

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 119**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06813452 .7**
96 Fecha de presentación: **15.08.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1915625**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.04.2008**

54 Título: **Sensibilidad apoptótica a APO2L/TRAIL analizando la expresión de GalNac-T14 en células/tejidos**

30 Prioridad:
16.08.2005 US 708677 P
24.05.2006 US 808076 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.05.2012

73 Titular/es:
Genentech, Inc.
1 DNA Way
South San Francisco CA 94080-4990 , US

72 Inventor/es:
WAGNER, Klaus, W. y
ASHKENAZI, Avi, J.

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 380 119 T3

DESCRIPCIÓN

Sensibilidad apoptótica a apo2l/trail analizando la expresión de galnac-t14 en células/tejidos.

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 **[0001]** Las invenciones descritas en este documento se refieren a procedimientos y ensayos para detectar biomarcadores predictivos de la sensibilidad de las células de mamífero a Apo2L/TRAIL. Más en particular, las invenciones de este documento se refieren a procedimientos y ensayos en los que se detectan moléculas asociadas con la familia de proteínas GalNac-T que predicen la sensibilidad de las células cancerosas de mamíferos a Apo2L/TRAIL.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 **[0002]** En la técnica se han identificado diversos ligandos y receptores pertenecientes a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). Entre estos ligandos se incluyen el factor de necrosis tumoral alfa ("TNF alfa"), el factor de necrosis tumoral beta ("TNF beta" o "linfotóxina alfa"), linfotóxina beta ("LT beta), ligando de CD30, ligando de CD27, ligando de CD40, ligando de OX-40, ligando de 4-1BB, LIGHT, ligando de Apo-1 (también denominado ligando de Fas o ligando de CD95), ligando de Apo-2 (también denominado Apo2L y TRAIL), ligando de Apo-3
15 (también denominado TWEAK), APRIL, ligando de OPG (también denominado ligando de RANK, ODF o TRANCE) y TALL-1 (también denominado BlyS, BAFF o THANK) (véase, por ejemplo, Ashkenazi, Nature Review, 2:420-430 (2002); Ashkenazi y Dixit, Science, 281:1305-1308 (1998); Ashkenazi y Dixit, Curr. Opin. Cell Biol., 11:255-260 (2000); Golstein, Curr. Biol., 7:750-753 (1997) Wallach, Cytokine Reference, Academic Press, 2000, páginas 377-411; Locksley et al., Cell, 104:487-501 (2001); Gruss y Dower, Blood, 85:3378-3404 (1995); Schmid et al., Proc. Natl.
20 Acad. Sci., 83:1881 (1986); Dealtry et al., Bur. J. Immunol., 17:689 (1987); Pitti et al., J. Biol. Chem., 271:12687-12690 (1996); Wiley et al., Immunity, 3:673-682 (1995); Browning et al., Cell, 72:847-856 (1993); Armitage et al. Nature, 357:80-82 (1992), documento WO 97/01633 publicado el 16 de enero de 1997; documento WO 97/25428 publicado el 17 de julio de 1997; Marsters et al., Curr. Biol., 8:525-528 (1998); Chicheportiche et al., Biol. Chem., 272:32401-32410 (1997); Hahne et al., J. Exp. Med., 188:1185-1190 (1998); documento WO98/28426 publicado el 2
25 de julio de 1998; documento WO98/46751 publicado el 22 de octubre de 1998; documento WO98/18921 publicado el 7 de mayo de 1998; Moore et al., Science, 285:260-263 (1999); Shu et al., J. Leukocyte Biol., 65:680 (1999); Schneider et al., J. Exp. Med., 189:1747-1756 (1999); Mukhopadhyay et al., J. Biol. Chem., 274:15978-15981 (1999)).

- [0003]** Normalmente, la inducción de diversas respuestas celulares mediadas por estos ligandos de la familia del TNF se inicia por su unión a receptores celulares específicos. Algunos, pero no todos los ligandos de la familia del TNF, se unen e inducen diversas actividades biológicas a través de "receptores de muerte" de la superficie celular activando caspasas o enzimas que participan en la ruta de muerte celular o apoptosis (Salvesen et al., Cell, 91:443-446 (1997). Los miembros incluidos en la superfamilia de receptores del TNF identificados hasta la fecha son TNFR1, TNFR2, TACI, GITR, CD27, OX-40, CD30, CD40, HVEM, Fas (también denominado Apo-1 o CD95), DR4
35 (también denominado TRAIL-R1), DR5 (también denominado Apo-2 o TRAIL-R2), DcR1, DcR2, osteoprotegerina (OPG), RANK y Apo-3 (también denominado DR3 o TRAMP) (véase, por ejemplo, Ashkenazi, Nature Reviews, 2:420-430 (2002); Ashkenazi y Dixit, Science, 281:1305-1308 (1998); Ashkenazi y Dixit, Curr. Opin. Cell Biol., 11:255-260 (2000); Golstein, Curr. Biol., 7:750-753 (1997); Wallach, Cytokine Reference, Academic Press, 2000, páginas 377-411; Locksley et al., Cell, 104:487-501 (2001); Gruss y Dower, Blood, 85:3378-3404 (1995); Hohman et al., J. Biol. Chem., 264:14927-14934 (1989); Brockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:3127-3131 (1990);
40 documento EP 417.563, publicado el 20 de marzo de 1991; Loetscher et al., Cell, 61:351 (1990); Schall et al., Cell, 61:361 (1990); Smith et al., Science, 248:1019-1023 (1990); Lewis et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 88:2830-2834 (1991); Goodwin et al., Mol. Cell. Biol., 11:3020-3026 (1991); Stamenkovic et al., EMBO J., 8:1403-1410 (1989); Mallett et al., EMBO J., 9:1063-1068 (1990); Anderson et al., Nature, 390:175-179 (1997); Chicheportiche et al., J. Biol. Chem., 272:32401-32410 (1997); Pan et al., Science, 276:111-113 (1997); Pan et al., Science, 277:815-818
45 (1997); Sheridan et al., Science, 277:818-821 (1997); Degli-Esposti et al., J. Exp. Med., 186:1165-1170 (1997); Marsters et al., Curr. Biol., 7:1003-1006 (1997); Tsuda et al., BBRC, 234:137-142 (1997); Nocentini et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 94:6216-6221 (1997); vonBulow et al., Science, 278:138-141 (1997)).

- [0004]** La mayoría de estos miembros de la familia de receptores del TNF comparten la estructura típica de receptores de superficie celular con regiones extracelular, transmembrana e intracelular, mientras que otros se encuentran de forma natural como proteínas solubles carentes de dominios transmembrana e intracelular. La porción extracelular de los TNFR típicos contiene un patrón repetitivo de secuencia de aminoácidos de dominios múltiples ricos en cisteína (DRC) que empiezan desde el extremo NH₂ terminal.

- [0005]** El ligando denominado Apo-2L o TRAIL se identificó hace varios años como miembro de la familia de citoquinas TNF (véanse, por ejemplo, Wiley et al., Immunity, 3:673-682 (1995); Pitti et al., J. Biol. Chem., 271:12697-12690 (1996); documentos WO 97/01633; WO 97/25428; patente de EE. UU. N ° 5.763.223 presentada el 9 de junio de 1998; patente de EE. UU. N ° 6.284.236 presentada el 4 de septiembre de 2001). La secuencia nativa completa del polipéptido Apo2L/TRAIL humano es una proteína transmembrana de tipo II de 281 aminoácidos. Algunas células pueden producir una forma soluble natural del polipéptido, mediante la escisión enzimática de la región

