



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

(11) PI 1012526-4 B1



(22) Data do Depósito: 01/03/2010

(45) Data de Concessão: 06/04/2021

(54) Título: USO DE AXL COMO UM BIOMARCADOR PARA A DETECÇÃO DA OCORRÊNCIA DE TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL (TEM), MÉTODOS PARA DETECÇÃO DA OCORRÊNCIA DE TEM, PARA IDENTIFICAÇÃO DE UM AGENTE CAPAZ DE INIBIR OU REVERTER TEM E USO DE UM KIT

(51) Int.Cl.: C12Q 1/68; G01N 33/574.

(30) Prioridade Unionista: 10/07/2009 GB 0912074.2; 13/03/2009 GB 0904418.1.

(73) Titular(es): BERGEN TEKNOLOGIOVERFORING AS.

(72) Inventor(es): JAMES BRADLEY LORENS; DAVID ROBERT MICKLEM; LARS AKSLEN.

(86) Pedido PCT: PCT IB2010000516 de 01/03/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/103388 de 16/09/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 13/09/2011

(57) Resumo: USO DE AXL COMO UM BIOMARCADOR PARA A DETECÇÃO DA OCORRÊNCIA DE TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL (TEM), MÉTODOS PARA DETECÇÃO DA OCORRÊNCIA DE TEM, PARA IDENTIFICAÇÃO DE UM AGENTE CAPAZ DE INIBIR OU REVERTER TEM, USO DE UM KIT, MÉTODO, USO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA OU KIT, BEM COMO MÉTODO DE PROGNÓSTICO. A presente invenção refere-se ao uso de Axl como um biomarcador para a detecção da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM) em um indivíduo. Mais especificamente, a invenção refere-se a vários métodos para a detecção da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM) em um indivíduo por medição de expressão e/ou atividade de Axl.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "USO DE AXL COMO UM BIOMARCADOR PARA A DETECÇÃO DA OCORRÊNCIA DE TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL (TEM), MÉTODOS PARA DETECÇÃO DA OCORRÊNCIA DE TEM, PARA IDENTIFICAÇÃO DE UM AGENTE CAPAZ DE INIBIR OU REVERTER TEM E USO DE UM KIT".

[0001] A presente invenção refere-se um biomarcador e a método de diagnóstico/prognóstico para a detecção da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM). Mais especificamente, a invenção refere-se a métodos de diagnóstico, de prognóstico e terapêutico que envolvem a expressão e/ou atividade de Axl.

Antecedentes da Invenção

[0002] Axl é um membro do receptor da sub-família de quinase de tirosina. Embora similar a outro receptor de cinases de tirosina, a proteína de Axl representa uma única estrutura da região extracelular que justapõe IgL e FNIII repete, e tem uma região extracelular contendo um domínio intracelular, cuja parte é o domínio de quinase. Axl transduz sinais a partir da matriz extracelular no citoplasma por ligação de fatores de crescimento como gene específico de aprisionamento de crescimento de proteína dependente da vitamina K 6 (Gas6). O domínio extracelular de Axl pode ser clivado e um domínio extracelular solúvel de 65 kDa pode liberado. Clivagem aumenta mudança de receptor e gera uma quinase parcialmente ativada (O'Bryan JP, e outros (1995) J Biol Chem. 270 (2): 551-557). No entanto, a função do domínio clivado é desconhecida.

[0003] Informação estrutural com relação ao produto de gene e gene de Axl de ser humano é descrito na WO 03/068983. As seguintes publicações de patentes também referem-se a Axl ou outros receptores de quinase de tirosina: a patente de U.S. nº 5.468.634; a patente de U.S. nº 6.087.144; a patente de U.S. nº 5.538. 861; a patente de

U.S. nº 5.968. 508; a patente de U.S. nº 6.211.142; a patente de U.S. nº 6.235.769; WO 99/49894; WO 00/76309; WO 01/16181 e WO 01/32926. Axl está envolvido no estímulo de proliferação celular. Especificamente, Axl é um oncogene associado a leucemia mielógena crônica, isto é, está também associada a câncer de cólon e melanoma. Está na vizinhança próxima ao oncogene de bcl3 que está em 19q13.1-q13.2. O gene de Axl é evolutivamente conservado entre a espécie vertebrada, e é expresso durante o desenvolvimento no mesênquima.

[0004] Na interação com o ligante de Gas6, Axl se torna autofosforilado, e uma cascata de eventos de transdução de sinal ocorre. PI3K, AKT, src, Bad, 14-3-3, PLC, ERK, S6K (quinase regulada por mitógeno) e STAT são cada um conhecido como estando envolvido nessa cascata. Gas6 tem uma região rica com ácido γ -carboxiglutâmico (domínio de GLA) que permite ligação dependente de Ca^{++} a fosfolipídios de membrana. Gas6 é um mitógeno fraco e tem um efeito antiapoptótico nos fibroblastos de NIH3T3 sujeitos a tensão por citotoxicidade induzida por TNF, ou retirada de fator de crescimento. No NIH3T3 a ligação de Gas6 a Axl resulta na ativação de PI3K, AKT, src e Bad.

[0005] Estudos mostraram que Axl desempenha numerosas funções diferentes na formação de tumor. Axl é uma chave reguladora de comportamentos angiogênico incluindo migração de célula endotelial, proliferação e formação de tubo. Axl é também necessário para células de carcinoma de mama de ser humano para formar um tumor *in vivo*, indicando que Axl regula processos que são vitais para tanto neovascularização quanto tumorigênese (Holland S. e outros, Cancer Res 2005; 65 (20), 15 de outubro de 2005).

[0006] A atividade de receptor de Axl de quinase de tirosina está positivamente correlacionada com metástase de tumor. Mais especificamente, estudos mostraram que Axl aumenta expressão de MMP-9, que é exigido para a invasão mediada por Axl. Axl promove invasão

celular por indução da atividade de MMP-9 através da ativação de NF-BK e Brg-1 (Tai, K-Y e outros, Oncogene (2008), 27, 4044-4055).

[0007] Axl é ultraexpresso em células de glioma de ser humano e pode ser usado para prever prognóstico baixo em pacientes com Glioblastoma Multiforme (GBM) (Vajkoczy P. e outros, PNAS, 11 de abril de 2006, vol 103, nº15, 5799-5804; Hutterer M. e outros, Clinical Cancer Res 2008; 14 (1) 1 Jan de 2008;). Axl é também relativamente ultraexpresso em linhas de células de câncer de pulmão altamente invasivas em comparação com seus correspondentes minimamente invasivos (Shieh, Y-S e outros, Neoplasia, vol 7, nº 12, Dez 2005, 1058-1064). Acredita-se que Axl, portanto, desempenhe um papel importante na progressão e invasão de tumor.

[0008] Do mesmo modo, Axl é expresso em células de câncer de mama altamente invasivas, mas não em células de câncer de mama de baixa invasividade. Mais especificamente, inibição de sinalização de Axl (por mutante de Axl negativo dominante, um anticorpo contra o domínio extracelular de Axl, ou por supressão de RNA de grampo de cabelo curto de Axl) diminuiu a motilidade e invasibilidade de células de câncer de mama altamente invasivas. Inibidores de Axl de molécula pequena interferiram com a motilidade e invasibilidade de células de câncer de mama. Assim, Axl é entendido como sendo um elemento crítico na rede de sinalização que governa a motilidade /invasibilidade de células de câncer de mama (Zhang, Y-X e outros, Cancer Res 2008; 68 (6), 15 de março de 2008).

[0009] Nas células mesangiais, Gas6 demonstrou ter um efeito mitogênico, indicativo de um papel possível na progressão de glomeruloesclerose. Evidência sugeriu que a trajetória de Gas6/Axl também desempenha um papel na glomerulonefrite (Yanagita M. e outros, The Journal of Clinical Investigação, 2002, 110 (2) 239-246. Outros estudos mostraram que Gas6 promove a sobrevivência de células endoteliais

em um modelo para lesão arterial. Angiotensina II, via seu receptor de AT1, demonstrou aumentar receptor de proteína e mRNA de Axl nas células de músculo liso vascular (Melaragno M. G. e outros, Circ Res., 1998, 83 (7): 697- 704).

[00010] Axl também demonstrou estar envolvido na adesão celular, proliferação de célula e regulação de homeostase no sistema imune (Lu Q., 2001) Science 293 (5528): 306-311). Após a ativação de Axl, os seguintes fenômenos foram observados: inibição de apoptose, aumento na sobrevivência de célula "normal" (não transformada) de fibroblastos e células endoteliais, migração de célula de músculo liso vascular (VSMC) (inativação da migração de blocos de quinase de Axl), melhoramento de formação de neointima na parede de vaso sanguíneo (Melaragno M. G. e outros, Trends Cardiovasc Med., 1999, (Review) 9 (8): 250-253) e envolvimento na formação de lesão e a progressão de aterosclerose.

[00011] A presente invenção procura prover novas aplicações de diagnóstico, de prognóstico e terapêuticas que envolvem Axl. Em particular, a invenção procura prover métodos para a detecção da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM), que têm implicações terapêuticas no tratamento de câncer, mais especificamente, cânceres metastático e resistentes a fármaco.

Afirmação da Invenção

[00012] Um primeiro aspecto da invenção refere-se ao uso de Axl como um biomarcador para a detecção da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM) em um indivíduo.

[00013] A presente invenção é com base na constatação que expressão de Axl está correlacionada com a ocorrência da transição epitélio-mesenquimal (TEM). Para nosso conhecimento, a presente invenção representa a primeira demonstração de tal correlação. Vantajosamente, essa constatação abre provocação de novas oportunida-

des para a provisão de métodos de diagnóstico, de prognóstico e terapêutico no campo de câncer, mais particularmente, cânceres metastásicos e resistentes a fármaco.

[00014] Os presentes inventores demonstraram um papel anteriormente não reconhecido para o receptor de Axl de quinase de tirosina como um efetor induzido por TEM essencial na cascata de invasão por metástase. Os resultados mostram que a ativação de programa de TEM leva a regulação positiva de Axl que é essencial para invasividade e metástase espontânea de células de carcinoma de mama malignas e fenótipo de resistência a fármaco. Expressão de Axl se correlaciona fortemente com mortalidade de paciente com câncer de mama a partir de tumores detectados por mamografia de tempo em tempo e tumores de mama clinicamente identificados, sugerindo uma ligação entre ativação de Axl e o desenvolvimento de doença metastática.

[00015] Um segundo aspecto da invenção refere-se a um método para a detecção da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM) em uma amostra, o dito método compreendendo as etapas de:

(i) isolamento de uma amostra de uma célula, grupo de células, um modelo de animal ou ser humano;

(ii) determinação da expressão de Axl na dita amostra quando comparada com uma amostra de controle, em que a regulação positiva da expressão de Axl em relação à amostra de controle é indicativa da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM).

[00016] Vantajosamente, determinação da expressão de Axl provê um marcador "permanente" para a detecção da ocorrência de um evento de TEM, que por si mesmo é de natureza transitória. Assim, a detecção de Expressão de Axl provê uma indicação única e permanente de se um evento de TEM ocorreu.

[00017] Estudos pelo requerente mostraram que é devido ao fato de que ativação relacionada com TEM estabelece um laço de sinalização

de Axl-Gas6 autócrino que é vantajoso a células malignas. Axl pode também ser ativado via mecanismos parácrinos.

[00018] Detecção de células de tumor que sofreram TEM é complicada pelo fato de que marcadores correntes (por exemplo, vimentina, N-Caderina, carece de E-caderina) são baseados nas proteínas de junção e citoesqueletal de mesênquima que estão presentes nas células estromais normais. Distinguir células de tumor a partir de células de estroma envolventes é difícil. Expressão de Axl é mais provável ser restrita a células de tumor em tumores sólidos provendo uma característica de distinguir células de tumor maligno.

[00019] Reversibilidade de TEM é importante para a formação de metástase em sítios distantes. Expressão de Axl pode ser usada para detectar metástase.

[00020] Um terceiro aspecto da invenção refere-se a um método de diagnóstico de câncer metastático em um indivíduo por detecção da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM), o dito método compreendendo determinação do nível de um polipeptídeo de receptor de Axl em uma amostra oriunda do indivíduo, em que um nível mais alto do polipeptídeo em comparação com o nível em um indivíduo livre de câncer metastático é indicativo da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM).

[00021] Um quarto aspecto da invenção refere-se ao uso de Axl ou um gene que codifica Axl na monitoração da atividade de um agente capaz de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM).

[00022] Um quinto aspecto da invenção refere-se a um método para a identificação de um agente capaz de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM), o dito método compreendendo administração do dito agente a uma célula, grupo de células, modelo de animal ou ser humano e monitoramento da atividade e/ou expressão de Axl.

[00023] Um sexto aspecto da invenção refere-se a um método para

a detecção da capacidade de um agente de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM), o dito método compreendendo:

(i) administração do agente a uma célula, grupo de células, um modelo de animal ou ser humano;

(ii) medição de expressão de Axl nas amostras derivadas das células, animal ou ser humano tratados e não tratados; e

(iii) detecção de um aumento ou uma diminuição na expressão ou a atividade de Axl na amostra tratada quando em comparação com a amostra não tratada como uma indicação da capacidade de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM).

[00024] Um sétimo aspecto da invenção refere-se a um método de monitoramento da atividade de um inibidor de Axl, o dito método compreendendo detecção da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM) por:

(i) administração do dito inibidor de Axl a uma célula, grupo de células, um modelo de animal ou ser humano; e

(ii) medição de expressão de Axl nas amostras derivadas das células, animal ou ser humano tratados e não tratados; e (iii) detecção de um aumento ou uma diminuição na expressão ou a atividade de Axl na amostra tratada quando em comparação com a amostra não tratada como uma indicação de atividade inibitória de Axl.

[00025] Um oitavo aspecto da invenção refere-se a um método para a identificação de um agente capaz de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM), o dito método compreendendo as etapas de:

(i) contato do agente com receptor de Axl ou células que expressam o receptor de Axl;

(ii) medição da atividade de receptor de Axl in a presença do agente; e

(iii) comparação da atividade medida na etapa (ii) com aquela medida sob condições controladas, em que uma diminuição

identifica o agente como sendo capaz de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM).

[00026] Um nono aspecto da invenção refere-se a um método para a identificação de um agente capaz de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM) por triagem de uma pluralidade de agentes, o dito método compreendendo as etapas de:

(i) contato da pluralidade de agentes com o receptor de Axl ou células que expressam o receptor de Axl;

(ii) medição da atividade de receptor de Axl na presença da pluralidade de agentes;

(iii) comparação da atividade medida na etapa (ii) com aquela medida sob condições controladas, em que uma diminuição identifica a pluralidade de agentes como sendo capaz de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM); e

(iv) separadamente determinação do qual(dos quais) agente ou agentes presentes na pluralidade de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM).

[00027] Um décimo aspecto refere-se ao uso de um agente identificado de acordo com o método da invenção na preparação de um medicamento para o tratamento de câncer metastático.

[00028] Um décimo primeiro aspecto refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um agente identificado de acordo com o método da invenção misturada com um veículo, excipiente ou diluente farmaceuticamente aceitável.

[00029] Um décimo segundo aspecto refere-se a um processo de preparação de uma composição que compreende:

(i) identificação de um agente capaz de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM) usando-se o método de acordo com a invenção; e

(ii) misturação do dito agente com um veículo, excipiente ou

diluyente farmacêuticamente aceitável.

[00030] Um décimo terceiro aspecto da invenção refere-se a um método para a inibição ou reversão de transição epitélio-mesenquimal (TEM) em um indivíduo que necessita do mesmo, o dito método compreendendo administração de inibidor de Axl ao dito indivíduo.

[00031] Um décimo quarto aspecto da invenção refere-se a um método para o tratamento de câncer metastático em um indivíduo que necessita do mesmo, o dito método compreendendo inibição ou reversão de transição epitélio-mesenquimal (TEM) por administração ao dito indivíduo um inibidor de Axl.

[00032] Um décimo quinto aspecto da invenção refere-se ao uso de um inibidor de Axl na preparação de um medicamento para a inibição ou reversão de transição epitélio-mesenquimal (TEM).

[00033] Um décimo sexto aspecto da invenção refere-se ao uso de um inibidor de Axl na preparação de um medicamento para o tratamento de câncer metastático por inibição ou reversão de transição epitélio-mesenquimal (TEM).

[00034] Um décimo sétimo aspecto da invenção refere-se a um kit para a avaliação da capacidade de um agente de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM), o dito kit compreendendo anticorpos de anti-Axl, uma sonda de ácido nucleico para Axl ou um iniciador de QPCR para Axl.

[00035] Um décimo oitavo aspecto refere-se ao uso de um kit como definido acima em um método de acordo com a invenção.

Descrição Detalhada

[00036] Metástase subjacentes a maioria das mortes relacionadas com câncer. Portanto, ulteriormente o entendimento dos mecanismos moleculares que permitem disseminação de célula de tumor é uma questão de saúde vital. Transições epitélio-mesenquimal (TEM) doam células de carcinoma com atributos de sobrevivência e migratórios

aumentados que facilitam progressão maligna. Caracterização de efetores de TEM é provável fornecer novos discernimentos em metástase e novas possibilidades para o tratamento. O requerente mostrou que a presença do receptor de Axl de quinase de tirosina é cânceres de mama primário detectado por mamografia independentemente prevê sobrevivência de paciente total fortemente reduzida, e lesões de metástase no paciente emparelhada mostram expressão de Axl aumentada. O requerente também demonstrou que Axl é fortemente induzido por transição epitelial em mesenquimal em células epiteliais mamárias malignas que estabelece um laço de sinalização autócrino com seu ligante, Gas6. Usando-se análise de interferência de RNA epi-alélica nas células de câncer de mama metastática, o requerente delineou uma limiar distinto da expressão de Axl para célula *in vitro* como mesenquimal, e para formar tumores em microambientes engenheirados de tecido e estranho *in vivo*. De modo importante, supressão de Axl totalmente evitou o espalhamento de células de carcinoma de mama altamente metastáticas da glândula mamária para linfonodos e vários órgãos principais, e sobrevivência total aumentada, em dois modelos diferentes de câncer de mama experimentais com base na imagem ótica. Assim, Axl representa um novo efector a jusante de célula de tumor TEM que é necessário para metástase de câncer de mama. A detecção e tratamento direcionado de tumores de expressão de Axl representa uma nova estratégia terapêutica importante para câncer de mama.

O papel de Axl em TEM e metástase

[00037] A aquisição de características celulares mesenquimais das células de câncer epiteliais com a motilidade de célula invasiva unicelular associada a metástase (Theirry, 2002 Weinberg, 2007).

[00038] Como mencionado acima, os presentes inventores demonstraram que Axl é um efector induzido por TEM essencial na cascata de

invasão de metástase. Os resultados mostram que a ativação de programa de TEM leva a regulação positiva de Axl que é essencial para a invasividade e metástase espontânea de células de carcinoma de mama malignas. Expressão de Axl se correlaciona fortemente com mortalidade de paciente com câncer de mama a partir de tumores detectados por mamografia de tempo em tempo, sugerindo uma ligação entre ativação de Axl e o desenvolvimento da doença metastática.

[00039] Axl foi originalmente identificado como uma chave reguladora de migração de célula invasiva em uma triagem genética funcional (Holland e outros 2005). Foi demonstrado aqui que a expressão de Axl em células de câncer de mama malignas é necessária para invasividade nas matrizes tridimensionais em resposta a diferentes indutores de quimiotaxia (soro, SDF-1). Em contraste com isso, foi observado pouco efeito de supressão de Axl em ensaios de 2D com base na placa (proliferação, esfregamento) ou na adesão celular. Inibição de Axl também inibe migração de célula de carcinoma de pulmão e de glioma sem afetar proliferação (Angelillo-Scherrer e outros., 2005; Shieh e outros, 2005). Portanto um tema comum é que sinalização de Axl é essencial para fenótipo migratório mesenquimal nas células de tumor malignas.

[00040] Congruente com isso foi demonstrado que Axl representa um novo marcador de TEM induzido por vários fatores de transcrição incluindo Twist, Snail, Slug e ZEP2. Expressão desses fatores de transcrição em células epiteliais elicia um programa de desenvolvimento normal que transitoriamente regula para cima características mesenquimais em células epiteliais. Células epiteliais pré-malignas são pensadas ativar TEM via sinais contextuais tal como TGFbeta elaborado por células estromais locais (Weinberg, 2007). Esse processo é dinâmico *in vivo* como expressão de marcador associado a TEM tal como E-caderina varia grandemente em tumores. De fator, Axl é um

prognosticador independente em nosso estudo e não se correlaciona com mudanças em E-caderina. Isso carece de evidência clínica para TEM é bem documentada e debatida. O requerente mostrou que a expressão de Axl representa uma mudança induzida por TEM mais durável.

[00041] A fim de determinar se Axl é essencial para metástase a partir do microambiente mamário, nós implantamos uma linha de célula de carcinoma de mama altamente metastática (*in vivo* de passagem) (MDA-231-DH2LN) para dentro de glândulas mamárias e espalhamento monitorado por imagem ótica *in vivo* de luciferase bioluminescência. Imagem ótica de corpo total temporal revelou espalhamento de MDA-231-DH2LN extensivo para linfonodos, pulmões, ovários, e rins no período de 28 dias de implantação em todos os camundongos de controle. Metástases de linfonodo espontâneas foram detectadas inicialmente em 4 semanas em todos os animais. Metástases de órgãos foram detectadas através de todas as 9 semanas seguintes. No sacrifício, órgãos extirpados foram escaneados individualmente e demonstraram conter metástases, confirmados posteriormente por histologia. Em contraste com isso, nenhuma metástase foi detectada por bioluminescências ou histologia de órgãos oriundos de células de supressão de Axl portando em camundongos (MDA-231-DH2LN-AxlshRNA). Essa fonte inibição de espalhamento do sítio mamário ortotópico que Axl é essencial para metástase.

[00042] Juntos, nossos resultados indicam que a detecção ou tratamento direcionado de tumores mamários de expressão de tratamento de Axl- representa uma importante nova estratégia para o desenvolvimento terapêutico de câncer de mama.

Ferramentas de diagnóstico

[00043] Um aspecto da invenção refere-se a uma ferramenta de diagnóstico para a detecção da ocorrência de transição epitélio-

mesenquimal (TEM).

[00044] Assim, em um primeiro aspecto a invenção refere-se ao uso de Axl como um biomarcador para a detecção da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM) em um indivíduo.

[00045] Em uma concretização preferida, Axl é um biomarcador para a detecção da indução de transição epitélio-mesenquimal (TEM).

[00046] Metástase para sítios distantes é a causa mais comum de morte de tumores sólidos (Gupta 2006, Sporn 1996). Para realizar isso, células de tumor descartam retenções epiteliais, redefinem complexos junção e motilidade invasiva adquirida para romper através da borda de membrana basal. Essas células metastáticas então intravazam na circulação linfática e hematogênea, disseminação a sítios distantes no corpo. Umas poucas dessas células metastáticas tinham êxito na extravasão através da parede capilar e em raros casos colonizam o estroma de tecido estranho (Weinberg e outros). Esse processo maligno é facilitado por uma transição epitélio-mesenquimal (TEM), um programa em desenvolvimento onde células epiteliais transitoriamente assumem um fenótipo mesenquimal durante gastrulação e organogênese, permitindo movimento invasivo de célula única para longe da camada epitelial (Hall, 1985; Thierry, 2002). O programa de TEM é iniciado por ativação contextual de trajetórias de sinalização morfogênico que induz a expressão de reguladores transcrito, incluindo Twist, Snail, Slug e Zeb2, que alteram a expressão de proteínas de complexo junção (Thiery and Sleeman 2006). O perfil de expressão de gene de TEM reflete a mudança fenotípica, repressão de E-caderina e citoceratinas com indução de vimentina e N-caderina (Weinberg e outros 2007).

[00047] Um outro aspecto da invenção refere-se ao uso de Axl como um biomarcador para a detecção e monitoramento de malignidade.

[00048] Um outro aspecto da invenção refere-se ao uso de Axl co-

mo um biomarcador para a detecção de metástase de tumor. De preferência, o tumor é um carcinoma, mais de preferência um câncer de mama.

[00049] Em uma concretização, a invenção provê um método de diagnóstico para a determinação de se um indivíduo seria um candidato para receber tratamento com um inibidor de Axl. Por exemplo, se expressão de Axl for mostrada como sendo regulada positivamente, essa pode ser usada como um guia para desempenho e opções de tratamento, isto é, um prognóstico nas aplicações de remédio personalizado, para selecionar indivíduos que devem provavelmente ser suscetíveis a tratamento com um inibidor de Axl. Por exemplo, se expressão de Axl for mostrada como sendo regulada positivamente em um tumor primário, essa pode ser usada para inferir uma probabilidade aumentada de metástase. Essa informação pode ser usada como uma guia para opções de tratamento, isto é, um prognóstico em aplicações de remédios personalizados, para selecionar indivíduos que são prováveis de necessitar tratamentos mais agressivos, tratamento cirúrgico anticâncer, quimoterapêutico ou radioterapêutico tal como mastectomia radical.

