receptor para uma citocina do tipo IL-6. Os exemplos de métodos adequados para detectar se a proliferação celular foi bloqueada incluem, mas não são limitados a:

- determinar atividade de telomerase

A atividade enzimática da telomerase pode ser determinada por meio de qualquer método conhecido na área. Por exemplo, a atividade de telomerase pode ser determinada 35 por meio da determinação da taxa de alongamento de uma certo seqüência repetitiva que contém 2, 3 ou mais repetições da seqüência de telômero unitário (Yegorov, E.E. et al., 1997, *Mol. Biol.*, 31:130-136). Para medir a dita atividade, extratos citoplasmáticos, extratos

nucleares, lisados de célula ou células inteiras podem ser usadas. "Aumento" na atividade de telomerase é entendido que signifique que o nível absoluto de atividade de telomerase em uma célula particular é aumentado em comparação com células normais no mesmo indivíduo ou em comparação com células normais em sujeitos que não sofrem a condição.

5        •        determinar o comprimento dos telômeros

Os métodos para determinar o comprimento dos telômeros foram enormemente descritos na área por Harley, C. B., et al. (Nature, 1990, 345:458-460); Levy, M. Z. et al., (J. Mol. Biol., 1992, 225:951-960); Lindsey, J. et al., (Mutat. Res., 1991, 256:45-48) e Allsopp, R. C. et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89:10114-10118), entre outros. Endonucleases de restrição que não fragmentam o DNA telomérico são convencionalmente usadas para separar posteriormente os fragmentos obtidos pelo seu peso molecular e detectar os telômeros por meio de hibridização usando sondas específicas para a seqüência dos telômeros.

10      •        Determinar a proliferação celular

15      Proliferação celular pode ser determinada por meio de métodos amplamente conhecidos para o técnico no assunto, incluindo a determinação do tempo de duplicação celular, como descrito por Harley et al., (Nature, 1990, 345:458-460). A taxa de proliferação celular pode ser determinada por meio da determinação da incorporação de uridina tritiada na célula ou ensaios colorimétricos usando BrdU.

20      Na presente invenção, "variante funcionalmente equivalente de uma citocina do tipo IL-6" é entendida como uma proteína cuja seqüência de aminoácidos (i) é substancialmente homóloga à seqüência de aminoácidos de uma citocina do tipo IL-6 e (ii) realiza as mesmas funções que a dita citocina do tipo IL-6. A similaridade funcional de uma proteína com outra específica pode ser determinada por meio de ensaios de interferência com a expressão do 25 gene que codifica a proteína específica que, mediante a redução da expressão, reduziria a atividade dessa proteína, e a subsequente recuperação da atividade por meio da expressão da seqüência da outra proteína. Estes experimentos são realizados usando seqüências de RNA de interferência específicas e complementares para a seqüência da proteína específica e vetores de expressão que incorporam a seqüência específica da outra proteína regulada 30 por um promotor induzível ou não.

35      Uma seqüência de aminoácidos é substancialmente homóloga a uma certa seqüência de aminoácidos quando tem um grau de identidade de pelo menos 70%, vantajosamente pelo menos 75%, tipicamente pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, ainda mais preferivelmente pelo menos 95%, 97%, 98% ou 99%, com respeito à dita certa seqüência de aminoácidos. O grau de identidade entre duas seqüências de aminoácidos pode ser determinado por métodos convencionais, por exemplo, por meio de algoritmos de alinhamento de seqüências padrão

conhecidos no estado da técnica, tal como, por exemplo, BLAST [Altschul S.F. et al. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 5 de outubro de 1990; 215(3):403-10].

O técnico no assunto entende que as mutações na seqüência de nucleotídeos do gene que codifica uma citocina do tipo IL-6 ocasionando substituições conservativas de 5 aminoácidos nas posições não críticas para a funcionalidade da proteína são evolucionariamente mutações neutras que não afetam sua estrutura global total ou funcionalidade. As ditas variantes estão dentro do escopo da presente invenção. Aquelas variantes funcionalmente equivalentes de uma citocina do tipo IL-6 que têm inserções, deleções ou modificações de um ou mais aminoácidos com respeito à dita citocina do tipo 10 IL-6 e, além disso, conservam as mesmas funções que a dita citocina, estão também incluídas dentro do escopo da invenção.

Portanto, como é usado no presente documento o termo "variante funcionalmente equivalente" também inclui qualquer fragmento funcionalmente equivalente de uma citocina do tipo IL-6. O termo "fragmento" se refere a um peptídeo que compreende uma porção de 15 uma proteína. Neste caso, um fragmento funcionalmente equivalente de uma citocina do tipo IL-6 é um peptídeo ou proteína que compreende uma porção de uma citocina do tipo IL-6 e as mesmas funções que a dita citocina.

#### Métodos de Diagnóstico da invenção

Os autores da presente invenção têm mostrado que uma citocina do tipo IL-6, mais 20 especificamente LIF, está envolvida na ativação da cascata JAK-STAT, assim induzindo a processo de proliferação celular e o aumento de células-tronco tumorais (células-tronco de câncer). Este achado permite desenvolver métodos de diagnóstico para diagnosticar doenças associadas à proliferação celular indesejada baseada na determinação dos níveis de citocina do tipo IL-6.

Assim, em outro aspecto, a invenção se refere a um método *in vitro* para o 25 diagnóstico de doenças associadas à proliferação celular indesejada em um sujeito ou para determinar a predisposição de um sujeito de sofrer a dita doença associada à proliferação celular indesejada, ou para determinar o estágio ou gravidade da dita doença associada à proliferação celular indesejada em um sujeito, ou para monitorar o efeito da terapia 30 administrada a um sujeito com a dita doença associada à proliferação celular indesejada, que compreende quantificar os níveis de expressão do gene que codifica uma citocina do tipo IL-6 ou da proteína codificada pelo dito gene ou variante funcionalmente equivalente da dita proteína em uma amostra biológica do dito sujeito, em que um aumento da expressão 35 do gene que codifica uma citocina do tipo IL-6 ou da proteína codificada pelo dito gene ou variante funcionalmente equivalente da dita proteína, com respeito à expressão do gene que codifica uma citocina do tipo IL-6 ou da proteína codificada pelo dito gene ou variante funcionalmente equivalente da dita proteína em uma amostra de controle, é indicativo de

uma doença associada à proliferação celular indesejada, ou de uma maior predisposição do dito sujeito de sofrer de uma doença associada à proliferação celular indesejada ou da não resposta à terapia administrada ao dito sujeito.

Como usado no presente documento, diagnosticar se refere à avaliação da probabilidade de acordo com que um sujeito sofre de uma doença. Como será entendido pelos técnicos no assunto, tal avaliação normalmente pode não ser correta para 100% dos sujeitos a serem diagnosticados, embora seja preferível. No entanto, o termo requer ser capaz de identificar uma parte estatisticamente significante dos sujeitos como sofrendo da doença ou que têm uma predisposição à mesma. O técnico no assunto pode determinar se uma parte é estatisticamente significante simplesmente usando diversas ferramentas de avaliação estatística bem conhecidas, por exemplo, determinação de intervalos de confiança, determinação do valor de p, teste t de Student, teste de Mann-Whitney, etc. Os detalhes estão em Dowdy e Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, Nova Iorque 1983. Os intervalos de confiança preferidos são pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%. Os valores de p são preferivelmente 0,2, 0,1, 0,05.

Como usado no presente documento, o termo "predisposição" significa que um sujeito ainda não desenvolveu a doença ou quaisquer dos sintomas da doença mencionada acima ou outros critérios de diagnóstico, mas desenvolverão, no entanto, a doença no futuro com uma certa probabilidade. A dita probabilidade será significantemente diferente da probabilidade estatística de aparecimento de uma doença associada à proliferação celular indesejada. É preferivelmente diagnosticado que a probabilidade de desenvolver uma doença associada à proliferação celular indesejada é pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou 100% de uma predisposição. O diagnóstico de uma predisposição pode algumas vezes ser denominado como prognóstico ou predição da probabilidade de um sujeito desenvolver a doença.

No contexto da presente invenção, "amostra de controle" é entendida como a amostra de referência que é usada para determinar a variação dos níveis de expressão dos genes e proteínas usadas na presente invenção. Em uma modalidade, o valor de referência é obtido do sinal proporcionado usando uma amostra de tecido obtida de um indivíduo saudável. Preferivelmente, as amostras são tomadas do mesmo tecido de diversos indivíduos saudáveis e combinadas, tal que a quantidade de mRNA ou de polipeptídeos na amostra reflete o valor médio das ditas moléculas na população.

A quantificação dos níveis de expressão de um gene que codifica uma citocina do tipo IL-6 pode ser realizada a partir do RNA que resulta da transcrição do dito gene (mRNA) ou, alternativamente, do DNA complementar (cDNA) do dito gene. Adicionalmente, o método

da invenção pode incluir realizar uma etapa de extração para o propósito de obtenção do RNA total, que pode ser realizada por meio de técnicas convencionais (Chomczynski *et al.*, Anal. Biochem., 1987, 162:156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15:532).

Virtualmente qualquer método convencional pode ser usado dentro do contexto da invenção para detectar e quantificar os níveis de mRNA codificado por um gene que codifica uma citocina do tipo IL-6 ou de seu correspondente cDNA. Por meio de ilustração não limitativa, os níveis de mRNA codificado pelo dito gene pode ser quantificado por meio do uso de métodos convencionais, por exemplo, métodos que compreendem a amplificação do mRNA e a quantificação do produto de a amplificação do dito mRNA, tal como eletroforese e coloração, ou alternativamente, por meio de Northern blot e o uso de sondas específicas para o mRNA dos genes de interesse ou de seu correspondente cDNA, mapeamento com a nuclease S1, RT-LCR, hibridização, microarranjos, etc., preferivelmente, por meio de PCR quantitativo em tempo real usando conjuntos adequados de sondas e primers. De maneira similar, os níveis do cDNA correspondente ao dito mRNA codificado pelo gene que codifica uma citocina do tipo IL-6 pode também ser quantificado por meio do uso de técnicas convencionais; neste caso, o método da invenção inclui uma etapa de síntese do correspondente cDNA por meio de transcrição reversa (RT) do correspondente mRNA seguido pela amplificação e quantificação do produto da amplificação do dito cDNA. Os métodos convencionais para quantificar os níveis de expressão podem ser encontrados, por exemplo, em Sambrook *et al.*, 2001. "Molecular cloning: A Laboratory Manual", 3<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.E., Vol. 1-3.

Assim, em uma modalidade particular do método da invenção, a quantificação dos níveis de expressão do gene que codifica uma citocina do tipo IL-6 compreende a quantificação do RNA mensageiro (mRNA) do dito gene, um fragmento do dito mRNA, DNA complementar (cDNA) do dito gene, um fragmento do dito cDNA, ou misturas dos mesmos.

Em outra modalidade particular, a quantificação dos níveis de expressão do gene que codifica uma citocina do tipo IL-6 é realizada por meio de uma reação em cadeia de polimerase quantitativa.

Além disso, para colocar o método da invenção em prática, os níveis de expressão da proteína codificada pelo dito gene que codifica uma citocina do tipo IL-6, isto é, um gene que codifica IL-6, IL-11, fator inibitório de leucemia (LIF), oncostatina M (OSM), cardiotrofina-1 (CT-I), fator neurotrófico ciliar (CNTF) ou citocina semelhante a cardiotrofina (CLC) podem também ser quantificados.