- extracelular polipeptídica (Mariani et al., J. Cell. Biol., 137:221-229 (1997)). Los estudios cristalográficos de las formas solubles de Apo2L/TRAIL, muestran una estructura homotrimérica similar a las estructuras del TNF y de otras proteínas relacionadas (Hymowitz et al., Molec. Cell, 4:563-571 (1999); Cha et al., Immunity, 11:253-261 (1999); Mongkolsapaya et al., Nature Structural Biology, 6:1048 (1999); Hymowitz et al., Biochemistry, 39:633-644 (2000)).
- 5 Sin embargo, se encontró que Apo2L/TRAIL, a diferencia de otros miembros de la familia del TNF, tiene una característica estructural exclusiva en la que tres restos de cisteína (en la posición 230 de cada subunidad del homotrimero) de coordinan conjuntamente con un átomo de cinc y que la unión al cinc es importante para la estabilidad del trímero y su actividad biológica (Hymowitz et al., *supra*; Bodmer et al., J. Biol. Chem., 275:20632-20637 (2000)).
- 10 **[0006]** Se ha publicado en la literatura que Apo2L/TRAIL puede tener una función principal en la modulación del sistema inmune, incluso en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide [véanse, por ejemplo, Thomas et al., J. Immunol., 161:2195-2200 (1998); Johnsen et al., Cytokine, 11:664-672 (1999); Griffith et al., J. Exp. Med., 189:1343-1353 (1999); Song et al., J. Exp. Med., 191:1095-1103 (2000)].
- 15 **[0007]** También se ha publicado que las formas solubles de Apo2L/TRAIL inducen la apoptosis en diversas células cancerosas, como tumores de colon, pulmón, mama, próstata, vejiga, riñón, ovario y cerebro, así como melanoma, leucemia y mieloma múltiple (véanse, por ejemplo, Wiley et al., *supra*; Pitti et al., *supra*; patente de EE. UU. N° 6.030.945 presentada el 29 de febrero de 2000; patente de EE. UU. N° 6.746.668 presentada el 8 de junio de 2004; Rieger et al., FEBS Letters, 427:124-128 (1998); Ashkenazi et al., J. Clin. Invest., 104:155-162 (1999); Walczak et al., Nature Med., 5:157-163 (1999); Keane et al., Cancer Research, 59:734-741 (1999); Mizutani et al., Clin. Cancer Res., 5:2605-2612 (1999); Gazitt, Leukemia, 13:1817-1824 (1999); Yu et al., Cancer Res., 60:2384-2389 (2000); Chinnaiyan et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 97:1754-1759 (2000)). Los estudios *in vivo* en modelos murinos de tumores sugieren además que Apo2L/TRAIL, solo o en combinación con quimioterapia o radioterapia, puede ejercer efectos antitumorales considerables (véanse, por ejemplo, Ashkenazi et al., *supra*; Walczak et al., *supra*; Gliniak et al., Cancer Res., 59:6153-6158 (1999); Chinnaiyan et al., *supra*; Roth et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 265:1999 (1999); solicitud de patente US/00/15512; solicitud de patente US/01/23691). Al contrario que muchos tipos de células cancerosas, la mayoría de los tipos de células humanas normales parecen resistentes a la inducción de apoptosis mediante determinadas formas recombinantes de Apo2L/TRAIL (Ashkenazi et al., *supra*; Walczak et al., *supra*). Jo et al. han publicado que una forma soluble etiquetada con polihistidina de Apo2L/TRAIL inducía apoptosis *in vitro* en hepatocitos humanos normales aislados, pero no en no humanos (Jo et al., Nature Med., 6:564-567 (2000); véase también, Nagata, Nature Med., 6:502-503 (2000)). Se considera que determinadas preparaciones de Apo2L/TRAIL recombinante pueden variar en términos de propiedades bioquímicas y actividades biológicas en células enfermas frente a normales dependiendo, por ejemplo, de la presencia o ausencia de una molécula etiqueta, del contenido de cinc y % del contenido en trímero (véanse Lawrence et al., Nature Med., Letter to the Editor, 7:383-385 (2001); Qin et al., Nature Med., Letter to the Editor, 7:385-386 (2001)).
- 30 **[0008]** Se ha encontrado que Apo2L/TRAIL se une al menos a cinco receptores diferentes. Al menos dos de los receptores a los que se une Apo2L/TRAIL contienen un dominio de muerte citoplasmático funcional. Uno de estos receptores se ha denominado "DR4" (y alternativamente TR4 o TRAIL-R1) (Pan et al., Science, 276:111-113 (1997); véanse también los documentos WO98/32856 publicado el 30 de julio de 1998; WO99/37684 publicado el 29 de julio de 1999; WO 00/73349 publicado el 7 de diciembre de 2000, US 2003/0036168 publicado el 20 de febrero de 2003; US 6.433.147 publicado el 13 de agosto de 2002; US 6.461.823 publicado el 8 de octubre de 2002 y US 6,342,383 publicado el 29 enero de 2002).
- 40 **[0009]** Otro de estos receptores para Apo2L/TRAIL se ha denominado DR5 (también se ha denominado alternativamente Apo-2; TRAIL-R o TRAIL-R2, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 o KILLER) (véanse, por ejemplo, Sheridan et al., Science, 277: 818-821 (1997), Pan et al., Science, 277:815-818 (1997), documentos WO98/51793 publicado el 19 de noviembre de 1998 y WO 98/41629 publicado el 24 de septiembre de 1998; Screatton et al., Curr. Biol., 7:693-696 (1997); Walczak et al., EMBO J., 16:5386-5387 (1997); Wu et al., Nature Genetics, 17:141-143 (1997); documentos WO98/35986 publicado el 20 de agosto de 1998; EP870.827 publicado el 14 de octubre de 1998; WO98/46643 publicado el 22 de octubre de 1998; WO99/02653 publicado el 21 de enero de 1999; WO99/09165 publicado el 25 de febrero de 1999; WO99/11791 publicado el 11 de marzo de 1999; WO 03/042367 publicado el 22 de mayo de 2003 ; WO 02/097033 publicado el 5 de diciembre de 2002; WO 03/038043 publicado el 8 de mayo de 2003; US 2002/0072091 publicado el 13 de agosto de 2002; US 2002/0098550 publicado el 7 de diciembre de 2001; US 6.313.269 presentado el 6 de diciembre de 2001; US 2001/0010924 publicado el 2 de agosto de 2001; US 2003/0125540 publicado el 3 de julio de 2003; US 2002/0160446 publicado el 31 de octubre de 2002, US 2002/0048785 publicado el 25 de abril de 2002; US 2004/0141952 publicado el 22 de julio de 2004; US 2005/0129699 publicado el 16 de junio de 2005, US 2005/0129616 publicado el 16 de junio de 2005, US 6.342.369 presentado el febrero de 2002; US 6.569.642 presentado el 27 de mayo de 2003, US 6.072.047 presentado el 6 de junio de 2000, US 6.642.358 presentado el 4 de noviembre de 2003; US 6.743.625 presentado el 1 de junio de 2004). Al igual que DR4, se publica que DR5 contiene un dominio de muerte citoplasmático y es capaz de realizar la señalización de la apoptosis tras la unión del ligando (o tras la unión de una molécula, como un anticuerpo agonista, que mimetiza la actividad del ligando). La estructura cristalina del complejo formado entre Apo-2L/TRAIL y DR5 se describe en Hymowitz et al., Molecular Cell, 4:563-571 (1999).
- 60

[0010] Tras la unión del ligando, tanto DR4 como DR5 pueden desencadenar independientemente la apoptosis reclutando y activando el iniciador de apoptosis caspasa 8, a través de la molécula adaptadora que contiene el dominio de muerte denominado FADD/Mort1 [Kischkel et al., *Immunity*, 12:611-620 (2000); Sprick et al., *Immunity*, 12:599-609 (2000); Bodmer et al., *Nature Cell Biol.*, 2:241-243 (2000)].

[0011] Se ha publicado que Apo2L/TRAIL también se une a aquellos receptores denominados DcR1, DcR2 y OPG, que se considera funcionan como inhibidores, más que como traductores de señalización (véase, por ejemplo, DCR1 (también denominada TRID, LIT o TRAIL-R3) [Pan et al., *Science*, 276:111-113 (1997); Sheridan et al., *Science*, 277:818-821 (1997); McFarlane et al., *J. Biol. Chem.*, 272:25417-25420 (1997); Schneider et al., *FEBS Letters*, 416:329-334 (1997); Degli-Esposti et al., *J. Exp. Med.*, 186:1165-1170 (1997) y Mongkolsapaya et al., *J. Immunol.*, 160:3-6 (1998); DCR2 (también denominado TRUND o TRAIL-R4) [Marsters et al., *Curr. Biol.*, 7:1003-1006 (1997); Pan et al., *FEBS Letters*, 424:41-45 (1998); Degli-Esposti et al., *Immunity*, 7:813-820 (1997)] y OPG [Simonet et al., *supra*]. Al contrario que DR4 y DR5, los receptores DcR1 y DcR2 no señalizan la apoptosis.

[0012] Se han recogido en la literatura determinados anticuerpos que se unen a los receptores DR4 y/o DR5. Por ejemplo, anticuerpos anti-DR4 dirigidos frente al receptor DR4 y que tienen actividad agonista o apoptótica en determinadas células de mamíferos se describen, por ejemplo, en los documentos WO 99/37684 publicado el 29 de julio de 1999; WO 00/73349 publicado el 12 de julio de 2000, WO 03/066661 publicado el 14 de agosto de 2003. Véanse también Griffith et al., *J. Immunol.*, 162:2597-2605 (1999); Chuntharapai et al., *J. Immunol.*, 166:4891-4898 (2001); documentos WO 02/097033 publicado el 2 de diciembre de 2002; WO 03/042367 publicado el 22 de mayo de 2003; WO 03/038043 publicado el 8 de mayo de 2003; WO 03/037913 publicado el 8 de mayo de 2003; US 2003/0073187 publicado el 17 de abril de 2003; US 2003/0108516 publicado el 12 de junio de 2003. Igualmente se han descrito determinados anticuerpos anti-DR5, véanse por ejemplo, el documento WO 98/51793 publicado el 8 de noviembre de 1998; Griffith et al., *J. Immunol.*, 162:2597-2605 (1999); Ichikawa et al., *Nature Med.*, 7:954-960 (2001); Hylander et al., "An Antibody to DR5 (TRAIL-Receptor 2) Suppresses the Growth of Patient Derived Gastrointestinal Tumors Grown in SCID mice", resumen del 2ª International Congress on Monoclonal Antibodies in Cancers, 29 de agosto-1 de septiembre de 2002, Banff, Alberta, Canadá; documentos WO 03/038043 publicado el 8 de mayo de 2003; WO 03/037913 publicado el 8 de mayo de 2003; US 2003/0180296 publicado el 25 de septiembre de 2003. Además, se han descrito determinados anticuerpos que presentaban reactividad cruzada con ambos receptores DR4 y DR5 (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 6.252.050 presentada el 26 de junio de 2001).

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

[0013] La invención descrita en este documento proporciona procedimientos y ensayos que examinan la expresión de uno o más biomarcadores en una muestra de tejido o células de mamífero, en los que la expresión de uno o más de dichos biomarcadores es predictiva de si la muestra de tejido o de células será sensible a agentes, tales como Apo2L/TRAIL. En varias realizaciones de la invención, los procedimientos y ensayos examinan la expresión de moléculas en la familia de proteínas GalNac-T, en particular GalNac-T14 (véase Wang et al. 300, 738-744 que describe la clonación del polipéptido GalNAC).