[00050] Assim, um outro aspecto da invenção refere-se a um método para a determinação de se um indivíduo estará suscetível a tratamento com um inibidor de Axl, o dito método compreendendo as etapas de:

(i) isolamento de uma amostra de uma célula, grupo de células, um modelo de animal ou ser humano;

(ii) determinação da expressão de Axl na dita amostra quando comparada com uma amostra de controle, em que a regulação positiva de expressão de Axl em relação à amostra de controle é indicativo de suscetibilidade a tratamento com um inibidor de Axl.

[00051] O termo "marcador" ou "biomarcador" é usado aqui como

referindo a um gene ou proteína cuja expressão em uma amostra derivada de uma célula ou mamífero é alterada ou é modulada, por exemplo, regulada positivamente ou para baixo, quando a transição epitélio-mesenquimal (TEM) ocorre. Onde o biomarcador é uma proteína, modulação ou alteração de expressão inclui modulação através de diferentes modificações pós-traducionais.

[00052] Modificações pós-traducionais são eventos de processamento covalentes que mudam as propriedades de uma proteína por clivagem proteolítica ou por adição de um grupo de modificação em um ou mais aminoácidos. Modificações pós-traducionais comuns incluem fosforilação, acetilação, metilação, acilação, glicosilação, âncora de GPI, ubiquitinação e assim por diante. Uma revisão de tais modificações e métodos para a detecção pode ser encontrada em Mann e outros Nature Biotechnology 23 de março de 2003, Vol. 21, págs. 255-261.

[00053] Em uma concretização preferida, a regulação positiva Axl é indicativa da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM).

[00054] Um outro aspecto da invenção refere-se a um método para a detecção da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM) em uma amostra, o dito método compreendendo as etapas de: (i) isolamento de uma amostra de uma célula, grupo de células, um modelo de animal ou ser humano;

(ii) determinação da expressão de Axl na dita amostra quando comparada com uma amostra de controle, em que a regulação positiva de expressão de Axl em relação à amostra de controle é indicativo da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM).

[00055] Um outro aspecto da invenção refere-se a um método de diagnóstico de câncer metastático em um indivíduo por detecção da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM), o dito método compreendendo determinação do nível de um polipeptídeo de receptor

de Axl em uma amostra oriunda do indivíduo, em que um nível mais alto do polipeptídeo em comparação com o nível em um indivíduo livre de câncer metastático é indicativo da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM).

[00056] Em particular, cânceres de interesse incluem qualquer carcinoma, mais de preferência cânceres de mama, de pulmão, gástrico, de cabeça e pescoço, colorretal, renal, pancreático, uterino, hepático, bexiga, endometrial e próstata e leucemias. Mais de preferência, o câncer é câncer de mama metastático.

[00057] De preferência, a expressão do gene de Axl, ou o nível de polipeptídeo de receptor de Axl, é medida usando-se um anticorpo de anti-Axl ou um agente de afinidade.

Diagnóstico para novos agentes terapêuticos

[00058] Um outro aspecto da invenção refere-se a um ensaio de diagnóstico para a identificação de agentes que são capazes de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM), desse modo tendo aplicações terapêuticas potenciais no tratamento de desordens proliferativas tal como câncer.

[00059] Assim, um aspecto da invenção refere-se ao uso de Axl ou um gene que codifica Axl na monitoração da atividade de um agente capaz de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM).

[00060] Em uma concretização preferida, a presença de Axl é monitorada depois da administração do agente capaz de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM) a uma célula, grupo de células, um modelo de animal ou ser humano. Um outro aspecto da invenção refere-se a um método para a identificação de um agente capaz de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM), o dito método compreendendo a administração do dito agente a uma célula, grupo de células, modelo de animal ou ser humano e monitoramento da atividade e/ou a expressão de Axl.

[00061] Em uma concretização preferida, o método compreende a administração do dito agente a uma célula, grupo de células, modelo de animal ou ser humano e detecção da expressão alterada de Axl na dita amostra tratada quando em comparação com uma amostra de controle não tratada.

[00062] Por "expressão alterada" quer se dizer um aumento, diminuição ou de outro modo o nível modificado ou padrão de expressão em uma amostra derivada de uma célula tratada quando em comparação com uma amostra de controle, não tratada.

[00063] O termo "expressão" refere-se à transcrição do modelo de DNA do gene para produzir o mRNA correspondente e tradução desse mRNA para produzir o produto de gene correspondente (isto é, um peptídeo, polipeptídeo, ou proteína) bem como a "expressão" de uma proteína em uma ou mais formas que podem ter sido modificadas pós-tradução.

[00064] Detecção de expressão alterada incluindo expressão de gene pode ser realizada por qualquer um dos métodos conhecidos na técnica, particularmente por análise de microarranjo, Western blotting por técnicas de PCR tal como QPCR. Expressão alterada pode também ser detectada por análise de teor de proteína de amostras usando-se métodos tal como ELISA, PET ou SELDI-TOF MS como descritos aqui e and usando-se outras técnicas analíticas tal como eletroforese de 2Dgel. Técnicas tal como isso pode ser particularmente útil para a detecção de expressão alterada na forma de formas pós-traducionalmente modificada alternativa de uma proteína.

[00065] Um outro aspecto da invenção refere-se a um método para a detecção da capacidade de um agente de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM), o dito método compreendendo:

(i) administração do agente a uma célula, grupo de células, um modelo de animal ou ser humano; e

(ii) medição de expressão de Axl nas amostras derivadas das células, animal ou ser humano tratados e não tratados; e

(iii) detecção de um aumento ou uma diminuição na expressão de Axl na amostra tratada quando em comparação com a amostra não tratada como uma indicação da capacidade de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM).

[00066] A inibição pode ser em qualquer nível (por exemplo, no nível de expressão de gene ou o nível de proteína).

[00067] Ainda um outro aspecto da invenção refere-se a um método de monitoramento da atividade de um inibidor de Axl, o dito método compreendendo detecção da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM) por;

(i) administração do dito inibidor de Axl a uma célula, grupo de células, um modelo de animal ou ser humano;

(ii) medição de expressão de Axl nas amostras derivadas das células, animal ou ser humano tratados e não tratados; e

(iii) detecção de um aumento ou uma diminuição na expressão ou a atividade de Axl na amostra tratada quando em comparação com a amostra não tratada como uma indicação de atividade inibitória de Axl.

[00068] Por esse aspecto, de preferência a amostra é analisada por análise de proteína, mais de preferência por ELISA, PET, citometria de fluxo, SELDI-TOF MS ou 2-D PAGE.

[00069] Como usado aqui, uma amostra derivada de uma célula tratada ou não tratada pode ser um lisado, extrato ou amostra de ácido nucleico derivado de um grupo de células que pode ser oriundo de cultura de tecido ou animal ou ser humano. Para análise de proteína, uma amostra pode ser um sobrenadante de cultura de tecido. Uma célula pode ser isolada de um indivíduo (por exemplo, células inteiras oriundas de uma amostra de sangue, soro ou plasma) ou pode ser parte de

uma amostra de tecido tal como uma biopsia.

[00070] De preferência, o grupo de células é uma cultura de células.

[00071] Tipos de células preferidos são selecionados de linhas de células de tumor colônico tal como HT29, linhas de células de tumor do pulmão tal como A549, linhas de células de tumor renal tal como A498, linhas de células de tumor de bexiga tal como HT13, linhas de células de tumor de mama tal como MDA-MB-231, linhas de células de tumor endometrial tal como AN3CA, linhas de células de tumor uterino tal como MESSA DH6, célula de sarcoma uterino, linhas de células de tumor hepático tal como Hep2G, próstata linhas de células de tumor de próstata tal como DU145, linhas de células de tumor de célula T tal como célula T de Cem, linhas de células de tumor pancreático tal como MiaPaCa2.

[00072] Alternativamente, as células podem estar na forma de uma amostra histológica de uma biopsia de tumor (tal como uma amostra tirada por microcirurgia de captura pós-laser). Métodos adequados para a detecção de expressão de gene nas amostras de biopsia incluem usando-se técnicas de imunoistoquímica ou FISH usando-se anticorpos que reconhecem os genes identificados aqui bem como métodos para a análise da composição de proteína de amostras.

[00073] Em uma outra alternativa, as células podem ser culturas de células no sangue tais como PBMCs. Como usado aqui, o termo "PBMC" refere-se a células mononucleares de sangue periférico e inclui PBLs (linfócitos de sangue periférico).

[00074] De modo adequado, alterações na expressão incluindo mudanças na expressão de gene são monitoradas nas amostras tiradas do mamífero ou ser humano. Amostras adequadas incluem, mas não são limitadas a, amostras de tecido tais como biopsia, sangue, urina, e raspagens bucais etc. Em uma concretização, expressão de gene é de preferência detectado em células de tumor, particularmente células

derivadas de um tumor tal como cânceres de mama, de pulmão, gástrico, cabeça e de pescoço, colorretal, renal, pancreático, uterino, hepático, de bexiga, endometrial e próstata e leucemias ou de células de sangue tais como linfócitos e, de preferência, linfócitos periféricos tal como PBMC.

[00075] Em uma outra concretização expressão de proteína alterada é detectada em amostras de sobrenadante de cultura de tecido, ou plasma ou soro oriundo de mamífero ou ser humano.

[00076] Na detecção de proteínas no soro e, em particular, nas amostras de plasma de pacientes, amostras são removidas e são submetidas às técnicas analíticas de proteína tais como citometria de fluxo, ELISA, PET e SELDI-TOF MS, como descritas aqui.

[00077] Em uma concretização preferida, o método compreende extração de RNA a partir da dita amostra e detecção de expressão de gene por QPCR.

[00078] Em uma outra concretização, expressão de gene é detectada por detecção de produtos de proteína tão como, por exemplo, por Western Blot.

[00079] Um outro aspecto da invenção refere-se a um método para a identificação de um agente capaz de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM), o dito método compreendendo as etapas de:

(i) contato do agente com receptor de Axl ou células que expressam o receptor de Axl;

(ii) medição da atividade de receptor de Axl in a presença do agente; e

(iii) comparação da atividade medida na etapa (ii) com aquela medida sob condições controladas, em que uma diminuição identifica o agente como sendo capaz de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM).

[00080] De preferência, a atividade medida é fosforilação de tirosina

de um substrato do receptor de Axl.

[00081] Maia de preferência, a atividade medida é autofosforilação do receptor de Axl.

[00082] Para essa concretização particular, de preferência as células no contato da etapa (i) anteriormente foram transfectadas pelo gene de Axl.

[00083] Ainda mais de preferência, as células transfectadas são ou transitoriamente ou estavelmente transfectadas.

[00084] Em uma concretização preferida, as condições controladas na etapa (iii) compreendem contato do agente com células que carecem de um gene de Axl ativo.

[00085] Ainda mais de preferência, as células têm uma forma inativa mutada do gene de Axl.

[00086] Em uma outra concretização preferida, as condições controladas na etapa (iii) compreendem comparação da atividade com aquela medida na ausência do agente.

[00087] Em uma concretização particularmente preferida, o receptor de Axl compreende uma porção biologicamente ativa do domínio intracelular.

[00088] Em uma concretização preferida, o receptor de Axl é imobilizado, por exemplo, por ligação a uma fase sólida.

[00089] Um outro aspecto da invenção refere-se a um método para a identificação de um agente capaz de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM) por triagem de uma pluralidade de agentes, o dito método compreendendo as etapas de:

(i) contato da pluralidade de agentes com o receptor de Axl ou células que expressam o receptor de Axl;

(ii) medição da atividade de receptor de Axl na presença da pluralidade de agentes;

(iii) comparação da atividade medida na etapa (ii) com

aquela sob condições controladas, em que uma diminuição identifica a pluralidade de agentes como sendo capaz de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM); e

(v) separadamente determinação do qual(dos quais) agente ou agentes presentes na pluralidade de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM).

[00090] De preferência, nos métodos da invenção como descritos acima, o agente é para o tratamento de câncer metastático.

Agentes identificados pelo método

[00091] Um outro aspecto refere-se ao uso de um agente identificado de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima na preparação de um medicamento para o tratamento de câncer metastático.

[00092] De preferência, o câncer é selecionado de cânceres de mama, de pulmão, gástrico, de cabeça e de pescoço, colorretal, renal, pancreático, uterino, hepático, de bexiga, endometrial e de próstata e leucemias. Mais de preferência, o câncer é o câncer de mama.

Medição da expressão alterada de marcadores de gene/proteína

[00093] Níveis de expressão de gene e de proteína podem ser determinados usando-se uma série de técnicas diferentes.

(a) no nível de RNA

[00094] Expressão de gene pode ser detectada no nível de RNA. RNA pode ser extraída a partir de células usando-se técnicas de extração de RNA incluindo, por exemplo, usando-se extração de fenol ácido/guanidina isotiocianato (RNAzol B; Biogênese), kits de preparação de RNeasy RNA (Qiagen) ou gene de PAX (PreAnalytix, Suíça). Formatos de ensaio típicos utilizando-se hibridização de ácido ribonucleico incluem ensaios run-on nucleares, RT-PCR, ensaios de proteção de RNase (Melton e outros., Nuc. Acids Res. 12:7035), Northern blotting e hibridização *in situ*. Expressão de gene pode também ser

detectada por análise de microconjuntos como descrita abaixo.

[00095] Para Northern blotting, amostras de RNA são primeiramente separadas por tamanho via eletroforese em um gel de agarose sob condições de desnaturação. O RNA é então transferido para uma membrana, reticulada e hibridizada com uma sonda marcada. Sondas radiomarcadas de atividade altamente específicas ou não isotópicas podem ser usadas incluindo sondas de RNA transcritos *in vitro*, iniciadas aleatórias ou traduzidas de corte ou sondas de DNA geradas por PCR, sondas de RNA transcritas *in vitro*, e oligonucleotídeos. Adicionalmente, sequências com apenas homologia parcial (por exemplo, cDNA oriundo de uma espécie diferente ou fragmentos de DNA genômicos que poderiam conter um éxon) podem ser usadas como sondas.

[00096] Ensaio de proteção de nuclease (incluindo tanto riboenaios de proteção de nuclease quanto ensaios de nuclease de S1) fornecem um método extremamente sensível para a detecção e quantificação de mRNAs específicos. A base do NPA é hibridização de solução de uma sonda de sem sentido (radiomarcada ou não isotópica) para dar uma amostra de RNA. Depois de hibridização, RNA e sonda não hibridizada, de fio único são degradados por nucleases. Os fragmentos protegidos restantes são separados em um gel de acrilamida. NPAs permitem a detecção simultânea de várias espécies de RNA.

[00097] Hibridização *in situ* (ISH) é uma ferramenta poderosa e versátil para a localização de mRNAs específicos em células e tecidos. Hibridização da sonda ocorre dentro da célula ou do tecido. Uma vez que a estrutura celular é mantida através de todo o procedimento, ISH provê informação sobre a localização de mRNA dentro da amostra de tecido.

[00098] O procedimento começa por fixação das amostras em formalina tamponada neutra, e implantação do tecido na parafina. As amostras são então fatiadas em seções finas e são montadas sobre

lâminas de microscópio. Alternativamente, tecido pode ser congelado seccionado e pós-fixado em paraformaldeído. Depois de uma série de lavagem para desencerar e reidratar as seções, uma digestão de proteínase K é realizada para aumentar acessabilidade de sonda, e uma sonda marcada é então hibridizada para dar as seções de amostra. Sondas radiomarcadas são visualizadas com película líquida seca sobre as lâminas, enquanto sondas não isotopicamente marcadas são convencionalmente detectadas com reagentes calorimétricos ou fluorescentes. Esse último método de detecção é uma base para hibridização in situ fluorescente (FISH).

[00099] Métodos para a detecção que podem ser empregados incluem rótulos radioativos, rótulos de enzima, rótulos quimioluminescentes, rótulos fluorescentes e outros rótulos adequados.

[000100] Tipicamente, RT-PCR é usado para ampliar alvos de RNA. Nesse processo, a enzima de transcriptase reversa é usada para converter RNA em DNA complementar (cDNA) que pode então ser ampliado para facilitar detecção. RT-PCR quantitativo relativo envolve ampliação de um controle interno simultaneamente com o gene de interesse. O controle interno é usado para normalizar as amostras. Uma vez que comparações normalizadas, diretas de abundância relativa de um mRNA específico pode ser produzido através das amostras. Controles internos comumente usados incluem, por exemplo, GAPDH, HPRT, actina e ciclofilina.

[000101] Muitos métodos de ampliação de DNA são conhecidos, a maioria dos quais contam com uma reação de cadeia enzimática (tal como uma reação de cadeia de polimerase, uma reação de cadeia de ligase, ou uma replicação de sequência autossustentada) ou da replicação de toda ou a parte do vetor para dentro do qual ele foi clonado.

[000102] Muitos métodos alvo e ampliação de sinal (TAS) foram descritos na literatura, por exemplo, revisões gerais desses métodos em

Landegren, U. e outros., Science 242:229-237 (1988) e Lewis, R., Genetic Engineering News 10:1, 54-55 (1990).

[000103] PCR é um método de ampliação de ácido nucleico descrito *inter alia* na patente de U.S. nº 4.683.195 e na patente de U.S. nº 4.683.202. PCR pode ser usada para ampliar qualquer ácido nucleico conhecido em um contexto diagnóstico (Mok e outros., 1994, Gynaecologic Oncology 52:247-252). Replicação de sequência autossustentada (3SR) é uma variação de TAS, que envolve a ampliação isotérmica de um modelo de ácido nucleico via ciclos sequenciais de polimerase de transcriptase reversa (RT), e atividades de nuclease que são mediadas por um coquetel de enzima e iniciadores de oligonucleotídeo apropriados (Guatelli e outros., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874). Reação de ampliação de ligação ou sistema de ampliação de ligação usa ligase de DNA e quatro oligonucleotídeos, dois por fio alvo. Essa técnica é descrita por Wu, D. Y. and Wallace, R. B., 1989, Genomics 4:560. Na técnica de Replicase de Q[beta], replicase de RNA para o bacteriófago de Q[beta], que replica RNA de fio único, é usado para ampliar o DNA alvo, como descrito por Lizardi e outros., 1988, Bio/Technology 6:1197.

[000104] PCR quantitativo (Q-PCR) é uma técnica que permite quantidades relativas de transcritos dentro de uma amostra a ser determinada. Um método adequado para a realização de QPCR é descrito aqui.

[000105] Tecnologia de ampliação alternativa pode ser explorada na presente invenção. Por exemplo, ampliação de círculo de rotação (Lizardi e outros., 1998, Nat Genet 19:225) é uma tecnologia de ampliação comercialmente disponível (RCAT(TM)) que é dirigida por polimerase de DNA e pode replicar sondas de oligonucleotídeos circulares com cinética linear ou geométrica sob condições isotérmicas. Uma outra técnica, ampliação de deslocamento de fio (SDA; Walker e outros,

1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:392) começa com uma sequência especificamente definida única para um alvo específico.

[000106] Sondas adequadas para a detecção da expressão de Axl identificadas aqui podem convenientemente ser embalada na forma de um kit de teste em um recipiente adequado. Em tais kits a sonda pode estar ligada a um suporte sólido onde o formato do ensaio para o qual o kit é designado exige tal ligação. O kit pode também conter reagentes adequados para o tratamento da amostra a ser sondada, hibridização da sonda para dar ácido nucleico na amostra, reagentes de controle, instruções e similares. Kits adequados podem compreender, por exemplo, iniciador para uma reação de QPCR ou sondas marcadas para a realização de FISH.

(b) no nível de polipeptídeo

[000107] Expressão de proteína ou gene alterado pode também ser detectado por medição dos polipeptídeos codificados pelo gene de Axl. Isso pode ser alcançado por uso de moléculas que se ligam aos polipeptídeos codificados por gene de Axl. Moléculas/agentes adequados que se ligam ou diretamente ou indiretamente aos polipeptídeos a fim de detectar a presença da proteína incluem moléculas de ocorrência natural tais como peptídeos e proteínas, por exemplo, anticorpos, ou eles podem ser moléculas sintéticas.

[000108] Anticorpos para os genes de Axl ou proteínas podem ser derivados de fontes comerciais ou através das técnicas que são familiares por aqueles versados na técnica. Em uma concretização, e onde a expressão alterada manifesta-se através da expressão de alteração de formas traducionalmente modificadas de um biomarcador de proteína, anticorpos específicos para aquelas formas diferentes podem ser usadas.

[000109] Métodos para a produção de anticorpos são conhecidos por aqueles versados na técnica. Se anticorpos policlonais forem deseja-

dos, um mamífero selecionado (por exemplo, camundongo, coelho, cabra, cavalo, etc.) é imunizado com um polipeptídeo imunogênico que porta um epítopo(s) a partir de um polipeptídeo. Soro oriundo do animal imunizado é coletado e é tratado de acordo com procedimentos conhecidos. Se soro contendo anticorpos policlonais para um epítopo de um polipeptídeo contém anticorpos para outros antígenos, os anticorpos policlonais podem ser purificados por cromatografia por imunoafinidade. Técnicas para a produção e processamento de antissoros policlonais são conhecidas na técnica. A fim de gerar uma resposta imunogênica maior, polipeptídeos ou seus fragmentos podem ser haptenizados a um outro polipeptídeo para o uso como imunógenos em animais ou ser humanos.

[000110] Anticorpos monoclonais dirigidos contra epítopos nos polipeptídeos podem também ser prontamente produzidos por aquele versado na técnica. A metodologia geral para a produção de anticorpos monoclonais por hibridomas é bem conhecida. Linhas de células de produção de anticorpo imortal podem ser criadas por fusão de célula, e também por outras técnicas tal como transformação direta de linfócitos B com DNA oncogênico, ou transfecção com vírus de Epstein-Barr. Paineis de anticorpos monoclonais produzidos contra epítopos nos polipeptídeos da invenção podem ser triados quanto a várias propriedades; isto é, para afinidade de epítopo e isótipo.

[000111] Uma técnica alternativa envolve triagem de bibliotecas de desempenho de fago onde, por exemplo, os fragmentos de scFv de expressão de fago sobre a superfície de seu revestimento com uma grande variedade de regiões de determinação de complementaridade (CDRs). Essa técnica é bem conhecida na técnica.

[000112] Para as finalidades dessa invenção, o termo "anticorpo", a não ser que especificado ao contrário, inclui anticorpos inteiros, ou fragmentos de anticorpos inteiros que retêm sua atividade de ligação pa-

ra um antígeno alvo. Tais fragmentos incluem fragmentos de Fv, de F(ab') e de F(ab')₂, bem como anticorpos de cadeia simples (scFv). Além do mais, os seus anticorpos e fragmentos podem ser anticorpos humanizados, por exemplo, como descrita na EP 239400 A. O termo "anticorpo" como usado aqui também inclui reagentes por afinidade como anticorpo. Por exemplo: anticorpos policlonais e monoclonais, anticorpos recombinantes, fragmentos proteolíticos e recombinantes de anticorpos (Fab, Fv, scFv, diacorpos), anticorpos de domínio simples (VHH, sdAb, nanocorpos, IgNAR, VNAR), e proteínas não relacionadas com anticorpos, que foram engenheiradas a ter ligação específica como anticorpo, tais como as seguintes:

[000113] Nome com base em:

Aficorpos Proteína A, Z domínio	6 kDa
Afitinas Sac7d (oriundas de <i>Sulfolobus acidocaldarius</i>)	7 kDa
Anticalinas Lipocalinas	20 kDa
DARPinS pedaços de repetição de Ankyri	14 kDa
Finômeros Fyn, domínio de SH3	7 kDa
peptídeos de domínio de Kunitz Vários inibidores de protease	6 kDa

Monocorpos Fibronectina

[000114] Técnicas de laboratório padrão tal como imunomanchamento como descritas acima podem ser usadas para detectar níveis alterados de atividade de Axl, quando comparados com células não tratadas na mesma população de célula.

[000115] Expressão de gene pode também ser determinada por detecção de mudanças no processamento pós-traducionais de polipeptídeos ou modificação pós-transcritiva de ácidos nucleicos. Por exemplo, fosforilação diferencial de polipeptídeos, a clivagem de polipeptídeos ou união alternativa de RNA, e similares podem ser medidas. Níveis de produtos de expressão de gene tais como polipeptídeos, bem

como sua modificação pós-traducional, podem ser detectadas usando-se ensaios de proteína ou técnicas tal como eletroforese de poliacrilamida de 2D registrados

[000116] Anticorpos podem ser usados para a detecção de expressão de Axl por um método que compreende:

- (a) provisão de um anticorpo da invenção;
- (b) incubação de uma amostra biológica com o dito anticorpo sob condições que permitem a formação de um complexo de um complexo de anticorpo-antígeno; e
- (c) determinação de se o complexo de anticorpo-antígeno compreendendo o dito anticorpo é formado.