Como é entendido pelo técnico no assunto, o nível de expressão de uma proteína pode ser quantificado por meio de qualquer método convencional. Por meio de ilustração não limitativa, os níveis de proteína podem ser quantificados, por exemplo, por meio do uso de anticorpos com a capacidade de se ligar à dita proteínas (ou a fragmentos das mesmas

que contém um determinante antigênico) e a quantificação subsequente dos complexos formados. Os anticorpos que são usados nestes ensaios podem ou pode não ser marcados. Os exemplos ilustrativos de marcadores que podem ser usados incluem isótopos radioativos, enzimas, fluoróforos, reagentes quimioluminescentes, substratos de enzima ou 5 cofatores, inibidores de enzima, partículas, corantes, etc. Existe uma grande variedade de ensaios conhecidos que podem ser usados na presente invenção que usam não anticorpos marcados (anticorpo primário) e anticorpos marcados (anticorpo secundário); estas técnicas incluem técnicas de Western-blot, ELISA (ensaio de imunoabsorvência ligado à enzima), RIA (radioimunoensaio), EIA competitivo (imunoensaio de enzima competitivo), DAS-ELISA 10 (ELISA sanduíche de anticorpo duplo), imunocitoquímica e imunohistoquímica, técnicas baseadas no uso de biochips ou microarranjos de proteínas que incluem anticorpos específicos ou ensaios baseados em precipitação coloidal em formatos tais como varetas de medida. Outras maneiras para detectar e quantificar proteínas incluem técnicas de 15 cromatografia de afinidade, ensaios de ligação a ligando, etc. Em outra modalidade particular, a quantificação dos níveis de proteína é realizada por meio de Western blot, imunohistoquímica ou ELISA.

Em outra modalidade preferida, a determinação dos níveis de expressão da citocina do tipo IL-6 pode ser levada a cabo por meio da determinação da atividade da dita proteína, uma vez que altos níveis de expressão geralmente resultam em uma atividade específica 20 mais alta da dita proteína em uma amostra. Os ensaios para determinar a atividade de citocinas do tipo IL-6 foram anteriormente descritos no contexto dos métodos terapêuticos da invenção.

As citocinas do tipo IL-6 cujos níveis podem ser usados como marcadores de proliferação celular indesejada foram anteriormente descritas na presente descrição e são 25 aplicáveis ao método da invenção. De maneira similar, o método de diagnóstico da invenção pode ser aplicado a quaisquer das doenças associadas à proliferação celular indesejada definidas acima. Em uma modalidade preferida, a doença associada à proliferação celular indesejada é um câncer, preferivelmente um câncer que têm altos níveis de uma citocina do tipo IL-6 ou alta atividade da via de sinalização JAK-STAT.

30 Colocar o método da invenção em prática compreende obter uma amostra biológica do sujeito a ser estudada. Os exemplos ilustrativos não limitantes das ditas amostras incluem tipos diferentes de fluidos biológicos, tais como sangue, soro, plasma, fluido cerebrospinal, fluido peritoneal, fezes, urina e saliva, bem como amostras de tecidos. As amostras de fluidos biológicos podem ser obtidas por qualquer método convencional como 35 as amostras de tecidos; por meio de ilustração, as ditas amostras de tecidos podem ser amostras de biópsias obtidas por ressecção cirúrgica.

Em outro aspecto, a invenção se refere ao uso de um kit que compreende reagentes

para a quantificação dos níveis de expressão do gene que codifica uma citocina do tipo IL-6 ou da proteína codificada pelo dito gene ou variante funcionalmente equivalente da dita proteína para o diagnóstico de câncer em um sujeito ou para determinar a predisposição de um sujeito de sofrer o dito câncer, ou para determinar o estágio ou gravidade do dito câncer  
 5 em um sujeito, ou para monitorar o efeito da terapia administrada a um sujeito com o dito câncer, em que se os reagentes detectarem um aumento na expressão do dito gene ou da dita proteína ou variante funcionalmente equivalente da mesma com respeito a uma amostra de controle, então o dito sujeito poderia sofrer de uma doença associada à proliferação celular indesejada, ou apresentar uma maior predisposição de sofrer a dita doença  
 10 associada à proliferação celular indesejada, ou apresentar uma maior gravidade da dita doença, ou a terapia administrada não estaria sendo eficaz.

Todos os termos e expressões usadas na definição do uso do kit foram anteriormente descritos e explicados para outros aspectos inventivos e modalidades particulares da presente invenção, e são também aplicáveis ao uso do kit descrito no  
 15 presente documento.

Métodos para desenhar terapias personalizadas e para selecionar pacientes que podem se beneficiar da terapia baseada em inibidores de IL-6

Os autores da presente invenção têm mostrado que inibidores de citocinas pertencentes à família de IL-6 e, mais particularmente, LIF, causaram uma inibição da  
 20 proliferação de células tumorais. Têm de maneira similar observado que existem tumores que têm níveis muito altos das ditas citocinas, portanto propõem que a terapia baseada no uso de inibidores de IL-6 pode ser particularmente benéfica para o tratamento de pacientes em que existem altos níveis de citocina do tipo IL-6.

Assim, em outro aspecto, a invenção se refere a um método *in vitro* para desenhar  
 25 uma terapia personalizada para um paciente que sofre de uma doença associada à proliferação celular indesejada que compreende:

- (a) quantificar os níveis de expressão da citocina do tipo IL-6 no dito paciente, e
- (b) comparar os ditos níveis de expressão com níveis de controle,  
 em que se os níveis de expressão de uma citocina do tipo IL-6 no dito paciente forem  
 30 maiores que os valores de controle, então um agente inibidor de uma citocina do tipo IL-6 é administrada ao dito paciente.

Em outro aspecto, a invenção se refere a um método *in vitro* para selecionar pacientes que sofrem de uma doença associada à proliferação celular indesejada, a ser tratado com um agente inibidor de uma citocina do tipo IL-6 que compreende

- 35 a) quantificar os níveis de expressão da citocina do tipo IL-6 no dito paciente, e
- b) comparar os ditos níveis de expressão com níveis de controle,

em que se os níveis de expressão de uma citocina do tipo IL-6 no dito paciente forem maiores que os valores de controle, então o dito paciente seria selecionado para receber tratamento com um agente inibidor de uma citocina do tipo IL-6.

Em ambos os aspectos, uma modalidade preferida é que em que a doença 5 associada à proliferação celular indesejada é associada à proliferação de células-tronco indesejada.

Em uma modalidade preferida, o agente inibidor de uma citocina do tipo IL-6 é selecionado do grupo que consiste em siRNAs, oligonucleotídeos antisenso, ribozimas específicas, anticorpos e polipeptídeos. Os agentes inibidores são preferivelmente 10 anticorpos e, mais preferivelmente, anticorpos inibidores específicos à dita citocina do tipo IL-6 ou anticorpos que bloqueiam os receptores de citocina do tipo IL-6.

As citocinas do tipo IL-6 que podem ser usadas como marcadores para selecionar pacientes ou para desenhar terapias personalizadas foram descritas com detalhe acima e são selecionadas de LIF, IL-6, IL-11, oncostatina M, cardiotrofina-1, CNTF e CLC.

15 As doenças que apresentam proliferação celular indesejada são aquelas descritas acima. Em uma modalidade preferida, a dita doença que apresenta proliferação celular indesejada é câncer. Ainda mais preferivelmente, o dito câncer é causado por uma alta atividade da via de sinalização JAK-STAT.

Em uma modalidade preferida, o dito câncer é um dos seguintes: glioma, leucemia 20 linfoblástica aguda de célula pré-B, leucemia mielóide aguda, carcinoma colorretal, câncer de bexiga, câncer ductal de mama ou carcinoma de mama. Ainda mais preferivelmente, o dito glioma é glioma de grau IV.

#### Métodos de Prognóstico da invenção

Em outro aspecto, a invenção se refere a um método de prognóstico *in vitro* para 25 predizer a expectativa de vida média de pacientes que sofrem de uma doença associada à proliferação celular indesejada. Este método é baseado na observação de que, por exemplo, no caso de glioma, a expectativa de vida média é reduzida para pacientes que mostram níveis de expressão de LIF mais altos que os de pacientes de controle (Figura 12).

O método é baseado em 30

- quantificar os níveis de expressão da citocina do tipo IL-6 no dito paciente, e
- comparar os ditos níveis de expressão com níveis de controle,

em que se os níveis de expressão de uma citocina do tipo IL-6 no dito paciente forem maiores que os valores de pacientes de controle dessa mesma doença, então o dito paciente provavelmente terá uma expectativa de vida mais baixa que o grupo de controle.

Em um aspecto mais específico, a concentração da citocina do tipo IL-6 pode ser medida para propósitos de prognóstico, a saber, para a predição da expectativa de vida

média de um indivíduo que sofre da dita doença. Para este propósito, a concentração da citocina do tipo IL-6 do paciente com tumor é comparada com a concentração de referência dessa mesma citocina do tipo IL-6. Os pacientes do grupo de referência tipicamente consistem em pacientes que são bem documentados e que sofrem da mesma doença. Por exemplo, a amostra de referência pode ser obtida de quantidades idênticas de um grupo de pelo menos 2, pelo menos 10, pelo menos 100 a mais de 1000 indivíduos, tal que a população de pacientes que sofrem da dita doença é estatisticamente significante. O grupo de referência pode consistir em um ou mais do seguinte:

- 5 a) todos os pacientes que sofrem da dita doença
- 10 b) todos os pacientes que sofrem da dita doença que não mostram níveis significantemente supra-regulados da citocina do tipo IL-6
- c) todos os pacientes que sofrem da dita doença que mostram níveis significantemente infra-regulados da citocina do tipo IL-6.

A concentração de citocina do tipo IL-6 pode ser determinada intracelular, no espaço intersticial ou em extratos em que ambas a proteína intracelular e aquela encontrada no espaço intersticial. Os níveis de citocina IL-6 podem ser determinados por meio da medição da atividade da dita citocina usando ensaios adequados para esse propósito, ou por meio da medição da quantidade de proteína usando métodos imunológicos ou por meio da medição do mRNA correspondente à citocina do tipo IL-6.

20 Neste aspecto, uma modalidade preferida é uma doença associada à proliferação celular indesejada. Em uma modalidade mais particular, a doença associada à proliferação celular indesejada é câncer. Ainda mais preferido, o tipo de câncer é associado a níveis anormalmente altos da citocina do tipo IL-6 em um subconjunto de pacientes do dito câncer. Em uma modalidade mais particular, o câncer é um dos seguintes: leucemia, glioma, 25 carcinoma colorretal, câncer de bexiga, câncer de mama. Em uma modalidade mais particular, a leucemia é leucemia linfoblástica aguda de célula pré-B ou leucemia mielóide aguda e o câncer de mama é câncer ductal de mama ou carcinoma de mama.

As citocinas do tipo IL-6 que podem ser usadas como marcadores para testar pacientes para propósitos de prognóstico foram descritas com detalhe acima e são 30 selecionadas de LIF, IL-6, IL-11, oncostatina M, cardiotrofina-1, CNTF e CLC.

Métodos estatísticos levarão em consideração a predição da expectativa de vida média de pacientes baseada nos níveis da citocina do tipo IL-6.

A invenção é descrita a seguir por meio dos seguintes exemplos que precisam ser considerados como meramente ilustrativos e exemplos não limitantes da mesma.

