



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

(21) **PI0802917-2 A2**



\* B R P I 0 8 0 2 9 1 7 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 24/06/2008  
(43) Data da Publicação: 08/09/2010  
(RPI 2070)

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

---

(54) Título: **MÉTODO E KIT DE DIAGNÓSTICO E/OU PROGNÓSTICO DE CÂNCER DE PULMÃO**

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

(72) Inventor(es): Emily Shacter, Felipe Dal-Pizzol, Fábio Klamt, José Cláudio Fonseca Moreira, Mauro Antônio Alves CastroReferente a RPI 2044 de 09/03/2010, quanto ao item (57).

(57) Resumo: MÉTODO E KIT DE DIAGNÓSTICO E/OU PROGNÓSTICO DE CÂNCER DE PULMÃO. A presente invenção proporciona um processo e um kit para o diagnóstico e/ou prognóstico de câncer, especialmente de câncer de pulmão. Particularmente, o referido processo e kit são baseados na expressão do gene CFL1, utilizado como biomarcador de câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC). O referido processo e kit podem ser aplicados vantajosamente na clínica oncológica.



## Relatório Descritivo de Patente de Invenção

### MÉTODO E KIT DE DIAGNÓSTICO E/OU PROGNÓSTICO DE CÂNCER DE PULMÃO

#### 5 Campo da Invenção

A presente invenção consiste em um método e um kit para o diagnóstico e um processo de prognóstico de câncer, em especial o câncer de pulmão. Particularmente, o referido processo e kit são baseados na quantificação da expressão do gene *CFL1*, utilizado como biomarcador de câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC). A presente invenção é particularmente útil em setores médicos (oncologia clínica e laboratorial), laboratórios de biologia molecular e biotecnologia, laboratórios de análises clínicas, laboratórios de citopatologia, hospitais, instituições de pesquisa, universidades e na indústria farmacêutica.

15

#### Antecedentes da Invenção

O câncer de pulmão é o mais comum de todos os tumores malignos, apresentando aumento anual de 2% na incidência mundial. Cerca de 90% dos casos diagnosticados está associado ao consumo de derivados de tabaco. No Brasil, o câncer de pulmão foi responsável por cerca de 14.715 óbitos em 2000, sendo o tipo de câncer que mais fez vítimas. Segundo a estimativa de incidência de câncer do INCA, o câncer de pulmão deverá atingir aproximadamente 27.270 brasileiros (17.810 homens e 9.460 mulheres) em 2008. O câncer de pulmão, do ponto de vista anatomo-patológico, é classificado em dois tipos principais: células pequenas (15%) e células não-pequenas ou NSCLC (85%). Quando comparados com os demais tipos de tumores, como de cólon, próstata e mama, a resposta clínica às terapias convencionais – cirurgia, radioterapia, e quimioterapia – é extremamente insatisfatória.

30

A maneira mais fácil de diagnosticar o câncer de pulmão é através de um raio-X do tórax complementado por uma tomografia computadorizada. A

broncoscopia (endoscopia respiratória) deve ser realizada para avaliar a árvore traqueobrônquica e, eventualmente, permitir a coleta de biópsias. É fundamental obter um diagnóstico de certeza, seja pela citologia ou patologia. Uma vez obtida a confirmação da doença, é realizado o estadiamento que avalia o estágio de evolução, ou seja, verifica se a doença está restrita ao pulmão ou disseminada por outros órgãos.

O estadiamento clínico-patológico (TNM) de câncer de pulmão – que é feito através de exame físico, diagnóstico por imagem (radiológicos e ultrassonografia), endoscopia e/ou exploração cirúrgica – é considerado, ainda hoje, o padrão-ouro para o prognóstico e decisão terapêutica (cirurgia, radioterapia e quimioterapia) em câncer de pulmão. Estes métodos podem ser associados para obtenção de estimativas de sobrevida mais precisas, onde o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico/prognóstico (a exemplo da cariotipagem, em leucemias) podem ser de fundamental importância, pois influenciam a decisão terapêutica e, conseqüentemente, repercutem na sobrevida do paciente, que hoje fica entre 9 a 11 meses para o câncer de pulmão do tipo NSCLC. Entretanto, até o presente momento, não há um biomarcador em uso na oncologia clínica para orientar as decisões terapêuticas nestes casos.