[0014] Como se ha descrito anteriormente, la mayoría de los tipos de células humanas normales parecen resistentes a la inducción de apoptosis mediante determinadas formas recombinantes de Apo2L/TRAIL (Ashkenazi et al., *supra*; Walczak et al., *supra*). También se ha observado que algunas poblaciones de tipos celulares humanos afectados (como ciertas poblaciones de células cancerosas) son resistentes a la inducción de apoptosis por determinadas formas recombinantes de Apo2L/TRAIL (Ashkenazi et al., *J. Clin. Invest.*, 1999, *supra*; Walczak et al., *Nature Med.*, 1999, *supra*). Por tanto, examinando la expresión de biomarcadores seleccionados en una muestra de tejido o células de mamífero mediante un ensayo, puede obtenerse de forma conveniente y eficaz información útil para evaluar de forma apropiada o eficaz terapias para los pacientes en tratamiento. Por ejemplo, la información obtenida de un ensayo para detectar la expresión de GalNac-T14 en una muestra de tejido o células de mamífero puede proporcionar a los médicos datos útiles que pueden usarse para determinar un régimen terapéutico óptimo (usando Apo2L/TRAIL) para pacientes que padecen un trastorno, tal como el cáncer.

[0015] La presente invención proporciona procedimientos para predecir la sensibilidad de una muestra de tejido o de células de cáncer de mamífero a Apo2L/TRAIL, comprendiendo el procedimiento examinar la muestra de tejido o de células para detectar la expresión de GalNac-T14, en el que la expresión de dicho GalNac-T14 es predictivo de que dicha muestra de tejido o de células es sensible a la actividad inductora de apoptosis de

[0016] En ciertas realizaciones, los procedimientos comprenden obtener una muestra de tejido o de células de mamífero y examinar el tejido o las células por la expresión de GalNac-T14. Los procedimientos pueden realizarse en diversos formatos de ensayo, incluyendo ensayos de detección de ARNm y/o expresión de proteínas, ensayos de actividad enzimática y otros descritos en este documento. La determinación de la expresión de GalNac-T14 en dichos tejidos o células será predictiva de que dichos tejidos o células serán sensibles a la actividad inductora de apoptosis de Apo2L/TRAIL. En realizaciones opcionales, también puede examinarse la expresión de DR4, DR5, DcR1 o DcR2 en los tejidos o las células.

[0017] Entre otros procedimientos de la invención se incluyen procedimientos para inducir apoptosis en una muestra de tejido o de células de cáncer de mamífero que comprenden:

examinar la muestra de tejido o de células para detectar la expresión de GalNac-T14 y

posteriormente detectar la expresión de dicho GalNac-T14, exponer dicha muestra de tejido o de células a una cantidad eficaz de Apo2L/TRAIL. Las etapas de los procedimientos para examinar la expresión de GalNac-T14 pueden realizarse en diversos formatos de ensayo, como ensayos de detección de ARNm y/o expresión de

5 proteínas, ensayos de actividad enzimática y otros descritos en este documento. En realizaciones opcionales, los procedimientos también comprenden examinar la expresión de los receptores DR4, DR5, DcR1 o DcR2 en las muestras de tejidos o de células. Opcionalmente, la muestra de tejido y de células comprende tejido o células cancerosas. Opcionalmente, la muestra de tejido y de células comprende células de cáncer de pulmón no microcítico, células de cáncer pancreático, células de cáncer de mama o células de linfoma no Hodgkin.

10 **[0018]** En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de Apo2L/TRAIL en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno relacionado con el sistema inmune o cáncer en un sujeto mamífero, en el que se ha determinado que una muestra de tejido o muestra de células del sujeto expresa GalNac-T14 y la expresión de GalNac-T14 es predictiva de que dicha muestra de tejido o muestra de células es sensible a la actividad inductora de apoptosis de Apo2L/TRAIL.

15 **[0019]** En un aspecto adicional, la presente invención proporciona Apo2L/TRAIL para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer en un sujeto mamífero, en el que se ha determinado que una muestra de tejido o muestra de células del sujeto expresa GalNac-T14 y la expresión de GalNac-T14 es predictiva de que dicha muestra de tejido o muestra de células es sensible a la actividad inductora de apoptosis de Apo2L/TRAIL.

20 **[0020]** En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo o un polinucleótido para detectar la expresión de GalNac-T14 en una muestra de tejido o de células de mamífero para predecir la sensibilidad de una muestra de tejido o de células de mamífero a Apo2L/TRAIL, en el que la expresión de dicha GalNac-T14 es predictiva de que dicha muestra de tejido o de células es sensible a la actividad inductora de apoptosis de Apo2L/TRAIL.

25 **[0021]** En la realización de estos usos médicos, el examen de la expresión de uno o más biomarcadores puede realizarse en diversos formatos de ensayo, como ensayos de detección de ARNm y/o expresión de proteínas, ensayos de actividad enzimática y otros descritos en este documento. En realizaciones opcionales, los procedimientos también comprenden examinar la expresión de los receptores DR4, DR5, DcR1 o DcR2 en la muestra de tejido o de células. Opcionalmente, los procedimientos comprenden tratar el cáncer en un mamífero.

30 **[0022]** Opcionalmente, los procedimientos comprenden, además de la administración de una cantidad eficaz de Apo2L/TRAIL, la administración de un agente o agentes quimioterapéuticos o radioterapia a dicho mamífero.

[0023] En realizaciones adicionales de la invención, los procedimientos mencionados anteriormente pueden comprender examinar la expresión en el tejido o en las células de mamífero de otras moléculas de GalNac-T, como GalNac-T3.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 **[0024]**

En la figura 1 se muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc del ligando Apo-2 humano (SEC ID N ° 2) y su secuencia de aminoácidos derivada (SEC ID N ° 1). La letra "N" en la posición del nucleótido 447 se usa para indicar que la base del nucleótido puede ser una "T" o una "G".

40 En las figuras 2A y 2B se muestran la secuencia de nucleótidos de un ADNc (SEC ID N ° 4 y 30, respectivamente, por orden de aparición) para el receptor de longitud completa de DR4 humano y su secuencia de aminoácidos derivada (SEC ID N ° 3). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos respectivas para el receptor DR4 humano también se recogen en Pan et al., Science, 276:111 (1997).

45 En la figura 3A se muestra la secuencia de 411 aminoácidos del receptor DR5 humano (SEC ID N ° 5) como aparece publicada en el documento WO 98/51793 de 19 de noviembre de 1998. En la técnica se conoce una variante de ajuste transcripcional del receptor DR5 humano. Esta variante de ajuste del receptor DR5 codifica la secuencia de 440 aminoácidos (SEC ID N ° 6) del receptor DR5 humano mostrado en las figuras 3B y 3C como se publica en el documento WO 98/35986 de 20 de agosto de 1998.

50 En las figuras 3D-1 a 3D-3 se muestran las secuencias de nucleótidos del ADNc (SEC ID N ° 7 y 31, respectivamente por orden de aparición) para el receptor DcR1 humano de longitud completa y las secuencias de aminoácidos derivadas de dos sitios de inicio de la traducción diferentes en la molécula de ADNc del DcR1 (duplicada) mostrada en las figuras 3D-1 a 3D-3 (SEC ID N ° 8 y 32, respectivamente por orden de aparición). También se muestran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos respectivas para el receptor DcR1 humano (y dominios particulares del mismo) que se describen en el documento WO 98/58062.

En la figura 3E se muestran las secuencias de nucleótidos de un ADNc (SEC ID N ° 9) para el receptor DcR2 humano de longitud completa y su secuencia de aminoácidos derivada (SEC ID N ° 10). También se muestran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos respectivas para el receptor DcR2 humano (y dominios particulares del mismo) que se describen en el documento WO 99/10484.

- 5 En la figura 4A se muestra la secuencia de nucleótidos de GalNac-T14 humano (SEC ID N ° 11) y su secuencia de aminoácidos derivada (SEC ID N ° 12). Estas secuencias también se describen en Wang et al., BBRC, 300:738-744 (2003).

- 10 En la figura 4B se muestra la secuencia de nucleótidos de GalNac-T3 humano (SEC ID N ° 13) y su secuencia de aminoácidos derivada (SEC ID N ° 14). Estas secuencias también se describen en Bennett et al., J. Biol. Chem., 271:17006-17012 (1996).

- 15 En la figura 5 se proporciona una gráfica resumen de IC50 de los datos obtenidos en el análisis de sensibilidad o resistencia de líneas celulares de cáncer de pulmón no microcítico ("NSCLC") a la actividad apoptótica de Apo2L (+ suero bovino fetal "SBF" al 0,5% o SBF al 10%) o del anticuerpo monoclonal frente a DR5 "Ac DR5", "XL" entrecruzado o sin entrecruzar, + suero bovino fetal "SBF" al 0,5% o SBF al 10%) determinado en un ensayo de citotoxicidad MTT.

En la figura 6 se proporciona una gráfica resumen de IC50 de los datos obtenidos en el análisis de sensibilidad o resistencia de líneas celulares de cáncer pancreático a la actividad apoptótica de Apo2L (+ suero bovino fetal "SBF" al 0,5% o SBF al 10%) o del anticuerpo monoclonal frente a DR5 "Ac DR5", "XL" entrecruzado o sin entrecruzar, + suero bovino fetal "SBF" al 0,5% o SBF al 10%) determinado en un ensayo de citotoxicidad MTT.