[000117] Amostras adequadas incluem extratos de tecidos tais como tecidos de cérebro, de mama, de ovário, de pulmão, de cólon, de pâncreas, de testículos, de fígado, de músculo e de osso ou oriundos de crescimentos neoplásicos derivados de tais tecidos. Outros exemplos adequados incluem amostras de sangue e de urina.

[000118] Anticorpos que especificamente se ligam a proteínas de Axl podem ser usados nos métodos e kits de diagnóstico e prognóstico que são bem conhecidos por aqueles comumente com aqueles de habilidade comum na técnica para detectar ou quantificar a proteína de expressão de Axl em um tecido ou fluido de corpo. Resultados desses testes podem ser usados para diagnosticar ou prever a ocorrência ou recorrência de câncer e outra motilidade de célula ou doenças mediadas pela sobrevivência da célula, ou avaliar a eficácia de tratamento e dosagem de fármaco.

[000119] Anticorpos podem ser avaliados quanto a ligação imuno-específica por qualquer método conhecido na técnica. Os imunoenaios que podem ser usados incluem mas não são limitados a sistemas de ensaio não competitivos e competitivos usando-se técnicas tais como *western blots*, imunistoquímica, radioimunoenaios, ELISA, imunoen-

saos de sanduíche, ensaios de imunoprecipitação, reações de precipitina, reações de precipitina de difusão por gel, ensaios de imunodifusão, ensaios de aglutinação, ensaios de fixação de complemento, ensaio imunorradiométricos, imunoensaios fluorescentes e imunoensaios de proteína A.

[000120] Tais ensaios são rotineiros na técnica (vide, por exemplo, Ausubel e outros., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, que é incorporado por referência aqui em sua totalidade).

[000121] Anticorpos para o uso na invenção são de preferência ligados a um suporte sólido e/ou são embalados para dentro de kits em um recipiente adequado juntamente com reagentes, controles, instruções adequados e similares.

[000122] Outros métodos incluem, mas não são limitados a, 2D-PAGE embora isso é menos adequado para a triagem de grande escala. Jamais técnicas incluem tempo de voo de ionização de dessorção de laser auxiliado pela matriz de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS). Em análise de MALDI-TOF, proteínas em uma mistura complexa são fixadas a uma matriz metálica sólida, são dessorvidas com feixe de laser pulsado para gerar íons de fase gasosa que atravessam um tubo de voo livre de campo, e são então separadas de acordo com suas velocidades dependente de massa. Proteínas e peptídeos individuais podem ser identificados através do uso de ferramentas de informática para buscar bases de dados de sequência de proteínas e de peptídeos. Tempo de dessorção/ionização por laser de superfície aumentada de MS de voo (SELDI-TOF MS) é um método de MS com base na afinidade em que proteínas são seletivamente adsorvida em uma superfície sólida quimicamente modificada, impurezas são removidas por lavagem, uma matriz de absorção de energia é aplicada, e as proteínas são identificadas por análise de massa de dessorção por

laser.

[000123] SELDI-TOF-MS pode ser usado para a detecção da aparição/perda de ou proteínas intactas ou fragmentos de proteínas específicas. Além disso, SELDI-TOF-MS pode também ser usado para a detecção de modificações pós-traducionais de proteínas devido à diferença em massa causada pela adição/remoção de grupos químicos. Assim fosforilação de um resíduo único causará um deslocamento de massa de 80 Da devido ao grupo fosfato. Uma base de dados de pesos moleculares que podem ser atribuídos para modificações pós-traducionais está livremente acessíveis na internet (<http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home?avgmass=all>). Além do mais polipeptídeos específicos podem ser capturados por abordagens com base em afinidade usando-se SELDI-TOF-MS por emprego de anticorpos que especificamente reconhecem uma forma pós-traducionalmente modificada da proteína, ou que podem reconhecer igualmente também todas as formas da proteína.

Conjuntos

[000124] Tecnologia de conjunto e as várias técnicas e aplicações associadas a ela é descrita em geral numerosos livros técnicos e documentos. Esses incluem Lemieux e outros., 1998, Molecular Breeding 4:277-289; Schena and Davis. Parallel Analysis with Biological Chips, in PCR Methods Manual (eds. M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky); Schena and Davis, 1999, Genes, Genomes and Chips. In DMA Microensaios: A Practical Approach (ed. M. Schena), Oxford University Press, Oxford, UK, 1999); The Chipping Forecast (Nature Genetics special issue; January 1999 Supplement); Mark Schena (Ed.), Microarray Biochip Technology, (Eaton Publishing Company); Cortes, 2000, The Scientist 14(17):25; Gwynne and Page, Microarray analysis: the next revolution in molecular biology, Science, 1999, August 6; Eakins and Chu, 1999, Trends in Biotechnology, 17:217-218, e também vários

web sites espalhados no mundo.

[000125] Tecnologia de conjunto supera as desvantagens com métodos tradicionais em biologia molecular, que em geral trabalham em uma base de "um gene em uma experiência", resultando em baixa quantidade produzida e incapacidade de apreciar a "imagem inteira" da função de gene. Atualmente, as principais aplicações para a tecnologia de conjunto incluem a identificação de sequência (gene/mutação de gene) e a determinação do nível de expressão (abundância) de genes. O perfil de expressão de gene pode fazer uso de tecnologia de conjunto, opcionalmente em combinação com técnicas proteômicas (Celis e outros., 2000, FEBS Lett, 480(1):2-16; Lockhart and Winzeler, 2000, Nature 405(6788):827-836; Khan e outros., 1999, 20(2):223-9). Outras aplicações de tecnologia de conjunto são também bem conhecidas na técnica; por exemplo, revelação do gene, pesquisa de câncer (Marx, 2000, Science 289: 1670-1672; Scherf e outros., 2000, Nat Genet 24(3):236-44; Ross e outros., 2000, Nat Genet 2000, 24(3):227-35), análise de SNP (Wang e outros., 1998, Science 280 (5366): 1077-82), revelação de fármaco, farmacogenômicos, diagnóstico de doença (por exemplo, utilising microfluidics devices: Chemical & Engineering News, 22 de fevereiro de 1999, 77(8): 27-36), toxicology (Rockett and Dix (2000), Xenobiotica 30(2): 155-77; Afshari e outros., 1999, Cancer Res 59(19): 4759-60) e toxicogenômicos (um híbrido de toxicologia molecular e genômicos funcionais). O objetivo de toxicogenômicos é encontrar correlações entre respostas tóxicas a toxicantes e mudanças nos perfis genéticas dos objetivos expostos a tais toxicantes (Nuwaysir e outros., 1999, Molecular Carcinogenesis 24: 153-159).

[000126] No contexto da presente invenção, tecnologia de conjunto pode ser usada, por exemplo, na análise da proteína de expressão de Axl. Em uma concretização, tecnologia de conjunto pode ser usada para analisar o efeito de um composto de candidato na atividade de

Axl.

[000127] Em geral, qualquer biblioteca ou grupo de amostras podem ser dispostos de um modo ordenado em um conjunto, por separação espacial dos membros da biblioteca ou grupo.

[000128] Exemplos de bibliotecas adequadas para o conjunto incluem bibliotecas de ácidos nucleicos (incluindo DNA, cDNA, oligonucleotídeo, etc. bibliotecas), peptídeo, polipeptídeo e bibliotecas de proteínas, bem como bibliotecas compreendendo quaisquer moléculas, tais como bibliotecas de ligante, entre outras.

[000129] Correspondentemente, onde faz-se referência a uma "biblioteca" nesse documento, a não ser que o contexto dita de outra maneira, tal referência seria tomada a incluir referência a uma biblioteca na forma de um conjunto.

[000130] As amostras (por exemplo, membros de uma biblioteca) são em geral fixadas ou são imobilizadas sobre uma fase sólida, de preferência um substrato sólido, para limitar difusão e mistura das amostras. Em uma concretização preferida, bibliotecas de ligantes de ligação de DNA podem ser preparadas. Em particular, as bibliotecas podem ser imobilizadas a um fase sólida substancialmente planar, incluindo membranas e substratos não porosos tais como plástico e vidro. Além do mais, as amostras são de preferência dispostas de tal modo que o índice (isto é, referência ou acesso a uma amostra particular) é facilitado. Tipicamente as amostras são aplicadas como pontos em uma formação de grade. Sistemas de ensaio comuns podem ser adaptados para essa finalidade. Por exemplo, um conjunto pode ser imobilizado sobre a superfície de uma microplaca, ou com múltiplas amostras em uma cavidade, ou com uma única amostra em cada cavidade. Além do mais, o substrato sólido pode ser uma membrana, tal como uma nitrocelulose ou membrana de nylon (por exemplo, membranas usadas nas experiências de *blotting*). Substratos alternati-

vos incluem substratos à base de sílica ou, vidro. Assim, as amostras são imobilizadas por qualquer método adequado conhecido na técnica, por exemplo, por interações de carga, ou por acoplamento químico às cavidades ou fundo das cavidades, ou à superfície da membrana. Outros meios de disposição e fixação podem ser usados, por exemplo, pipetagem, *drop-touch*, meios piezoelétricos, tecnologia de jato de tinta e tecnologia de jato de bolha, aplicação eletroestática, etc. No caso à base de silício, fotolitografia pode ser utilizada para dispor e fixar as amostras na lasca.

[000131] As amostras podem ser dispostas por ser "marcadas" sobre o substrato sólido; isso pode ser feito por uso manual ou por uso robótico para depositar a amostra. Em geral, conjuntos podem ser descritos como macroconjuntos ou microconjuntos, a diferença sendo o tamanho das manchas de amostra. Macroconjuntos tipicamente contêm tamanhos de mancha da amostra de cerca de 300 micra ou mais e podem ser facilmente formados imagem pela existência de scanners de gel e *blot*. Os tamanhos de mancha da amostra em microarranjos são tipicamente menos do que 200 micra de diâmetro e esses ensaios usualmente contêm milhares de manchas. Assim, microconjuntos podem exigir equipamento robótico especializado e equipamento de formação de imagem, que podem necessitar que seja feito por encomenda. Instrumentação é descrita em geral em uma revisão por Cortese, 2000, *The Scientist* 14(11):26.

[000132] Técnicas para a produção de bibliotecas imobilizadas de moléculas de DNA foram descritas na técnica. Em geral, a maioria dos métodos anteriormente descritos de como sintetizar bibliotecas de molécula de ácido nucleico de fio único, usando-se, por exemplo, técnicas de mascaramento para formar várias permutações de sequências nas várias posições discretas sobre o substrato sólido. A patente de U.S. nº5.837.832, cujo conteúdo é incorporado aqui por referência, descre-

ve um método aperfeiçoado para a produção de conjunto de DNA imobilizados para dar substratos de silício com base em tecnologia de integração em escala muito grande. Em particular, a patente de U.S. nº5.837.832 descreve uma estratégia chamada "colocar azulejo" para sintetizar conjuntos específicos de sondas em localizações especialmente definidas em um substrato que pode ser usado para substrato que pode ser usado para produzir as bibliotecas de DNA imobilizadas da presente invenção. A patente de U.S. nº5.837.832 também provê referências para as técnicas anteriores que podem também ser usadas.

[000133] Conjuntos de peptídeos (ou peptidomiméticos) podem também ser sintetizados em uma superfície de modo que coloca cada membro de biblioteca distinto (por exemplo, sequência de peptídeos única) em uma localização predefinida, discreta no conjunto. A identidade de cada membro de biblioteca é determinada por sua localização espacial no conjunto. As localizações no conjunto onde interações de ligação entre uma molécula predeterminada (por exemplo, um alvo ou uma sonda) e membros de bibliotecas reativos ocorrem são determinados, desse modo identificação das sequências dos membros de biblioteca reativos com base na localização espacial. Esses métodos são descritos na patente de U.S. nº 5.143.854; na WO 90/15070 e na WO 92/10092; Fodor e outros, 1991 , Science 251:767; Dower and Fodor, 1991 , Ann. Rep. Med. Chem. 26:271.

[000134] Para auxiliar detecção, alvos e sondas, podem ser marcados com qualquer repórter prontamente detectáveis, por exemplo, um repórter fluorescente, bioluminescente, fosforescente, radioativo, etc. Tais repórteres, sua detecção, acoplamento a alvos/sondas, etc são discutidos em outro lugar nesse documento. Marcação de sondas e alvo é também revelada em Shalon e outros, 1996, Genome Res 6(7): 639-45.

[000135] Exemplos específicos de conjuntos de DNA incluem os seguintes:

[000136] Formato I: sonda cDNA (-500 - ~5,000 de bases longas) é imobilizada para dar uma superfície sólida tal como as vidro usando-se manchamento com robô e é exposta a um conjunto de alvos ou separadamente ou em uma mistura. Esse método é amplamente considerado como tendo sido desenvolvido na Stanford University (Ekins and Chu, 1999, Trends in Biotechnology, 17: 217-218).

[000137] Formato II: um conjunto de oligonucleotídeo (~20 - ~25-mer oligos) ou sondas de ácido nucleico de peptídeo (PNA) é sintetizado ou *in situ*(on-chip) ou por síntese convencional por imobilização de *on-chip* . O conjunto é exposto a DNA de amostra marcado, é hibridizado, e a identidade /abundância de sequências complementares são determinadas. Tal lasca de DNA é vendida pela Affymetrix, Inc., sob a marca registrada GeneChip(R).

[000138] Exemplos de alguns formatos de microarranjo comercialmente disponíveis são indicados, por exemplo, em Marshall and Hodgson, 1998, Nature Biotechnology 16(1): 27-31.

[000139] Análise de dados é também uma parte importante de uma experiência que envolve conjuntos. Os dados brutos oriundos de uma experiência de microarranjo tipicamente são imagens que necessita ser transformadas em matrizes de – tabelas onde fileiras representam, por exemplo, genes, colunas representam, por exemplo, várias amostras tais como tecidos ou condições experimentais, e números em cada célula, por exemplo caracterizam o nível de expressão do gene particular na amostra particular. Essas matrizes têm de ser analisadas ulteriormente, se qualquer conhecimento sobre os processos biológicos subjacentes deve ser extraído. São revelados métodos de análise de dados (incluindo análise de dados supervisionados e não supervisionados bem como abordagens de bioinformática) em Brazma and Vilo

J, 2000, FEBS Lett 480(1): 17-24.

[000140] Como revelado acima, proteínas, polipeptídeos, etc podem também ser imobilizadas nos conjuntos. Por exemplo, anticorpos foram usados em análise de microarranjo da proteoma usando-se lascas de proteína (Borrebaeck CA1 2000, Immunol Today 21 (8): 379-82). Conjuntos de polipeptídeos são revistos em, por exemplo, MacBeath and Schreiber, 2000, Science, 289(5485): 1760-1763.

Composição farmacêutica

[000141] Um outro aspecto refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um agente identificado de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima misturada com um veículo, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitável.

[000142] Um outro aspecto refere-se a um processo de preparação de uma composição que compreende:

(i) identificação de um agente capaz de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM) usando-se qualquer um dos métodos descritos acima; e

(ii) misturação do dito agente com um veículo, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitável.

[000143] Ainda um outro aspecto da invenção refere-se ao uso de um agente identificado pelos métodos da invenção na preparação de um medicamento para o tratamento de uma desordem proliferativa, mais de preferência, câncer.

[000144] Para o uso de acordo com a presente invenção, o agente identificado pelos métodos acima pode ser apresentado como uma formulação farmacêutica, compreendendo os compostos ou sal fisiologicamente aceitável, éster ou outro seu derivado fisiologicamente funcional juntamente com um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis e outros ingredientes terapêuticos e/ou profiláticos. O(s) veículo(s) deve(m) ser aceitável no sentido de ser compatível com os outros

ingredientes da formulação e não nocível ao seu receptor. As composições farmacêuticas podem ser de uso ou animal na medicina humana ou veterinária.

[000145] Exemplos de tais excipientes adequados para várias formas diferentes de composições farmacêuticas descritas aqui podem ser encontradas no "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 2ª Edition, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller.

[000146] Veículos ou diluentes aceitáveis para o uso terapêutico são bem conhecidos na técnica farmacêutica, e são descritos, por exemplo, na Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985).

[000147] Exemplos de veículos adequados incluem lactose, amido, glicose, metil celulose, estearato de magnésio, manitol, sorbitol e similares.

[000148] Exemplos de diluentes adequados incluem etanol, glicerol e água.

[000149] A escolha do veículo, excipiente ou diluente farmacêutico pode ser selecionado com relação à rota pretendida de administração e prática farmacêutica padrão. As composições farmacêuticas podem compreender como, ou em adição ao veículo, excipiente ou diluente quaisquer aglutinantes, lubrificantes, agentes de suspensão, agentes de revestimento, agentes de solubilização, tampões, agente(s) aromatizante(s), agente(s) tensoativo(s), espessante(s), preservativo(s) (incluindo antioxidantes) e similares, e substâncias incluídas para a finalidade de tornar a formulação isotônica com o sangue do receptor pretendido.

[000150] Exemplos de aglutinantes adequados incluem amido, gelatina, açúcares naturais tais como glicose, lactose anidra, lactose de fluxo livre, beta-lactose, adoçantes de milho, gomas naturais e sintéticas, tais como acácia, tragacanto ou alginato de sódio, carboximetil

celulose e polietileno glicol.

[000151] Exemplos de lubrificantes adequados incluem oleato de sódio, estearato de sódio, estearato de magnésio, benzoato de sódio, acetato de sódio, cloreto de sódio e similares.

[000152] Conservantes, estabilizadores, corantes e ainda agentes de aromatização podem ser providos na composição farmacêutica. Exemplos de conservantes incluem benzoato de sódio, ácido sórbico e ésteres de ácido p-hidroxibenzóico. Antioxidantes e agentes de suspensão podem também ser usados.

[000153] Formulações farmacêuticas incluem aquelas adequadas para administração oral, topical (incluindo dérmica, bucal e sublingual), retal ou parenteral (incluindo subcutânea intradérmica, intramuscular e intravenosa), nasal e pulmonar, por exemplo, por inalação. A formulação pode, onde apropriado, ser convenientemente apresentada em unidades de dosagem e pode ser preparada por qualquer um dos métodos bem conhecidos na técnica de farmácia. Todos os métodos incluem a etapa de pôr em associação um composto ativo com veículos líquidos ou veículos sólidos finamente divididos ou ambos e então, se necessário, formação do produto na formulação desejada.

[000154] Formulações farmacêuticas adequadas para a administração oral em que o veículo é um sólido são mais de preferência apresentadas como formulações de dose unitária tais como bolos, cápsulas ou comprimidos cada um contendo uma quantidade predeterminada de agente ativo. Um comprimido pode ser produzido procompressão ou moldagem, opcionalmente com um ou mais ingredientes acessórios. Comprimidos comprimidos podem ser preparados por compressão em uma máquina adequada de um agente ativo em uma forma de escoamento livre tais como pós ou grânulos opcionalmente misturados com um aglutinante, lubrificante, diluente inerte, agente de lubrificação, agente tensoativo ou agente de dispersão. Comprimidos

modelados podem ser produzidos por moldagem de um agente ativo com um diluente líquido inerte. Comprimidos podem ser opcionalmente revestidos e, se não revestidos, podem opcionalmente ser sulcados. Cápsulas podem ser preparadas por introdução de um agente ativo, ou sozinho ou em mistura com um ou mais ingredientes acessórios, nos revestimento de cápsulas e então selamento delas de modo usual. Cachês são análogos a cápsulas em que um agente ativo juntamente com qualquer(qualsquer) ingrediente(s) acessório(s) é(são) selado(s) em um envelope de papel de arroz. Um agente ativo pode também ser formulado como grânulos dispersáveis, que podem, por exemplo, ser suspensos em água antes da administração, ou borrifados sobre alimento. Os grânulos podem ser embalados como sachê. Formulações adequadas para a administração oral em que o veículo é um líquido pode ser apresentado como uma solução ou uma suspensão em um líquido aquoso ou não aquoso, ou como uma emulsão líquida de óleo em água.

[000155] Formulações para a administração oral incluem formas de dosagem de liberação controlada, por exemplo, comprimidos em que um agente ativo é formulado em uma matriz de controle de liberação apropriado, ou é revestido com uma película de controle de liberação adequada. Tais formulações podem ser particularmente convenientes para o uso profilático.

[000156] Formulações farmacêuticas adequadas para a administração retal em que o veículo é um sólido são mais de preferência apresentadas como supositórios de dose unitária. Veículos adequados incluem manteiga de cacau e outros materiais comumente usados na técnica. Os supositórios podem ser convenientemente formados por mistura de um agente ativo com o(s) veículo(s) amolecido(s) ou fundido(s) seguido por resfriamento e moldagem em moldes.

[000157] Formulações farmacêuticas adequadas para a administra-

ção parenteral incluem suspensões ou soluções estéreis de um agente ativo em veículos aquosos ou oleagenosos.

[000158] Preparações injetáveis podem ser adaptadas para infusão contínua ou injeção por bolus. Tais preparações são convenientemente apresentados em recipientes de múltiplas doses ou de dose unitária que são selados depois da introdução da formulação até que o exigido para o uso. Alternativamente, um agente ativo pode estar na forma em pó que é constituído com um veículo adequado, tal como água livre de pirogênio, estéril, antes do uso.

[000159] Um composto ativo pode também ser formulado como preparações de depósito de longa ação, que pode ser administrado por injeção intramuscular ou por implantação, por exemplo, subcutaneamente ou intramuscularmente. Preparações de depósito podem incluir, por exemplo, materiais poliméricos ou hidrofóbicos adequados ou resinas de troca de íons. Tais formulações de longa ação são particularmente convenientes para o uso profilático. Formulações adequadas para a administração pulmonar via a cavidade bucal são apresentados tais que partículas contendo um composto ativo e desejavelmente tendo um diâmetro na faixa de 0,5 a 7 micra são fornecidos na árvore brônquica do receptor.

[000160] Como uma possibilidade tais formulações são indicadas na forma de pós finamente triturados que podem ser apresentados ou em uma cápsula penetrável, de modo adequado de, por exemplo, gelatina, para o uso em um dispositivo de inalação, ou alternativamente como uma formulação autopropelente compreendendo um agente ativo, um propelente líquido ou gasoso adequado e opcionalmente outros ingredientes tais como um tensoativo e/ou um diluente sólido. Propelentes líquidos adequados incluem propano e os clorofluorocarbeto, e propelentes gasosos adequados incluem dióxido de carbono. Formulações de auto-propelente podem ser empregados em que um agente ativo é

distribuído na forma de gotículas de solução ou de suspensão.

[000161] Tais formulações de auto-propelente são análogas às aquelas conhecidas na técnica e podem ser preparadas por procedimentos estabelecidos. De modo adequado elas são apresentadas em um recipiente provido com ou um válvula manualmente operável ou de funcionamento automático tendo as características de borrifamento desejado; vantajosamente a válvula é de um fornecimento de tipo medido de um volume fixo, por exemplo, de 25 a 100 microlitros, em cada sua operação.

[000162] Como uma outra possibilidade um agente ativo pode estar na forma de uma solução ou suspensão para o uso em um atomizador ou nebulizador pelo que uma corrente de ar acelerada ou agitação ultrassônica é empregado para produzir um névoa de gotícula fina para a inalação.

[000163] Formulações adequadas para a administração nasal incluem preparações em geral similares às aquelas descritos acima para a administração pulmonar. Quando distribuídas tais formulações desejavelmente teriam um diâmetro de partícula na faixa de 10 a 200 micra para permitir retenção na cavidade nasal; essa pode ser alcançada por, quando apropriado, uso de um pó de um tamanho de partícula adequada ou escolha de uma válvula apropriada. Outras formulações adequadas incluem pós grossos tendo um diâmetro de partícula na faixa de 20 a 500 micra, para a administração por inalação rápida através da passagem nasal de um recipiente mantido próximo ao nariz, e gotas nasais compreendendo de 0,2 a 5% p/v de um agente ativo em solução ou suspensão aquosa ou oleosa.

[000164] Veículos farmacologicamente aceitáveis são bem conhecidos por aqueles versados na técnica e incluem, mas não são limitados a, 0,1 M e de preferência 0,5 M de tampão de fosfato ou de 0,8% de solução salina. Adicionalmente, tais veículos farmacologicamente acei-

táveis podem ser soluções, suspensões e emulsões aquosas ou não aquosas. Exemplos de solventes não aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, óleos vegetais tal como óleo de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis tal como oleato de etila. Veículos aquosos incluem água, soluções, emulsões ou suspensões alcoólicas/aquosas, incluindo solução salina e meio tamponado. Veículos parenterais incluem solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, óleos fixos ou de Ringer lactados. Conservantes e outros aditivos podem também estar presentes, tais como por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes de quelação, gases inertes e similares.