35 Exemplo 1

1. Materiais e Métodos

1.1 Linhagens celulares e culturas de células primárias

As células U373MG e A172 foram um presente generoso de J. Rich e D. Bigner e foram cultivadas em DMEM com 10% de soro fetal bovino (FBS). A cultura primária de células tumorais (CPCT) e as neuroesferas de GBM foram geradas como foi descrito (Bruna *et al.*, (2007) *Cancer Cell* 11, 147-160; Gunther *et al.*, (2008) *Oncogene*. 1 de maio; 27(20): 5 2897-909). De maneira breve, as amostras de tumores foram processadas nos 30 minutos após a ressecção cirúrgica. As peças moídas das amostras de gliomas humanos foram digeridas com 200 U/ml de colagenase I (Sigma) e 500 U/ml de DNase I (Sigma) em PBS durante 2 horas a 37°C e com agitação vigorosa constante. A suspensão de células individuais foi filtrada através de um filtro de células de 70 µm (BD Falcon) e lavada com 10 PBS. Finalmente, as células foram ressuspensas e subsequentemente cultivadas em DMEM com 10% de FBS, para a cultura de CPCTs, ou em meio de neuroesferas no caso das neuroesferas de GBM. As neuroesferas de neuroprogenitores humanos normais foram geradas de tecido de córtex cerebral embrionário humano (12-16 semanas após a concepção) coletadas após abortos voluntários. As amostras foram processadas e 15 cultivadas como foi descrito (Poltavtseva *et al.* (2002) *Brain Res Dev Brain Res* 134, 149-154). O meio de neuroesferas consiste em meio neurobasal (Gibco) suplementado com B27 (Gibco), L-glutamina (Gibco), penicilina/estreptomicina, e fatores de crescimento (20 ng/ml de EGF e 20 ng/ml de FGF-2 (Peprotech)).

As amostras de gliomas humanos e tecidos embrionários humanos foram obtidas do 20 Hospital Vall d'Hebron. O protocolo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética (CEIC) de Vall d'Hebron com o consentimento informado obtido de todos os sujeitos.

### 1.2 Plasmídeos e reagentes

DNA genômico de U373MG foi usado para amplificar a região -634/+32 do promotor de LIF humano que foi克lonado no vetor de luciferase básico pGL2. As construções de 25 deleção (-267/+32), e (-73/+32) foram geradas por meio de digestão da construção (-634/+32). Duas mutações ponto foram introduzidas nas posições -183 bp e -184 bp na construção (-267/+32) para interromper o elemento de ligação de Smad (ELS) e gerar a construção (-267/+32) mutSBE. TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3 (R&D Systems), inibidor de TβRI (SB431542, Tocris), LIF (Chemicon), os anticorpos de neutralização contra LIF (R&D), 30 inibidor JAK (piridona tetracíclica 6 (P6) Calbiochem), a montagem de SMART siRNAs alvo a Smad2, Smad3 e Smad4 (Dharmacon), e o siRNA siGlo de controle (Dharmacon) foram usados nas concentrações indicadas. Os anticorpos específicos contra p-Smad2, Smad2, p-STAT3 (p-Tyr705) e STAT3 total (Sinalização Celular) e contra Smad2, Smad3 e Smad4 (Hata *et al.*, (2000) *Cell* 100, 229-240) foram usados para Western blotting.

### 35 1.3 Imunocitoquímica, ELISA e imunoprecipitação de cromatina

A imunocitoquímica de neuroesferas e neuroesferas diferenciadas foi realizada como foi descrito (Geshwind *et al.*, 2001) usando os seguintes anticorpos: anti-nestina

(Chemicon), anti-GFAP (Dako), anti-Tuj1 (Chemicon), anti-O4 (Chemicon), anti-Sox2 (Chemicon), anti- $\alpha$ -tubulina (Sigma). Os núcleos foram contra-corados com 4',6-diamino-2-fenilindole (DAPI).

Para a determinação quantitativa dos níveis de proteína de LIF secretada ao meio, o 5 kit de ELISA de LIF humano (R&D Systems) foi usado, seguindo as especificações do fabricante. O sobrenadante de células U373MG ou neuroesferas de GBM anteriormente privadas de soro foi coletado após 48 horas do tratamento indicado. As células flutuantes foram descartadas e 5 ml dos sobrenadantes foram concentrados usando membranas de Amicon Ultra-4 PLCC Ultracel-PL de 5 kDa (Millipore) a um volume final de 200  $\mu$ l.

10 A imunoprecipitação de cromatina foi realizada como foi descrito (Bruna *et al.*, mencionado acima). A série de primers proximal e distal do promotor de LIF cobrem as regiões (-410/-165) e (-4534/-4293), respectivamente.

#### 1.4 Ensaio de Auto-renovação

A auto-renovação das neuroesferas foi avaliada semeando um número idêntico de 15 células em uma densidade muito baixa em poços de uma placa de 96 poços. As células foram tratadas, na ausência de fatores de crescimento, com os compostos indicados e o número total de novas neuroesferas formadas após 7 dias em cultura foi contado (Lee *et al.* (2008) Cancer Cell 13, 69-80; Reynolds e Weiss, (1996) Dev Biol 175, 1-13; Seaberg e van der Kooy, (2002) J Neurosci 22, 1784-1793).

20 1.5 PCR quantitativo em tempo real

O qRT-PCR foi realizado usando sondas Taqman de Applied Biosystems, de acordo com as recomendações do fabricante. As reações foram levadas a cabo em um detector de seqüência ABI 7000 (Perkin Elmer) e os resultados foram expressos como a razão de mudança calculada por meio do método DDCt em relação à amostra de controle ou a 25 primeira amostra quantificada. A unidade ribossomal de 18S ou  $\beta$ -actina foi usada como controle de normalização interna.

#### 1.6 Ensaio de luciferase

As células A172 foram transientemente transfectadas com as construções diferentes de indicador do promotor de LIF e plasmídeo pRL-TK de luciferase de renilla (Promega) 30 como um controle de normalização usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

#### 1.7 Ensaio de tumor intracraniano

As quantidades indicadas de células foram estereotaticamente inoculadas no corpo estriado do hemisfério direito do cérebro (1 mm anterior, 1,8 mm lateral com respeito ao bregma, e 3,0 mm intraparenquimal) de camundongos fêmeas Balbc nu/nu de sete semanas 35 de idade (Charles River Laboratories). Os camundongos foram sacrificados quando apresentaram sintomas neurais ou uma perda de peso significante. Os estudos foram conduzidos pelo imageamento por ressonância magnética (IRM) em um ímã vertical 9,4T

em uma interface com um sistema AVANCE 400 (Bruker). Sob anestesia com xilazina/cetamina, aos camundongos foi dada uma injeção intravenosa de um agente de contraste IRM, ácido pentaacético de dietilenotriamina de gadolínio, em uma dose de 0,25 mmol Gd/kg de peso e foram colocados em um rolo de freqüência de rádio 18 (diâmetro interno, 35 mm). Após o localizador tomar imagens nos três eixos ortogonais, as imagens do cérebro inteiro do camundongo foram adquiridas.

### 1.8 Análises estatísticas

Um teste de correlação de Spearman foi usado para analisar as relações entre *LIF* e *TGFβ2*, *Musashi-1*, *Sox2* e *Nestina*. Os dados nos gráficos são apresentados como a média 10 ± d.p.

### Exemplo 1

#### TGFβ induz a auto-renovação de CIGs derivadas de paciente

Para estudar o efeito de TGFβ sobre a capacidade de auto-renovação de CIGs (células de iniciação de glioma), as células foram obtidas de amostras de GBMs humanos 15 cirurgicamente retirados (glioblastoma multiforme). Da mesma amostra de tumor, por um lado culturas primárias de células tumorais (CPCTs) foram geradas na presença de soro e, em paralelo, as células tumorais foram cultivadas em meio livre de soro na presença de EGF e FGF. As células cultivadas em meio livre de soro suplementado com EGF e FGF rapidamente geraram esferas multicelulares não aderentes (neuroesferas) como foi descrito 20 (Galli *et al.* (2004) Cancer Res 64, 7011-7021; Gunther *et al.*, mencionado acima; Lee *et al.*, (2006) Cancer Cell 9, 391-403; Singh *et al.* (2003) Cancer Res 63, 5821- 5828) (Figura 1A). As neuroesferas geradas das amostras de tumor expressam altos níveis dos marcadores de célula de neuroprogenitor *Musashi-1*, *Sox2* e *Nestina* (Figura 1B), e passaram por diferenciação de multilinhagem adquirindo a expressão de GFAP (marcador de astrócito), 25 Tuj-1 (marcador neuronal), e O4 (marcador de oligodendrócito) quando foram cultivadas na presença de soro (Figura 2). Além disso, as neuroesferas derivadas de tumores foram muito oncogênicas em comparação às CPCTs. As células das neuroesferas e as CPCTs foram ortotopicamente implantadas no cérebro de camundongos imunossuprimidos. O crescimento tumoral foi avaliado por meio de imageamento por ressonância magnética (IRM) e o peso 30 dos camundongos foi monitorado. As células das neuroesferas geraram tumores 30-60 dias após a inoculação, o que causou uma perda de peso intensa, enquanto as CPCTs não cresceram em tumores durante o mesmo intervalo de tempo em todos os casos (Figura 1C). Assim, as neuroesferas geradas de amostras de GBM humanos expressaram marcadores 35 de célula de neuroprogenitor, mostraram diferenciação de multilinhagem potencial, e foram muito oncogênicas. Todas estas características indicaram que as neuroesferas obtidas de GBMs derivadas de pacientes foram enriquecidas em CIGs.

Foi decidido avaliar o efeito de TGFβ sobre a capacidade de auto-renovação de CIGs

seguindo um protocolo bem descrito baseado na capacidade de CIGs para gerar neuroesferas (Reynolds e Weiss, 1996, Dev Biol. 175:1-13; Seaberg e van der Kooy, 2002, J Neurosci 22:1784-1793). As neuroesferas derivadas de pacientes foram desassociadas em células individuais, tratadas com TGF $\beta$  ou deixadas sem tratar durante 7 dias na ausência  
 5 de fatores de crescimento e as neuroesferas recém formadas e o número total de células foram contados. Seguindo este protocolo, o efeito de TGF $\beta$  sobre a capacidade de auto-renovação dos CIGs derivados de três pacientes diferentes foi avaliada. O tratamento com TGF $\beta$  significantemente aumentou o número de neuroesferas e aumentou o número total de células (Figura 1D, 1E, 1F). Estes efeitos foram bloqueados quando um inibidor de receptor  
 10 TGF $\beta$  I (T $\beta$ RI) foi adicionado ao mesmo tempo que TGF $\beta$ . O inibidor de T $\beta$ RI isolado não teve significante efeito (Figura 1D, 1E, 1F). Estes resultados mostraram que a via de TGF $\beta$  aumentou a auto-renovação de CIGs.