- 20 En la figura 7 se proporciona una gráfica resumen de IC50 de los datos obtenidos en el análisis de sensibilidad o resistencia de líneas celulares de cáncer linfoma no Hodgkin ("LNH") a la actividad apoptótica de Apo2L (+ suero bovino fetal "SBF" al 10%) o del anticuerpo monoclonal frente a DR5 "Ac DR5", "XL" entrecruzado o sin entrecruzar, + suero bovino fetal "SBF" al 10%) determinado en un ensayo de citotoxicidad MTT.

- 25 En la figura 8 se proporciona una comparación de sensibilidad ("sen") o resistencia ("RES") de líneas células de cáncer NSCLC, pancreático y LNH frente al anticuerpo frente a DR5 y la correlación con la expresión de GalNac-T14, según se determina mediante la expresión del ARNm de GalNac-T14.

En la figura 9 se proporciona un diagrama de barras de diversas líneas celulares de NSCLC, pancreáticas y de LNH ordenadas (en orden descendiente) por niveles de patrones de expresión del ARNm de GalNac-T14.

- 30 En las figuras 10A-D se muestra la expresión diferencial de enzimas de O-glucosilación específicas en líneas celulares cancerosas sensibles y resistentes a Apo2L/TRAIL. (A) La viabilidad celular se determinó tras la incubación con dosis variables de Apo2L/TRAIL. La IC50 para cada línea celular se calculó como la concentración de Apo2L/TRAIL que proporciona el 50% de la pérdida de viabilidad. Cada experimento de viabilidad celular se repitió al menos tres veces en presencia de baja (0,5%) y alta (10%) concentración de suero bovino fetal. Los símbolos de color negro, gris o en blanco muestran las líneas celulares que son muy sensibles, moderadamente sensibles o resistentes a Apo2L/TRAIL, respectivamente. (B) Niveles de expresión del ARNm de ppGalNacT-14 (grupo de sondas 219271_at) en líneas celulares pancreáticas y de melanoma maligno. Las líneas celulares se ordenan por tipo de tejido y sensibilidad a Apo2L/TRAIL. Las barras de color negro, gris o en blanco muestran las líneas celulares como en A. (C) Niveles de expresión del ARNm de Fut-6 (panel superior, grupo de sondas 211885_x_at) y ppGalNacT-3 (panel inferior, grupo de sondas 203397_s_at) en líneas celulares de cáncer colorrectal. Las líneas celulares se dispusieron como en B. Los valores de P en los paneles B y C se basan en una prueba de Fisher de la correlación entre la sensibilidad de la línea celular (incluyendo alto y moderado) y la expresión del ARNm por encima del punto de corte. (D) Efecto de Apo2L/TRAIL sobre el crecimiento de xenoinjertos de tumores establecidos. Ratones desnudos atímicos portadores de tumores GalNacT-3/fut-6-positivos (panel izquierdo) o GalNacT-3/fut-6-negativos (panel derecho) recibieron vehículo o Apo2L/TRAIL (60 mg/kg/día i.p. los días 0-4) y se controló el volumen del tumor (media $\pm$ DT, N=10 ratones/grupo).

- 55 En la figura 11 se muestra que la modulación de enzimas de O-glucosilación en particular altera la sensibilidad a Apo2L/TRAIL. (A) Células Colo205 se incubaron previamente con el inhibidor de la enzima pan de O-glucosilación bencil-GalNac (b-GalANc), se trataron con Apo2L/TRAIL durante 24 h y se determinó la viabilidad celular (DMSO=control del vehículo). (B) Células PSN-1 (carcinoma pancreático) y Hs294T (melanoma) fueron transfectadas con ARNic de caspasa-8 o ppGalNacT-14 durante 48 h, se incubaron con Apo2L/TRAIL durante otras 24 h y se determinó la viabilidad celular. Se usaron como control (NTC) ARNic dobles frente a una secuencia no diana (Dharmacon). (C) Células de carcinoma colorrectal DLD-1 se transfectaron con ppGalNacT-3 o Fut-6 mediante ARNic y se ensayaron como en B. (D) Células HEK293 se transfectaron conjuntamente con plásmidos que codificaban los genes indicados en combinación con ppGalNacT o control vector. La apoptosis se determinó a las 24 h mediante tinción con anexina V (panel izquierdo). Las células de melanoma H1569 se transdujeron con retrovirus que dirigían la expresión de ppGalNacT-24 o retrovirus control, los conjuntos de líneas celulares resultantes se trataron con Apo2L/TRAIL durante 24 h y se determinó la viabilidad celular (panel derecho). Se usaron análisis de

inmunotransferencia usando anticuerpos anti-FLAG para verificar la expresión de ppGalNacT-14 etiquetado con epítope.

En la figura 12 se muestra (A) el análisis de la cascada de caspasas inducida por Apo2L/TRAIL. Células PSN-1 y DLD-1 se transfectaron con ARNic frente a ppGalNacT-14 o Fut-6, respectivamente, durante 48 h. Las células se trataron con Apo2L/TRAIL durante 4 u 8 h y los lisados celulares se analizaron mediante inmunotransferencia con anticuerpos específicos para la caspasa-8, Bid, caspasa-9, caspasa-3 o actina como control de carga. (B) Células PSN-1 se transfectaron con ARNic de ppGalNacT-14 como en A, se trataron con Apo2L/TRAIL durante 4 h y se determinó la actividad enzimática de la caspasa 3/7 en los lisados celulares. (C) Análisis de DISC de Apo2L/TRAIL. Se transfectaron células PSN-1 con ARNic de ppGalNacT-14 como en A. Se añadió FLAG-Apo2L/TRAIL (1 mg/ml) durante 0-60 min; las células se lisaron y sometieron a inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-FLAG. Se detectaron FADD asociado a DISC, caspasa-8 y DR4 mediante inmunotransferencia. (D) Células PSN-1 se transfectaron, trataron y sometieron a inmunoprecipitación de DISC como en C, y se determinó la actividad enzimática asociada a DISC de la caspasa 8 como se describió previamente (Sharp et al., J. Biol. Chem., 280:19401 (2005).

En la figura 13 se muestra (A) análisis de monosacáridos del DR5 humano recombinante (variedad de ajuste larga) producido en células CHO, realizado mediante HPAEC-PAD (cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica de pulsos). (B) Comparación de secuencias de los receptores de Apo2L/TRAIL humanos (SEC ID N ° 22, 33, 23, 34, 24, 35, 25, 36, 26, 37, 27 y 38-44, respectivamente por orden de aparición) (forma larga del DR5 humano de 440 aa "hDR5L", forma corta del DR5 humano de 411 aa "hDR5S" y hDR4), DR5 murino (mDR5), Fas humano (hFas) y TNFR1 humano (hTNFR1). Los recuadros indican posible sitios de O-glucosilación. (C) Análisis por inmunotransferencia de lisados celulares totales correspondientes a D. DR5L-5T y DR5S-5T son construcciones que contienen 5 sustituciones de treonina por alanina y DR5L-5T3S y DR5S-5T3S son construcciones que contienen 5 sustituciones de treonina por alanina y tres de serina por alanina, respectivamente, en restos que son posibles sitios de O-glucosilación. (D) Células HEK293 se cotransfectaron con las construcciones DR5 indicadas junto con el vector o el plásmido ppGalNacT-14 durante 48 h y se midió la apoptosis mediante tinción con anexina V. (E) Niveles de expresión de ARNm para ppGalNacT-14 (chip Affymetrix, conjunto de sondas 219271_at) en muestras de tumores humanos primarios de cánceres de piel (SCC=carcinoma espinocelular), pulmón, páncreas (Panc), mama, ovario (Ov), endometrio (Endo), vejiga (Bla, TCC=carcinoma celular de transición) y LNH (FL=linfoma folicular, DLBCL=linfoma difuso de células B grandes). La mediana de la expresión de las muestras se indica mediante una barra horizontal de color gris para cada clase. Se muestra un nivel de corte de 500 y 200 (melanoma) que se corresponde con los datos de la línea celular de la figura 10B.

En la figura 14 se muestra (A) reducción de la expresión de ARNm de ppGalNacT-14 o ppGalNacT-3 en células PSN-1 o DLD-1 después del silenciamiento durante 48 h del ARNic mediante análisis de Taqman. (B) La expresión de GalNacT-14 se reconstituye en células PSN-1 mediante transfección del plásmido vacío (Vacío), GalNacT-14 de tipo silvestre (GalNacT-14) o GalNacT-14 que contienen mutaciones silentes de ARNic (GalNacT-14 si(1)Mut (SEC ID N ° 28)) posterior a siGalNacT-14 (1) (SEC ID N ° 29) silenciamiento mediada de ppGalNacT-14. (C) La regulación por disminución de ppGalNacT-3 o Fut-6 mediante ARN de interferencia inhibe la muerte celular inducida por Apo2L/TRAIL en células C170 (cáncer colorrectal). Los procedimientos experimentales son como los de 11C. (Tabla 1) A) Tabla resumen de fenotipos silenciados por ARNic. Las líneas celulares, en las que la regulación por disminución de GalNacT-14 o ppGalNacT-3 y Fut-6 daba lugar a la protección frente a Apo2L/TRAIL, están marcadas indicando una protección menor (+) o mayor del 50% (++) con al menos un oligonucleótido ARNic probado; (0) indica la ausencia de protección frente a Apo2L/TRAIL. (D),(E) Después de un silenciamiento de 48 h con los ARNic indicados, las células fueron tratadas con dosis crecientes de etopósido o estaurosporina (STS) durante 24 h y se sometieron a un ensayo de viabilidad celular. (F) Mezclas de las líneas celulares PA-TU-8902 y PL-45 que sobreexpresaban ppGalNacT-14 retroviral se sometieron a ensayos de viabilidad celular después del tratamiento con Apo2L/TRAIL. El análisis por inmunotransferencia usando anticuerpos anti-FLAG indica la expresión retroviral de ppGalNacT-14 en estas células.