[000165] Formulações adequadas para a formulação tópica podem ser providas, por exemplo, como géis, cremes ou pomadas. Tais preparações podem ser aplicadas, por exemplo, a um ferimento ou úlcera ou diretamente espalhável sobre a superfície de ferimento ou da úlcera ou transportadas em um suporte adequado tal como uma bandagem, gaze, malha ou similares que podem ser aplicadas a e sobre a área a ser tratada.

[000166] Formulações líquidas ou em pó podem também ser providas que podem ser borrifadas ou pulverizadas diretamente sobre o sítio a ser tratado, por exemplo, um ferimento ou úlcera. Alternativamente, um veículo tal como bandagem, gaze, malha ou similares pode ser borrifada ou povilhada com a formulação e então aplicada ao sítio a ser tratado.

[000167] De acordo com um outro aspecto da invenção, é provido um processo para a preparação de uma composição farmacêutica ou veterinária como descrita acima, o processo compreendendo pôr o(s) composto(s) ativo(s) em associação com o veículo, por exemplo, por mistura.

[000168] Em geral, as formulações são preparadas por uniforme-

mente e intimamente pôr em associação o agente ativo com veículos líquidos ou veículos sólidos finamente divididos ou ambos, e então se necessário modelagem do produto. A invenção estende-se a métodos para a preparação de uma composição farmacêutica compreendendo pôr um agente em associação com um veículo ou portador farmacêuticamente ou veterinariamente aceitáveis.

Aplicações Terapêuticas

[000169] Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um método de inibição de crescimento e espalhamento de células de câncer e outras células tendo sofridos uma transição epitélio-mesenquimal (TEM) em um indivíduo que necessita do mesmo, o dito método compreendendo administração de inibidor de Axl ao dito indivíduo.

[000170] Como usado aqui "inibição de transição epitelial em mesenquimal" refere-se a uma diminuição no número de células que sofrem e tendo sofridos transição epitélio-mesenquimal (TEM) em um indivíduo.

[000171] Em uma concretização preferida, o indivíduo que necessita do mesmo está sofrendo de câncer.

[000172] De preferência, onde o indivíduo está sofrendo de câncer, o método da invenção inibe células de tumor tendo sofrido uma transição epitélio-mesenquimal (TEM) em uma tal extensão que as células de câncer são incapazes de sofrer metástase, isto é a inibição é tal que o câncer não se desenvolve para dar câncer metastático, ou que elas já sofrem metástase são incapazes de se desenvolver em sítios distantes no corpo.

[000173] Em uma concretização altamente preferida, o método da invenção previne que células completem a transição epitélio-mesenquimal (TEM) espalhem em sítios distantes no corpo, isto é a inibição é tal que o espalhamento de células metastáticas dependem da transição epitélio-mesenquimal (TEM) é eliminado.

[000174] Um outro aspecto da invenção refere-se a um método para o tratamento de câncer metastático em um indivíduo que necessita do mesmo, o dito método compreendendo inibição de células de tumor que sofrem transição epitélio-mesenquimal (TEM) por administração ao dito indivíduo um inibidor de Axl.

[000175] Como usado aqui, o termo "inibidor de Axl" refere-se a uma molécula que é capaz de inibir Axl, a trajetória de sinalização de Axl ou qualquer um ou mais componentes da trajetória da sinalização de Axl. Em uma concretização, a molécula será capaz de reduzir ou prevenir Axl ou expressão de proteína de Axl.

[000176] Em uma concretização particularmente preferida, o inibidor de Axl é um anticorpo de anti-Axl.

[000177] Em uma concretização particularmente preferida, o inibidor de Axl é um inibidor de quinase de molécula pequena. Um exemplo de tal inibidor de molécula pequena é R428, como descrito em Holland e outros 2010.

[000178] Em uma concretização particularmente preferida, o indivíduo é um mamífero, mais de preferência, um ser humano.

[000179] De preferência, o câncer é câncer de mama, de próstata, de glioma, pulmão, pancreático.

[000180] Metástase explica 90% de mortalidade relacionada com câncer.

[000181] O entendimento dos mecanismos moleculares permite que metástase de célula de tumor seja uma principal questão de saúde. Os presentes inventores demonstraram que o receptor de Axl de quinase de tirosina é um forte preditor de sobrevivência baixo de pacientes totais após câncer de mama detectado por mamografia primário.

[000182] Células de câncer de mama metastático exigem expressão de Axl para manter um fenótipo maligno invasivo e para formar tumores de mama em diferentes microambientes. Indução de uma transição

epitélio-mesenquimal (TEM) em células epiteliais de mamífero regula para cima expressão de Axl que gera um laço de sinalização autócrino com seu ligante, Gas6. Inibição de expressão de Axl previne espalhamento de metastático a partir dos sítios ortóticos na glândula mamária a linfonodos e órgãos principais. Portanto ativação dependente de TEM inapropriada de Axl durante as transições malignas precoces podem promover metástase e negativamente afetam sobrevivência do paciente total. Rompimento de sinalização de Axl via estratégias terapêuticas estabelecidas, portanto, representa uma avenida de excitação para o desenvolvimento terapêutico de tratamentos para as desordens proliferativas de células tais como câncer de mama, e desordens de motilidade de célula e mediadas por sobrevivência de célula.

[000183] Um outro aspecto da invenção refere-se ao uso de um inibidor de Axl na preparação de um medicamento para a inibição ou reversão de transição epitélio-mesenquimal (TEM).

[000184] Ainda um outro aspecto da invenção refere-se ao uso de um inibidor de Axl na preparação de um medicamento para o tratamento de câncer metastático por inibição de células de tumor dependente de uma transição epitélio-mesenquimal (TEM).

[000185] Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um método de tratamento de câncer metastático ou de câncer de estágio tardio em um indivíduo que necessita do mesmo, o dito método compreendendo administração de inibidor de Axl ao dito indivíduo.

[000186] Em um outro aspecto, a invenção refere-se ao uso de um inibidor de Axl na preparação de um medicamento para o tratamento de câncer metastático ou de câncer de estágio tardio.

[000187] Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um método de inibição de metástase em um indivíduo que necessita do mesmo, o dito método compreendendo administração de inibidor de Axl ao dito indivíduo.

[000188] Um outro aspecto refere-se a um método de inibição de invasividade induzida por TEM em indivíduo que sofre de câncer, o dito método compreendendo administração de inibidor de Axl ao dito indivíduo.

[000189] Ainda um outro aspecto refere-se ao uso de um inibidor de Axl na preparação de um medicamento para a inibição de invasividade induzida por TEM em indivíduo que sofre de câncer.

[000190] De preferência, o inibidor de Axl é um anticorpo de anti-Axl ou um inibidor de molécula pequena.

Administração

[000191] As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser adaptadas para a administração retal, nasal, intrabronquial, tópica (incluindo bucal e sublingual), vaginal ou parenteral (incluindo subcutânea, intramuscular, intravenosa, intra-arterial e intradérmica), intraperitoneal ou intratecal. De preferência a formulação é uma formulação oralmente administrada. As formulações podem convenientemente ser apresentadas em forma de dosagem unitária, isto é, na forma de porções discretas contendo uma dose unitária, múltiplas ou subunidades de uma dose unitária. À título de exemplo, as formulações podem estar na forma de comprimidos e cápsulas de liberação sustentada, e podem ser preparadas por qualquer método conhecido na técnica de farmácia.

[000192] Formulações para a administração oral na presente invenção podem ser apresentadas como: unidades discretas tais como cápsulas, gellules, gotas, cachês, pílulas ou comprimidos cada contendo uma quantidade predeterminada do agente ativo; como um pó ou grânulos; como uma emulsão, emulsão ou uma suspensão do agente ativo em um líquido aquoso ou um líquido não aquoso; ou como uma emulsão de líquida de óleo em água ou uma emulsão líquida de água em óleo; ou como um bolus etc. De preferência, essas composições

contêm de 1 a 250 mg e mais de preferência de 10-100 mg, do ingrediente ativo por dose.

[000193] Para composições para a administração oral (por exemplo, comprimidos e cápsulas), o termo "veículo aceitável" inclui veículos tais como excipientes comuns, por exemplo, agentes de ligação, por exemplo xarope, acácia, gelatina, sorbitol, tragacanto, polivinilpirrolidona (Povidona), metilcelulose, etilcelulose, carboximetilcelulose de sódio, hidroxipropil-metilcelulose, sacarose e amido; materiais de enchimento e veículos, por exemplo, amido de milho, gelatina, lactose, sacarose, celulose microcristalina, caulim, manitol, fosfato de dicálcio, cloreto de sódio e ácido algínico; e lubrificantes tais como estearato de magnésio, estearato de sódio e outros estearatos metálicos, ácido glicerol estearato esteárico, fluido de silicone, talco, ceras, óleos e sílica coloidal. Agentes aromatizantes tais como hortelã-pimenta, óleo de gaultéria, aromatizante de cereja e similares podem também ser usados. Pode ser desejável adicionar um agente de coloração para produzir a forma de dosagem prontamente identificável. Comprimidos podem também ser revestidos por métodos bem conhecidos na técnica.

[000194] Um comprimido pode ser produzido por compressão ou moldagem, opcionalmente com um ou mais ingredientes acessórios. Comprimidos podem ser preparados por compressão de em uma máquina adequada o agente ativo em forma de escoamento livre tal como pó ou grânulos, opcionalmente misturados com um aglutinante, lubrificante, diluente inerte, preservativo, agente tensoativo ou de dispersão. Comprimidos modelados podem ser produzidos por moldagem de em uma máquina adequada uma mistura do composto em pó umedecido com um diluente líquido inerte. Os comprimidos podem ser opcionalmente ser revestidos ou sulcados e podem ser formulados de modo a prover baixa ou liberação controlada do agente ativo.

[000195] Outras formulações adequadas para a administração oral

incluem pastilhas compreendendo o agente ativo em uma base aromatizada, usualmente sacarose e acácia ou tragacanto; pastilhas compreendendo o agente ativo em uma base inerte tais como gelatina e glicerina, ou sacarose e acácia; de lavadores bucais compreendendo o agente ativo em um veículo líquido adequado.

[000196] Outras formas de administração compreendem soluções ou emulsões que podem ser injetadas intravenosamente, intra-arterialmente, intratecalmente, subcutaneamente, intradermicamente, intraperitonealmente ou intramuscularmente, e que são preparadas a partir de soluções estéreis ou esterilizáveis. Formas injetáveis tipicamente contêm entre 10 - 1000 mg, de preferência entre 10 - 250 mg, do ingrediente ativo por dose.

[000197] As composições farmacêuticas da presente invenção podem também estar na forma de supositórios, pessários, suspensões, emulsões, loções, pomadas, cremes, géis, sprays, soluções ou pós de povilhamento.

[000198] Um meio alternativo de administração transdérmica é por uso de um emplastro de pele. Por exemplo, o ingrediente ativo pode ser incorporado em um creme que consiste de uma emulsão aquosa de polietileno glicóis ou parafina líquida. O ingrediente ativo pode também ser incorporado, em uma concentração de entre 1 e 10% em peso, em uma pomada que consiste de uma cera branca e base de parafina mole branca juntamente com tais estabilizadores e conservantes quando podem ser exigidos.

Dosagem

[000199] Uma pessoa versada na técnica pode facilmente determinar uma dose apropriada de uma das presentes composições para administrar a um indivíduo sem experimentação imprópria. Tipicamente, um médico determinará a dosagem real que será mais adequada para um paciente individual e dependerá de uma variedade de fatores incluindo

a atividade do agente específico empregado, da estabilidade metabólica e da duração da ação do agente, da idade, do peso de corpo, da saúde geral, do sexo, da dieta, do modo e do tempo de administração, da taxa de excreção, da combinação de fármaco, da severidade da condição particular, e da terapia do sofrimento individual. As dosagens descritas aqui são exemplares do caso médio. Pode haver naturalmente casos individuais onde faixas de dosagem mais altas ou mais baixas são merecidas, e essas estão dentro do escopo da invenção.

[000200] De acordo com dessa invenção, uma quantidade eficaz de agente pode ser administrada a inibir Axl. Naturalmente, essa quantidade de dosagem ulteriormente será modificada de acordo com o tipo de administração do agente. Por exemplo, para alcançar uma "quantidade eficaz" para a terapia aguda, administração parenteral é preferida. Uma infusão intravenosa do composto em 5% de dextrose em água ou solução salina normal, ou uma formulação similar com excipientes adequados, é mais eficaz, embora uma injeção em bolus intramuscular seja também útil. Tipicamente, a dose parenteral será cerca de 0,01 a cerca de 100 mg/kg; de preferência entre 0,1 e 20 mg/kg, de um modo a manter a concentração de fármaco no plasma em uma concentração eficaz para inibir uma quinase. Os agentes podem ser administrados de uma a quatro vezes diariamente em um nível para alcançar uma dose diária total de cerca de 0,4 a cerca de 400 mg/kg/dia. A quantidade precisa de um agente ativo que é terapeuticamente eficaz, a rota pela qual tal agente é melhor administrado, é prontamente determinada por aquele versado na técnica por comparação do nível de sangue do agente com a concentração exigida ter um efeito terapêutico.

[000201] Os agentes dessa invenção podem também ser administrados oralmente ao paciente, de um modo tal que a concentração de fármaco seja suficiente para alcançar uma ou mais das indicações te-

rapêuticas descritas aqui. Tipicamente, uma composição farmacêutica contendo o agente é administrada a uma dose oral de entre cerca de 0,1 a cerca de 50 mg/kg de um modo consistente com a condição do paciente. De preferência a dose oral seria cerca de 0,5 a cerca de 20 mg/kg.

[000202] Os agentes dessa invenção podem ser testados em um de vários ensaios biológicos para determinar a concentração de um agente que é exigido a ter um dado efeito farmacológico.

Kit de Partes

[000203] Um outro aspecto da invenção refere-se a um kit para a avaliação da capacidade de um agente de inibir ou reverter a transição epitélio-mesenquimal (TEM), o dito kit compreendendo anticorpos de anti- Axl.

[000204] Ainda um outro aspecto da invenção refere-se a kit para a avaliação da capacidade de um agente de inibir ou reverter a transição epitélio-mesenquimal (TEM), o dito kit compreendendo uma sonda de ácido nucleico para Axl.

[000205] Um outro aspecto da invenção refere-se a kit para a avaliação da capacidade de um agente de inibir ou reverter a transição epitélio-mesenquimal (TEM), o dito kit compreendendo pelo menos um iniciador de QPCR para Axl.

[000206] Um outro aspecto da invenção refere-se ao uso de um kit como definido acima em qualquer um dos métodos descritos acima.

Diagnósticos e prognósticos

[000207] A invenção também refere-se ao uso de Axl como um biomarcador no diagnóstico ou prognóstico das doenças caracterizadas por atividade proliferativa, particularmente em indivíduos a serem tratados com inibidores de Axl.

[000208] Como usado aqui, o termo "método de prognóstico" significa um método que permite uma previsão em relação a progressão de

uma doença de um ser humano ou animal diagnosticado a doença, em particular, câncer. Mais especificamente, os cânceres de interesse incluem cânceres de mama, de pulmão, gástrico, de cabeça e de pescoço, colorretal, renal, pancreático, uterino, hepático, de bexiga, endometrial e de próstata e leucemias.

[000209] O termo "método de diagnóstico" como usado aqui significa um método que permite uma determinação da presença ou do tipo de câncer em ou em um ser humano ou animal. De modo adequado o marcador permite que o sucesso do tratamento com um inibidor de Axl seja avaliado. Como discutido acima, diagnósticos adequados incluem sondas dirigidas a qualquer um dos genes como identificados aqui tal como, por exemplo, iniciadores de QPCR, sondas de FISH e também indicados.

[000210] O termo "método de prognóstico" como usado aqui significa um método que permite uma determinação da probabilidade de um indivíduo sendo suscetível ou responsável ao tratamento com um agente/regime particular. Tal métodos de prognóstico fornecem informação do resultado provável de um regime de tratamento particular, por exemplo, a probabilidade de um indivíduo que responde ao dito tratamento, e/ou informação no tocante a como agressivamente um indivíduo seria tratado dentro de um regime de tratamento particular, e/ou como agressivamente um indivíduo seria tratado com métodos terapêuticos convencionais tais como radiação/quimioterapia. Os métodos de prognóstico descritos aqui, portanto, têm aplicações importantes no campo de remédios personalizados.

[000211] Uma concretização preferida assim refere-se ao uso de um biomarcador como descrito acima em uma aplicação de remédio personalizado.

[000212] Em uma concretização preferida, a aplicação de remédio personalizado é para a determinação de se um indivíduo estará susce-

tível ou responsável ao tratamento com um inibidor de Axl.

[000213] Em uma concretização preferida, a aplicação de remédio personalizado é para a determinação de se um indivíduo é particularmente provável de sofrer de câncer metastático.

[000214] Um outro aspecto da invenção refere-se a um método de prognóstico para a determinação de se um indivíduo estará suscetível a tratamento com um inibidor de Axl, o dito método compreendendo detecção da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM) no dito indivíduo.

[000215] Um outro aspecto da invenção refere-se ao uso de Axl como um biomarcador em um agente de prognóstico para a determinação de se um indivíduo estará suscetível ou responsável ao tratamento com um inibidor de Axl.

[000216] Um outro aspecto da invenção refere-se a um método de prognóstico para a determinação de se um indivíduo é particularmente provável de sofrer de câncer metastático, o dito método compreendendo detecção da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM) no dito indivíduo.

[000217] De preferência, os métodos de prognóstico descritos acima compreendem as etapas de:

(i) obtenção de uma amostra a partir do dito indivíduo; e

(ii) determinação da expressão de Axl na dita amostra quando comparada com uma amostra de controle, em que a regulação positiva de expressão de Axl em relação à amostra de controle é indicativa de suscetibilidade a tratamento com um inibidor de Axl e probabilidade aumentada de sofrimento de câncer metastático.

[000218] Através de todo o relatório, de preferência os métodos descritos aqui são realizados *ex vivo*.

[000219] De preferência, a amostra é analisada por análise de proteína, mais de preferência, por ELISA, PET, citometria de fluxo, SELDI-

TOF MS ou 2-D PAGE.

[000220] A presente invenção é ulteriormente ilustrada à título dos seguintes exemplos não limitantes, e com referência às seguintes figuras, em que:

[000221] figura 1 mostra que a expressão de Axl é um fator de prognóstico negativo quanto a sobrevivência de câncer de mama. (A) fraca imunohistoquímica (60%) e forte expressão de Axl. (B) análise de Kaplan-Meier de 8 anos acompanhamento clínico. (C) Análise multivariada. (D) Expressão de Axl em pares emparelhados (n=16) de carcinoma de mama humano primário e metastático: tumores primários à esquerda (superior. Axl negativo, inferior. Axl positivo), metástases à direita (superior, fígado, inferior, osso). Expressão de Axl tenderam a ser mais forte nas metástases quando comparada com tumores primários correspondentes (p = 0,11, teste de McNemar).

[000222] Figura 2 mostra que Axl é exigido para invasividade de célula de câncer de mama (A) FACS e (B) Western blot da expressão de Axl em série de célula de carcinoma de mama de MB-MDA-231 epitelial. (C) Axl é análise epitelial fosforilada de ensaio de invasão de matrigel induzida por soro (D) ou SDF-1 (E). Análise de 3D matrigel (F, G) de MB- MDA-231/shLuc (painéis superiores) e MB-MDA-231/shAxl2 (painéis inferiores).

[000223] Figura 3 mostra atividade de Axl é regulada positivamente por indutores de TEM em célula epitelial de mama. (A) Análise de citometria de fluxo de níveis superficiais de Axl sobre uma linha de célula de MCFIOa estavelmente expressa Twist. (B) Extratos oriundos de controle (wt) e de células de MCFIOa de expressão de Twist foram analisados quanto a mudanças nos marcadores epiteliais (E-caderina, [beta]-catenina) e mesenquimais (N-caderina). Meio condicionado foi analisado por SDS-PAGE e imunomanchamento usando-se um anticorpo contra Gas6. (C) Células de MCFIOa transduzidas com vetores

retrovirais que codificam Twist, Zeb2, Slug, Snail ou controle de vetor (GFP) foram analisadas pela citometria de fluxo quanto a expressão de superfície de Axl (esquerdo) e a fluorescência de meio geométrico (direito). (D) Extratos oriundos de MCF1 As células transduzidas com vetores retrovirais de Twist, Zeb2, Slug ou Snail foram analisadas por imunomanchamento quanto a mudanças nos marcadores epiteliais (E-caderina, [beta]-catenina) e mesenquimal (N-caderina, vimentina). (E) Morfologia de células de MCFIAs transduzidas com vetores retrovirais de Twist, Zeb2, Slug ou Snail a 72 horas pós-semeadura.

[000224] Figura 4 mostra que tumores de mama engenheiradas com tecido exigem expressão de Axl. (A) Imagem *in vivo* de implantes de engenheiramento de tecido de tumor de MDA-MB-231/GFP-Luc nos camundongos NODSCID. Crescimento de tumor temporal foi monitorado por imagem ótica *in vivo* de bioluminescência de luciferase de células de MDA-MB-231/GFP-Luc (i). Número de célula de tumor (fóton total) e medições de extensão de infiltração radial (diâmetro de sinal) são a partir de implantes de controle (linha sólida) e implantes de célula que medem MDA-MB-231/GFP-Luc- shAxl2 (linha tracejada) mostra dependência de crescimento de tumor e colonização dentro de armações de engenheiramento de tecido de ácido poli-láctico (ii). Aparência de armações bilaterais na excisão (iii), Análise imunoistoquímica de tumores engenheirados de tecido com Axl de anti-humano em 28 dias pós-implantação (painel esquerdo, controle de vetor; painel direito, shAxl2) (iv). Implantes de engenheiramento de tecido de tumor com controle de tipo selvagem (painel esquerdo) e células de expressão de shAxl2 (painel direito) foram analisadas por imunoistoquímica com um Axl de anti-humano (v). Quadrados negros demarcam colonização e espalhamento radial de células de Luc de MDA-MB-231/GFP Luc. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ (teste t emparelhado) em comparação com controle. N = 6 camundongo/grupo. (B) Imagem temporal *in vivo* de

implantes tricelulares compreendendo células microvasculares de ser humano primárias (EC), células de músculo liso vascular (SMC) e células de Luc de MDA-MB-231/GFP (i). Crescimento de tumor (fóton total) e medições de espalhamento radial (diâmetro) nos implantes de controle (linha sólida) e nos implantes de célula de MDA-MB-231 de expressão shAxl2 (linha quebrada) analisados na presença de uma vasculatura engenheirada de tecido (ii). Tumores extirpados (28 dias) são altamente vascularizados por microvasos de ser humano engenheirados (iii) análise imunoistoquímica mostra que vasos de manchamento com CD31 de anti-humano engenheirados contêm células de hemáceas intra-lumenais (inset) indicativos de desobstrução e perfusão (iv): painel esquerdo, controle de vetor; painel direito, shAxl- 2). *p0,05, **p0,005, ***p<0,0005 (teste t emparelhado) em comparação com controle. N= 7 camundongo/grupo, diâmetro de vaso de intra-armação (esquerdo) não é afetado enquanto densidade microvascular (direita) é levemente aumentada nos tumores de MDA-MB-231 engenheirados com tecido por expressão de shAxl2.

[000225] Figura 5 mostra análise epi-alélica *in vivo* descreve um limiar de expressão de Axl distinta exigido para a formação de tumor de mama. (A) Imagem *in vivo* temporal de bioluminescência dos xenoenxertos de MDA-MB-231 /GFP-Luc epi-alélicos subcutâneos em camundongo NOD/SCID^Δ2mnull compreendendo expressão de Axl graduada por shRNAs shAxl278 (i), shAx280 (ii) e shAxl2 (iii) de direcionamento de Axl em comparação com um controle de shRNA de direcionamento de Axl ineficaz (shAxl279). (C) Gráficos de barra mostram significam mudanças em fótons e diâmetros de tumor com base na análise de imagem ótica tumores. Medições de crescimento de tumor MDA-MB-231/GFP-Luc epi-alélicos (fóton total) e infiltração radial (diâmetro de sinal) foram normalizadas para shAxl279 (shRNA ineficaz) (H). (D) Crescimento de tumor (medições 28 dias) representado grafi-

camente versus conhecimento de Axl revelam o limiar terapêutico (80% de expressão reduzida). * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ (teste t emparelhado) em comparação com controle. N = 6 camundongo/grupo.

[000226] Figura 6 mostra que Axl é exigido para metástase de células de carcinoma de mama. (A) Tumor primário monitorado *in vivo* e metástase, I. Crescimento ortopédico (painel superior) e metástase para linfonodo durante um tempo (painel inferior). II. Crescimento de tumor primário monitorado por imagem ótica *in vivo* (GE Explore Optix) de tipo selvagem (linha sólida) e implantes de RNAi de Axl (linha quebrada). (B) Detecção de metástase em órgãos diferentes. (C) Linhas de células de detecção de câncer de mama *ex vivo*. I. Imagens de órgão extirpados são mostradas. II. Análise histológica dos mesmos tecidos confirmaram metástase (ceta) para diferentes órgãos. (D) Teste de Mann-Whitney (classificação de log) entre controle (vetor) e camundongos injetados ortograficamente com shAxl2 mostram uma sobrevivência aumentada de camundongo portadores de tumor de MDA-MB-231-D3H2LN/GFP-Luc-shAxl2 ($P = 0,013$).