O alto gasto público no ano de 2006 em diagnóstico e acompanhamento laboratorial de pacientes com câncer de pulmão do tipo NSCLC no Brasil e o alto custo do teste de PSA (antígeno prostático específico – usado para o acompanhamento de pacientes com câncer de próstata), servem como referência da potencialidade comercial dos biomarcadores tumorais, sendo que ainda não há um biomarcador molecular específico para NSCLC. Assim, o presente invento pode ter equivalente potencialidade comercial.

O desenvolvimento de Kits diagnóstico baseados no uso de biomarcadores tumorais possui importante implicação clínica, como a detecção precoce, o diagnóstico, a predição da eficácia e o direcionamento do tratamento terapêutico. Com o desenvolvimento de novas tecnologias e o crescente interesse dos oncologistas clínicos pelo uso de biomarcadores

moleculares, tanto instituições acadêmicas, quanto a indústria farmacêutica têm aumentado seus esforços no desenvolvimento de novos biomarcadores para o câncer. Especificamente em relação ao câncer de pulmão de células não-pequenas, diversos são os potenciais biomarcadores moleculares, entre eles estão os genes *ERCC*, *EGFR*, *BCL2L1*, *BAX*, *CBLC*, *CD63*, *YWHAZ* (14-3-3 $\zeta$ ), *CYP24A1*, a família *STAT*, entre outros. Contudo, nenhum deles demonstrou ser superior ao padrão-ouro (estadiamento clínico) e, portanto, não há, até o presente momento, um biomarcador em uso na oncologia clínica para orientar as decisões terapêuticas em câncer de pulmão do tipo NSCLC.

10 A presente invenção visa proporcionar o desenvolvimento de um Kit Diagnóstico baseado no uso de um biomarcador prognóstico para uma relevante doença que ainda não apresenta nenhum biomarcador validado até o presente momento. Adicionalmente, o referido biomarcador é obtido pelos níveis de expressão do gene *CFL1* em biópsias de pacientes diagnosticados com NSCLC. Além disso, como não existem biomarcadores sendo utilizados na clínica oncológica de pacientes com NSCLC, seu prognóstico baseia-se somente no estadiamento clínico (padrão-ouro). Este novo biomarcador foi comparado com o padrão-ouro e demonstrou significativa superioridade para o prognóstico, bem como superioridade quando comparado com outros potenciais biomarcadores em estudo.

20 Na literatura patentária foram encontrados alguns documentos que circunscrevem o tema, porém sem antecipá-lo.

O documento CN 1,931,373 descreve uma técnica que usa cofilina-1 para diagnóstico e prognóstico de pacientes com tumores de ovário (oophoroma) tratados com quimioterápicos análogos ao taxol.

25 A presente invenção difere do documento por não proporcionar a interpretação do nível de expressão do gene *CFL1* (cofilina 1) e o prognóstico de pacientes com câncer de pulmão do tipo NSCLC.

O documento WO 2004/035092 trata de um agente que modula a expressão e/ou atividade da proteína cofilina (isoforma 1) aplicado no

tratamento e/ou profilaxia de doenças inflamatórias respiratórias, notadamente asma.

A presente invenção difere do documento por não revelar ou reivindicar qualquer uso associado ao diagnóstico ou prognóstico de câncer.

5 O documento CA 2,560,972 refere-se a uma técnica que usa análise do proteoma do fluido amniótico (múltiplas proteínas presentes no fluido amniótico) para identificar estados patológicos associadas a condições materno/fetais. Neste documento, a cofilina 1 aparece como uma das muitas proteínas identificadas no fluido amniótico.

10 A presente invenção difere desse documento por se referir especificamente ao nível de expressão do gene *CFL1* (cofilina 1) e o prognóstico de pacientes com câncer de pulmão do tipo NSCLC.