Figura 15 (A) análisis por inmunotransferencia de la cascada de activación de caspasas inducida por Apo2L/TRAIL en Colo205 sensible a Apo2L/TRAIL y en las líneas celulares de cáncer colorrectal resistentes RKO y SW 1417. Las células se trataron con 1.000 ng/ml de Apo2L/TRAIL durante 8 y 24 horas y los lisados celulares totales se sometieron a análisis por inmunotransferencia usando anticuerpos específicos para caspasa-8, Bid, caspasa-9, caspasa-3 y actina como control de carga. (B) El silenciamiento de Fut-6 reducía el reclutamiento y activación de la caspasa-8 en el DISC DE Apo2L/TRAIL en células DLD-1. Procedimiento experimental según 12D. (C) La expresión en la superficie celular de DR4 y DR5 se determinó mediante análisis por FACS en células que se sometieron a un silenciamiento de ARNic con los genes indicados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0025] Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados en este documento generalmente son bien entendidos y normalmente se emplean usando metodología convencional por los expertos en la materia, como por ejemplo, la metodología de clonación molecular ampliamente utilizada descrita en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Si es pertinente, los procedimientos que conllevan el uso de kits y reactivos disponibles en el mercado se realizan

generalmente según los protocolos y/o parámetros definidos por el fabricante siempre que no se especifique otra cosa.

[0026] Antes de describir los procedimientos y ensayos actuales, se debe entender que esta invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, especies o géneros de animales, construcciones y reactivos en particular descritos ya que, por supuesto, pueden variar. También se comprenderá que la terminología usada en este documento sólo tiene la intención de describir realizaciones en particular y no pretende limitar el alcance de la presente invención que sólo estará limitada por las reivindicaciones adjuntas.

[0027] Debería apreciarse que, según se usa en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "a", "y" y "el" incluyen los referentes plurales siempre que el contexto no dicte lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a "una alteración genética" incluye una diversidad de estas alteraciones y la referencia a "una sonda" incluye la referencia a una o más sondas y equivalentes a las mismas conocidas por los expertos en la materia y así sucesivamente.

I DEFINICIONES

[0028] Los términos "Apo2L/TRAIL", "Apo-2L" y "TRAIL" se usan en este documento para referirse a una secuencia polipeptídica que incluye los restos de aminoácidos 114-281 inclusive, los restos 95-281 inclusive, los restos 92-281 inclusive, los restos 91-281, inclusive, los restos 41-281 inclusive, los restos 15-281, inclusive o los restos 1-281 inclusive, de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 1, así como fragmentos biológicamente activos, o variantes de delección, inserción o sustitución de las secuencias anteriores. En una realización, la secuencia polipeptídica comprende los restos 114-281 de la figura 1 y, opcionalmente, consta de los restos 114-281 de la figura 1. Opcionalmente, la secuencia polipeptídica comprende los restos 92-281 o los restos 91-281 de la figura 1. Los polipéptidos Apo-2L pueden estar codificados por la secuencia de nucleótidos nativa mostrada en la figura 1. Opcionalmente, el codón que codifica el resto Pro119 (figura 1) puede ser "CCT" o "CCG". En otras realizaciones, los fragmentos o variantes son biológicamente activos y tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 80%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 90% e, incluso más preferiblemente, una identidad de secuencia de al menos el 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente de Apo2L/TRAIL. Opcionalmente, el polipéptido Apo2L/TRAIL está codificado por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia polinucleotídica codificadora proporcionada en la figura 1. La definición abarca las variantes de sustitución de Apo2L/TRAIL en las que al menos uno de sus aminoácidos nativos está sustituido por un resto de alanina. Entre las variantes de sustitución de Apo2L/TRAIL en particular se incluyen aquellas en las que se sustituye al menos un aminoácido por un resto de alanina. Entre estas variantes de sustitución se incluyen las identificadas, por ejemplo, como "D203A", "D218A" y "D269A". Esta nomenclatura se usa para identificar las variantes de Apo2L/TRAIL en las que los restos de ácido aspártico de las posiciones 203, 218 y/o 269 (según la numeración mostrada en la figura 1) se han sustituido por restos de alanina. Opcionalmente, las variantes de Apo2L pueden comprender una o más de las sustituciones de alanina que se muestran en la tabla 1 de la solicitud PCT publicada WO 01/00832. Entre las variantes de sustitución se incluyen una o más de las sustituciones de restos identificadas en la tabla 1 del documento WO 01/00832 publicado el 4 de enero de 2001. La definición también abarca una secuencia nativa de Apo2L/TRAIL aislada de una fuente de Apo2L/TRAIL o preparada mediante procedimientos recombinantes o sintéticos. El Apo2L/TRAIL de la invención incluye los polipéptidos referidos como Apo2L/TRAIL o TRAIL descritos en las publicaciones PCT N ° WO97/01633 y WO97/25428. Los términos "Apo2L/TRAIL" o "Apo2L" se usan para referirse generalmente a formas del Apo2L/TRAIL que incluyen formas monoméricas, diméricas o triméricas del polipéptido. Todas las numeraciones de los restos de aminoácidos hacen referencia a la secuencia de Apo2L usada en la numeración según la figura 1, siempre que específicamente no se establezca otra cosa. Por ejemplo, "D203" o "Asp203" se refiere al resto de ácido aspártico en la posición 203 de la secuencia proporcionada en la figura 1.

[0029] El término "dominio extracelular de Apo2L/TRAIL" o "DEC de Apo2L/TRAIL" se refiere a una forma de Apo2L/TRAIL que está esencialmente libre de dominios transmembrana y citoplasmático. Generalmente, el DEC tendrá menos del 1% de estos dominios transmembrana y citoplasmático y, preferiblemente, tendrá menos del 0,5% de dichos dominios. Se entenderá que cualquier dominio transmembrana identificado de los polipéptidos de la presente invención es identificado según criterios empleados de forma rutinaria en la materia para identificar este tipo de dominio hidrófobo. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar, aunque lo más probable es que no lo haga en más de aproximadamente 5 aminoácidos en uno de los extremos del dominio inicialmente identificado. En realizaciones preferidas, el DEC constará de una secuencia soluble del dominio extracelular del polipéptido que no contiene los dominios transmembrana y citoplasmática o intracelular (y no esté unida a la membrana). Secuencias del dominio extracelular en particular de Apo-2L/TRAIL se describen en las publicaciones PCT N ° WO97/01633 y WO97/25428.

[0030] El término "monómero de Apo2L/TRAIL" o "monómero de Apo2L" se refiere a una cadena covalente de una secuencia del dominio extracelular de Apo2L.

[0031] El término "dímero de Apo2L/TRAIL" o "dímero de Apo2L" se refiere a dos monómeros de Apo2L unidos mediante un enlace covalente a través de un enlace disulfuro. El término, según se usa en este documento, incluye dímeros de Apo2L que se mantienen libres y dímeros de Apo2L que están en formas triméricas de Apo2L (es decir, asociados con un tercer monómero de Apo2L).

5 **[0032]** El término "trímero de Apo2L/TRAIL" o "trímero de Apo2L" se refiere a tres monómeros de Apo2L que están asociados no covalentemente.

10 **[0033]** El término "agregado de Apo2L/TRAIL" se usa para referirse a formas oligoméricas mayores autoasociadas de Apo2L/TRAIL, como trímeros de Apo2L/TRAIL que forman, por ejemplo, formas hexaméricas y nanoméricas de Apo2L/TRAIL. La determinación de la presencia y cantidad de monómeros, dímeros o trímeros de Apo2L/TRAIL (u otros agregados) puede hacerse usando procedimientos y ensayos conocidos en la técnica (y usando materiales disponibles en el mercado), como HPLC de exclusión de tamaño nativo ("SEC"), exclusión de tamaño desnaturalizante usando dodecil sulfato sódico ("SDS-SEC"), HPLC en fase inversa y electroforesis capilar.