#### Exemplo 2

##### TGF $\beta$ induz a expressão de LIF em células de GBM humano

15 Foi decidido investigar os mecanismos moleculares responsáveis pelo efeito de TGF $\beta$  sobre CIGs. As respostas de gene a TGF $\beta$  em células de GBM que poderiam estar envolvidas na regulação da auto-renovação de CIGs foram investigadas. Em um trabalho anterior (Bruna et al., 2007), análises de transcriptoma foram conduzidas na célula U373MG de linhagem de glioma tratada com TGF $\beta$  e/ou um inibidor de T $\beta$ RI. *LIF* estava entre as 63 respostas de gene a TGF $\beta$  em U373MG que era dependente da atividade de T $\beta$ RI. A via de sinalização JAK-STAT LIF-LIFR/gp130 foi implicada na auto-renovação de células-tronco, tanto em células-tronco embrionárias (Niwa et al., 1998, Genes Dev, 12: 2048-2060; Williams et al., 1988, Nature, 336:684-687) e em células neuroprogenitoras (Bauer e Paterson, 2006, J Neurosci, 26:12089-12099; Molne et al., 2000, J Neurosci Res, 59:301-311; Wright et al.,  
 20 2003, J. Neurochem, 86:179-195) e foi hipotetizado que LIF poderia mediar o efeito de TGF $\beta$  sobre CIGs. Foi primeiro determinado se a indução do transcrito de *LIF* mediada por TGF $\beta$  foi observada em células tumorais derivadas de pacientes. Um painel de CPCTs derivada de 11 diferentes GBMs humanos foi tratado com TGF $\beta$  durante 3 horas e os níveis de mRNA de *LIF* foram determinados. TGF $\beta$  induziu LIF em todas as CPCTs ensaiadas (Figura 3A).  
 25 Estes resultados indicaram que a indução de LIF por TGF $\beta$  é um fenômeno comum que ocorre na maioria dos GBMs humanos. Além disso, TGF $\beta$  foi capaz de induzir o transcrito de *LIF* em neuroesferas derivadas de pacientes (Figura 3B) e este efeito foi dependente da atividade de T $\beta$ RI uma vez que a indução de LIF por TGF $\beta$  foi bloqueada na presença de um inibidor de T $\beta$ RI (Figura 3C). Três membros da família de TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, e  
 30 TGF $\beta$ 3) foram capazes de induzir LIF em neuroesferas derivadas de pacientes (Figura 3D) e, como era esperado, a indução do transcrito de *LIF* por TGF $\beta$  resultou em um aumento da secreção da proteína de LIF quando foi medida por meio de ELISA em meio condicionado

de neuroesferas (Figura 3E).

Exemplo 3

TGF $\beta$  induz a expressão de LIF através de um complexo Smad ativado que se liga ao promotor de LIF

5 Para estudar a regulação transcricional de *LIF* por TGF $\beta$ , o promotor de *LIF* humano foi clonado em uma construção repórter básica pGL2. TGF $\beta$  foi capaz de transativar as construções repórter que continham as regiões -634/+32 e -276/+32 do promotor de *LIF* em células U373MG. O fragmento -73/+32 do promotor de *LIF* perdeu a resposta transcricional a TGF $\beta$ , indicando que o elemento de resposta a TGF $\beta$  foi incluído na região -276/-73  
10 (Figura 4A, 4B). Esta região contém um único elemento de ligação de Smad (ELS, 5'GTCT-3') próximo a um sítio de ligação a SP1 (Figura 4A). O ELS foi mutado e foi observado que a resposta a TGF $\beta$  foi eliminada (Figura 4B), indicando que um complexo Smad ativado se liga ao ELS proximal no promotor de *LIF* para induzir a transcrição. Os ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) foram realizados e foi observado que Smad2  
15 endógeno ligado à região proximal do promotor de *LIF* e não à região distal de 4kb a montante da sítio de iniciação de transcrição em células tratadas com TGF $\beta$  (Figura 4C). Para finalmente mostrar que os Smads estão envolvidos na indução da expressão de LIF por TGF $\beta$ , Smad2, Smad3, both Smad2 e 3, e Smad4 foram silenciados usando RNA interferente. A indução de LIF por TGF $\beta$  diminuiu quando Smad2 e Smad3, ou Smad4 foi  
20 diminuído, indicando que um complexo Smad ativado é requerido para a resposta transcricional de *LIF* a TGF $\beta$  (Figura 4D). Smad2 e Smad3 são redundantes neste processo uma vez que o silenciamento de cada Smad separadamente não significantemente afetou os níveis de LIF induzidos por TGF $\beta$  (Figura 4D). Como era esperado, a indução de LIF por TGF $\beta$  em neuroesferas derivadas de pacientes também dependeram de Smad. O  
25 silenciamento de Smad4 em GBM humano cancelou a resposta de LIF a TGF $\beta$  (Figura 4E).

Exemplo 4

TGF $\beta$  induz a via JK-STAT através da indução de LIF em neuroesferas derivadas de pacientes

30 Com a finalidade de distinguir se a via de sinalização de LIF é funcional em neuroesferas de GBM, as neuroesferas foram tratadas com LIF recombinante e os níveis de fosforilação do substrato a jusante do receptor de complexo de LIF, STAT3, foram determinados. LIF recombinante induziu uma rápida fosforilação de STAT3, indicando que as neuroesferas derivadas de pacientes expressam um receptor funcional de complexo de LIF (Figura 5A). Além disso, a indução de p-STAT3 foi prevenida pela presença de uma  
35 piridona tetracíclica 6 (P6) farmacológica específica a JAK (Pedranzini et al., 2006, Cancer Res, 66: 9714-9721; Thompson et al., 2002, Bioorg Med Chem Lett, 12:1219-1223) (Figura 5B). De maneira interessante, TGF $\beta$  induziu a fosforilação de STAT3 em neuroesferas de

GBM e o inibidor de T $\beta$ RI preveniu esse efeito (Figura 5C). Foi decidido avaliar se LIF estava mediando a indução de p-STAT3 por TGF $\beta$ . Para este propósito, um anticorpo de neutralização contra LIF foi usado para especificamente bloquear o efeito de LIF secretado em células tratadas com TGF $\beta$ . A presença do anticorpo de neutralização de LIF diminuiu a indução de p-STAT3 por TGF $\beta$ . Além disso, os níveis de p-STAT3 em células tratadas com TGF $\beta$  foram represados por meio do tratamento com P6 (Figura 5D). Estes resultados indicaram que TGF $\beta$  foi capaz de ativar a via JAK-STAT em neuroesferas derivadas de pacientes através da indução da secreção de LIF que agiu por meio de um loop autócrino/parácrino.

10 Exemplo 5

LIF media a indução da auto-renovação de CIGs por TGF $\beta$

Foi decidido avaliar se LIF e via JAK-STAT mediaram o aumento de auto-renovação de CIGs por TGF $\beta$ . Para este propósito, o anticorpo de neutralização contra LIF e P6 foi usado para especificamente bloquear o efeito do LIF secretado em células tratadas com TGF $\beta$ . As neuroesferas foram desassociadas em células individuais e foram tratadas com TGF $\beta$ , LIF recombinante, anticorpo anti-LIF e/ou P6. As neuroesferas recém formadas e o número total de células foram contados. LIF recombinante aumentou a quantidade de neuroesferas recém formadas bem como o número total de células, indicando que LIF induz a auto-renovação de CIGs (Figura 6A, 6B, 6C). O tratamento com o anticorpo de neutralização de LIF diminuiu a indução da auto-renovação de CIGs por TGF $\beta$ . Além disso, P6 represou o efeito de TGF $\beta$  sobre a auto-renovação de CIGs, indicando que o efeito do TGF $\beta$  sobre a auto-renovação foi dependente da atividade de JAK (Figura 6A, 6B, 6C). Como um todo, estes dados mostraram que TGF $\beta$  induziu a capacidade de auto-renovação de CIGs derivados de pacientes através da via LIF-JAK-STAT.

25 Exemplo 6

TGF $\beta$  previne a diferenciação de CIGs através de LIF

As neuroesferas derivadas de GBMs cresceram na ausência de fatores de crescimento e semeadas em placas revestidas com poli-L-lisina tendem a diferenciar perdendo a expressão dos marcadores neuroprogenitores Musashi-1, Sox2 e Nestina, e 30 estando aderidas à placa de cultura. Foi decidido avaliar o efeito de TGF $\beta$  e LIF sobre este processo de diferenciação. As neuroesferas foram cultivadas na presença de TGF $\beta$  ou LIF sem EGF ou FGF durante 7 dias e subseqüentemente processadas para coloração por imunohistoquímica e ensaios qRT-PCR para determinar os níveis dos marcadores de neuroprogenitores *Musashi-1*, *Sox2* e *Nestina*. As neuroesferas tratadas com TGF $\beta$  ou LIF 35 diferiram morfológicamente das células de controle em que aderiram menos à placa de cultura, mantendo a estrutura esférica. Além disso, as células tratadas com TGF $\beta$  ou LIF mantiveram a expressão de *Musashi-1*, *Sox2* e *Nestina* detectada por meio de ensaios de

imunocitoquímica (Figura 7A) e quantificada por meio de qRT-PCR (Figura 7B). Isto indicou que TGF $\beta$  e LIF são fatores que não somente regulam a auto-renovação de CIGs, mas estão também envolvidos na prevenção da diferenciação de CIGs.

#### Exemplo 7

##### 5 Efeito de TGF $\beta$ e LIF on neuroprogenitores humanos normais

Estes dados indicaram que TGF $\beta$  e LIF estavam regulando a auto-renovação e diferenciação de CIGs. Foi decidido avaliar se este efeito foi específico a células tumorais ou estava também presente em células neuroprogenitoras normais. Para responder esta questão, células neuroprogenitoras foram obtidas de amostras de córtex cerebral fetal humano (desde 12 até 16 semanas após a concepção). Como foi anteriormente descrito (Carpenter *et al.*, 1999, Exp Neurol, 158: 265-278; Poltavtseva *et al.*, 2002, Brain Res Dev Brain Res, 134: 149-154; Wright *et al.*, 2003, J Neurochem, 86: 179-195), neuroprogenitores humanos geraram neuroesferas quando foram crescidos em meio livre de soro suplementado com EGF e FGF e estas neuroesferas expressaram Musashi-1, Sox2 e Nestina de maneira similar a neuroesferas de GBM (Figura 8A). Em primeiro lugar, foi determinado se TGF $\beta$  induziu LIF em neuroprogenitores humanos normais. As neuroesferas normais não induziram LIF em resposta a TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 ou TGF $\beta$ 3 em comparação com neuroesferas de GBM (Figura 8B). Além disso, TGF $\beta$  não induziu LIF em neuroprogenitores de camundongo obtidos de embriões de camundongo ou da área subventricular de camundongos adultos (dados não mostrados). Isto indicou que a indução de LIF por TGF $\beta$  é específica a neuroesferas de GBM. Como era esperado, uma vez que TGF $\beta$  não induziu LIF, TGF $\beta$  não aumentou a capacidade de auto-renovação de neuroprogenitores normais e o número e tamanho das neuroesferas de neuroprogenitor não aumentou pelo tratamento com TGF $\beta$ . De fato, as neuroesferas tratadas com TGF $\beta$  eram menores e o número total de células tinha diminuído devido à presença de TGF $\beta$  (Figura 8C, 8D). Por outro lado, LIF aumentou o número e tamanho das neuroesferas recém formadas bem como o número total de células (Figura 8C, 8D) de acordo com artigos anteriores (Bauer e Patterson, 2006; Wright *et al.*, 2003). Assim, LIF tem o mesmo efeito sobre a auto-renovação em GBM e neuroesferas normais. Pelo contrário, existe uma diferença no efeito de TGF $\beta$  sobre a capacidade de auto-renovação de normal e tumor neuroesferas devido à incapacidade de TGF $\beta$  de induzir LIF normal em neuroprogenitores.