[000227] Figura 7 mostra que Axl é essencial para recorrência de resposta pós-imune e metástase de células de carcinoma de mama em camundongos BALB/c. (A) Células de carcinoma de mama 4T1-GFP-Luc de camundongos que expressam shRNA de direcionamento de Axl camundongo (shmAxl2) ou shRNA de direcionamento de Axl de ser humano (shAxl279) foram analisados por citometria de fluxo para a expressão de superfície de Axl de camundongo ou controle de isótipo controle. (B) Imagem *in vivo* temporal de bioluminescência de células de 4T1-GFP-Luc injetadas ortotróficas (almofada gorda mamária) que expressam um shRNA de direcionamento de Axl de camundongo (4T1-GFP-LucshmAxl2) ou shRNA específico de ser humano de controle negativo (4T1-GFP-Luc-shAxl279) em camundongos BALB/c (i). Quantificação de bioluminescência de sangue total (fóton total) no controle

(4T1-GFP-Luc shAxl279, (linha sólida) e supressão de Axl (4T1-GFP-Luc-shmAxl2, linha cinza) injetado em camundongo BALB/c durante um período de 8 semanas (H). * $p < 0,05$ (teste t), N= 7 camundongo/grupo. (C) Sobrevivência de metástase espontânea (a 8 semanas de implantação pós-ortótica) para diferentes órgãos monitorados por detecção bioluminescência *ex vivo* de células de 4T1-GFP-Luc em órgãos extirpados do controle ou camundongos de BALB/c portador de tumor de supressão de Axl.

[000228] Figura 8 mostra a sequência para o vetor L383 pCSI Pu-ro2AGFP2ALuc2.

[000229] Figura 9, Painel A, mostra análise de citometria de fluxo de células de MCFIAs transduzidas com construtos de Slug ou Ha-Ras (pBABE puro H-Ras V12, Addgene), analisadas usando-se co-expressão de GFP; expressão de Ha-Ras foi selecionada por tratamento com puromicina por 48 horas. Expressão de Slug e Ha-Ras nas células de MCFIOa levam a um forte aumento na expressão de superfície do marcador de célula tronco de câncer CD44.

[000230] figura 9, Painel B, mostra que expressão de superfície de Axl em células de MCFIOa que codificam Lsug, Ras. Expressão de superfície de Axl se correlaciona com a presença de CD44 e características mesenquimais tanto em TEM induzido tanto por Slug quanto por.

[000231] Figura 9, Painel C, mostra morfologia mesenquimal de células de MCFIOa de expressão de Slug a 72 horas pós semeadura classificadas por FACS para sub-população de expressão alta de CD44 (CD44+) e baixa de CD44 (CD44-). Células de CD44- mostram morfologia epitelial, enquanto células de CD44+ MCF10 demonstram morfologia mesenquimal alongada.

[000232] Figura 9, Painel D, mostra análise de Western blot de células de CD44- e de CD44+MCF10a transduzidas com vetores retrovi-

rais que codificam células de Slug, Ras. CD44-MCFIOa retinham expressão de proteína de cicloesqueleto e juncional epitelial. Em contaste com isso, células de CD44+ mostraram expressão de marcador mesenquimal (vimentina, N-caderina) e perda de E-caderina, demonstrativo de TEM.

[000233] Figura 9, Painel E, mostra crescimento das células de MCFIOa de expressão de CD44+ e CD44- Slug e Ha-Ras em 3-D matrigel. CD44+, células de MCFIOa de expressão de Axl são invasivas, consistente com um fenótipo mesenquimal.

[000234] Figura 10 mostra que células de MCFIOa constitutivamente expressam (Topo, Western blot, lisado total) e secretam (Middle, Western blot, meio condicionado) Gas6 que torna expressão associada a células (Bottom, anti-Gas6, análise de citometria de fluxo) em expressão de Axl induzida por Slug e Snail.

[000235] Figura 11 mostra que células de MDA-MB-231 constitutivamente expressam o ligante de Axl, Gas6. (Topo, Western blot, lisado total que é predominantemente associado a célula; Meio, Western blot, meio condicionado; fundo, anti-Gas6, análise de citometria de). Supressão de Axl reduz Gas6 associado a célula enquanto níveis crescentes no meio condicionado (Gas6*) sem afetar expressão total.

EXEMPLOS

Materiais e Métodos

Plasmídios e anticorpos

[000236] Todos os shRNAs eram expressos a partir de um promotor de U6 humano modificado no LTR dos vetores retrovirais RRI-Red/L087 (Genbank: EU424173) usados para transformar células de MDA-MB-231 via infecção retroviral. RRI-Red também expressa Pu-ro2AmRed1 resultando em resistência a puromicina e fluorescência vermelha em células transformadas com sucesso. Todos os nucleotídeos de cDNA de Axl são numerados como no Genbank: BC032229.

As seguintes sequências foram usadas: Axl2; (grampo em letras minúsculas)

GACATCCTCTTTCTCCTGCGAAGCCCATctggctATGGGCTTCGCAGGAGAAAGAGG
ATGTC , shAxl278;
ACGGGTCTCCTTCTTTGCGCGttggatccctggatcgatccaaCGGCGAAAGAAGGAGACC
CG, shAxl279;
GCTTCAGGCGATTTCCCCGGCGttggatccctggatcgatccaaCGCCGGGGAAATCGCCT
GAAGC, shAxl280;
ATGCACGCCCAGCCGCACAGCGttggatccctggatcgatccaaCGCTGTGCGGCTGGGCG
TGCAT shLuc;

GATTATGTCCGGTTATGTAAACAATCCGGctggctCCGGATTGTTTACATAACCGGAC
ATAATC.

[000237] O vetor de expressão retroviral L383 pCSI Pu-ro2AGFP2ALuc2 (vide figura 8) foi produzido em vários estágio por clonagem das sequências de codificação de puromicin-N-acetil- transferase, EGFP, e luciferase de vagalume em vetor de expressão retroviral de CRU5 (Blo e outros., 2007). Cada quadro de leitura aberto foi separado do seguinte por um ligador que codifica a região 2A (XXSGLRSGQLLNFDLLKLAGDVESNPGP) de vírus de doença de pé e de boca. Essa sequência é clivada co- co-traducionalmente resultando na produção de quantidades aproximadamente estequiométricas de cada proteína (Lorens 2004). Plasmídios que expressam hSnail, hSlug e hZEB2 foram construídos por clonagem dos fragmentos apropriados dos construtos BC012910, BC015895 e BC060819 (Open Biosystems) respectivamente no vetor retroviral de CRU5-I RES-GFP (Lorens e outros 2000). Dois anticorpos contra Axl de ser humano foram usados; Axl de anti-humano monoclonal de camundongo (MAB154, R&D Systems) e Axl de anti-humano de cabra (M-20, Santa Cruz). Além disso, os seguintes anticorpos foram empregados; pAxl de anti-humano de coelho (Y779, R&D), Snail de anti-humano de rato (SN9H2, sinalização de célula), Slug de anti-humano de camundongo (L40Cb, sinalização de célula), E-caderina de anti-humano de coelho

(24E10, Sinalização de célula), N-caderina de anti-humano de coelho (ab18203, Abeam), actina, b-catenina anti-humano de camundongo (L54E2, Sinalização de célula), Gas6 de anti-humano de camundongo (R&D Systems), Twist de anti-humano de coelho (Twist2C1a, Abeam).

Cultura de células, transduções retrovirais e ensaio de proliferação de célula

[000238] Todas as células foram cultivadas a 37°C, 5% de CO₂. Células de Phoenix A (Dr. Gary Nolan, Stanford), células de carcinoma epiteliais de mama de ser humano de MDA-MB-231 (American Type Culture Collection, Rockville, MD), células endoteliais microvasculares dérmicas humanas (HMVEC), e células de músculo liso da artéria pulmonar (PASMC) (Cambrex, Walkersville, MD, USA) foram mantidas como anteriormente descritas (Holland 2005). A linha de célula clonal MDA-MB-231 -DH3L2N (Xenogen Corporação, Alameda, CA, USA) foi cultivada em meio essencial mínimo com meio de solução de salina equilibrada com meio de Earl de MEM/EBSS suplementado com 10% de FBS, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de L-glutamina, e 1% de piruvato de sódio. Células de Phoenix A foram transfectadas usando-se o método de fosfato de cálcio (Swift, 1999). Cerca de 30 horas depois da transfecção, o meio foi mudado em meio de crescimento para as células serem infectadas, suplementadas com 10% de FBS. Sobrenadante infeccioso foi coletado -48 horas depois da transfecção. Células alvo foram expostas a sobrenadante contendo 5 mg/ml de sulfato de protamina de um dia para o outro. Células foram infectadas com 1 µg/ml de puromicina. Ensaio de proliferação de célula foi realizado para analisar o potencial de proliferação das diferentes células de supressão de Axl em comparação com linha de célula de controle usando-se ensaio de MTS de Promega. Células foram semeadas em placas de cultura de tecido de 96 cavidades ou não tratadas ou revestidas com ou 20 µl de colágeno (do rabo do rato, Roche), Fibronectina

(Sigma) ou Matrigel (BD Biosciences). 2000 Células em 100 µl de meio foram semeadas em triplicada em placas de 96 cavidades e foram analisadas a cada 24 horas usando-se o ensaio de MTS da Promega de acordo com as instruções do fabricante.

Imunomanchamento, Citometria de fluxo e armazenagem de célula

[000239] As células de MDA-MB-231 foram tripsinadas usando-se procedimentos padrão e foram lavadas em PBS-0,2% de BSA antes do manchamento com anti-Axl (#MAB154, R&D Systems) em uma concentração final de 5 mg/ml em PBS-0,2% de BSA por 40 minutos a temperatura ambiente. Células foram lavadas duas vezes em PBS-0,2% de BSA) e foram incubadas com anticorpo secundário (APC de anticomundongo de cabra (Alofiocianina, reticulada, sondas moleculares) a uma concentração final de 0,2 mg/ml por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Células foram lavadas duas vezes com PBS-2% de BSA e foram ressuspensas em 300 ml de PBS-0,2% de BSA antes da análise em um citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences). Análises de dados foram realizadas usando-se o software FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA). Células que expressam altos níveis de GFP, RFP e baixos Axl (shRNA) foram isoladas por FACS Aria SORP com laser de 488 nm, 532 nm, 638 nm e 407 nm para estabelecer população de células homogêneas, estáveis.

Extratos de proteína, SDS-PAGE, imunomanchamento e imunoprecipitação

[000240] Células foram lisadas em tampão de RIPA (PBS com 1% (v/v) de Nonidet P-40 (NP-40), 0,5% (p/v) de desoxicolato de sódio, , 0,1% (p/v) de SDS) suplementado com inibidor de protease (Complete Mini, EDTA-livre, Roche #13457200) e PMSF a 0,2 mM. SDS-PAGE e imunomanchamento foram realizados de acordo com procedimentos padrão. Para imunoprecipitação, células foram lisadas em tampão de

NP-40 (10% de glicerol, 1% de NP-40, Tris a 50 mM, pH 7,4, NaCl a 0,2 M, MgCl₂ a 2,5 mM) suplementado com inibidor de protease e coquetel de inibidor de fosfatase de PhosSTOP (Roche). Extratos foram incubados com anticorpo acoplados a contas de protA/G por 1 hora a 4°C, e as contas foram lavadas em tampão de NP-40 quatro vezes antes da eluição.

Ensaio de invasão e ensaio de 3D matrigel

[000241] O ensaio de quimioinvasão de câmara de boyden (Albini e outros 2004) foi realizado usando-se Becton Dickinson (insertos de cultura de célula de BDFalcon (8 µm), placa de 24 cavidade de múltiplas placas Falcon^R, e fator de crescimento reduziu matrigel de BD. Insertos foram revestidos no interior com matrigel diluído livre de soro para dar uma concentração final de 30 µg de matrigel em cada inserto. Trabalho de Matrigel é manipulado a 4°C até que a solidificação por 30 minutos a 37°C. 5 x 10⁵ células, ressuspensas em meio de célula livre de soro com 0,1 % de BSA adicionado no topo de cada inserto. Meio de célula enriquecido com FBS funciona como um quimioatraente. Depois de 20 horas de incubação em 37°C comum 5% de CO₂ como células dentro da câmara foram removidas por um chumaço de algodão. Células no outro lado da membrana foram fixadas, e foram manchadas com DAPI. Retratos foram tirados usando-se um microscópio fluorescente e as células foram contadas usando-se Image J (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image> J, Wayne Rasband.National).

[000242] Os ensaios de 3D foram modificados de Sandal e outros 2007; 30000 células foram semeadas nos gel e culturas foram deixadas se desenvolver por 10-12 dias antes que elas fossem analisadas.

Amostras clínicas

[000243] A presente série de cânceres de mama foi selecionada da população com base no Programa de triagem de câncer de mama Norwegian (Hordaland County), que começou em 1996 com mamogra-

fia de duas visões feita a cada 24 meses. Resumidamente, 95 cânceres de intervalo invasivos ocorreram durante o primeiro de dois intervalos de triagem (1996-2001), e esses foram emparelhados por tamanho com 95 tumores detectados por triagem de um total de 317 tumores invasivos durante o primeiro de dois ciclos (diâmetro médio de 15,6 e 15,7 mm, respectivamente. Depois do emparelhamento, o tamanho de tumor médio para a triagem detectado e casos de intervalo eram de 25,1 e 23,1 mm, respectivamente, e a idade média correspondente nesses grupos era de 62 e 59 anos. Além da idade e diâmetro de tumor (por exame patológico), características básicas, tais como metástases de linfonodo, de grau histológico, tipo histológico, densidade de mama, e metástases distantes no diagnóstico foram registradas. O tempo médio do último mamograma para o diagnóstico de intervalo de câncer era de 17,1 meses. Última data de acompanhamento era de 31 de novembro de 2004, e tempo de acompanhamento médio (de sobreviventes) era de 72 meses. Durante o período de acompanhamento, 31 pacientes morreram de câncer de mama.

Imunoistoquímica

[000244] Lâminas de microarranjo de tecido foram usados no presente estudo. A técnica de microarranjo é tecido que conserva e foi validado em vários estudos, imunoistoquímica foi realizada em seções de 5 µm de espessura de tecidos assentado com parafina, fixos com formalina. Recuperação de antígeno foi realizada por ebulição por 10 min a 750 W e 20 min a 350 W em TRS (solução de recuperação de alvo; tampão de DakoCytomation, Dinamarca, AS), pH 6,0, em um forno de microonda. Um auto-machador DakoCytomation foi usado para o manchamento.

[000245] As lâminas foram incubadas de um dia para o outro a temperatura ambiente com um anticorpo policlonal contra Axl (H-124; cat. # 20741), diluição 1:200 (Santa Cruz, USA). Manchamento de imuno-

peroxidase foi realizado usando-se o kit de previsão de DakoCytomation (DakoCytomation, Dinamarca AS) com diaminobenzidina tetracloreto peroxidase como substrato antes do contra-manchamento com hematoxilina de Mayer (DakoCytomation, Dinamarca AS).

Avaliação do manchamento

[000246] O manchamento foi predominantemente citoplásmico, embora houvesse alguma concentração do manchamento na membrana citoplásmica. Manchamento foi registrado por um sistema de graduação subjetiva e semi-quantitativa, considerando a intensidade do manchamento e a proporção de células de tumor mostrando uma reação positiva. Todos os três núcleos de cada caso foram avaliados. Intensidade foi registrada como 0 (nenhum manchamento) a 3 (forte manchamento); a percentagem de área de manchamento de membrana foi registrada como 0 (nenhuma célula de tumor positiva), 1 (<10%), 2 (10%-50%), e 3 (>50% de células de tumor). Um índice de manchamento (SI) foi calculado como o produto de intensidade e área de manchamento, registro de imunoistoquímico foi feito cego para características do paciente e resultado.

Estatísticas

[000247] Comparações dos grupos foram realizadas por teste Pearson χ^2 . Em todas as análises estatísticas, valores de corte para as categorias de índice de manchamento (SI) eram com base em valores médios. Análises de sobrevivência não variadas (usando-se morte do carcinoma endometrial como o ponto final; morte oriunda de outros casos foram censuradas) foram realizadas usando-se o procedimento limite de produto (método de Kaplan-Meier), com o tempo de operação primária como os dados de entrada.

[000248] O teste de classificação de log (Mantel-Cox) foi usado para comparar curvas de sobrevivência para diferentes de categorias de cada variável. Variáveis com impacto na sobrevivência em análises

não variadas ($P \leq .15$) foram examinadas por diagrama de log-log para determinar como essas variáveis poderiam incorporadas nos modelos de regressão de riscos proporcionais de Cox'.

Raça de camundongo e cuidado de animal

[000249] No presente estudo nós usamos camundongos fêmeas de PrkdcSCID/B2mnull (abreviados como NOD/SCID/B2mnull), camundongos imunodeficientes combinados severos (GADES Institute, Norway), de 8-10 de idade e pesando entre 20-25 g. Eles foram mantidos sob condições padrão em um ciclo 12 h claro/escuro e foram deixados pelo menos 7 dias para aclimatizar em sua nova condição ambiental antes do início da experiência. Essa investigação, projetada para minimizar o número de animais e sofrendo, foi realizada de acordo com a regulação de Norwegian na Experimentação com animal, a convenção europeia para a proteção de animais vertebrados usados para finalidades científicas e as diretrizes da autoridade de pesquisa de animal Norwegian.

Imagem de bioluminescência (BLI)

[000250] BLI foi realizada usando-se uma câmara eXplore Optix (GE Healthcare) montada em uma caixa de espécie. Imagem e quantificação de sinais foram feitas usando-se software eXplore Optix. Para imagem *in vivo*, animais receberam injeção via intraperitoneal (i.p) o substrato de D-luciferina (Biosynth), 150 mg/kg em PBS (Solução salina tamponada por fosfato) e foram anestesiados com isoflurano. Camundongos foram colocados no estágio aquecido dentro da caixa de câmara com exposição contínua a 1-2% de isoflurano e foram formados imagem para diferentes visões dependendo do modelo de tumor. Região de interesse foi identificada e foi quantificada como fóton total/sec-1 usando-se software eXplore Optix (GE Explore Optix). Bioluminescência de base *in vivo* estava na faixa de $2-3 \times 10$ contagens de fóton. Para a imagem *ex vivo*, 150 mg/kg de D-luciferina foram injeta-

dos para dentro dos camundongos exatamente antes da necropsia. Tecidos de interesse foram extirpados, foram colocados em placas e foram formados imagem.

Modelos de tumor *in vivo*

Engenhieramento de tecido

[000251] 1x10⁶ células de MDA-MB 231 que expressam biomarcador de GFP-Luc e interferência de diferentes RNAs que regulam a expressão de Axl, foram suspensos em uma mistura de 1:1 de F-12 Kaighn's (Invitrogen): Matrigel (BD Biosciences) e foram semeadas em 6x6 mm de armações de ácido poli-láctico (PLLA).

[000252] NOD/SCID/B2mnull fêmeas foram anestesiadas por exposição a 1-2% de isoflurano (Isoba vet.-Schering-Plough A/S) durante o procedimento de implantação e na imagem subsequente dias. Duas armações foram implantadas subcutaneamente (s.c) em cada camundongo de acordo com Nor e outros. Lab Invest.; 81 (4) 453; 2001 Armações com células que expressam Axl foram implantadas no lado esquerdo de cada camundongo enquanto as armações do lado direito com células em que Axl foi suprimido. Depois do procedimento cirúrgico, camundongos anestesiados foram colocados no sistema de imagem e foram formados imagem para tanto lados esquerdo quanto direito por 10-15 min depois da injeção intraperitoneal de 150 mg/kg D-luciferina (Biosynth). Desenvolvimento de tumor foi monitorado *in vivo* uma vez por semana por formação de imagem por 4 semanas.

Ensaio de xenoenxerto

[000253] 1 x 10⁶ MDA-MB-231 Células infectadas com vetores de shRNA e meio de GFP-Luc foram suspensos em 100 µl de meio de F12K + 10% de FBS/ Matrigel (razão de 1:1, BD Biosciences) e injetadas com uma agulha de insulina de calibre 29 para dentro de ambos os flancos de NOD/SCID/B2m fêmeas. Nas células positivas de flanco esquerdo na expressão de Axl foram injetadas, enquanto células no

flanco direito negativas na expressão de Axl foram injetadas.

[000254] Para células de MDA-MB-231 de implantes tricelulares infectados com vetores de shRNA e GFP-Luc foram misturadas com células endoteliais microvasculares dérmicas de ser humano (HMVEC), e células de músculo liso de artéria pulmonar (PASMC) na razão de 1:2:2. Crescimento de tumor foi monitorado *in vivo* por formação de imagem por 4 semanas consecutivas.

Modelo de metástase espontânea de almofada de gordura mamária

[000255] Sub-linha de células de MDA-MB-231 de ser humano (chamado MDA-MB 231 DH3L2N - Xenógeno) que expressam o biomarcador de GFP-Luc e interferência de diferentes RNAs que regulam expressão de Axl foram injetados para dentro da almofada mamária de camundongos. Camundongos NOD/SCID/B2mnull foram anestesiados pela exposição a 1-3% de isoflurano e foram injetados com 50 µl de 2 x 10⁶ células de MDA-MB-231 DH3L2N suspensas em meio de MEM/EBSS/Matrigel (1:1) para dentro da almofada de gordura mamária abdominal. 10-15 min depois da injeção de D-luciferina (Biosynth), camundongos foram colocados no sistema de imagem eXplore Optix e formados imagem a partir da visão ventral. Crescimento de tumor e espalhamento de metástase foram monitorados a cada duas semanas por imagem de bioluminescente por até 9 semanas. A parte inferior de cada animal foi coberta antes da reimagem, para minimizar a bioluminescência do tumor primário de modo que os sinais oriundos das regiões metastáticas poderiam ser observados *in vivo*.

Coleta de tecido

[000256] No fim de cada experiência os implantes de tecidos de tumor e diferentes órgãos foram recuperados a partir dos camundongos e foram preservados em 10% de Paraformaldeído (Sigma-Aldrich) para outra análise. Tecidos foram preparados para histopatologia (man-

chamento, seção, e assentamento com parafina) e foram analisados pela avaliação por microscópio.

Análise estatística de resultados de modelo de animal

[000257] A bioluminescência média (fótons/sec-1), diâmetro de tumor e erros padrão correspondentes foram determinados para cada experiência. Diagramas de regressão foram usados para descrever a relação entre bioluminescência, número de célula e diâmetro de tumor. Análises estatísticas eram com base no teste t emparelhado.

Resultados

[000258] Expressão de Axl é um forte fator de prognóstico para a sobrevivência global de pacientes com câncer de mama.

[000259] A fim de avaliar as regras de Axl em patogênese de câncer de mama, nós investigamos a expressão de Axl em tumores oriundos de uma série de pacientes com câncer de mama identificados durante um programa de triagem de câncer de mama Norwegian que começou em 1996 que vincula mamografia de duas-visão bi-anual (Wang e outros 2001). Resumidamente, 95 cânceres de intervalo invasivos ocorreu durante o primeiro de dois intervalos de triagem (1996-2001), e esses foram emparelhados pelo tamanho com 95 tumores detectados pela triagem a partir de um total de 317 tumores invasivos durante o primeiro de dois ciclos (diâmetro média 15,6 e 15,7 mm, respectivamente (Collett e outros., 2005). Depois do emparelhamento, o tamanho de tumor médio para a triagem detectado e casos de intervalo eram de 25,1 e 23,1mm, respectivamente, e a idade média correspondente nesses grupos era de 62 e 59 anos. Além da idade e diâmetro de tumor (por exame patológico), características básicas, tal como densidade de mama, tipo histológico, grau histológico, metástases de linfonodo e metástases distantes no diagnóstico foram registradas. O intervalo de tempo médio do último mamograma para o diagnóstico de câncer era de 17,1 meses. Parâmetros clínicos foram monitorados,

Última data de acompanhamento era 31 de novembro de 2004, e tempo de acompanhamento médio (de sobreviventes) era de 72 meses. Durante o período de acompanhamento, 31 pacientes morreram de câncer de mama.

[000260] Não houvesse nenhuma associação significativa entre expressão de Axl (dividido em dois grupos por índice de manchamento médio; figura 1A) e importantes características clínico-patológicas tais como grau histológico, diâmetro de tumor, expressão de receptores de estrogênio e progesterona, e estado de linfonodo auxiliar. Também, expressão de Axl não era associada a HER2, E-caderina, marcadores de diferenciação basal (Citoceratina 5/6, P-caderina), EZH2, ou proliferação de célula de tumor por expressão de Ki-67.