15 **[0034]** "Receptor del ligando Apo2" incluye a los receptores denominados en la técnica como "DR4" y "DR5" cuyas secuencias polinucleotídica y polipeptídica se muestran, respectivamente, en las figuras 2 y 3. Pan et al., han descrito el miembro de la familia del receptor de TNF denominado "DR4" (Pan et al., Science, 276:111-113 (1997); véase también los documentos WO98/32856 publicado el 30 de julio de 1998; WO 99/37684 publicado el 29 de julio de 1999; WO 00/73349 publicado el 7 de diciembre de 2000; las patentes de EE. UU. 6.433.147 presentada el 13 de agosto de 2002, 6.461.823 presentada el 8 de octubre de 2002 y 6.342.383 presentada el 29 de enero de 2002). Sheridan et al., Science, 277:818-821 (1997) y Pan et al., Science, 277:815-818 (1997) describieron otro receptor para Apo2L/TRAIL (véanse también los documentos WO98/51793 publicado el 19 de noviembre de 1998 y WO98/4162 publicado el 24 de septiembre de 1998). Este receptor se denomina DR5 (el receptor también se denomina alternativamente Apo-2, TRAIL-R, TR6, Tanto-63, hAP08, TRICK2 o KILLER; Screaton et al., Curr. Biol., 7:693-696 (1997), Walczak et al., EMBO J., 16:5386-5387 (1997), Wu et al., Nature Genetics, 17:141-143 (1997), documentos WO98/3596 publicado el 20 de agosto de 1998; EP870.827 publicado el 14 de octubre de 1998; WO98/46643 publicado el 22 de octubre 1998; WO99/02653 publicado el 21 de enero de 1999; WO99/09165 publicado el 25 de febrero de 1999; WO99/1179 publicado el 11 de marzo de 1999; patentes de EE. UU. 2002/0072091 publicada el 13 de agosto de 2002; 2002/0098550 publicada el 7 de diciembre de 2001; 6.313.269 presentada el 6 de diciembre de 2001; 2001/0010924 publicada el 2 de agosto de 2001; 2003/01255540 publicada el 3 de julio de 2003; 2002/0160446 publicada el 31 de octubre de 2002, 2002/0048785 publicada el 25 de abril de 2002; 6.569.642 presentada el 27 de mayo de 2003, 6.072.047 presentada el 6 de junio de 2000, 6.642.358 presentada el 4 de noviembre de 2003). Como se describió anteriormente, entre otros receptores para Apo-2L se incluyen DcR1, DcR2 y OPG (véanse, Sheridan y col, *supra*, Marsters et al., *supra* y Simonet et al., *supra*). El término "receptor Apo-2L" cuando se usa en este documento abarca al receptor de secuencia nativa y las variantes del receptor. Estos términos abarcan al receptor Apo-2L expresado en diversos mamíferos, incluso en humanos. El receptor de Apo-2L puede expresarse de forma endógena como sucede naturalmente en diversos estirpes de tejidos humanos o puede expresarse mediante procedimientos recombinantes o sintéticos. Un "receptor de Apo-2L de secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un receptor de Apo-2L derivado de la naturaleza. Por tanto, un receptor de Apo-2L de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos del receptor de Apo-2L natural de cualquier mamífero. Este receptor de Apo-2L de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse por medio de recombinación o síntesis. El término "receptor de Apo-2L de secuencia nativa" abarca específicamente las formas del receptor naturales truncadas o secretadas (por ejemplo, una forma soluble que contiene, por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas de ajuste alternativo) y variantes alélicas naturales. Las variantes del receptor pueden incluir fragmentos o mutantes de delección del receptor de Apo-2L de secuencia nativa. En la figura 3A se muestra la secuencia de 411 aminoácidos del DR5 humano como se publicó en el documento WO 98/51793 de 19 de noviembre de 1998. En la técnica se conoce una variante de ajuste transcripcional del receptor DR5 humano. Esta variante de ajuste DR5 codifica la secuencia de 440 aminoácidos del receptor DR5 humano mostrado en las figuras 3B y 3C como se publicó en el documento WO 98/35986 de 20 de agosto de 1998.

50 **[0035]** "Anticuerpo frente a un receptor de muerte" se usa en este documento para referirse en general a un anticuerpo o anticuerpos dirigidos frente a un receptor de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral que contiene un dominio de muerte capaz de señalar la apoptosis y, entre estos anticuerpos, se incluyen anticuerpos frente a DR5 y anticuerpos frente a DR4.

55 **[0036]** "Anticuerpo frente al receptor DR5", "anticuerpo frente a DR5" o "anticuerpo anti-DR5" se usan en un sentido amplio para referirse a anticuerpos que se unen al menos a una forma de un receptor DR5, como la secuencia 1-411 mostrada en las figuras 3A o la secuencia 1-440 mostrada en las figuras 3B-3C, o a un dominio extracelular del mismo. Opcionalmente, el anticuerpo frente a DR5 se fusiona o une a una secuencia o molécula heteróloga. Preferiblemente, la secuencia heteróloga permite o ayuda al anticuerpo a formar complejos de orden superior u oligoméricos. Opcionalmente, el anticuerpo frente a DR5 se une al receptor DR5 pero no se une ni reacciona de forma cruzada con ningún otro receptor de Apo-2L (por ejemplo DR4, DcR1 o DcR2). Opcionalmente el anticuerpo es un agonista de la actividad de señalización de DR5.

[0037] Opcionalmente, el anticuerpo frente a DR5 de la invención se une a un receptor DR5 a un intervalo de concentraciones de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 20 mM según se determina en un ensayo de unión BIAcore. Opcionalmente, los anticuerpos frente a DR5 de la invención muestran un valor de IC₅₀ de aproximadamente 0,6 nM a aproximadamente 18 mM según se determina en el ensayo de unión BIAcore.

[0038] "Anticuerpo frente al receptor DR4", "anticuerpo frente a DR4" o "anticuerpo anti-DR4" se usan en un sentido amplio para referirse a anticuerpos que se unen al menos a una forma del receptor DR4 o a un dominio extracelular del mismo. Opcionalmente, el anticuerpo frente a DR4 se fusiona o une a una secuencia o molécula heteróloga. Preferiblemente, la secuencia heteróloga permite o ayuda al anticuerpo a formar complejos de orden superior u oligoméricos. Opcionalmente, el anticuerpo frente a DR4 se une al receptor DR4 pero no se une ni reacciona de forma cruzada con ningún otro receptor de Apo-2L (por ejemplo DR5, DcR1 o DcR2). Opcionalmente el anticuerpo es un agonista de la actividad de señalización de DR4.

[0039] Opcionalmente, el anticuerpo frente a DR4 de la invención se une al receptor DR4 a un intervalo de concentraciones de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 20 mM según se determina en un ensayo de unión BIAcore. Opcionalmente, los anticuerpos frente a DR4 de la invención muestran un valor de IC₅₀ de aproximadamente 0,6 nM a aproximadamente 18 mM según se determina en el ensayo de unión BIAcore.

[0040] El término "agonista" se usa en el sentido más amplio e incluye a cualquier molécula que de forma parcial, o completa, potencia, estimula o activa una o más actividades biológicas de Apo2L/TRAIL, DR4 o DR5, *in vitro*, *in situ* o *in vivo*. Entre los ejemplos de estas actividades biológicas de unión de Apo2L/TRAIL a DR4 o DR5, se incluyen la apoptosis así como las recogidas en la bibliografía. Un agonista puede funcionar de forma directa o indirecta. Por ejemplo, el agonista puede funcionar potenciando, estimulando o activando parcial o totalmente una o más actividades biológicas de DR4 o DR5, *in vitro*, *in situ* o *in vivo* como resultado de su unión directa a DR4 o DR5, lo que causa la activación o transducción de señales. El agonista también puede funcionar indirectamente potenciando, estimulando o activando parcial o totalmente una o más actividades biológicas de DR4 o DR5, *in vitro*, *in situ* o *in vivo* como resultado de, por ejemplo, estimular otra molécula efectora que causa, de este modo, la activación o transducción de señales de DR4 o DR5. Se contempla que un agonista pueda actuar como molécula potenciadora que funciona indirectamente potenciando o aumentando la activación o actividad de DR4 o DR5. Por ejemplo, el agonista puede potenciar la actividad de Apo-2L endógena en un mamífero. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la formación previa de complejos DR4 o DR5, o estabilizando los complejos del ligando respectivo con el receptor DR4 o DR5 (como la estabilización de un complejo nativo formado entre Apo-2L y DR4 o DR5).

[0041] El término "biomarcador" según se usa en la presente solicitud se refiere generalmente a una molécula, como un gen, proteína, estructura de hidratos de carbono o glucolípido, cuya expresión en un tejido o célula de mamífero puede detectarse mediante procedimientos convencionales (o procedimientos descritos en este documento) y es predictivo de la sensibilidad de las células o tejidos de mamíferos a Apo2L/TRAIL o al anticuerpo frente al receptor de muerte. Entre los biomarcadores contemplados por la presente invención se incluyen, pero sin limitaciones, moléculas de la familia de proteínas de GalNac-T. Se han descrito los miembros de la familia de genes y proteínas de la N-acetilgalactosamiltransferasa ("GalNac-T") humana (véanse, por ejemplo, Hang et al., "The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation initiated by the polypeptide N-acetyl-galactosaminyltransferases", Bioorganic & Medicinal Chemistry (disponible en mayo de 2005 en www.sciencedirect.com) y las referencias citadas en este; Wang et al., BBRC, 300:738-744 (2003) y las referencias citadas en este) y se piensa que su función es determinar el número y posición de cadenas de azúcares a través de enlaces O. Opcionalmente, se determina que la expresión de este biomarcador es mayor que la observada en una muestra de tejido o de células control. Opcionalmente, por ejemplo, la expresión de este biomarcador se determina usando una micromatriz de expresión génica, PCR cuantitativa o ensayo de inmunohistoquímica (IHC). Opcionalmente, la expresión de un biomarcador GalNac-T, como GalNac-T14 o GalNac-T3, se detectará a un nivel de al menos 750, según se determina mediante el análisis de micromatrices U133P de Affymetrix, o 500 veces, o preferiblemente al menos 1.000 veces superior, en la muestra de prueba de tejido o de células que el que puede observarse para una muestra de prueba de tejido o de células cuando se detecta la expresión del biomarcador usando PCR cuantitativa.