#### Exemplo 8

##### A expressão de LIF em gliomas humanos é correlacionada com TGF $\beta$ 2 e marcadores de neuroprogenitor

35 Para avaliar se LIF foi expresso em gliomas humanos, os níveis de LIF em um painel de 39 gliomas foram analisados. Foi observado que LIF foi expresso em 17 e era altamente expresso em 4-6 dos 39 gliomas (Figura 9A), indicando que uma grande proporção de

gliomas humanos expressou LIF. Uma vez que LIF é induzido por TGF $\beta$  e foi encontrado em trabalhos anteriores que TGF $\beta$ 2 é responsável pela alta atividade de TGF $\beta$  observada em gliomas (Bruna *et al.*, 2007, mencionado acima), foi avaliado se o TGF $\beta$ 2 estava envolvido na expressão de LIF. De fato, os níveis de LIF foram correlacionados com TGF $\beta$ 2 no painel de gliomas, adicionalmente suportando o fato de que TGF $\beta$ 2 é responsável pela indução de LIF em gliomas humanos (Figura 9A, B). Se LIF promove a auto-renovação de CIGs, o grupo deste tipo de células deveria ser enriquecido em tumores que expressam altos níveis de LIF. Para testar esta hipótese, os níveis de LIF foram comparados com a expressão de CIG/marcadores de neuroprogenitor. Os níveis de LIF correlacionaram com a expressão de Musashi-1 e Nestina, mas não de Sox2 (Figura 9A, B), indicando que LIF fomenta a auto-renovação de CIG e aumenta o grupo de CIGs presente na massa tumoral.

#### Exemplo 9

##### Pacientes com glioma ou glioblastoma têm uma expectativa de vida global mais curta

Em um subconjunto de todos os pacientes com glioma, os níveis de LIF são supra-regulados  $\geq 2$  vezes. Durante um determinado período de tempo, aqueles pacientes têm uma probabilidade significantemente reduzida de sobrevivência em comparação com pacientes de controle. Por exemplo, a probabilidade de sobrevivência após 1000 dias é reduzida a aproximadamente 50% em comparação com todos os pacientes com glioma, e a aproximadamente 35% em comparação com pacientes com glioma com níveis de LIF não supra-regulados  $\geq 2$  vezes (Figura 10). Dados obtidos de programa *REpository for Molecular BRAin Neoplasia Data* (REMBRANDT) do National Cancer Institute.

Em um subconjunto de todos pacientes com glioblastoma, níveis de LIF são supra-regulados  $\geq 9$  vezes. Durante um determinado período de tempo, aqueles pacientes têm uma probabilidade significantemente reduzida de sobrevivência em comparação com pacientes de controle. Por exemplo, a probabilidade de sobrevivência após 500 dias é reduzida a aproximadamente 50% em comparação com todos pacientes com glioblastoma (Figura 11). Dados obtidos de programa *REpository for Molecular BRAin Neoplasia Data* (REMBRANDT) do National Cancer Institute.

#### Exemplo 10

##### Níveis de mRNA de LIF são anormalmente altos em diversos tipos de tumores

Alguns pacientes de certos tipos de tumor têm níveis aberrantemente altos de LIF, como indicado pelos níveis aberrantemente altos de mRNA de LIF (Figura 12). Dados obtidos da equipe de bioinformática de GeneSapiens ([www.genenesapiens.org](http://www.genenesapiens.org)).

Isto indica que LIF poderia proporcionar uma vantagem seletiva na progressão de diferentes tipos de tumores. Os tipos de tumor onde  $\geq 10$  dos pacientes testados têm níveis de mRNA de LIF acima da barra de erro são: leucemia linfática aguda de célula pré-B (B-ALL), leucemia mielóide aguda (AML), glioma, adenocarcinoma de pulmão, carcinoma

colorretal, câncer de bexiga, câncer ductal de mama e carcinoma de mama.

Em aqueles pacientes com tumores que expressam altos níveis de LIF, LIF pode agir como um fator oncogênico através da regulação de células-tronco de câncer. Assim, o bloqueio de LIF poderia ser benéfico neste conjunto de tumores, e LIF pode também ser usado como um fator de diagnóstico e/ou um prognóstico naqueles pacientes.

5

## REIVINDICAÇÕES

1. Agente inibidor para o tratamento de câncer, **caracterizado por** o câncer apresentar uma concentração de LIF a qual é pelo menos maior que 5% do que aqueles que ocorrem em uma amostra de controle, e em que o dito agente inibidor ser um anticorpo anti-LIF e/ ou um siRNA contra LIF.
2. Agente inibidor de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o dito agente inibidor ser um anticorpo anti-LIF.
3. Agente inibidor de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, **caracterizado por** o dito câncer ser selecionado de tumor de mama, coração, pulmão, intestino delgado, cólon, baço, bexiga, cabeça, pescoço, ovário, cérebro, pancreático, pele, osso, medula óssea, sangue, timo, uterino, testicular e fígado.
4. Método *in vitro* para selecionar pacientes sofrendo de câncer para ser tratado com agente inibidor de LIF **caracterizado por**:
  - (i) quantificar os níveis de expressão de LIF no dito paciente; e
  - (ii) comparar os ditos níveis de expressão com níveis de controle, em que se os níveis de expressão do LIF no dito paciente são maiores do que os valores de controle, então o dito paciente é selecionado para receber o tratamento com um agente inibidor de LIF.
5. Método *in vitro* para o prognóstico de expectativa de vida de sujeitos que sofrem de câncer, **caracterizado por** compreender a quantificação dos níveis de expressão do gene que codifica LIF ou da proteína codificada pelo dito gene em uma amostra biológica do dito sujeito, em que um aumento da expressão do gene que codifica LIF ou da proteína codificada pelo dito gene, com respeito à expressão do gene que codifica LIF ou da proteína codificada pelo dito gene em uma amostra de controle, é indicativo de uma expectativa de vida reduzida.
6. Método *in vitro* para o diagnóstico de glioma em um sujeito, **caracterizado por** quantificar os níveis de expressão do gene que codifica LIF ou da proteína codificada pelo dito gene em uma amostra biológica do dito sujeito, em que um aumento da expressão do gene que codifica o LIF ou da proteína codificada pelo dito gene, com relação à expressão do gene que codifica o LIF ou da proteína codificada pelo dito gene em uma amostra de controle, é indicativo de glioma.
7. Método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, **caracterizado por** a quantificação dos níveis de expressão do gene que codifica LIF compreender a quantificação do RNA mensageiro (mRNA) do dito gene, um fragmento do dito mRNA, DNA complementar (cDNA) do dito gene, um fragmento do dito cDNA, ou misturas dos mesmos.
8. Método *in vitro* de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado por** a

quantificação dos níveis de expressão do gene que codifica o LIF ser realizada por meio de uma reação em cadeia de polimerase quantitativa (PCR).

9. Método *in vitro* de acordo com qualquer das reivindicações 4 a 6, **caracterizado por** a quantificação dos níveis de proteína ser realizada por meio de Western blot, imunohistoquímica, ELISA ou por meio de determinação da atividade da dita proteína.

10. Método *in vitro* para a identificação de compostos capazes de bloquear/inibir a proliferação celular de células tumorais induzida por LIF, **caracterizado por** compreender as etapas de:

- (i) contatar uma célula que expressa o receptor para LIF com LIF e um composto candidato, e
- (ii) identificar aqueles compostos que bloqueiam a proliferação celular da dita célula.

11. Método *in vitro* de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado por** a célula que expressa o receptor para LIF ser uma célula de glioma, preferivelmente uma célula de iniciação de glioma (GIC).

12. Uso de um kit **caracterizado por** compreender reagentes para a quantificação dos níveis de expressão do gene que codifica LIF ou da proteína codificada pelo dito gene para o diagnóstico de câncer em um sujeito ou para determinar a predisposição de um sujeito de sofrer do dito câncer, ou para determinar o estágio ou gravidade do dito câncer em um sujeito, ou para monitorar o efeito da terapia administrada a um sujeito com o dito câncer, no qual se os reagentes detectarem um aumento na expressão do dito gene ou da dita proteína com respeito a uma amostra de controle, então o dito sujeito poderia sofrer de câncer, ou apresentar uma maior predisposição de sofrer do dito câncer, ou apresentar uma maior gravidade do dito câncer, ou a terapia administrada não estaria sendo eficaz.

13. Agente inibidor de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 ou o método *in vitro* de acordo com reivindicação 4 **caracterizado por** o dito agente agir através da inibição da auto-regeneração de células tronco tumorais.

14. Método *in vitro* de acordo com qualquer das reivindicações 4 a 13, **caracterizado por** o agente inibidor ser selecionado do grupo que consiste em siRNAs, oligonucleotídeos antisenso, ribozimas específicas, anticorpos, polipeptídeos e inibidores de ligação a receptor de citocina.

15. Método *in vitro* de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado por** os anticorpos serem anticorpos inibidores específicos para LIF ou anticorpos que bloqueiam os receptores de LIF.

16. Agente inibidor de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6 e 13 a 15, ou kit de

acordo com a reivindicação 12 **caracterizado por** o dito câncer ser causado por uma alta atividade da via de sinalização JAK-STAT.

17. Agente inibidor de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 13 a 16, método *in vitro* de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 7 e 13 a 15,

5 **caracterizado por** o dito câncer ser um dos seguintes: glioma, leucemia linfoblástica aguda de célula pré-B, leucemia mielóide aguda, carcinoma colorretal, câncer de bexiga, câncer ductal de mama ou carcinoma de mama.

18. Agente inibidor ou método *in vitro* de acordo com a reivindicação 17 **caracterizado por** o dito glioma ser glioma de grau IV.

10 19. Composição farmacêutica **caracterizada por** compreender uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente inibidor de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, 13, 16 e 18 juntamente com um transportador farmaceuticamente aceitável.