[000261] No entanto, análise de sobrevivência de uma variável (método de Kaplan-Meier, teste de classificação de log), expressão de Axl estava significativamente associada a sobrevivência de paciente reduzida ($p=0,035$; figura 1B). Na análise de muitas variáveis (métodos nocivos proporcionais), incluindo fatores de prognósticos básicos como diâmetro de tumor, grau histológico estado de linfonodo além da expressão de Axl (etapa um), estado de expressão de Axl permaneceu como um fator de prognóstico negativo independente no modelo final ($p=0,021$), além do grau histológico, estado de linfonodo (vide figura 1C). Assim, expressão de Axl é um forte prognosticador de resultado clínico baixo em pacientes com câncer de mama.

[000262] Será então investigada a expressão de Axl em biopsias de pacientes de pares emparelhados ($n=16$) de carcinomas de mama primário e metastático. Expressão de Axl tendeu a ser ulteriormente elevada nas metástases quando em comparação com carcinoma de mama humano primário correspondente ($p=0,11$, teste de McNemar; figura 1d; metástases no direito, fígado (superior) e osso (inferior)), sugerindo que a expressão de Axl é um forte prognosticador de resultado

clínico baixo em pacientes com câncer de mama e associado a espalhamento metastático.

Axl é exigido para invasividade de célula de câncer de mama

[000263] A forte correlação da expressão de Axl em carcinomas de mama precoce com sobrevivência baixo indica um importante papel para Axl em patogênese de doença total. Como resultados de invariabilidade de mortalidade relacionada com câncer de mama de complicações da doença metastática, nós avaliamos se expressão de Axl foi necessária para invasividade de célula de carcinoma de mama maligna. Axl é expresso em várias linhas de células de carcinoma de mama de ser humano altamente metastático incluindo MB-MDA-231. O ligante de Axl, Gas6 é frequentemente co-expresso, levando a ativação autócrina (Holland e outros 2005). A fim de eficazmente correlacionar níveis de expressão de Axl células de MB-MDA-231 com comportamentos celulares específicos, nós desenvolveremos uma série epi-alélica de shRNAs de direcionamento de Axl que reduzem a expressão de Axl de um modo dependente de dose, usando-se uma abordagem de RNAi com base em FACS recentemente desenvolvida, CellSelectRNAi (figura 2A; Micklem e outros., na preparação). Essa coleta de Axl shRNA foi usada para criar uma série de célula de MB-MDA-231 de Axl epi-alélica com níveis de grau total (figura 2B) e níveis de proteína de Axl fosforilados (figura 2C).

[000264] Células de carcinoma malignas exibem invasividade de célula mesenquimal em géis de proteína de matriz extracelular tridimensional (Matrigel) que se correlaciona com potencial metastático *in vivo* (Bissell). Análise epi-alélico demonstrou uma exigência dependente de dose para a expressão de Axl para invasão de célula de MB-MDA-231 na resposta a soro (figura 2D) ou o quimiocina de SDF-1 (figura 2E), um fator importante em carcinoma metástase de carcinoma de mama. Em contraste com isso, supressão de Axl não tinha efeito na prolifera-

ção de célula de MB-MDA-231 e apenas um efeito modesto na migração bidimensional (cura de ferimento epitelial lateral). Isso indicou uma exigência específica para Axl no crescimento e invasividade tridimensional. Nós, portanto, avaliamos o efeito de supressão de Axl nas células de MB-MDA-231 em um ensaio de 3D- Matrigel. Células epiteliais de mama normais se auto-organizam em estruturas acinar esferoides polarizadas em 3D-Matrigel, enquanto células MB-MDA-231 malignas proliferam formação de colônias desorganizadas grandes com crescimentos de estelato, invasivos que refletem tumores agressivos (Bissell). Supressão de expressão de Axl fortemente reverteu fenótipo maligno de células de MB-MDA-231 em 3D-Matrigel, criando pequenas colônias redondas sem crescimentos malignos (figura 2F1G). Juntos, esses dados sugerem que a sinalização de Axl são exigidos para manter a invasividade de tipo mesenquimal de células de carcinoma metastática de mama.

[000265] Axl é regulado positivamente por fatores de transcrição de indução por TEM em células epiteliais de mama.

[000266] A aquisição de invasividade mesenquimal, a capacidade de migrar e invadir ECM, é a hallmark funcional de TEM. O fator de transcrição induzido por TEM Twist é exigido para metástase de células de carcinoma de mama (Yang e outros 2004). Nós, portanto, investigamos se expressão de Twist regula para cima Axl em células epiteliais de mama. Expressão de Twist em normal mama células epiteliais de mama normais (MCF10A) induz TEM (figura 3A; Glackin e outros., na preparação). Surpreendentemente, Axl é também fortemente regulada positivamente em células de MCF10A de expressão de Twist (figura 3A-B). Além disso, como Gas6 é constitutivamente expressa por células epiteliais de mama normais, essa expressão de Axl induzida por Twist estabelece um laço de ativação autócrino, evidenciado por Gas6 associado a célula aumentada e Axl fosforilado com tirosina (figura 3A,

C). Para determinar se outros fatores de transcrição de indução de TEM similarmente regulam para cima expressão de Axl, nós analisamos células de MCF10A que expressam ZEB2, Snail e Slug. Cada um desses fatores de transcrição de TEM induzia transição mesenquimal em células de MCF10A e regularia para cima expressão de Axl. Esses resultados sugerem que indução por TEM leva a expressão de Axl e pode estabelecer sinalização autócrina.

Expressão de Axl é necessária para a formação de tumor nos tumores de mama engenheirados de tecido experimental

[000267] A fim de avaliar a exigência para Axl para o crescimento *in vivo* maligno nós usamos uma abordagem de engenheiramento de tecido compreendendo células de MB-MDA-231 que expressam um construto de luciferase de GFP para formação de imagem *in vivo* eficaz (CSI; Tiron e outros, resultados não publicados), semeadas com Matrigel em armações de engenheiramento de tecido de ácido polilático e implantadas subcutaneamente para dentro de camundongos NOD-SCID imunocomprometidos. Crescimento dentro de microambientes de tumor engenheirado está associado a característica mesenquimais de célula de tumor como células de tumor colonizam a armação (Mooney). Células de MB-MDA-231 prontamente formam tumores essa colonização agressiva de exibição, de microambiente biomimética, a armação (figura 4A). Supressão de Axl fortemente inibiu a formação inibiu espalhamento lateral e morfologia maligna (figura 4A).

[000268] Para determinar se Axl influência a capacidade de células de câncer de mama de atrair e cooptar de vasos de sangue, nós desenvolveremos uma abordagem de implante tri-celular compreendendo células de MB-MDA-231 semeadas juntamente com células endoteliais microvasculares de ser humano (HuMVEC) e células de músculo liso vascular (vSMC) de criar vasculatura de tumor. Implantes de células de EC-vSMC de ser humano prontamente formam microvasculatu-

ra de ser humano intra-armação perfundida em camundongos NOD-SCID dentro do período de dois meses (Hegen e outros., na preparação). Como mostrado na figura 4B, células de MB-MDA-231 formam tumores altamente vascularizados, agressivos em modelo de implante tri-celular. A vasculatura de tumor de ser humano engenheirada é uniformemente distribuída e perfundida com células de hemáceas intraluminais. Em contraste com isso, supressão de Axl, formação de tumor bloqueada, sem afetar o desenvolvimento de uma microvasculatura de ser humano perfundida. Isso indica que Axl é exigido para a formação de tumor mesmo na presença de uma microvasculatura que provavelmente previne a necessidade de angiogênese induzida.

Um limiar de expressão de Axl distinto é exigido para a formação de tumor de mama

[000269] A fim de avaliar o nível da expressão de Axl necessário para formar um tumor, nós conduzimos uma análise epi-alélica *in vivo* de Axl em tumores de MDA-MB-231 subcutâneos. A série de célula de MDA-MB-231 epi-alélica de Axl (figura 1) foi injetada subcutaneamente e temporariamente foi monitorada quanto a formação de tumor por varredura bioluminescente. Essa abordagem revelou uma resposta de dose de Axl para o crescimento de tumor (figura 5). Correlação com níveis de Axl superficiais demonstrou um limiar da expressão de Axl exigida para a formação de tumor (figura 5B1C). Essa resposta de dose é congruente com os efeitos dependentes de dose de inibição de Axl na invasividade (figura 2).

Axl é essencial para metástase de células de carcinoma de mama

[000270] A fim de avaliar a exigência de Axl para metástase de câncer de mama, foi ortoticamente injetada MDA-MB-231-D3H2LN, um isolado de desenvolvimento rápido e altamente metastático de MDA-231 *in vivo*, na almofada de gordura mamária. Usando-se formação de

imagem bioluminescente de corpo total nós temporalmente monitoramos desenvolvimento de metástase espontânea durante um período de 9 semanas. Células de MDA-MB-231-D3H2LN de controle geravam tumores mamários ortotópicos grandes que se tornaram necrosantes no período de 5-6 semanas (figura 6A). Supressão de Axl em MDA-MB-231-D3H2LN reduziu a taxa de formação de tumor mamário primário mas também desenvolveu tumores mamários primários substanciais (figura 6A). Metástase espontânea foi inicialmente detectada no linfonodo sentinela torácico de camundongos injetados com MDA-MB-231-D3H2LN de controle a 4 semanas (figura 6A). Em contraste com isso, nenhuma metástase foi detectada em camundongos implantados com MDA-231 DHLN-AxlshRNA. Depois das 9 semanas após o sacrifício, órgãos extirpados foram varridos individualmente para bioluminescência devido à presença de células metastáticas. Camundongos injetados com MDA-MB-231-D3H2LN tinham formado metástase espontânea extensa em todos os camundongos, incluindo linfonodo, pulmão, ovários e rins. Em contraste com isso, células de MDA-MB-231 DHLN-AxlshRNA não formam metástase detectável (apesar de uma única lesão no rim de um camundongo). Análise histológica de biopsias de tecido a partir dos órgãos de camundongos injetados com MDA-MB-231-D3H2LN confirmassem a presença de múltiplas micro- e macrometástases em todos os órgãos como previsto pelas medições totais de fóton bioluminescente (figura 6C). Na micro- ou macrometástases foram observados na biopsia de tecidos oriundos de camundongos injetados com MDA-MB-231 DHLN-AxlshRNA, confirmando que a falta de bioluminescência observada era devido a formação de metástase inibida. Esses resultados mostram que Axl é essencial para metástase de carcinoma de mama.

[000271] Foi avaliada a contribuição funcional de Axl para a sobrevivência total de camundongos de NOD-SCID com controle de MDA-

MB-231-D3H2LN/GFP-Luc ortotopicamente injetados ou células de supressão de Axl. A sobrevivência total era significativamente aumentada em camundongos portadores de tumor de MDA-MB-231-D3H2LN/GFP-Luc- shAxl2 ($P=0,013$, teste de classificação de log; figura 6d). Esses resultados juntamente com nossas observações clínicas suportam a conclusão que Axl é importante para o desenvolvimento da doença metastática e sobrevivência do paciente total.

[000272] A fim de validar nossos resultados em um modelo metastático diferente nós transduzimos a linha de célula de 4T1 de carcinoma de mama de camundongo altamente metastático com o construto de CSI e selecionamos para expressão de GFPLuciferase por FACS (4T1-GFP-Luc). As células de 4T1 eram dependentes da expressão de Twist para metástase e exibem altos níveis de expressão de Axl (figura 7a). Nós desenvolvemos um vetor retroviral que expressam um shRNA de direcionamento de Axl de camundongo (shmAxl2) que eficazmente suprime níveis de superfície de Axl de camundongo em células de 4T1 (figura 7a). Um shRNA de direcionamento e Ax1 de ser humano desemparelhado (shAxl279) não tinha nenhum efeito sobre a expressão de Axl de camundongo. Similar a supressão de Twist em células de 4T1 e resultados com células de MDA-MB-231, expansão de cultura de tecido das células 4T1 suprimidas por Axl não era significativamente afetada (dados não mostrados).

[000273] Quando introduzidas para dentro da glândula mamária de camundongos BALB/c normais, as células de 4T1 de tumor sinérgicas exibem um padrão de crescimento bifásico, devido à rigorosa resposta imune que leva a regressão de tumor associada a infiltração de leucócito e necrose, seguido por recrescimento no sítio primário que coincide com metástase extensa a múltiplos órgãos. Células de 4T1-GFPLuc mostram apenas crescimento imunocomprometido em camundongos NOD-SCID (dados não mostrados). Nós injetamos células

de 4T1-GFP-Luc que expressam ou um shRNA de direcionamento de Ax1 de camundongo (4T1-GFP-Luc-shmAxl2) ou shRNA específico de ser humano de controle negativo (4T1-GFP-LucshAxl279) para dentro da almofada de gordura mamária de camundongos BALB/c fêmeas e quantificaram o crescimento de tumor e metástase por corpo inteiro temporal na formação de imagem ótica *in vivo* (figura 7b). As células de 4T1-GFP-Luc-shmAxl2 de controle exibiam crescimento primário rápido, alcançando um máximo depois de uma semana. Isso foi seguido por uma regressão abrupta que foi sustentada por cinco semanas (figura 7b). Na semana 6, recorrência no sítio primário e múltiplas metástases distantes foram observadas que subsequentemente se desenvolveram rapidamente, causando mortalidade e letalidade em todos os camundongos pela semana 8. As células de 4T1-GFP-L.UC que expressam o shRNA de direcionamento de Axl de camundongo (4T1-GFPLuc- shmAxl2) inicialmente seguiu um curso similar: um crescimento de tumor primário rápido, levemente atenuado por supressão de Axl, seguido por regressão (figura 7b). No entanto, a recorrência subsequente do tumor primário e emergência de metástase distante de desenvolvimento rápido estava totalmente ausente (figura 7b). De fato, todos os camundongos injetados com células de 4T1-GFP-Luc-shmAxl2 permaneceram saudáveis no hora do sacrifício (8 semanas). A esplenomegalia associada a característica de reação leucemoide do modelo de 4T1 foi também reduzida em camundongos portadores de tumores de supressão de Axl (dados não mostrados). Após o sacrifício a 8 semanas, órgão extirpados individuais foram formados imagem e emissão de luz quantificada, confirmando a presença de metástases em sítios de disseminação comuns em todos os camundongos que portam tumores de 4T1-GFP-Luc-shAxl279 (figuras 7c-d). Em contraste com isso, nas células de tumor bioluminescentes foram detectadas nos órgãos oriundos de camundongos com tumores

de 4T1-GFP- LucshmAxl2 (figuras 7d-e). Esses resultados suportam a conclusão que Axl é um regulador essencial de metástase de tumor de mama.

Regulação autócrino por Gas6

[000274] O Gas6 de ligante de Axl é frequentemente co-expresso com Axl, consistente com ativação autócrina. Níveis de Axl fosforilados e Gas6 associada a célula indicativos de sinalização autócrina são reduzidos na supressão de Axl em células de MDA-MB-231 (figura 11). Em células de MCF10A, Gas6 foi constitutivamente exposto e se tornou célula associada a expressão de Axl induzida por TEM (figura 11). Esses resultados sugerem que indução de programa de TEM leva a expressão de Axl e pode estabelecer sinalização autócrina em células epiteliais de mama. Uma vez que Axl, frequentemente co-expressada com Gas6, é detectado em muitos cânceres metastáticos, sinalização de Axl autócrino pode ser uma consequência frequente de TEM em muitos tipos de tumor. Fatores de transcrição de indução de TEM tais como Snail, Slug, e Twis potencialmente induzem expressão de Axl, sugerindo que Axl poderia participar em um laço de retroalimentação positivo que sustenta o fenótipo mesenquimal maligno de células de tumor. Essa observação é consistente com nossa observação de expressão de Axl elevada em lesões metastática.

Fenótipo de CD44+ está associada a expressão de Axl

[000275] Células de MCF10a foram transduzidas com construtos de Slug ou Ha-Ras (pBABE puro H-Ras V12, Addgene). Células transduzidas com Slug foram analisados por citometria de fluxo usando-se co-expressão de GFP; expressão de Ha-Ras foi selecionada por tratamento com puromicina por 48 horas. Como mostrado por citometria de fluxo (figura 9, painel A), expressão de Slug e Ha-Ras nas células de MCF10a levaram a um forte aumento na expressão de superfície do marcador de célula tronco CD44. Análise de citometria de fluxo de cé-

lulas de MCFIAs transduzidas com Slug ou Ha-Ras ulteriormente mostrou um forte aumento na expressão de Axl superficial. Células de MCFIOa de expressão de Slug ou Ha-Ras foram classificadas por FACS para subpopulações alta de CD44 (CD44+) e baixa (CD44-). As células de CD44- mostraram morfologia epitelial enquanto células de CD44+MCF10 demonstraram morfologia mesenquimal alongada (figura 9, Painel C). Análise de Western blot dessas células (figura 9, Painel

D) demonstraram que células de CD44- MCFIOa retinham expressão de proteína citoesquelética e de junção epitelial. Em contraste com isso, células de CD44+ mostraram forte expressão de marcador mesenquimal (vimentina, N-caderina) e perda de E-caderina, demonstrativo de TEM. Expressão de Axl correlacionada com a presença de CD44 e experiências mesenquimais tanto em TEM induzido por Há-Ras quanto Slug (figura 9, Paineis B, D). Crescimento das células de MCFIOa de expressão de CD44+ CD44- Slug e Ha-Ras em 3-D matrigel (figura 9, Painel E) demonstrou que as CD44+, células de MCFIOa de expressão de Axl são invasivas, consistentes com um fenótipo mesenquimal. Esses resultados demonstram que Axl é regulado positivamente por expressão de Slug e Ha-Ras nas células de MCFIOa e se correlaciona com experiências de célula tronco de câncer e mesenquimal.

[000276] Várias modificações e variações dos aspectos descritos da invenção estarão evidentes por aqueles versados na técnica sem se afastar do espírito e escopo da invenção. Embora a invenção tenha sido descrita em ligação com as concretizações preferidas específicas, seria entendido que a invenção como reivindicada não seria indevidamente limitada a tais concretizações específicas. De fato, pretende-se que várias modificações dos modos descritos de realização da invenção que sejam óbvias por aqueles versados nos campos relevantes

estejam dentro do escopo das seguintes revelações.

Referências

Camp, R.L., V. Neumeister, and D.L. Rimm, A Decade of Tissue Microarrays: Progress in the Discovery and Validation of Cancer Biomarkers. J Clin Oncol, 2008.

Collett, K., e *outros.*, A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors. Cancer Epidemiol Biomarkers

Elston, C.W. and I.O. Ellis, Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology, 1991. 19(5): p. 403-10. Prev, 2005. 14(5): p. 1108-12.

Gupta PB, Mani S, Yang J, Hartwell K, Weinberg RA. The evolving portrait of cancer metastasis. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2005;70:291-7.

Holland S. J., Frieria A.M., Franci C., Chan E., Atchison R., McLaughlin J., Swift S. E., Pali E., Yam G., Wong S., Lasaga J., Shen M., Yu S., Xu W., Hitoshi Y., Payan D.G, Nor J. E., Powell M.J, and Lorens J.B. (2005) The Receptor Tyrosine Kinase Axl Regulates Angiogenesis and Tumor Growth. Cancer Research 65:9294-9303.

Kononen, J., e *outros.*, Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nat Med, 1998. 4(7): p. 844-7.

Sun, W., Fujimoto, J. & Tamaya, T. Coexpression of Gas6/Axl in human ovarian cancers. Oncology 66, 450-7 (2004).

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer. 2 de junho de 2002; 2(6):442-54

Vajkoczy P, Knyazev P, Kunkel A, Capelle HH, Behrndt S, von Tengg-Koblighk H, Kiessling F, Eichelsbacher U, Essig M, Read TA, Erber R, Ullrich A Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyro-

sine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2006)103:5799-804

Yang J, Mani Weinberg RA. Explorin a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res* 2006 66: 4549-52.

Yang J. Mani SA, Donathier JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 2004 117: 927-39

Yang J. Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell.* junho de 2008; 14(6):818-29. Wang, H., e outros., Mammography in Norway: results from the first screening round in four counties and cost-effectiveness of a modeled nationwide triage. *Cancer Causes Control*, 2001. 12(1): p. 39-45.

Holland e outros. R428, a selective small molecule inhibitor of Axl kinase, blocks tumour spread and prolongs survival in models of metastatic cancer. *Cancer Research*; 70(4), 15 de fevereiro de 2010.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de Axl, caracterizado pelo fato de que é como um biomarcador para a detecção da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM) em um indivíduo.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que Axl é um biomarcador para a detecção da indução de transição epitélio-mesenquimal (TEM).

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a regulação positiva de Axl é indicativa da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM).

4. Método para a detecção da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM) em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende:

determinar a expressão de Axl na amostra de uma célula, grupo de células, um modelo de animal ou ser humano, quando comparada com uma amostra de controle, em que a regulação positiva de expressão Axl em relação à amostra de controle é indicativa da ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (TEM).

5. Método para a identificação de um agente capaz de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM), caracterizado pelo fato de que compreende a administração do dito agente a uma célula, grupo de células ou modelo de animal e monitoração da atividade e/ou a expressão de Axl, em que o método

compreende:

(i) administrar o agente a uma célula, grupo de células ou um modelo de animal; e

(ii) medir a expressão de Axl nas amostras derivadas das células tratadas e não tratadas, de animal ou ser humano; e

(iii) detectar um aumento ou uma diminuição na expressão de Axl na amostra tratada em comparação com a amostra não tratada

como uma indicação da capacidade de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM).

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a amostra é analisada por análise de proteína, em que a análise de proteína é opcionalmente por ELISA, PET, citometria de fluxo, SELDI-TOF MS ou 2-D PAGE.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, caracterizado pelo fato de que o grupo de células é uma cultura de células, e/ou em que as células são células de tumor, PBMC ou linfócitos.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 e 5 a 7, caracterizado pelo fato de que a amostra é sangue, soro, plasma ou sobrenadante de cultura de tecido.

9. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(i) colocar em contato o agente com receptor tirosina quinase de Axl ou células que expressam o receptor tirosina quinase de Axl;

(ii) medir a atividade de receptor de Axl na presença do agente; e

(iii) comparar a atividade medida na etapa (ii) com aquela medida sob condições controladas, em que uma diminuição identifica o agente como sendo capaz de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM).

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

(i) a atividade medida é fosforilação de tirosina de um substrato de receptor de Axl, em que o receptor de Axl é opcionalmente imobilizado; ou

(ii) a atividade medida é autofosforilação do receptor de Axl;

ou

(iii) as células na etapa de contato (i) foram anteriormente transfectadas pelo gene de Axl, em que as células transfectadas são opcionalmente transitórias ou estavelmente transfectadas; ou

(iv) as condições controladas na etapa (iii) compreende o contato do agente com células que carecem de um gene de Axl, em que as células opcionalmente têm uma forma inativa mutada do gene de Axl; ou

(v) o receptor de Axl compreende uma porção biologicamente ativa do domínio intracelular.

11. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que compreende a triagem de uma pluralidade de agentes, o dito método compreendendo as etapas de:

(i) colocar em contato a pluralidade de agentes com o receptor de Axl ou células que expressam o receptor de Axl;

(ii) medir a atividade de receptor de Axl na presença da pluralidade de agentes;

(iii) comparar a atividade medida na etapa (ii) com aquela medida sob condições controladas, em que uma diminuição identifica a pluralidade de agentes como sendo capaz de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM); e

(iv) separadamente determinar qual agente ou quais agentes presente(s) na pluralidade de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM).

12. Uso de um kit, caracterizado pelo fato de que é para a avaliação da capacidade de um agente de inibir ou reverter transição epitélio-mesenquimal (TEM),

o dito kit compreendendo anticorpos de anti-Axl, uma sonda de ácido nucléico para Axl, ou pelo menos um iniciador de QPCR para Axl.

13. Uso de um kit como definido na reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que é em:

(i) um método, como definido em qualquer uma das reivindicações 5 a 12; ou

(ii) um método para determinar se um indivíduo será suscetível ao tratamento com um inibidor de Axl.