O documento JP 2001188069 refere-se ao uso da proteína cofilina como marcador de dano hepático para o diagnóstico de hepatopatias. O documento  
15 US 6,660,276 trata do desenvolvimento de um peptídeo sintético para o tratamento de pacientes com melanoma. Este novo peptídeo apresenta seqüência homóloga a vários outros peptídeos, entre eles pMEL17, tirosinase e cofilina.

A literatura patentária analisada não antecipa e nem sugere, ainda que  
20 indiretamente, qualquer dos objetos da presente invenção. Os referidos documentos não fornecem uma estimativa do prognóstico de pacientes com câncer de pulmão, ou seja, o estado da técnica não proporciona meios para proporcionar o prognóstico de paciente com câncer de pulmão. A presente invenção, por outro lado, proporciona o prognóstico quali- e quantitativo de  
25 pacientes com base no nível de expressão do gene *CFL1*, proporcionando estimativas de sobrevida, além de apresentar um método e um kit para diagnóstico desse tipo de câncer.

### **Objetos da Invenção**

30 É um objeto da presente invenção um método para diagnóstico de câncer de pulmão compreendendo as etapas de:

a) identificar e/ou extrair um material biológico referente ao gene *CFL1* de uma amostra de células de pulmão;

b) quantificar o material biológico referente ao gene *CFL1*;

5 c) comparar o valor encontrado em b) com valores pré-estabelecidos.

Em uma realização preferencial, o método acima compreende ainda etapas de:

d) estimar um índice de modulação da atividade do gene *CFL1* para uma amostra de células de pulmão;

10 e) comparar o valor encontrado em b) com valores pré-estabelecidos.

Essa etapa de cálculo do índice de modulação da atividade do gene *CFL1* é usada como um prognóstico para os pacientes.

É um adicional objeto da presente invenção um kit para diagnóstico de câncer compreendendo:

15 a) meios para a identificação e/ou extração de um material biológico de uma amostra de células de pulmão;

b) meios para quantificar o material biológico referente ao gene *CFL1*;

c) meios para estimar um índice de modulação da atividade do gene *CFL1* para uma amostra de células de pulmão;

20

### **Breve Descrição das Figuras**

A **Figura 1** mostra exemplos de sequência de primers úteis para etapas de amplificação de material genético relacionado ao gene *CFL1*.

25 A **Figura 2** mostra o índice  $c_1$  obtido para os grupos *baixa* e *alta* expressão de *CFL1* apresentados na Figura 3. Os dados estão agrupados segundo o nível de expressão do gene *CFL1*, enquanto que o status do prognóstico é resultado das respectivas curvas Kaplan-Meier. O índice  $c_1$  foi obtido para cada paciente conforme a Eq.1, a qual foi calibrada para  $k$  e  $M$  apresentados na Eq.3. Como controle foram consideradas todas as sondas  
30 presentes no microarranjo "U133 Plus 2.0 Array" (*i.e.*  $M=54675$  sondas), com  $k$  estimando em 32,6. Valores correspondem à média ( $\pm$  95% CI).

A **Figura 3** mostra as curvas de sobrevivência (tipo Kaplan-Meier) organizadas segundo os níveis de expressão de *CFL1* nos diferentes estádios de câncer do tipo NSCLC. Dados obtidos em um estudo prospectivo com 111 pacientes diagnosticados com NSCLC e agrupados segundo o Sistema Internacional de Estadiamento para Câncer de Pulmão (A, B). Para verificar o valor prognóstico dos níveis de expressão do gene *CFL1*, os dados dos pacientes foram agrupados pelo estadiamento clínico (IA, IB, IIA/B, IIIA/B, IV) e foram discriminados pelos diferentes níveis de expressão do gene *CFL1* (baixa/alta) (C, D, E, F).

### Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção será exposta a seguir em detalhes. Os exemplos descritos a seguir são meras concretizações preferenciais da invenção, não devendo ser compreendidos como limitantes de invenção. Variações ou concretizações similares devem ser consideradas como dentro do escopo da invenção.