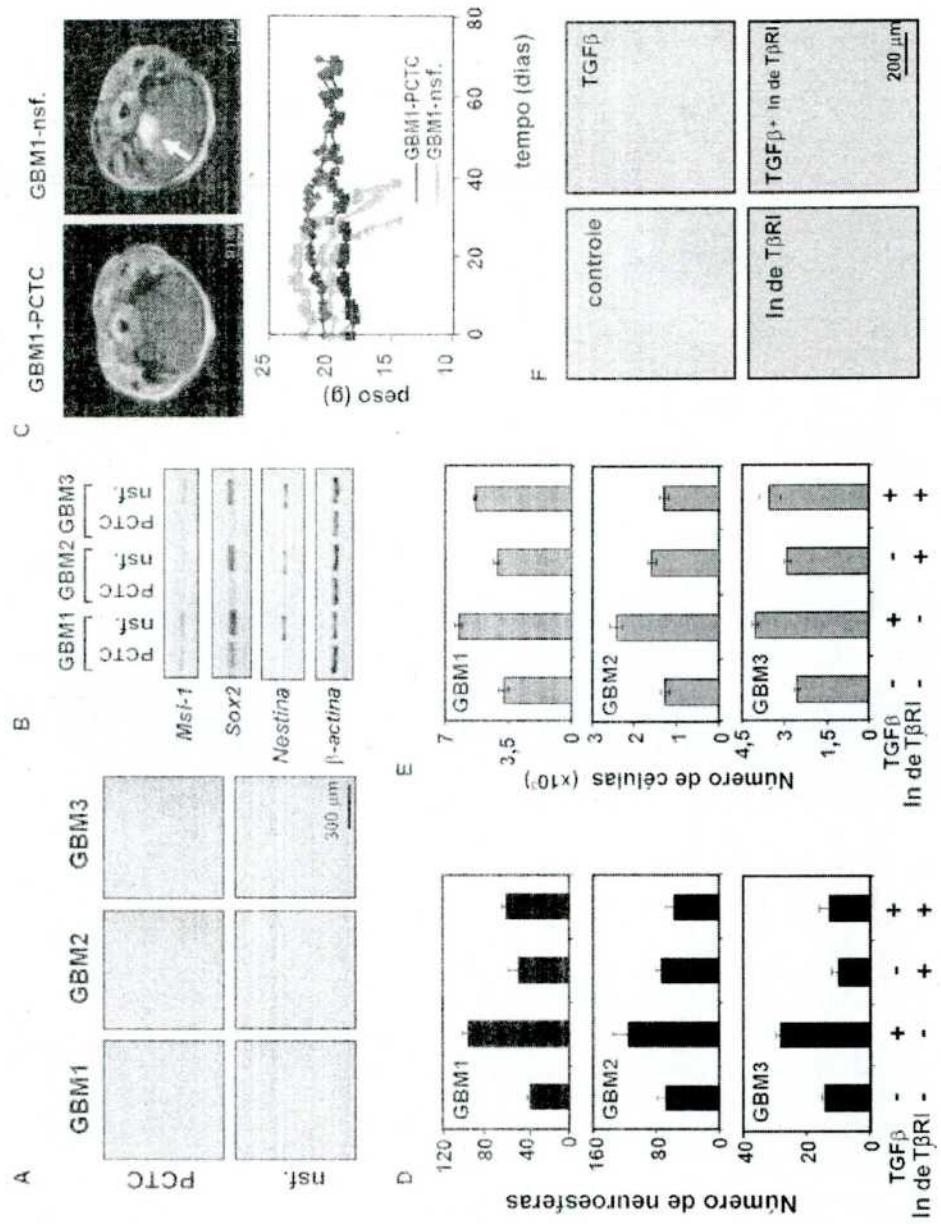


FIGURA 1

Neuroesferas de GBM1  
diferenciadas em soro

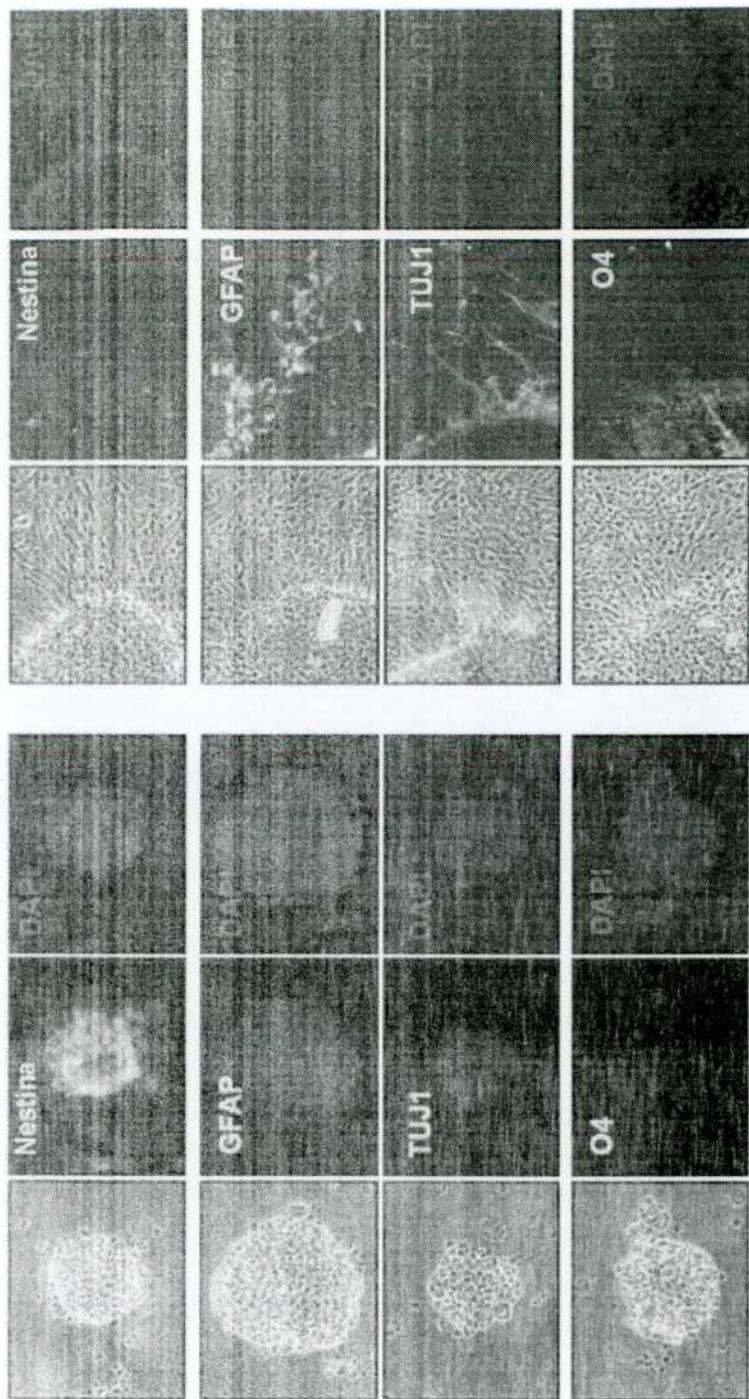
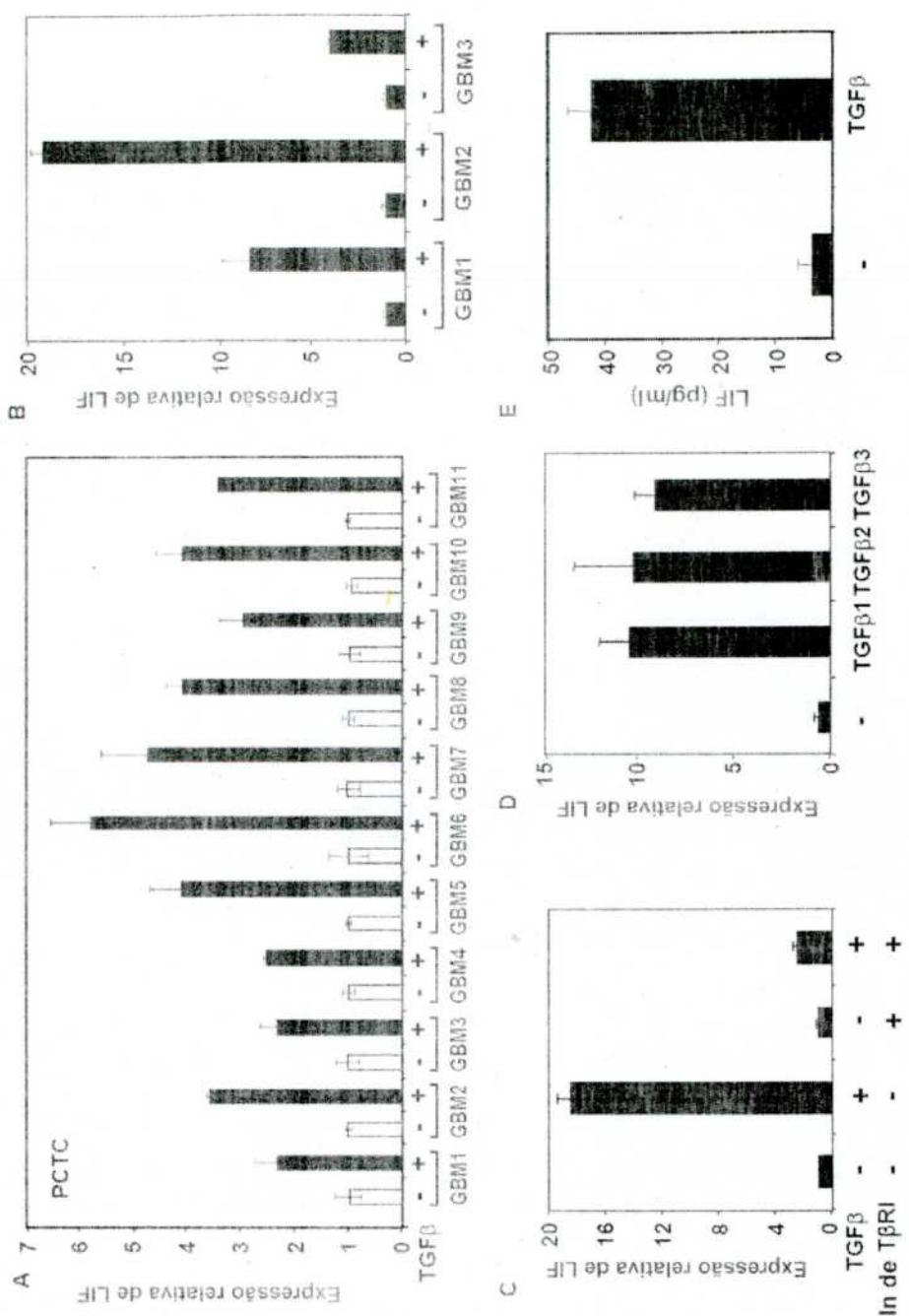