14. Uso ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o biomarcador Axl é a proteína Axl ou RNA.

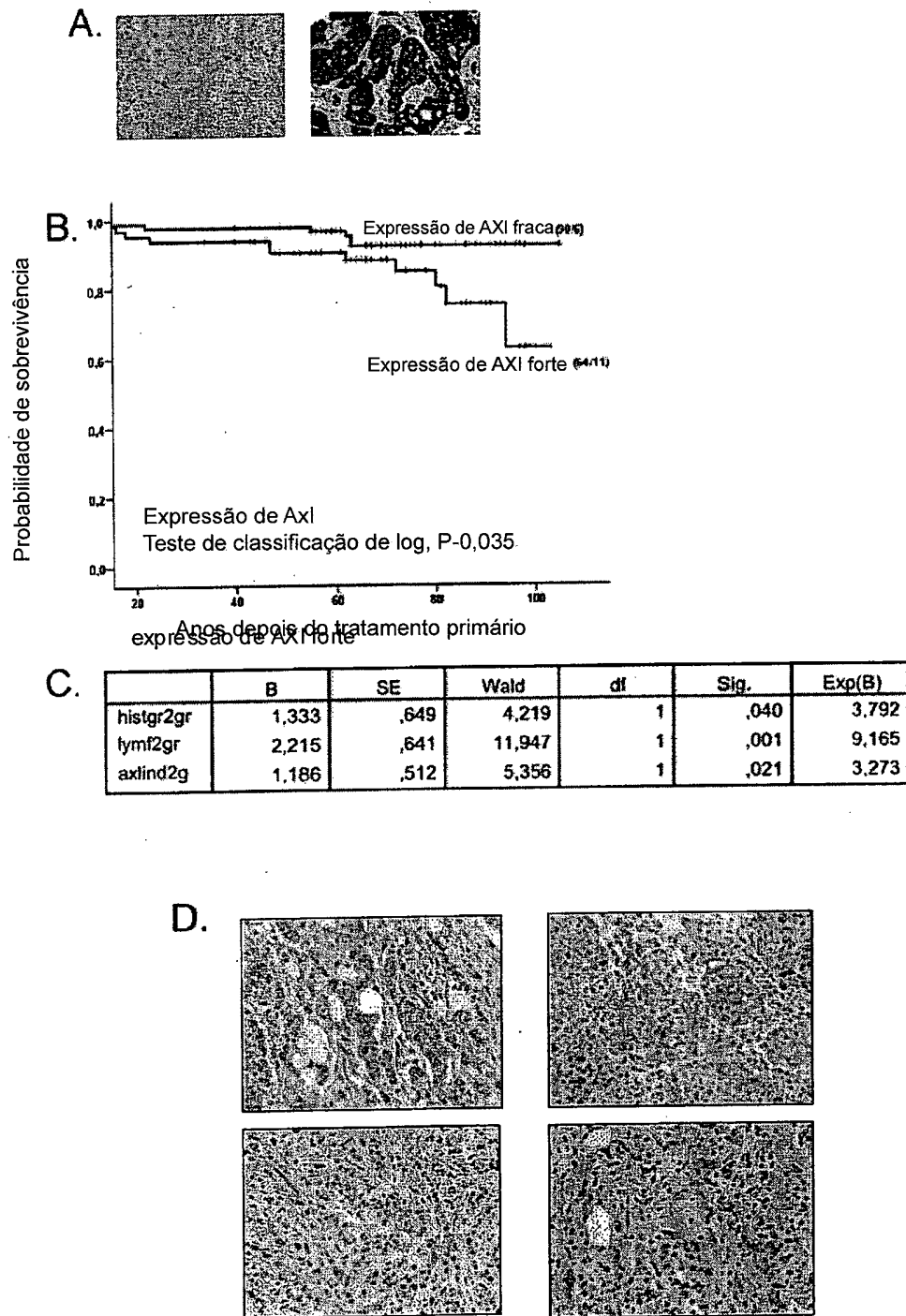


FIG. 1

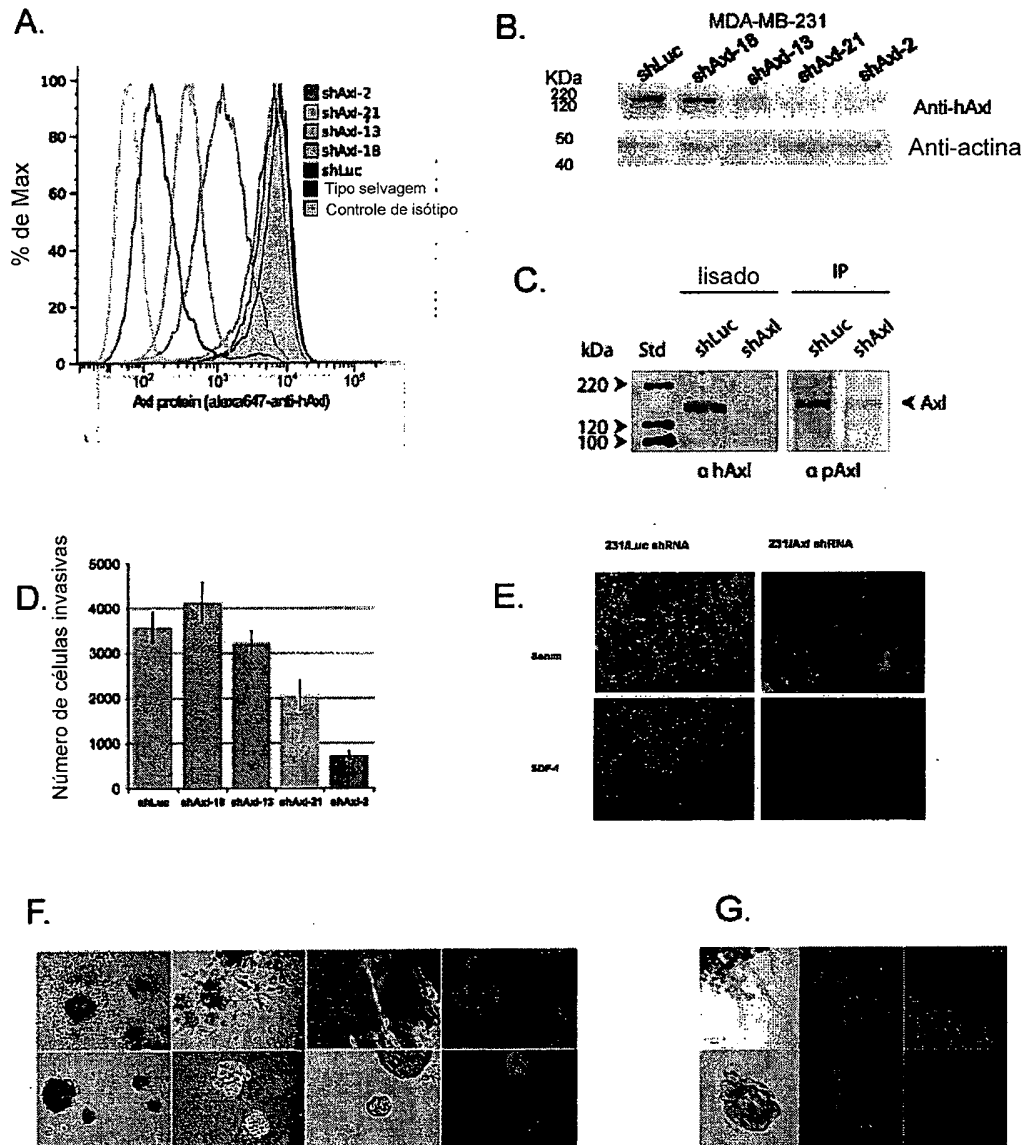


FIG. 2

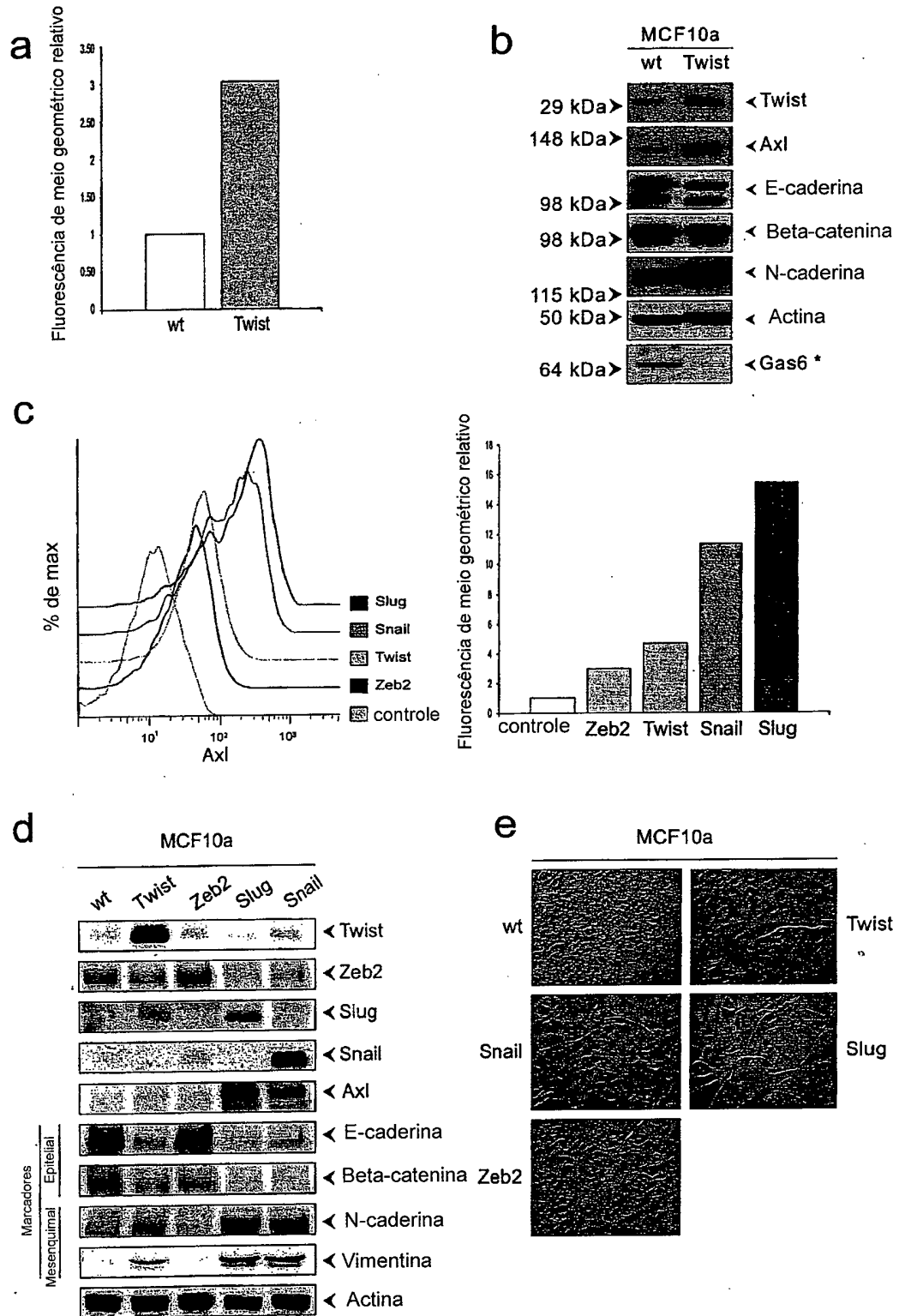


FIG. 3

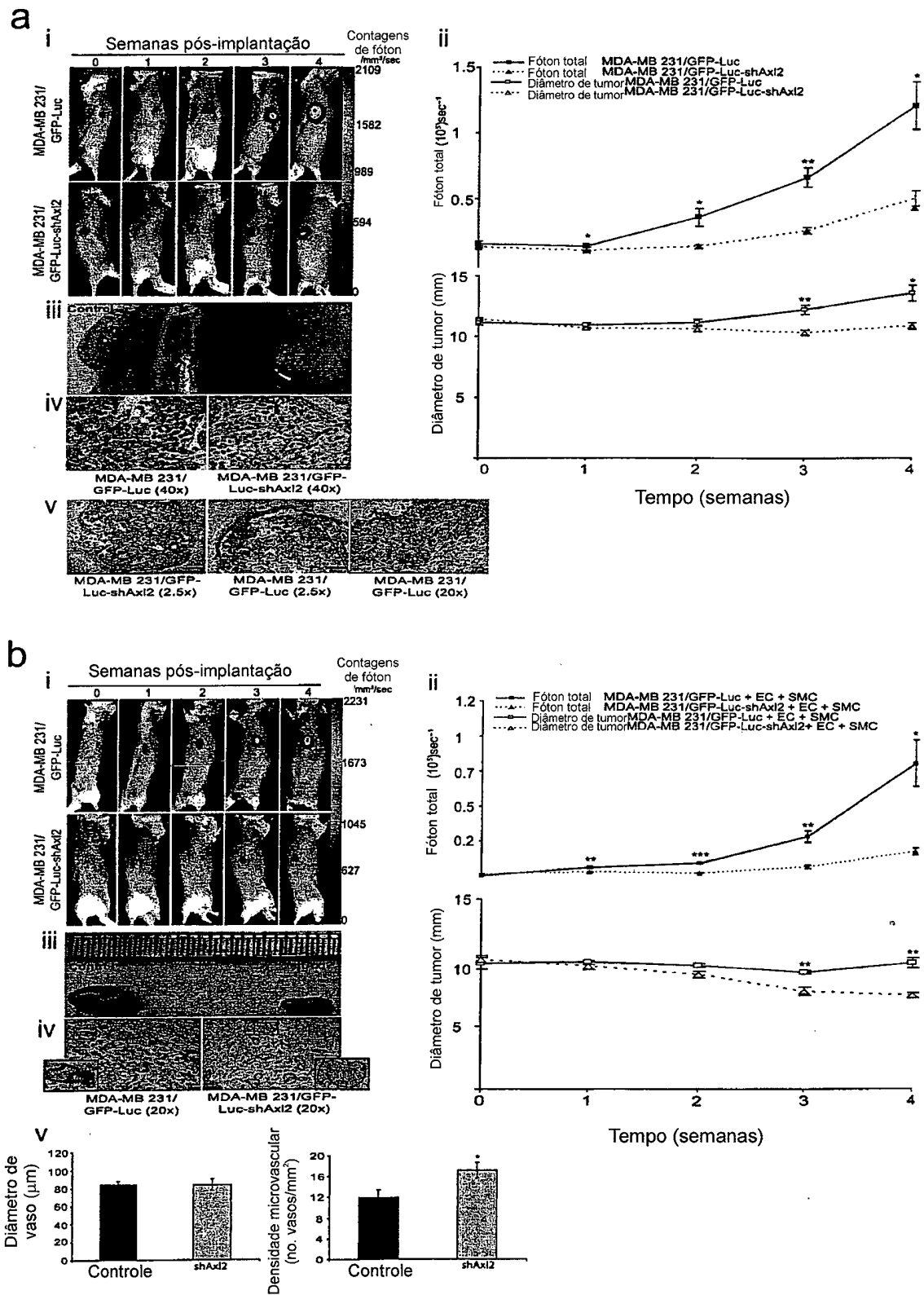
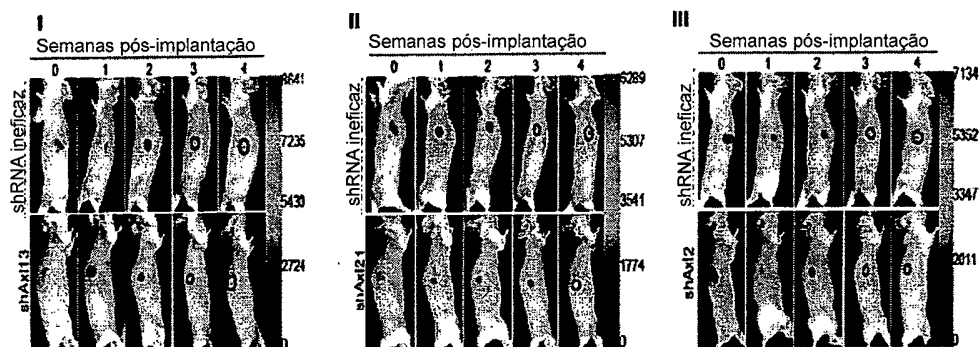
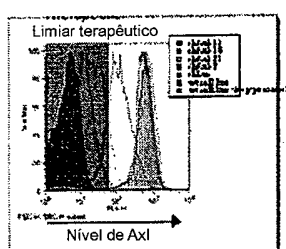


FIG. 4

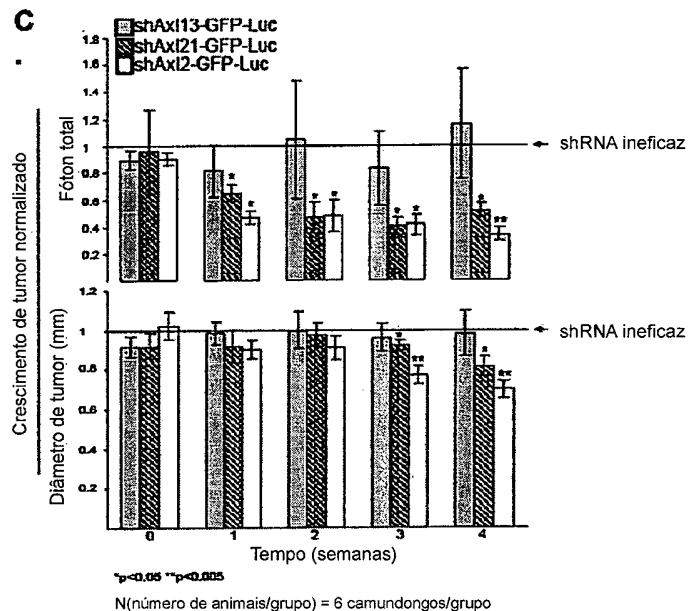
A.



B.



C.



D.

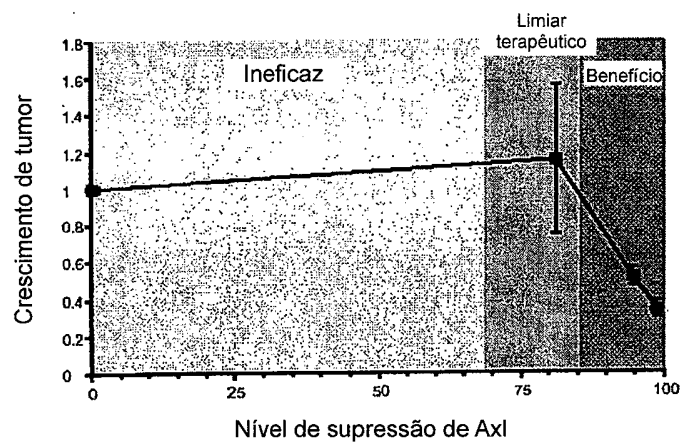
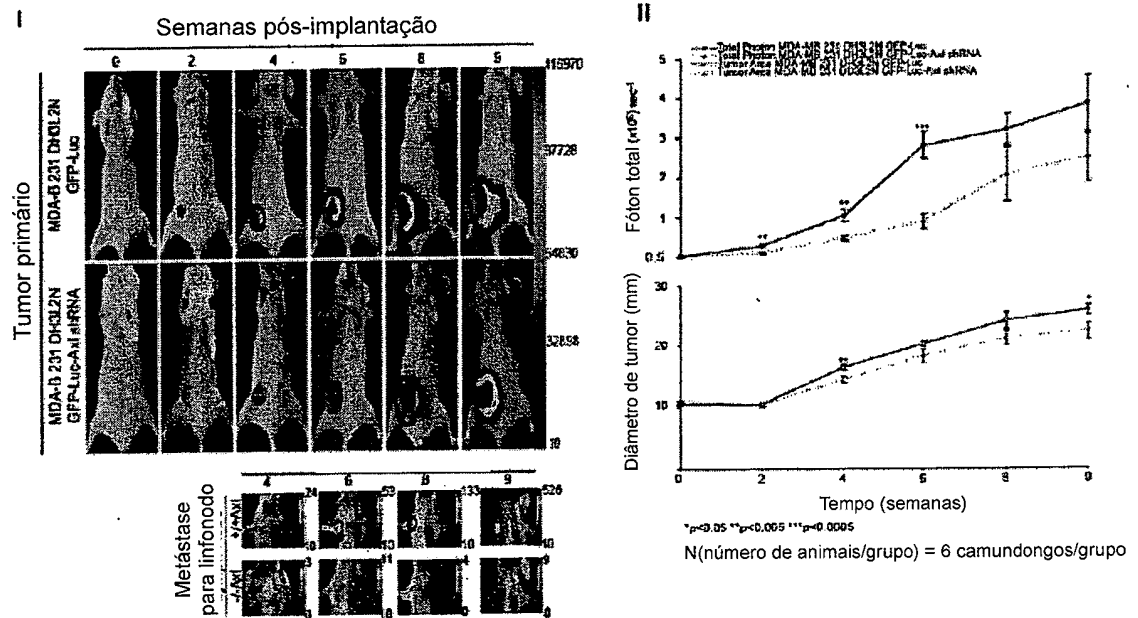


FIG. 5

A.



B.

Metastases detectadas

Linhas de células	<i>In vivo</i>	<i>Ex vivo</i>				
	Linfonodos	pulmões	rins	ovários	figado	
MDA-MB 231 DHLN GFP-Luc	5/6	4/6	3/6	2/6	0/6	
MDA-MB 231 DHLN GFP-Luc-Ai shRNA	0/6	0/6	1/6	0/6	0/6	

N(número de animais/grupo) = 6 camundongos/grupo

C.

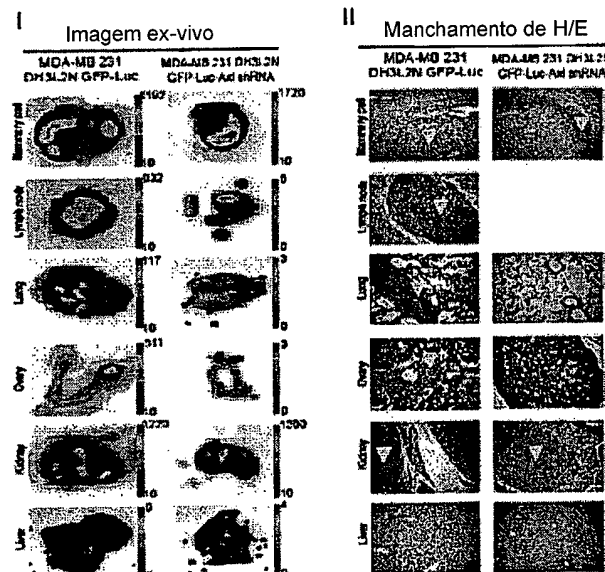
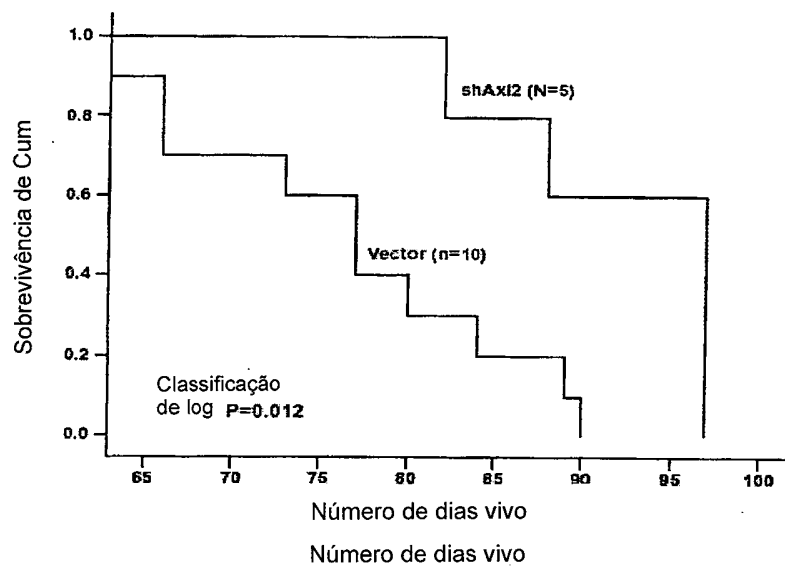


FIG. 6

7/14



Linha de célula	Número de dias vivo	
	Meio	Mediano
MDA-MB 231/DHLN-GFP-Luc	72.20	77.00
MDA-MB 231/DHLN-GFP-Luc-shAXI2	92.20	97.20

Estatística de teste	
	Número de dias vivo
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	60.000
Z	-2.463
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.013(a)