#### Cofilina 1 – *CFL1*

O relato a seguir descreve um processo *in vitro* e um kit para estimar o nível de expressão gênica do gene da cofilina 1 de um eucarioto, ou de um grupo de eucariotos, através da análise de material biológico, células e/ou tecidos dos mesmos. Embora a invenção possa ser aplicada a qualquer eucarioto no qual ocorra detectável expressão gênica de cofilina 1, será feita referência à concretização preferencial de uso na análise de expressão gênica de cofilina 1 (não-muscular) de humanos (*i.e.* gene *CFL1*) obtida de uma amostra de câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC). Este gene codifica uma proteína de 18kDa que está associada ao processo de polimerização e despolimerização do citoesqueleto de actina. A seqüência do gene *CFL1* pode ser identificada por diversos códigos de acesso, sendo aqui citados os mais usuais: Símbolo (*CFL1*); Nome (cofilin 1, non-muscle); Entrez

Gene ID (1072); Ensembl ID (ENSG00000172757); HGNC ID (1874); RefSeq ID (NM\_005507).

#### Câncer de Pulmão

A presente invenção é direcionada ao diagnóstico e prognóstico de  
5 câncer de pulmão, em especial ao câncer de pulmão do tipo NCSLC.

#### Material Biológico

O material biológico referente ao gene *CFL1* útil na presente invenção  
inclui, mas não se limita aos elementos como DNA, RNAs e/ou proteínas,  
inteiros ou parciais, encontrado em células e/ou tecidos e/ou órgãos de um  
10 organismo eucarioto. Em especial, o material biológico utilizado na presente  
invenção para a detecção do gene *CFL1* é o RNAm.

#### Método de Diagnóstico e Prognóstico

O método de diagnóstico da presente invenção compreende as etapas  
de:

- 15 a) identificar e/ou extrair um material biológico compreendendo o gene  
*CFL1* de uma amostra de células de pulmão;  
b) quantificar o material biológico compreendendo o gene *CFL1*;  
c) comparar o valor encontrado em b) com valores pré-estabelecidos.

A etapa de extração e/ou identificação útil na presente invenção inclui  
20 qualquer técnica já utilizada direcionada ao material biológico de escolha.

No caso do material biológico ser por exemplo o RNAm, é necessária a  
extração do material da célula para que seja feita a devida quantificação do  
mesmo.

Exemplos de técnicas incluem, mas não se limitam, técnicas corriqueiras  
25 de biologia molecular como PCR e microarranjos.

Na técnica de PCR, amplamente conhecida do meio científico, o material  
genético é desnaturado e primers se ligam à eles, permitindo a amplificação do  
material genético, como RNAm previamente extraído e purificado. Após essa  
amplificação, é possível verificar e comparar a expressão dessa molécula pela  
30 análise de géis. Quando há necessidade de amplificação de material genético,



como no PCR, os primers adequados podem, por exemplo, ser escolhidos dentre os primers mostrados na Figura 1.

No caso dos microarranjos, são construídos chips utilizando, por exemplo, fragmentos de DNA (como ESTs), em que inicialmente o RNAm deve ser transformado em um DNA complementar (cDNA). Esse cDNA será depositado sobre uma lâmina de vidro de forma automática e o material genético será hibridizado com sondas de RNAm que fluorescem em comprimentos de onda específicos. O sinal fluorescente emitido de cada ponto de hibridização representa a abundância ou expressão do cDNA correspondente, tendo-se uma informação quantitativa da expressão gênica nas condições de experimento e controle.

A etapa de quantificação útil na presente invenção inclui qualquer técnica já utilizada para quantificação do material biológico escolhido.

No entanto, diversas técnicas também permitem a quantificação do material biológico sem que seja necessário extraí-lo da célula. Para esse tipo de técnicas, usa-se somente a identificação do material biológico, sem a necessidade de sua extração. Exemplos de tais técnicas incluem, mas não se limitam a, fluorescência e citometria de fluxo. Na citometria de fluxo, por exemplo, vários parâmetros de modificação celular, incluindo DNAs e RNAs podem ser medidos através de um feixe de luz, como laser, de uma única frequência que, quando direcionado a um meio líquido em fluxo, consegue detectar e analisar as partículas que passam através do feixe.

#### Comparação com valores pré-estabelecidos

No método de diagnóstico, a etapa de comparação do valor encontrado pode ser feita com valores pré-estabelecidos, tendo como objetivo somente o diagnóstico e avalia se o paciente possui ou não câncer, sem fornecer informações sobre a sobrevida do paciente.