[0042] "UDP-N-acetil-D-galactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa-T14", "pp-GalNac-T14", "GalNac-T14" y "GALNT14" se usan en este documento para referirse a una proteína de membrana de tipo II que tiene características que recuerdan a la familia de moléculas de GalNac-T, comprendiendo un dominio citoplasmático N-terminal, dominio transmembrana, región tallo y dominio catalítico. En una realización opcional, la molécula de GalNac-T14 humana contiene 1.659 pares de bases que codifican una proteína de 552 aminoácidos, como se muestra en la figura 4A. El ADNc humano de longitud completa ha sido depositado en GenBank con N° de acceso AB078144. Como se describe en Wang et al., BBRC, 300:738-744 (2003), se han identificado isoformas de ajuste de GalNac-T14 que incluyen (o no) exones especiales, como los axones 2, 3 y/o 4. La presente invención contempla la exploración de la expresión de cualquiera de estas diversas isoformas de GalNac-T14 y que la expresión de una cualquiera de estas isoformas es predictiva de la sensibilidad de la muestra de tejido o de células a Apo2L/TRAIL o al anticuerpo frente al receptor de muerte.

[0043] "UDP-N-acetil-D-galactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa-T3", "pp-GalNac-T3", "GalNac-T3" y "GALNT3" se usan en este documento para referirse a una proteína de membrana de tipo II que

tienen características que recuerdan a la familia de moléculas de GalNac-T, comprendiendo un dominio citoplasmático N-terminal, dominio transmembrana, región tallo y dominio catalítico. En una realización opcional, el polipéptido GalNac-T3 humano comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 4B. GalNac-T3 también se describe en Bennett et al., J. Biol. Chem., 271:17006-17012 (1996).

5 **[0044]** Por “sujeto” o “paciente” se entiende cualquier sujeto individual para el que se desea tratamiento, incluyendo a humanos. También pretende incluirse como sujeto a cualquier sujeto incluido en ensayos clínicos de investigación que no muestre ningún signo clínico de enfermedad, sujetos implicados en estudios epidemiológicos o aquellos utilizados como controles.

10 **[0045]** El término “mamífero” como se usa en este documento se refiere a cualquier mamífero clasificado como mamífero, incluyendo humanos, vacas, caballos, perros y gatos. En una realización preferida de la invención, el mamífero es un humano.

15 **[0046]** Por “muestra de tejido o de células” se entiende una colección de células similares obtenidas de un tejido de un sujeto o paciente. La fuente de la muestra de tejido o de células puede ser un tejido sólido procedente de una muestra de órgano o tejido fresco, congelado y/o conservado, o de biopsia o aspirado; sangre o cualquier constituyente de la sangre; fluidos corporales como líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido intersticial; células de cualquier momento de la gestación o desarrollo del sujeto. La muestra del tejido también puede ser de células primarios o cultivadas, o de líneas celulares. Opcionalmente, la muestra de tejido o de células se obtiene de un tumor primario o metastásico. La muestra de tejido puede contener compuestos que no están entremezclados de forma natural con el tejido en la naturaleza como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares.

20 **[0047]** Para los objetivos de este documento, un “corte” de una muestra de tejido significa una única parte o pieza de una muestra de tejido, por ejemplo, un corte fino de tejido o de células cortadas a partir de una muestra de tejido. Se entiende que pueden hacerse múltiples cortes de las muestras de tejido y someterlas a análisis según la presente invención, a condición de que se entienda que la presente invención comprende un procedimiento por el cual se analiza el mismo corte de la muestra de tejido tanto a niveles morfológico como molecular, o se analiza con respecto tanto a proteínas como a ácidos nucleicos.

25 **[0048]** Por “correlacionado” o “que se correlaciona” se entiende comparar, de cualquier forma, la realización y/o los resultados de un primer análisis o protocolo con la realización y/o resultados de un segundo análisis o protocolo. Por ejemplo, pueden usarse los resultados de un primer análisis o protocolo para realizar un segundo protocolo y/o pueden usarse los resultados de un primer análisis o protocolo para determinar si debería realizarse un segundo análisis o protocolo. Con respecto a las diversas realizaciones de este documento, pueden usarse los resultados de un ensayo analítico como la expresión de ARNm o IHC para determinar si debería llevarse a cabo una pauta terapéutica específica usando Apo2L/TRAIL o un anticuerpo frente a un receptor de muerte.

30 **[0049]** Por “ácido nucleico” se entiende que se incluyen cualquier ADN o ARN. Por ejemplo, ácido nucleico cromosómico, mitocondrial, vírico y/o bacteriano presente en la muestra de tejido. El término “ácido nucleico” abarca a una o ambas cadenas de una molécula de ácido nucleico de cadena doble e incluye cualquier fragmento o porción de una molécula de ácido nucleico intacta.

35 **[0050]** Por “gen” se entiende cualquier secuencia de ácido nucleico o porción de la misma con el papel funcional de codificar o transcribir una proteína o regular la expresión de otro gen. El gen puede constar de todos los ácidos nucleicos responsables de codificar una proteína funcional o sólo una porción de los ácidos nucleicos responsables de codificar o expresar una proteína. La secuencia de ácido nucleico puede contener una anomalía genética dentro de los exones, intrones, regiones de iniciación o terminación, secuencias promotoras, otras secuencias reguladoras o regiones adyacentes al gen exclusivas.

40 **[0051]** La palabra “marcador” cuando se usa en este documento se refiere a un compuesto o composición que esta conjugada o fusionada directa o indirectamente a un reactivo como una sonda de ácido nucleico o un anticuerpo y facilita la detección del reactivo al que está conjugado o fusionado. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores isótopos radiactivos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar una alteración química de un compuesto o composición sustrato que sea detectable.

45 **[0052]** El término “anticuerpo” en este documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad biológica deseada.

50 **[0053]** Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden una porción de un anticuerpo intacto, comprendiendo preferiblemente la región de unión al antígeno o variable del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, dianticuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

[0054] Los “anticuerpos nativos” normalmente son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se une a una cadena pesada mediante un puente disulfuro covalente, mientras que el número de puentes disulfuro varía entre las cadenas pesadas de isotipos de inmunoglobulina diferentes. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en el otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se considera que restos de aminoácidos especiales forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

[0055] El término “variable” se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo en concreto por su antígeno en particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables o determinantes de complementariedad ambas tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones estructurales (FR, por sus siglas en inglés). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman lazos que conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura en lámina beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas y próximas mediante las regiones FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat, E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Edición, Public Health Services, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión del anticuerpo al antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC).

[0056] La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos denominados fragmentos “Fab”, cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de unión con el antígeno y sigue siendo capaz de provocar el entrecruzamiento del antígeno.

[0057] “Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento del antígeno y unión al antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y otro de la cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L . Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un dominio variable sencillo (de la mitad de un Fv que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad más baja que la del sitio de unión completo.

[0058] El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de algunos restos en el extremo carboxilo terminal del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en este documento para el Fab' en el que los restos de cisteína de los dominios constantes portan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se obtuvieron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros productos químicos para unir los fragmentos de anticuerpo.

[0059] Las “cadenas ligeras” de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrados pueden asignarse a uno de los dos tipos claramente diferenciados, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

[0060] Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas ligeras, los anticuerpos pueden asignarse a clases diferentes. Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunas de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

[0061] Los fragmentos de anticuerpo “Fv de cadena sencilla” o “scFv” comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, donde estos dominios se presentan en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido Fv además comprende un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite al scFv formar la estructura deseada para unirse al antígeno. Para una revisión de los scFv, véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994).

[0062] El término "dianticuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Usando un enlazador que sea demasiado corto como para permitir que los dos dominios de la misma cadena se apareen, se fuerza a los dominios a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión al antígeno. Los diantibios se describen más en profundidad, por ejemplo, en los documento EP 404.097, WO 93/11161 y en Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

[0063] Según se usa en este documento, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que puedan presentarse en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos estando dirigidos frente a un único sitio antígeno. Además, al contrario que las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal se dirige frente a un único determinante de un antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que son sintetizados por el cultivo del hibridoma y no están contaminados con otras inmunoglobulinas. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como que la producción del anticuerpo requiere ningún procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales utilizados según la presente invención pueden obtenerse mediante el procedimiento de obtención de hibridomas descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975) o pueden obtenerse mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al.; Nature, 352:624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), por ejemplo.

[0064] Los anticuerpos monoclonales de este documento incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica, u homóloga, a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie en particular o pertenece a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que el resto de las cadenas es idéntico, u homólogo, a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de estos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. N° 4.816.567 y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). Entre los anticuerpos quiméricos de interés de este documento se incluyen anticuerpos "primatizados" que comprende secuencias variables del dominio de unión al antígeno derivadas de un primate no humano (por ejemplo, monos del viejo mundo, como babuino, macaco rhesus o macaco cangrejero) y secuencias de la región constante humana (patente de EE. UU. N° 5.693.780).

[0065] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En la mayoría de los casos, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador), como ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todos los lazos hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas, o sustancialmente todas, las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), que normalmente es el de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véanse Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988) y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

[0066] El término "región hipervariable" cuando se usa en este documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos restos de un "lazo hipervariable" (por ejemplo, restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Los restos "estructurales" o "FR" son los restos del dominio variable distintos a los restos de la región hipervariable como se define en este documento.