FIGURA 2



### FIGURA 3

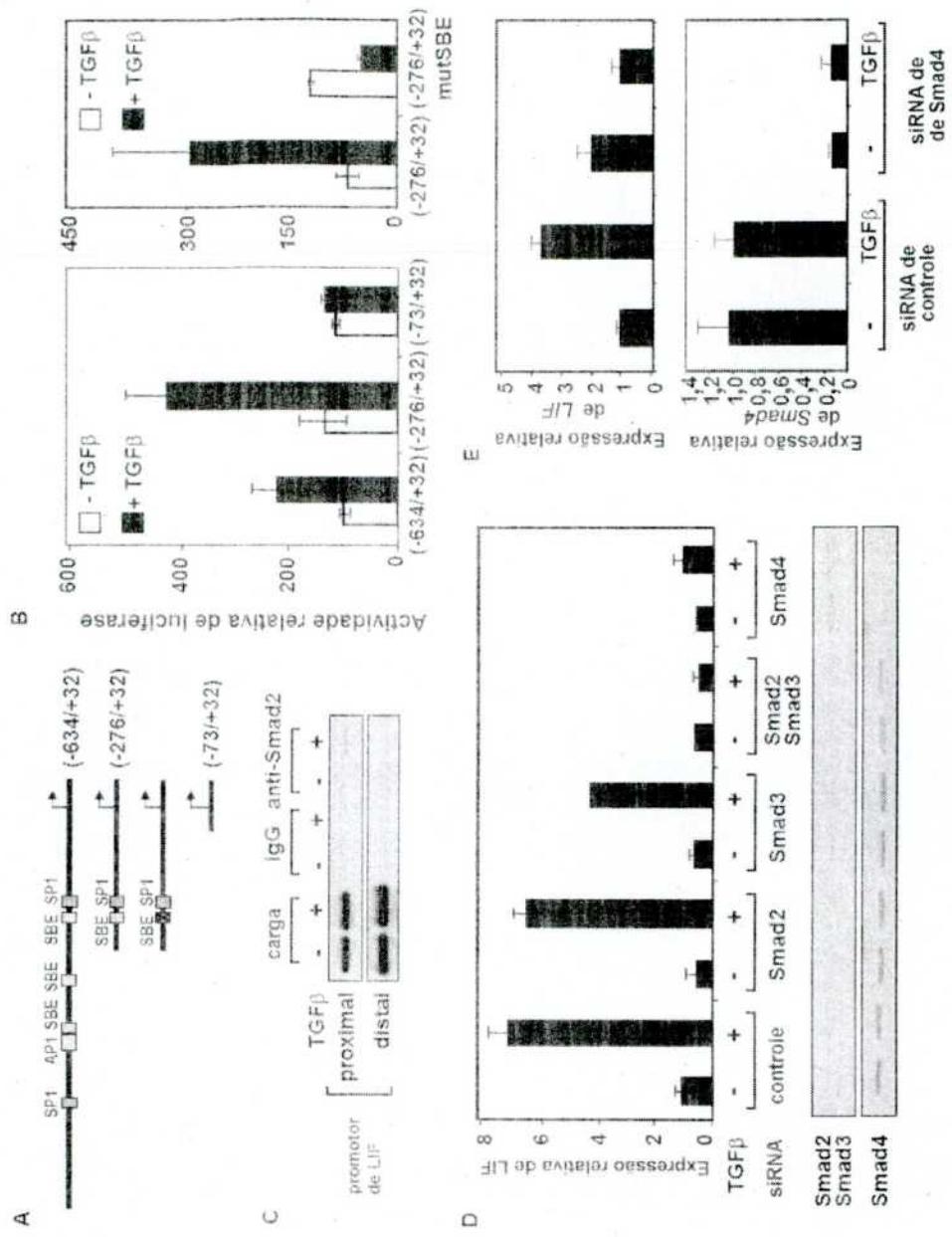


FIGURA 4

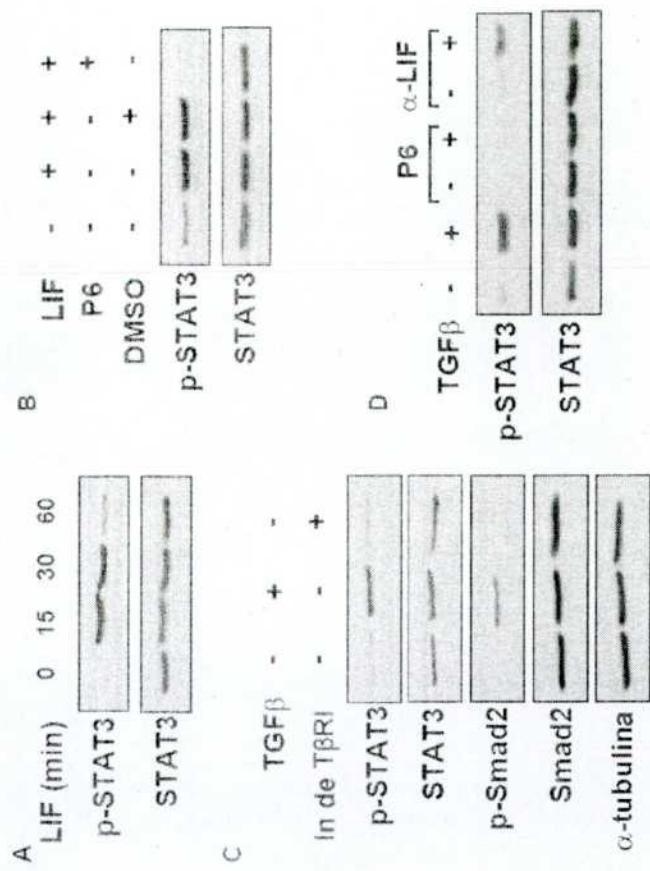


FIGURA 5

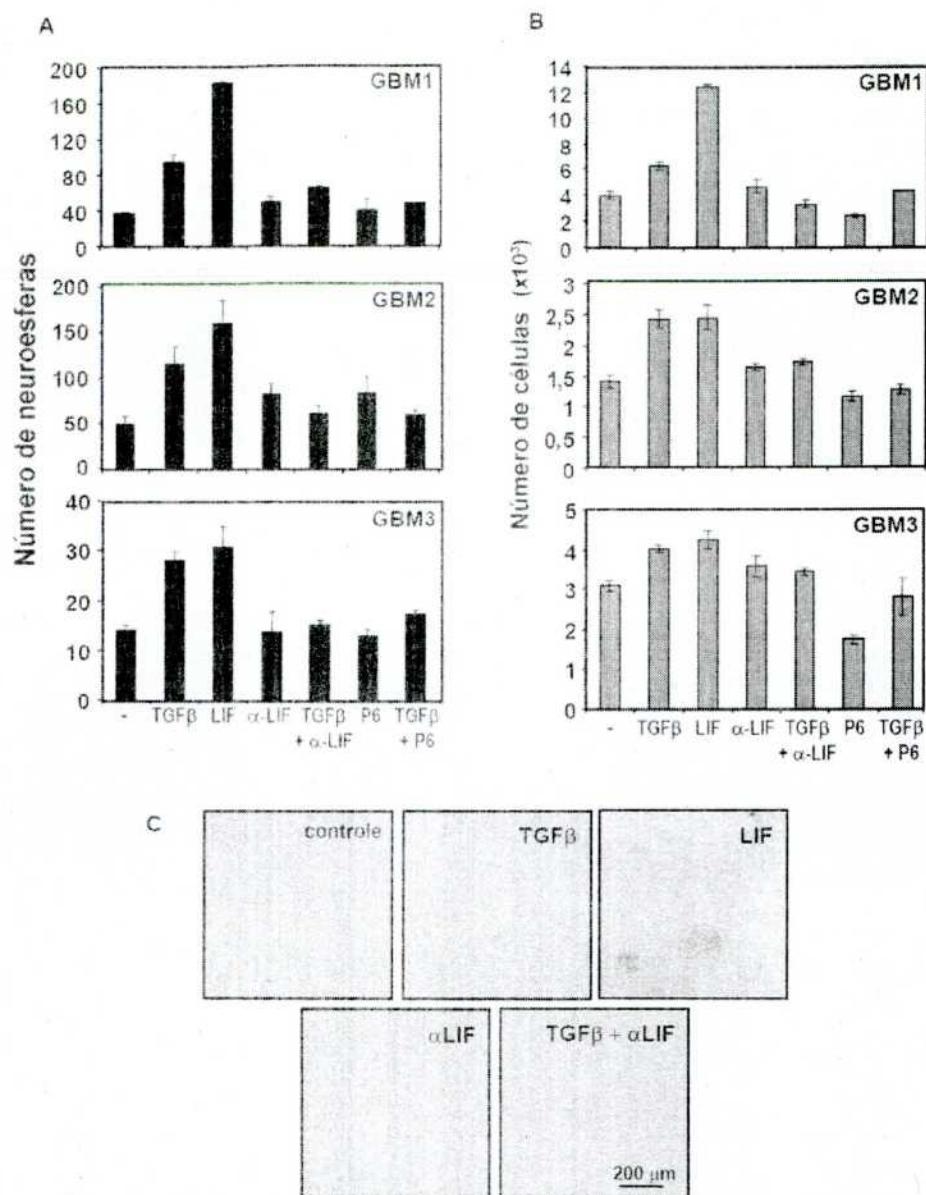


FIGURA 6

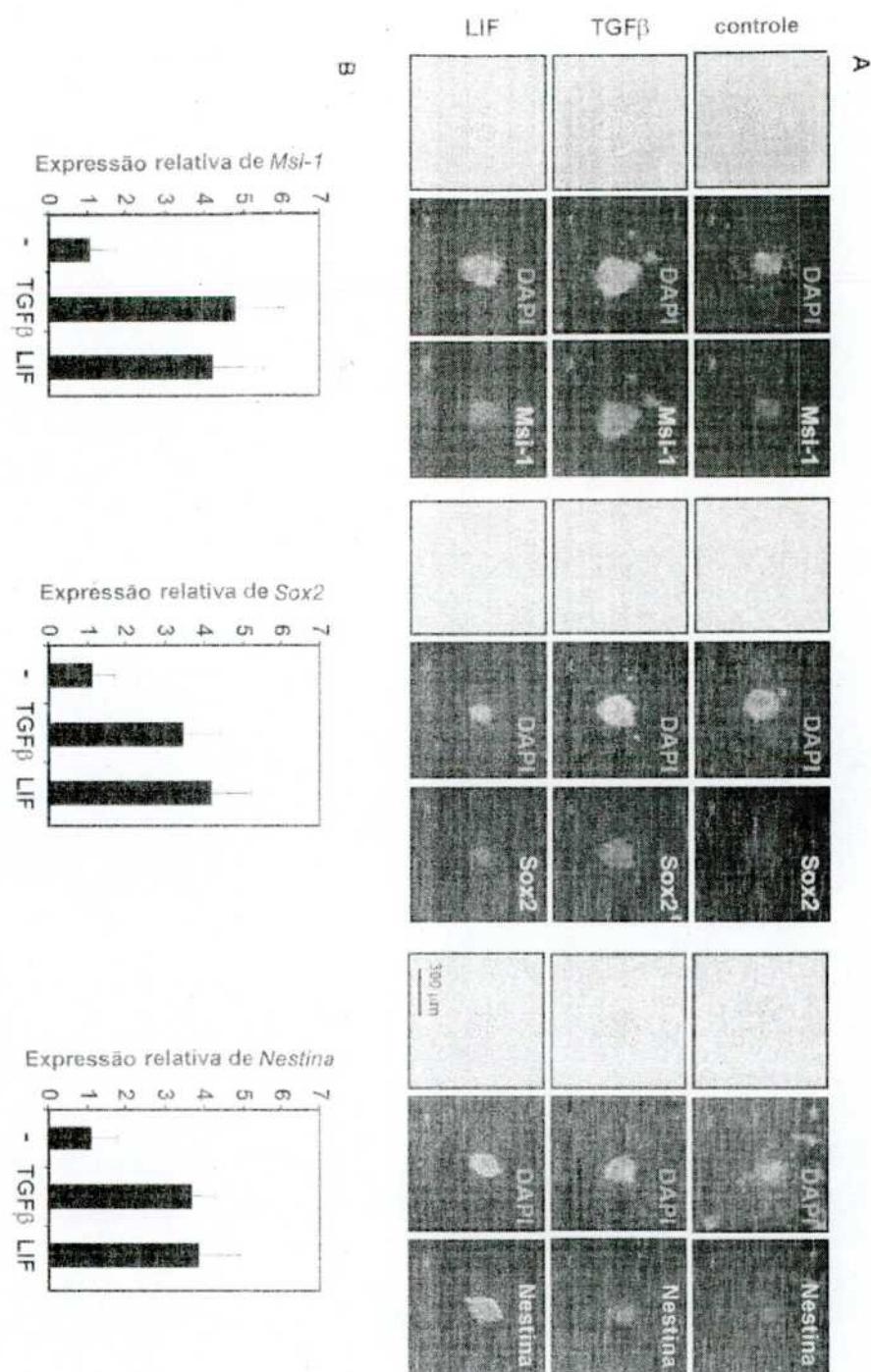


FIGURA 7

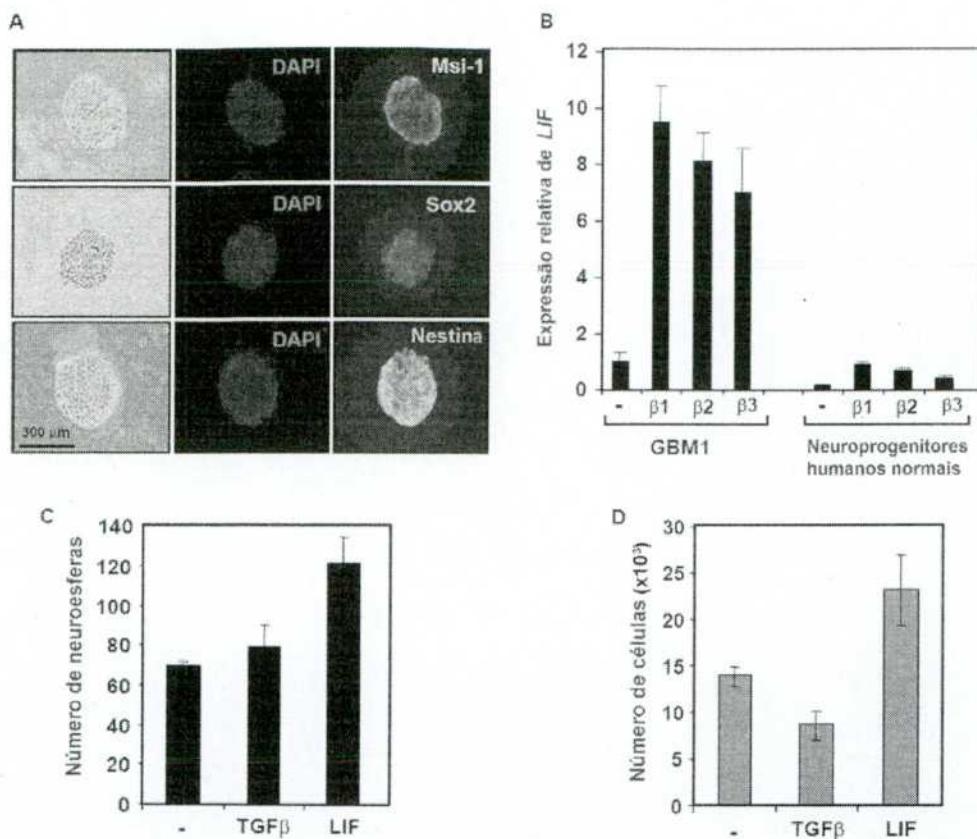


FIGURA 8

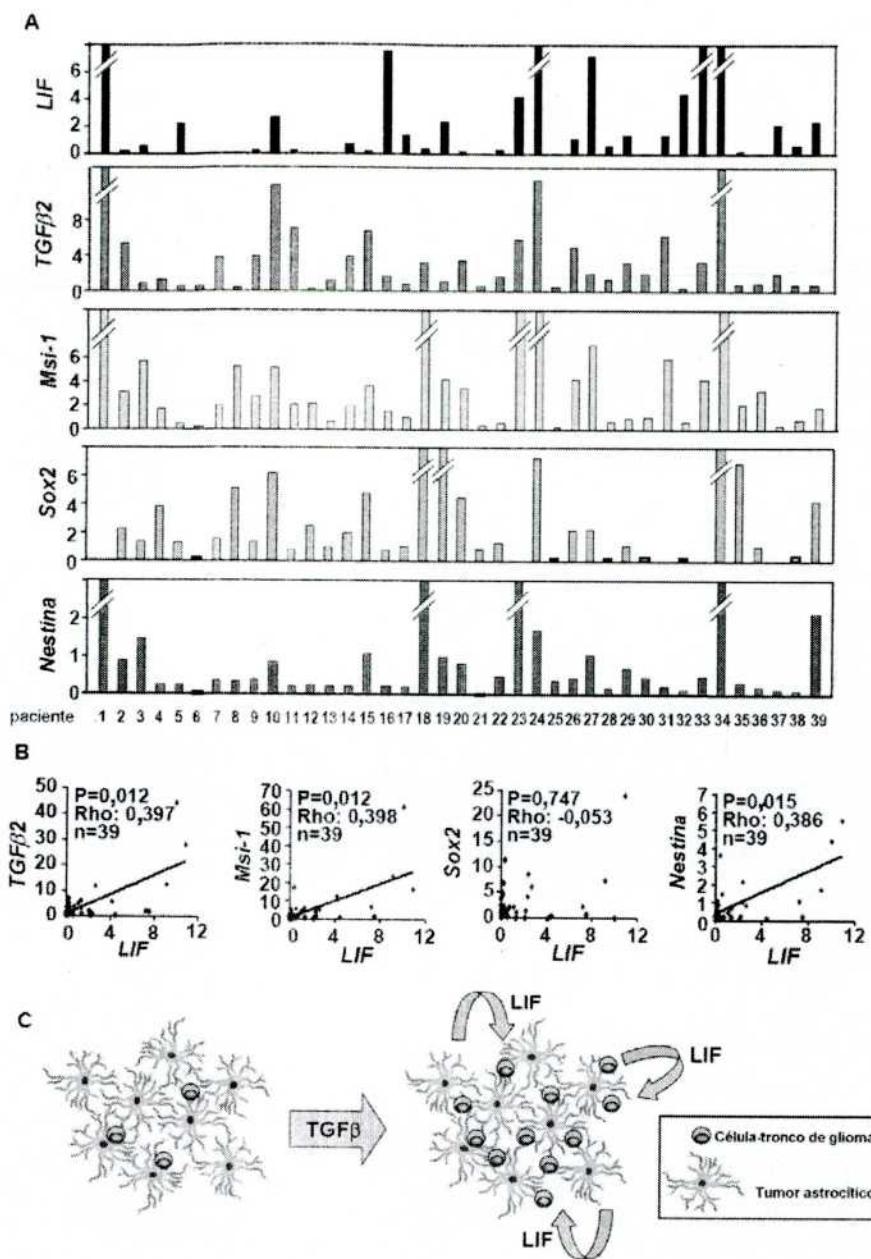


FIGURA 9

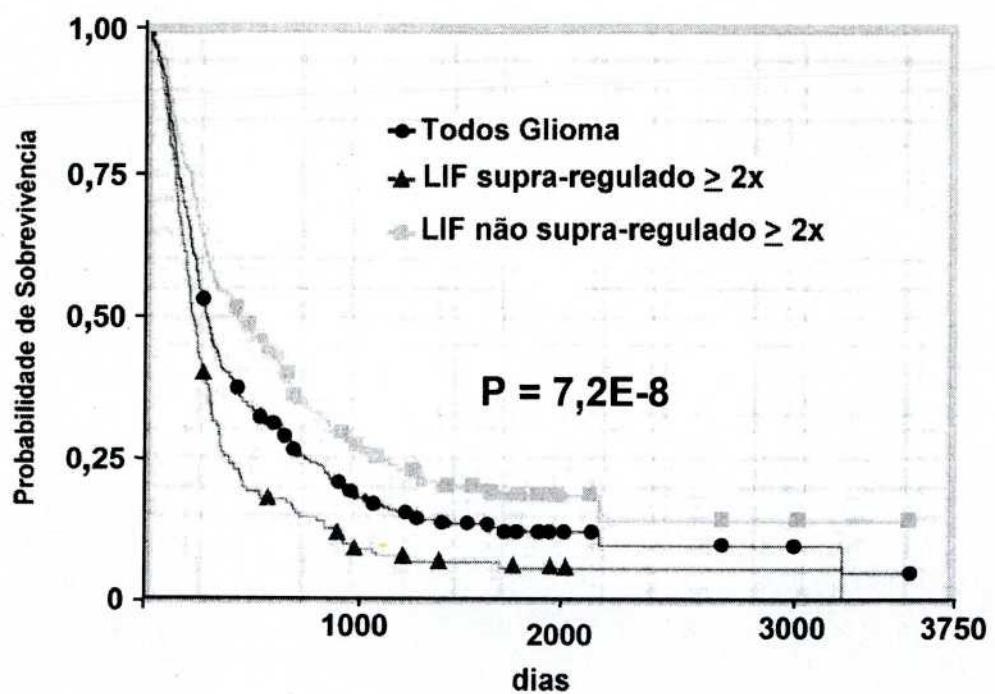


FIGURA 10

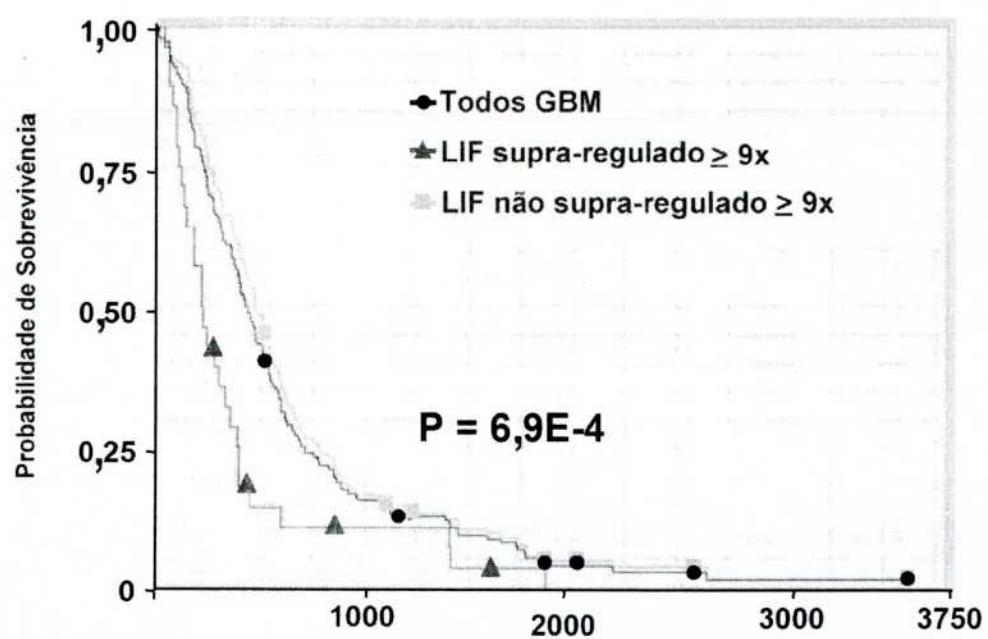


FIGURA 11

Resumo da Patente de Invenção para: “**AGENTES TERAPÊUTICOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS ASSOCIADAS À PROLIFERAÇÃO CELULAR INDESEJADA**”.

A invenção é baseada na observação de que LIF é capaz de ativar a auto-renovação de células tronco tumorais em câncer, em particular gliomas, o que indica que a inibição de LIF, e geralmente de citocinas do tipo IL-6, pode ser usada em composições terapêuticas para o tratamento de doenças associadas à proliferação indesejada. A invenção também se refere a um método para a identificação de compostos capazes de bloquear/inibir a proliferação de células tronco, e a um método *in vitro* para o diagnóstico de doenças associadas à proliferação celular indesejada em um sujeito ou para determinar a predisposição de um sujeito de sofrer a dita doença associada à proliferação celular indesejada, ou para o prognóstico de expectativa de vida média de sujeitos que sofrem dos ditos tumores.