O método de diagnóstico descrito acima pode ainda ser utilizado como prognóstico da sobrevida do paciente quando compreende as etapas adicionais de:

d) estimar um índice de modulação da atividade de *CFL1* para uma amostra de células de pulmão;

e) comparar o valor encontrado em b) com valores pré-estabelecidos.

5 A modulação da atividade de *CFL1* significa qualquer modificação na expressão de elementos como DNA, RNA e/ou proteínas e/ou qualquer modificação no comportamento das células durante e/ou após a expressão de determinado gene. Em especial, na presente invenção, as células compreendem e/ou expressam o gene *CFL1*.

10 O índice de *CFL1*, referido como “índice do biomarcador *CFL1*” ou simplesmente “índice  $c_1$ ”, pode ser utilizado para a análise de uma única amostra individualmente, tal como uma biópsia, ou um conjunto de diferentes amostras que podem ser biópsias de um grupo de pacientes com um dado tipo de neoplasia.

15 A análise do índice  $c_1$  pode ser conduzida de diferentes formas, sendo aqui apresentada uma forma simples e prática. Uma das melhores maneiras de se obter o índice  $c_1$  é pela razão do nível de expressão do gene *CFL1* pela média do nível de expressão gênica dos controles, como segue:

20

$$c_1 = \frac{ExpC_1}{ExpC_1 + k \frac{1}{M} \sum_i ExpC_i} \quad [1]$$

onde:

$ExpC_1$  representa o nível de expressão do gene *CFL1*;

25  $ExpC_i$  representa o nível de expressão gênica de um dado gene *i* escolhido como controle;

$M$  representa o número total de genes usados como controle de expressão gênica; e

$k$  corresponde a um termo de calibração de  $ExpC_i$ ;

permitindo desta forma o ajuste da equação para diferentes controles de expressão gênica.

Para proceder com a calibração pode-se estimar  $k$  a partir de uma amostra conhecida de tumores com baixa expressão de *CFL1* em relação a uma amostra com alta expressão de *CFL1*, tal que

$$c_{1\alpha} + c_{1\beta} = 1.0 \quad [2]$$

onde  $c_{1\alpha}$  e  $c_{1\beta}$  correspondem às amostras de alta e baixa expressão gênica do biomarcador, respectivamente. Com isso, o protocolo pode ser padronizado para diferentes condições técnicas, o que flexibiliza a manufatura do kit. Feito isso, pode-se obter o índice  $c_1$  para um dado paciente, o qual representa um valor adimensional, podendo variar de zero (0.0) a um (1.0).

Para interpretação do resultado, o índice  $c_1$  de uma dada biópsia deve então ser posicionado numa escala padronizada de prognóstico, exemplificada abaixo:

- a) Faixa de bom prognóstico:  $c_1 < 0,5$
- b) Faixa de mau prognóstico:  $c_1 \geq 0,5$

A intenção destas faixas não é limitar, mas sim exemplificar o uso do biomarcador. Tais faixas devem ser corrigidas para cada metodologia citada acima, uma vez que a obtenção dos níveis de expressão gênica é influenciada por uma série de fatores, tais como os fluorocromos ou isótopos radioativos escolhidos, os controles escolhidos, bem como dependem dos fabricantes dos microarranjos e dos equipamentos utilizados nas leituras dos sinais (*i.e. scanners*). É importante destacar que variações neste protocolo para obtenção do índice  $c_1$  podem gerar diferentes escalas, entretanto, este exemplo tem a intenção de materializar o objeto da invenção, que é a correlação entre o aumento da expressão do gene *CFL1* em cânceres do tipo NSCLC e um pior prognóstico para os pacientes. Portanto, os versados na arte prontamente saberão que esta formulação não limita a obtenção do índice  $c_1$ , o qual pode

ser expresso, por exemplo, em escalas que variam de zero (0.0) a cem (100.0), zero (0.0) a mil (1000.0), etc.