FIG. 6D

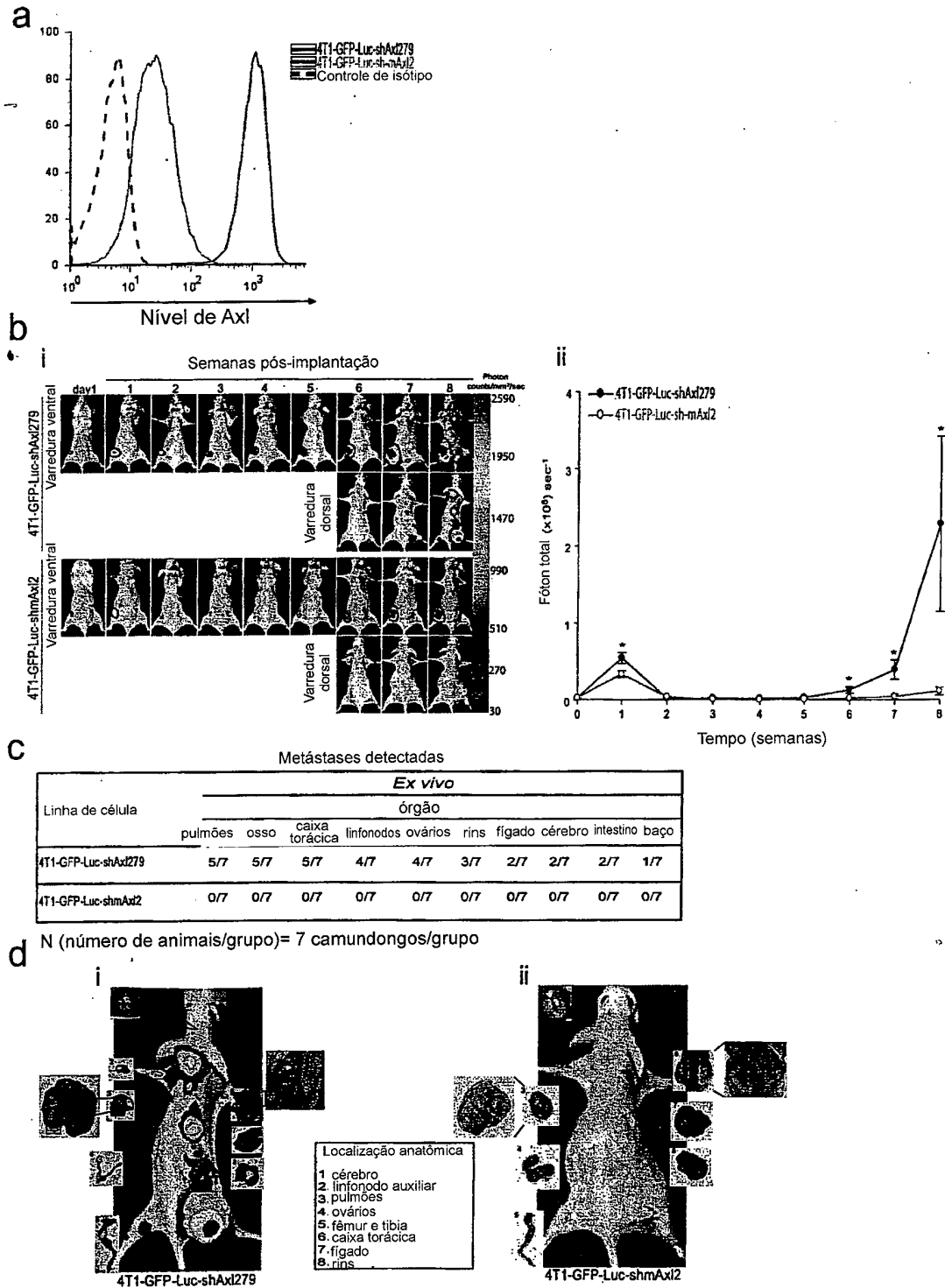


FIG. 7

```

1 CCTAGTTATT AATAGTAATC AATTACGGGG TCATTAGTTC ATAGCCCATA TATGGAGTTC
61 CGCGTTACAT AACTTACGGT AAATGGCCCC CCTGGCTGAC CGCCCAACGA CCCCCGCCCC
121 TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTTCCCATTA GTAACGCCAA TAGGGACTTT CCATTGACGT
181 CAATGGGTGG AGTATTTACG GTAAACTGCC CACTTGCCAG TACATCAAGT GTATCATATG
241 CCAAGTACGC CCCCTATTGA CGTCAATGAC GGTAATGGC CCGCCTGGCA TTATGCCCAG
301 TACATGACCT TATGGGACTT TCCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGT CATCGCTATT
361 ACCATGGTGA TCGGTTTTTG GCAGTACATC AATGGGCGTG GATAGCGGTT TGA CTACACGG
421 GGATTTCCAA GTCTCCACCC CATTGACGTC AATGGGAGTT TGTTTTGGCA CCAAAATCAA
481 CGGGACTTTC CAAAATGTCG TAACAACCTCC GCCCATTGA CGCAAATGGG CGGTAGGCAT
541 GTACGGTGGG AGGTCTATAT AAGCAGAGCT CAATAAAAGA GCCCAACCC CCTCACTCGG
601 CGCGCCAGTC CTCCGATTGA CTGAGTCGCC CGGGTACCCG TGATCCAAT AAACCCTCTT
661 GCAGTTGCGT CCGACTTGTG GTCTCGCTGT TCCTTGGGAG GGTCTCCTCT GAGTGATTGA
721 CTACCCGTCA GCGGGGGTCT TTCATTTGGG GGCTCGTCCG GGATCGGGAG ACCCCTGCCC
781 AGGGACCACC GACCCACCAC CGGGAGGTAA GCTGGCCAGC AACTTATCTG TGTCTGTCG
841 ATTGTCTAGT GTCTATGACT GATTTTATGC GCCTGCGTCG GTACTAGTTA GCTAACTAGC
901 TCTGTATCTG GCGGACCCGT GGTGGAATCG ACGAGTTCGG AACACCCGGC CGCAACCCTG
961 GGAGACGTCC CAGGGACTTC GGGGGCCGTT TTTGTGGCCC GACCTGAGTC CAAAATCCC
1021 GATCGTTTTG GACTCTTTGG TGCACCCCCC TTAGAGGAGG GATATGTGGT TCTGGTAGGA
1081 GACGAGAACC TAAAACAGTT CCCGCTCCG TCTGAATTTT TGCTTTCGGT TTGGGACCGA
1141 AGCCGCGCCG CGCGTCTTGT CTGCTGCAGC ATCGTTCTGT GTTGTCTCTG TCTGACTGTG
1201 TTTCTGTATT TGTCTGAAAA TATGGGCCCG GGCCAGACTG TTACCACTCC CTTAAGTTTG
1261 ACCTTAGGTC ACTGGAAAGA TGTCGAGCGG ATCGCTCACA ACCAGTCGGT AGATGTCAAG
1321 AAGAGACGTT GGTTTACCTT CTGCTCTGCA GAATGGCCAA CCTTTAACGT CGGATGGCCG
1381 CGAGACGGCA CCTTTAACCG AGACCTCATC ACCCAGGTTA AGATCAAGGT CTTTTACCT
1441 GGCCCGCATG GACACCCAGA CCAGGTCCCC TACATCGTGA CCTGGGAAGC CTTGGCTTTT
1501 GACCCCCCTC CCTGGGTCAA GCCCTTTGTA CACCCTAAGC CTCCGCCTCC TCTTCTCCA
1561 TCCGCCCCGT CTCTCCCCCT TGAACCTCCT CGTTGACCCC CGCCTCGATC CTCCCTTTAT
1621 CCAGCCCTCA CTCTTCTCT AGGCGCCCCC ATATGGCCAT ATGAGATCGA TCTTATATGG
1681 GGCACCCCGG CCCCTTGTA ACTTCCCTGA CCCTGACATG ACAAGAGTTA CTAACAGCCC
1741 CTCTCTCAA GCTCACTTAC AGGCTCTCTA CTTAGTCCAG CACGAAGTCT GGAGACCTCT
1801 GCGGACAGT ACCCAAGAAC AACTGGACCG ACCGGTGGTA CCTCACCTT ACCGAGTCGG
1861 CGACACAGTG TGGGTCCGCC GACACCAGAC CTTCAAAGTA GACGGCATCG GAAAGGACC
1921 TTACACAGT CACGTGAAGG CTGCCGACCC CGGGGTGGA CCATCCTCTA GACTGCCGGA
1981 ACACGCGCC CCATGACCGA GTACAAGCCC ACGGTGCGCC TCGCCACCCG CGACGACGTC
2041 TCTCGAGCCA TACGCACCT CGCCGCGCGC TTCGCCGACT ACCCCGCCAC CCTCACGCGC
2101 CCCCAGGCGG ACCGCCACAT CGAGCGGGTC ACCGAGCTGC AAGAACTCTT GCGCCGCGGT
2161 GTCGACCCGG ACATCGGCAA GGTGTGGGTC GCGGACGACG GCGCCGCGGT GCGCATGGCC
2221 GTCGGGCTCG AGAGCGTCGA AGCGGGGGCG GTGTTCCGCC AGATCGGTCC GCGCCGCGAC
2281 ACCACGCGG GTTCCCGGCT GGCCGCGCAG CAACAGATGG AAGGCCTCCT TCTCGCCCGA
2341 GAGTTGAGCG GTTCCCGGCT GGCCGCGCAG ACCGTGCGCG TCTCGCCCGA CCACAGGGG
2401 CGGCCCAAG AGCCGCGGTG GCAGCGCCGT CGTGCTCCCC GAGGTGGAGG CGGCCGAGCG
2461 AAGGGTCTGG GCAGCGCCGT CGCGCCCCGC AACCTCCCT TCTACGAGCG GCTCGGCTTC
2521 CCCGCCCTTC TGGAGACCTC CGCGCCCCGC GGACCGCGCA CCTGGTGCAT GACCCGCAAG
2581 ACCGTACCG CCGACGTCGA GGTGCCGAA TTTGACCTTC TTAACCTTGC GGGAGACGTC
2641 CTTGGTGCTG GATCCGGACA GCTGTTGAAT GGTGAGCAAG GGCGAGGAGC TGTTACCCG
2701 GAGTCCAACC CTGGGCCAT GGTGAGCAAG GGCGAGGAGC TGTTACCCG
2761 ATCCTGGTCG AGCTGGACGG CGACGTAAAC GGCCACAAGT TCAGCGTGT
2821 GAGGGCGATG CCACCTACGG CAAGCTGACC CTGAAGTTCA TCTGCACCAC CGGCAAGCTG
2881 CCCGTGCCCT GGCCACCCCT CGTGACCACC CTGACCTACG GCGTGCAATG CTTAGCCGC
2941 TACCCGACCT ACATGAAGCA GTACGACTTC TTCAAGTCCG CCATGCCCGA AGGCTACGTC
3001 CAGGAGCGCA CCATCTTCTT CAAGGACGAC GGCAACTACA AGACCCGCGC CGAGGTGAAG
3061 TTCGAGGGCG ACACCCTGGT GAACCGCATC GAGCTGAAGG GCATCGACTT CAAGGAGGAC
3121 GGCAACATCC TGGGGCACA GCTGGAGTAC AACTACAACA GCCACAACGT CTATATCATG
3181 GCCGACAAGC AGAAGAACGG CATCAAGGTG AACTTCAAGA TCCGCCACAA CATCGAGGAC
3241 GGCAGCGTGC AGCTCGCCGA CCACTACCAG CAGAACACCC CCATCGGCGA CGGCCCGGTG
3301 CTGCTGCCCG ACAACCACTA CCTGAGCACC CAGTCCGCC TGAGCAAAGA CCCCACGAG
3361 AAGCGCGATC ACATGGTCTT GCTGGAGTTC GTGACCGCC CCGGGATCAC TCTCGGCATG
3421 GACGAGCTGT ACAAGGAATT CTCCGAGTTC AGATCCGGAC AGCTGTTGAA TTTTGACCTT
3481 CTTAAACTTG CGGGAGACGT CGAGTCCAAC CCTGGGCCA TGGAAGACGC CAAAACATA
3541 AAGAAAGGCC CGGCGCCATT CTATCCGCTG GAAGATGGAA CCGCTGGAGA GCAACTGCAT
3601 AAGGCTATGA AGAGATACGC CCTGGTTCCT GGAACAATTG CTTTACAGA TGCACATATC
3661 GAGGTGGACA TCACTTACGC TGAGTACTTC GAAATGTCCG TTCGTTGGC AGAAGCTATG
3721 AAACGATATG GGCTGAATAC AAATCACAGA ATCGTCGTAT GCAGTGAAAA CTCTCTTCAA

```

FIG. 8

```

3781 TTCTTTATGC CGGTGTTGGG CGCGTTATTT ATCGGAGTTG CAGTTGCGCC CGCGAACGAC
3841 ATTTATAATG AACGTGAATT GCTCAACAGT ATGGGCATTT CGCAGCCTAC CGTGGTGTTT
3901 GTTTCCAAAA AGGGGTTGCA AAAAATTTTG AACGTGCAAA AAAAGCTCCC AATCATCCAA
3961 AAAATTATTA TCATGGATTC TAAACCGGAT TACCAGGGAT TTCAGTCGAT GTACACGTTT
4021 GTCACATCTC ATCTACCTCC CGGTTTTAAT GAATACGATT TTGTGCCAGA GTCCTTCGAT
4081 AGGGACAAGA CAATTGCACT GATCATGAAC TCCTCTGGAT CTAAGTGGT GCCTAAAGGT
4141 GTCGCTCTGC CTCATAGAAC TGCCTGCGTG AGATTCTCGC ATGCCAGAGA TCCTATTTTT
4201 GGCAATCAAA TCATTCCGGA TACTGCGATT TTAAGTGTG TTCCATTCCA TCACGGTTTT
4261 GGAATGTTTA CTACACTCGG ATATTTGATA TGTGGATTTT GAGTCGTCTT AATGTATAGA
4321 TTTGAAGAAG AGCTGTTTCT GAGGAGCCTT CAGGATTACA AGATTCAAAG TGCCTGCTG
4381 GTGCCAACCC TATTCTCCTT CTTCGCCAAA AGCACTCTGA TTGACAAATA CGATTTATCT
4441 AATTTACACG AAATTGCTTC TGGTGGCGCT CCCCTCTCTA AGGAAGTCGG GGAAGCGGTT
4501 GCCAAGAGGT TCCATCTGCC AGGTATCAGG CAAGGATATG GGCTCACTGA GACTACATCA
4561 GCTATTCTGA TTACACCCGA GGGGGATGAT AAACCGGGCG CGGTCCGTAA AGTTTCCCA
4621 TTTTTGAAG CGAAGGTTGT GGTGAGAGG TCCTATGATT ATGTCCGGTT ATGTAAACAA TCCGGAAGCG
4681 GGCGAACTGT GTGTGAGAGG GGATGGATGG CTACATTCTG GAGACATAGC TTAAGTGGAC
4741 ACCAACGCCT TGATTGACAA CGTTGACCGC CTGAAGTCTC TGATTAAGTA CAAAGGCTAT
4801 GAAGACGAAC ACTTCTTCAT CGTTGACCGC TTGCTCCAAC ACCCAACAT CTTCGACGCA
4861 CAGGTGGCTC CCGCTGAATT GGAATCCATC GGTGAACCTT CCGCCGCCGT TGTGTTTTG
4921 GGTGTCGAG GTCTTCCCGA CGATGACGCC GGTGAACCTT CCGCCGCCGT TGTGTTTTG
4981 GAGCACGGAA AGACGATGAC GGAAAAAGAG ATCGTGGATT ACGTCGCCAG TCAAGTAACA
5041 ACCGCGAAAA AGTTGCGCGG AGGAGTTGTG TTTGTGGACG AAGTACCGAA AGGTCTTACC
5101 GGAAAACTCG ACGCAAGAAA AATCAGAGAG ATCCTCATAA AGGCCAAGAA GGGCGGAAAG
5161 ATCGCCGTGG AATTCTAGAG CGGCCGCTCG ACGATAAAAT AAAAGATTTT ATTTAGTCTC
5221 CAGAAAAAGG GGGGAATGAA AGACCCACC TGTAGTTTG GCAAGCTAGC TTAAGTAACG
5281 CCATTTTGCA AGGCATGGAA AAATACATAA CTGAGAATAG AGAAGTTCAG ATCAAGGTCA

5341 GGAACAGATG GAACAGCTGA ATATGGGCCA AACAGGATAT CTGTGGTAAG CAGTTCCTGC
5401 CCCGGCTCAG GGCCAAGAAC AGATGGAACA GCTGAATATG GGCCAAACAG GATATCTGTG
5461 GTAAGCAGTT CCTGCCCGG CTCAGGGCCA AGAACAGATG GTCCCCAGAT GCGGTCCAGC
5521 CCTCAGCAGT TTCTAGAGAA CCATCAGATG TTTCCAGGGT GCCCAAGGA CCTGAAATGA
5581 CCCTGTGCCT TATTTGAAC AACCAATCAG TTCGTTCTC GCTTCTGTTT GCGCGCTTCT
5641 GCTCCCCGAG CTCAATAAAA GAGCCACAA CCCCTCACTC GGGGCGCCAG TCCTCCGATT
5701 GACTGAGTCG CCCGGGTACC CGTGTATCCA ATAAACCCTC TTGCAGTTGC ATCCGACTTG
5761 TGGTCTCGCT GTTCTTGGG AGGGTCTCCT CTGAGTGATT GACTACCCGT CAGCGGGGGT
5821 CTTTCATTTT CGACTTGTGG TCTCGCTGCC TTGGGAGGGT CTCCTCTGAG TGATTGACTA
5881 CCCGTGAGCG GGGGTCTTCA CATGCAGCAT GTATCAAAAT TAATTTGGTT TTTTTTCTTA
5941 AGTATTTACA TTAAATGGCC ATAGTTGCAT TAATGAATCG GCCAACGCGC GGGGAGAGGC
6001 GGTGTCGCTA TTGGCGCTCT TCCGCTTCTT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTCTGTC
6061 GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG
6121 GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCCTAAAA
6181 AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCCTC TGACGAGCAT CACAAAAATC
6241 GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC
6301 CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTT CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG
6361 CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT
6421 CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCGTT CAGCCCGACC
6481 GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC
6541 CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG
6601 AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG
6661 CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAACAAAA
6721 CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTTGGT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG
6781 GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAACT
6841 CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA
6901 ATTAATAAATG AAGTTTGCGC AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT TGGTCTGACA
6961 GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA
7021 TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC
7081 CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC GCTACCCGCG TCCAGATTTA TCAGCAATAA
7141 ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC
7201 AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA

```

FIG. 8 Continuação

7261	ACGTTGTTGC	CATTGCTACA	GGCATCGTGG	TGTCACGCTC	GTCGTTTGGT	ATGGCTTCAT
7321	TCAGCTCCGG	TTCCCAACGA	TCAAGGCGAG	TTACATGATC	CCCCATGTTG	TGCAAAAAAG
7381	CGGTTAGCTC	CTTCGGTCCT	CCGATCGTTG	TCAGAAGTAA	GTTGGCCGCA	GTGTTATCAC
7441	TCATGGTTAT	GGCAGCACTG	CATAATTCTC	TTACTGTCAT	GCCATCCGTA	AGATGCTTTT
7501	CTGTGACTGG	TGAGTACTCA	ACCAAGTCAT	TCTGAGAATA	GTGTATGCGG	CGACCGAGTT
7561	GCTCTTGCCC	GGCGTCAACA	CGGGATAATA	CCGCGCCACA	TAGCAGAACT	TTAAAAGTGC
7621	TCATCATTGG	AAAACGTTCT	TCGGGGCGAA	AACTCTCAAG	GATCTTACCG	CTGTTGAGAT
7681	CCAGTTCGAT	GTAACCCACT	CGTGCACCCA	ACTGATCTTC	AGCATCTTTT	ACTTTCACCA
7741	GCGTTTCTGG	GTGAGCAAAA	ACAGGAAGGC	AAAATGCCGC	AAAAAAGGGA	ATAAGGGCGA
7801	CACGGAAATG	TTGAATACTC	ATACTCTTCC	TTTTTCAATA	TTATTGAAGC	ATTTATCAGG
7861	GTTATTGTCT	CATGAGCGGA	TACATATTTG	AATGTATTTA	GAAAAATAAA	CAAATAGGGG
7921	TTCCGCGCAC	ATTTCCCCGA	AAAGTGCCAC	CAGCTTTGCT	CTTAGGAGTT	TCCTAATACA
7981	TCCCAAACCTC	AAATATATAA	AGCATTTGAC	TTGTTCTATG	C	

FIG. 8 Continuação

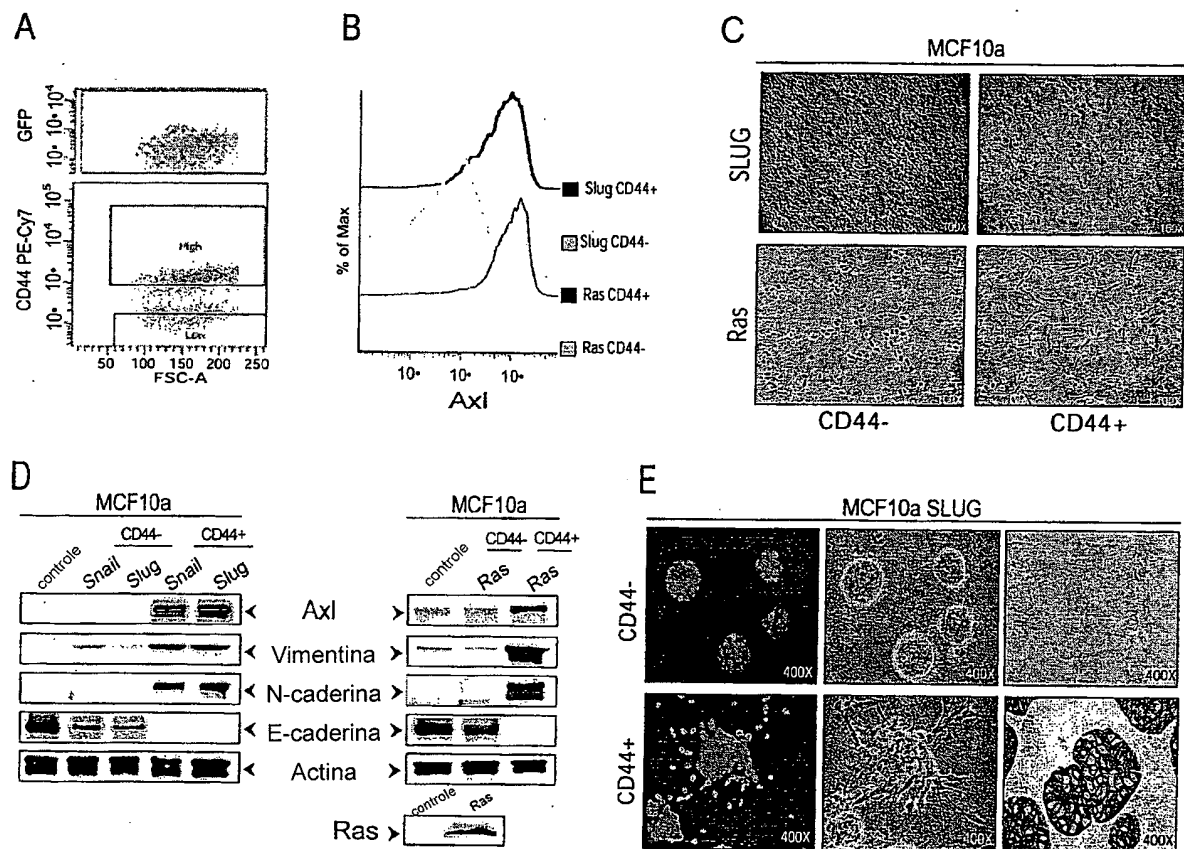


FIG. 9

A

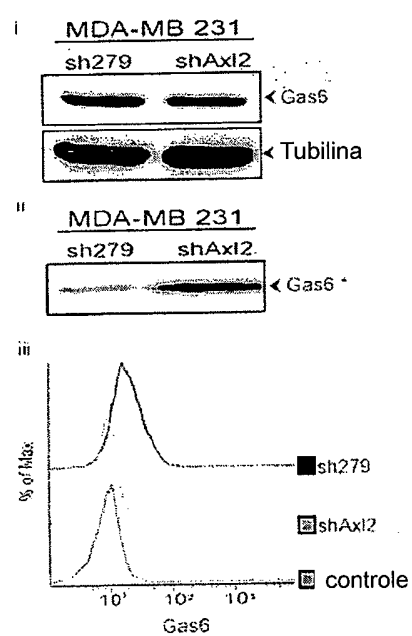


FIG. 10

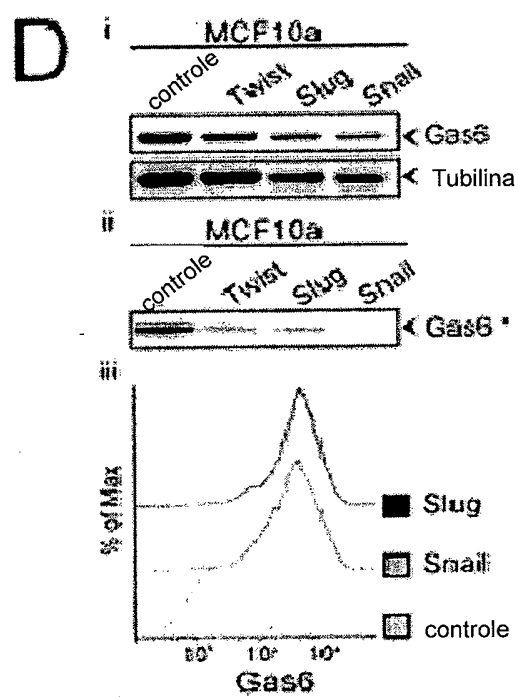


FIG. 11