Os nossos resultados compararam o valor prognóstico dos níveis de expressão do gene *CFL1* com diferentes biomarcadores potenciais para câncer do tipo NSCLC. Os dados de níveis de expressão gênica dos biomarcadores foram agrupados em dois grupos (alta/baixa expressão). As probabilidades de sobrevivência foram calculadas de acordo com o método de Kaplan-Meier. As diferenças de sobrevivência entre os grupos foram obtidas por teste estatístico de log-rank usando o programa SPSS (versão 14.0). Em todas as análises, o valor *P* menor que 0.05 foi considerado significativo. Foi possível verificar que o valor prognóstico da relação entre a expressão do gene *CFL1* e a sobrevida dos pacientes apresentou melhor resultado ( $p < 0,00026$ ), mesmo quando comparado a 12 genes considerados potenciais biomarcadores para câncer de pulmão (*BAX*, *BCL2L1*, *CBLC*, *TERT*, *EGFR*, *STAT1*, *MYC*, *E2F3*, *ERCC1*, *YWHAZ*, *ALKBH8*, *RRM1*). O gene com melhor resultado desse grupo (*BAX* com  $p < 0,0316$ ) ainda foi muito inferior ao *CFL1* ( $p < 0,00026$ ). Os genes com potencial biomarcador foram selecionados pela compilação de dados obtidos em pesquisa bibliográfica de biomarcadores para câncer de pulmão, especialmente NSCLC, utilizando-se a plataforma de busca do PubMed.

#### 20 Kit para Diagnóstico

O referido kit compreende, preferencialmente:

- a) meios para a identificação e/ou extração de um material biológico de uma amostra de células de pulmão;
- b) meios para quantificar o material biológico compreendendo *CFL1*;
- 25 c) meios para estimar um índice de modulação da atividade de *CFL1* para uma amostra de células de pulmão;

Em uma realização preferencial, o material celular é o RNAm e os meios para a obtenção do dito RNAm podem ocorrer por um grande número de variações metodológicas. Em uma de suas concretizações, podem ser utilizados dois métodos preferenciais, que incluem *microarrays* e/ou reativos/técnicas como PCR, ambos já conhecidos do estado da técnica.

Portanto, a presente invenção, que pode ser aplicada na clínica oncológica de pacientes com câncer de pulmão do tipo NSCLC, oferece várias inovações em relação ao estado atual da tecnologia, tais como:

5 – oferecimento de um biomarcador prognóstico com comprovada eficácia para, por exemplo, câncer de pulmão do tipo NSCLC que ainda não apresenta nenhum método laboratorial utilizável e nenhum biomarcador validado até o presente momento;

10 – desenvolvimento de um Kit Diagnóstico baseado no uso dos níveis de expressão do gene *CFL1* em biópsias de pacientes diagnosticados com NSCLC; e

– proporcionar o direcionamento da opção terapêutica baseada nas características moleculares dos tumores (uso dos níveis de expressão do gene *CFL1* em biópsias de pacientes diagnosticados com NSCLC), caracterizando-se assim uma abordagem individual farmacogenômica.

15

#### **Exemplo 1 – Processo *in vitro* para diagnóstico/prognóstico de câncer**

O processo revelado nesta concretização preferencial da invenção compreende as seguintes etapas:

20 (a) Obtenção dos RNA mensageiros (RNAm): as técnicas utilizadas na etapa de obtenção do RNA mensageiro de uma ou mais amostras de células e/ou tecidos de pelo menos um eucariota são aquelas conhecidas do estado da técnica, como métodos físicos e/ou químicos e;

25 (b) Quantificação do RNAm do gene *CFL1*: a quantificação dos RNAm pode ser realizada através de técnicas conhecidas dos versados na arte, como técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), *microarrays* entre outras. Tais técnicas proporcionam a detecção da presença de RNAm e/ou em uma amostra de células e/ou tecidos e possibilitam a quantificação do nível de expressão de um grande número de genes quando usado um painel de sondas (*i.e.* microarranjos de oligonuclotídeos) ou um gene em especial (*i.e.* PCR).

30 (c) Análise do nível de expressão gênica do biomarcador (gene *CFL1*): este processo visa o fornecimento de um índice prognóstico, o qual se aplica a

diversas situações, desde a caracterização fundamental, que se refere ao fornecimento do grau de agressividade tumoral de uma única neoplasia até estudos epidemiológicos, fornecendo o prognóstico de muitas neoplasias de um mesmo tipo. Uma vez obtidos os níveis de expressão de *CFL1*, pode-se classificar tanto neoplasias com bom prognóstico até as de pior prognóstico, numa escala que varia de zero a um.

(d) Determinação da expectativa de sobrevivência: da análise do nível de expressão gênica da etapa anterior é possível determinar uma maior ou menor probabilidade de sobrevivência do indivíduo, do qual, a amostra foi originada. A referida análise pode ser feita, por exemplo, a partir da correlação entre o nível de expressão do gene *CFL1* da presente invenção e a sobrevivência dos pacientes. Em uma configuração, quanto maior a expressão do gene *CFL1*, menor o prognóstico de sobrevivência do paciente.

#### 15 **Exemplo 2 – Kit para diagnóstico**

Nesta concretização preferencial da invenção, são revelados detalhes que permitirão uma melhor compreensão a respeito do kit para quantificação *in vitro* da expressão do gene *CFL1*, para prognóstico de pacientes com câncer de pulmão do tipo NSCLC.

20 Em particular, a técnica de *microarray* consiste basicamente nos seguintes passos:

(i) Extração de RNAm total;

(ii) Marcação dos ácidos nucleicos com fluorocromos ou isótopo radioativos;

25 (iii) Hibridização do RNAm total marcado com sondas de oligonucleotídeos fixadas no microarranjo (hibridização por complementaridade de bases); e

(iv) leitura do sinal da hibridização (em scanners) e geração de uma imagem de hibridização.

Após a leitura da imagem, a intensidade da hibridização é quantificada e o nível de expressão do gene *CFL1* pode então ser interpretado conforme a intensidade do sinal.

5 A especificidade da sonda depende de complementaridade com a seqüência de nucleotídeos do gene alvo. Para tanto, uma gama de sondas podem ser projetadas para se obter o resultado esperado, como sugerido pelo próprio fabricante de *microarrays*, Affymetrix.

10 **Exemplo 3 – Avaliação do processo e kit da invenção para diagnóstico/prognóstico de câncer**

Nesta concretização, da invenção, demonstramos a partir da expressão gênica de *CFL1* de amostra de 111 pacientes com câncer de pulmão do tipo NSCLC, a existência de correlação entre o índice que compõem a escala de expressão do gene *CFL1* da presente invenção e a sobrevida em 15 aproximadamente cinco anos dos pacientes.

**Exemplo 3.1 Protocolo para estimar o índice do biomarcador *CFL1* ( $c_1$ ) em um único paciente, através da realização de biópsia:**

20 A partir de uma biópsia de tecido de câncer de pulmão do tipo NSCLC, por exemplo, ou neoplasia maligna, obtém-se *in vitro* o nível de expressão do gene *CFL1* da amostra. O número total de amostras a ser analisado é dependente do grau de confiabilidade desejado. Em seguida é necessário obter o nível de expressão gênica de um ou mais marcadores internos invariáveis, é desejável que, neste caso, seja um conjunto de genes que representa uma 25 função celular essencial ou mesmo a totalidade dos genes obtidos num microarranjo (ou *microarray*).

30 Para demonstrar a obtenção das faixas de referência, seguindo o protocolo descrito acima, calculamos o índice  $c_1$  de cada tumor conforme a Eq.1, com  $k$  estimado em 32,6 de modo a satisfazer a Eq.2. Como controle foram consideradas todas as sondas presentes no microarranjo (*i.e.*  $M=54675$

sondas). Portanto, os valores de  $k$  e  $M$  geraram o termo de ajustamento para estas condições técnicas, padronizando a obtenção do índice  $c_1$  em

$$c_1 = \frac{ExpC_1}{ExpC_1 + 5,96 \times 10^{-4} \sum_i ExpC_i} \quad [3]$$

5

Os resultados foram então combinados nos mesmos grupos amostrais já descritos para o biomarcador *CFL1*. A média do índice  $c_1$  de cada grupo amostral está apresentada na Figura 2. Nestas condições, o protocolo de calibração gerou as faixas de referência do índice  $c_1$ , ou seja, bom prognóstico ( $c_1 < 0,5$ ) e mau prognóstico ( $c_1 \geq 0,5$ ).

10

Os versados na arte valorizarão imediatamente os importantes benefícios decorrentes do uso da presente invenção. Variações nas formas de concretizar o conceito inventivo aqui exemplificado devem ser compreendidas como dentro do espírito da invenção e das reivindicações anexas.

15



### Reivindicações

#### MÉTODO E KIT DE DIAGNÓSTICO E/OU PROGNÓSTICO DE CÂNCER DE PULMÃO

- 5            1. Método para diagnóstico e/ou prognóstico de câncer de pulmão caracterizado por compreender as etapas de:
- a) identificar e/ou extrair um material biológico referente ao gene *CFL1* de uma amostra de células de pulmão;
- b) quantificar o material biológico referente ao gene *CFL1*; e
- 10            c) comparar o valor encontrado em b) com valores pré-estabelecidos.
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por adicionalmente compreender as etapas de:
- d) estimar um índice de modulação da atividade do gene *CFL1*
- 15            para uma amostra de células de pulmão;
- e) comparar o valor encontrado em b) com valores pré-estabelecidos.
3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo câncer de pulmão ser do tipo NSCLC.
- 20            4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo material biológico referente ao gene *CFL1* ser escolhido do grupo que compreende DNA, RNAs e/ou proteínas, inteiros ou parciais.
5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo material biológico referente ao gene *CFL1* ser RNAm.
- 25            6. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo índice de modulação ser obtido através do uso da equação 1 abaixo:

$$C_1 = \frac{ExpC_1}{ExpC_1 + k \frac{1}{M} \sum_i ExpC_i} \quad [1]$$

onde:

***ExpC<sub>1</sub>*** representa o nível de expressão do gene *CFL1*;

$ExpC_i$  representa o nível de expressão gênica de um dado gene  $i$  escolhido como controle;

$M$  representa o número total de genes usados como controle de expressão gênica; e

5  $k$  corresponde a um termo de calibração de  $ExpC_i$ .

7. Kit para diagnóstico e/ou prognóstico de câncer caracterizado por compreender:

a) meios para a identificação e/ou extração de um material biológico de uma amostra de células de pulmão;

10 b) meios para quantificar o material biológico referente ao gene  $CFL1$ ;

c) meios para estimar um índice de modulação da atividade do gene  $CFL1$  para uma amostra de células de pulmão;

15 8. Kit, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo câncer de pulmão ser do tipo NSCLC.

9. Kit, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo material biológico referente ao gene  $CFL1$  ser escolhido do grupo que compreende DNA, RNAs e/ou proteínas, inteiros ou parciais.

20 10. Kit, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo material biológico referente ao gene  $CFL1$  ser RNAm.

11. Kit, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelos meios de extração e/ou identificação ser escolhido do grupo que compreende PCR, microarranjos e mistura dos mesmos.

25 12. Kit, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo índice de modulação ser obtido através do uso da equação 1 abaixo:

$$C_1 = \frac{ExpC_1}{ExpC_1 + k \frac{1}{M} \sum_i ExpC_i} \quad [1]$$

onde:

$ExpC_1$  representa o nível de expressão do gene  $CFL1$ ;

**$ExpC_i$**  representa o nível de expressão gênica de um dado gene  $i$  escolhido como controle;

**$M$**  representa o número total de genes usados como controle de expressão gênica; e

5  **$k$**  corresponde a um termo de calibração de  **$ExpC_i$** .

**Resumo****MÉTODO E KIT DE DIAGNÓSTICO E/OU PROGNÓSTICO DE CÂNCER DE  
PULMÃO**

A presente invenção proporciona um processo e um kit para o diagnóstico e/ou prognóstico de câncer, especialmente de câncer de pulmão. Particularmente, o referido processo e kit são baseados na expressão do gene *CFL1*, utilizado como biomarcador de câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC). O referido processo e kit podem ser aplicados vantajosamente na clínica oncológica.