[0067] Un anticuerpo "que se une" a un antígeno de interés es aquel capaz de unirse al antígeno con afinidad y/o aidez suficientes como para que el anticuerpo sea útil como agente terapéutico o diagnóstico para dirigirse hacia una célula que expresa el antígeno.

[0068] Para los fines de este documento, "inmunoterapia" se referirá a un procedimiento para tratar a un mamífero (preferiblemente un paciente humano) con un anticuerpo, en el que el anticuerpo puede ser un anticuerpo no conjugado o "desnudo", o el anticuerpo puede estar conjugado o fusionado con una molécula o agente heterólogo, como uno o más agentes citotóxicos generando de ese modo un "inmunconjugado".

[0069] Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95% en peso de anticuerpo según se determina mediante el procedimiento de Lowry y, más preferiblemente, más del 99% en peso, (2) hasta un nivel suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal o internos usando un secuenciador de taza giratoria o (3) a homogeneidad mediante PAGE-SDS en condiciones reductoras o no reductoras usando tinción con azul de Coomassie o, preferiblemente, con plata. Anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, ya que no se presentará al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo. Sin embargo, generalmente el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

[0070] La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un agente (por ejemplo, Apo2L/TRAIL, anticuerpo anti-DR4 o DR5, etc.) que es eficaz para prevenir, mejorar o tratar la enfermedad o afección en cuestión.

[0071] Los términos "tratando", "tratamiento" y "terapia" según se usan en este documento se refieren a terapia curativa, terapia profiláctica y terapia preventiva. El tratamiento o administración consecutiva se refiere al tratamiento al menos diariamente sin interrupción del tratamiento durante uno o más días. El tratamiento o administración intermitente, o tratamiento o administración de forma intermitente, se refiere al tratamiento que no es consecutivo sino más bien de naturaleza cíclica.

[0072] El término "citoquina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otras células como mediadores intercelulares. Ejemplos de estas citoquinas son las linfoquinas, monoquinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas de crecimiento como la hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana con N-metilión y hormona de crecimiento bovina, hormona paratiroidea, tiroxina, insulina, proinsulina, relaxina, prorrelaxina, hormonas glucoproteicas como hormona foliculo estimulante (FSH), hormona estimulante de tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH), factor de crecimiento hepático, factor de crecimiento de fibroblastos, prolactina, lactógeno de placenta, factor de necrosis tumoral α y β , sustancia inhibidora mulleriana, péptido asociado a gonadotropina de ratón, inhibina, activina, factor de crecimiento del endotelio vascular, integrina, trombopoyetina (TPO), factores de crecimiento nerviosos, factor de crecimiento de plaquetas, factores de crecimiento transformantes (TGF) como TGF- α y TGF- β , factor de crecimiento similar a insulina I y II, eritropoyetina (EPO), factores osteoinductores, interferones como interferón- α , β y gamma, factores estimulantes de colonia (CSF) como CSF de macrófagos (M-CSF), CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y CSF de granulocitos (G-CSF), interleuquinas (IL) como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17 y otros factores polipeptídicos como LIF y ligando kit (KL). Como se usa en este documento, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de un cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

[0073] El término "agente citotóxico" según se usa en este documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función celular y/o causa la muerte o destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y y ^{186}Re), agentes quimioterapéuticos y toxinas como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

[0074] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes como tiopea y ciclofosfamida (CYTOXAN[®]); sulfonatos de alquilo como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamilaminas incluyendo altretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamida, trietilenetiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (especialmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina, pancratistatina, una sarcodictina, espongiatrina, mostazas nitrogenadas como clorambucilo, clornafacina, chlofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato del óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos como los antibióticos de enedina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma II y caliqueamicina omega II (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfonatos, como clodronato; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y cromóforos cromoproteínas de antibióticos de enedina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (AdriamycinTM) (incluyendo morfolin-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolin-doxorrubicina y deoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas como

mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; ácido fólico relleno como ácido frolinico; aceglatona; glucósido de aldofosfamidato; ácido aminolevulínico; eniluracilo, amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona, ácido podofilínico; 2-etilhidrazida, procarbazona; PSK[®]; razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclortrietilamina; tricotecenos (especialmente la toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina, dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitossina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida, tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y docetaxel (TAXOTERE[®], Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GemzarTM), 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino como cisplatino y carboplatino; vinblastina, platino; etoposido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina, vinorelbina (NavelbinaTM), novantrona; tenipósido, edatrexato, daunomicina; aminopterina; xeloda, ibandronato; CPT-11, inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides como el ácido retinoico, capecitabina y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquier de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción de hormonas, como antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM), como por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NolvadexTM), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (FarestonTM), inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, como por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (MegaceTM), exemestano, formestano, fadrozol, vorozol (RivisorTM), letrozol (FemaraTM) y anastrozol (ArimidexTM) y antiandrógenos como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprórido y goserelina, y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las anteriores.

[0075] Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en este documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que sobreexpresa cualquiera de los genes identificados en este documento, *in vitro* o *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento es aquel que reduce significativamente el porcentaje de células que sobreexpresan dichos genes en fase S. Entre los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento se incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto a la fase S), como agentes que inducen la parada en G1 y la parada en fase M. Entre los bloqueantes de la fase M clásicos se incluyen los derivados de la vinca (vincristina y vinblastina), taxol e inhibidores de la topoisomerasa II como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen el ciclo celular en la fase G1 también se expande a la parada en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse información adicional en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" de Murakami et al. (WB Saunders: Filadelfia 1995), especialmente en la pág. 13.

[0076] Los términos "apoptosis" y "actividad apoptótica" se usan en un sentido amplio y se refieren a la forma ordenada o controlada de muerte celular en mamíferos que, normalmente, va acompañada de uno o más cambios celulares característicos, como condensación del citoplasma, pérdida de microvellosidades de la membrana plasmática, segmentación del núcleo, degradación del ADN cromosómico o pérdida de función mitocondrial. Esta actividad puede determinarse y medirse, por ejemplo, mediante un ensayo de viabilidad celular (como los ensayos con azul Alamar o ensayos de MTT), análisis por FACS, activación de caspasas, fragmentación de ADN (véase, por ejemplo, Nicoletti et al., J. Immunol. Methods, 139:271-279 (1991) y ensayos de escisión de la poli(ADP- ribosa) polimerasa "PARP", conocidos en la técnica.

[0077] Como se usa en este documento, el término "trastorno" en general se refiere a cualquier afección que podría beneficiarse del tratamiento con las composiciones descritas en este documento, incluyendo cualquier enfermedad o trastorno que puede tratarse con cantidades eficaces de Apo2L/TRAIL, un anticuerpo anti-DR4 y/o un anticuerpo anti-DR5. Esto incluye trastornos crónicos y agudos, así como aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Entre los ejemplos no limitantes de trastornos por tratar en este documento se incluyen cánceres benignos y malignos, enfermedades inflamatorias, angiogénicas e inmunológicas, enfermedades autoinmunes, artritis (incluyendo artritis reumatoide), esclerosis múltiple y VIH/SIDA.

[0078] Los términos "cáncer", "canceroso" o "maligno" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluye, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, leucemia, blastoma y sarcoma. Más ejemplos particulares de estos cánceres son carcinoma epidermoide, mieloma, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, glioma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer gastrointestinal (del tubo digestivo), cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer hepático, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, melanoma, condrosarcoma, neuroblastoma, cáncer de páncreas, gioblastoma

multiforme, cáncer de cuello de útero, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello.

[0079] El término "etiquetado" cuando se usa en este documento se refiere a una molécula quimérica que comprende un anticuerpo o polipéptido fusionado con un "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene suficientes residuos como para proporcionar un epítipo frente al que puede obtenerse un anticuerpo o proporcionar alguna otra función, como la capacidad para formar oligómeros (por ejemplo, como ocurre con péptidos que tienen dominios en cremallera de leucina), aunque también es suficientemente corto como para que generalmente no interfiera con la actividad del anticuerpo o del polipéptido. El polipéptido etiqueta preferiblemente también es suficientemente exclusivo como para que un anticuerpo específico de la etiqueta no presente una reacción cruzada considerable con otros epítopes. Los polipéptidos etiqueta adecuados generalmente tienen al menos seis restos de aminoácido y, normalmente, entre aproximadamente 8 y aproximadamente 50 restos de aminoácidos (preferiblemente, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 restos).

[0080] El término "ión metálico divalente" se refiere a un ión metálico que tiene dos cargas positivas. Entre los ejemplos de iones metálicos divalentes se incluyen, pero sin limitaciones, cinc, cobalto, níquel, cadmio, magnesio y manganeso. Entre las formas particulares de estos metales que pueden emplearse se incluyen formas de sales (por ejemplo, formas de sales farmacéuticamente aceptables) como formas cloruro, acetato, carbonato, citrato y sulfato de los iones metálicos divalentes mencionados anteriormente. Opcionalmente, un ión metálico divalente para su uso en la presente invención es el cinc y, preferiblemente, la forma de sal sulfato de cinc o cloruro de cinc.

[0081] "Aislado" cuando se usa para describir los diversos péptidos o proteínas descritos en este documento, significa un péptido o proteína que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que normalmente podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del péptido o la proteína, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En las realizaciones preferidas, el péptido o la proteína se purificará (1) a un nivel suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal o internos usando un secuenciador de taza giratoria, (2) a homogeneidad mediante PAGE-SDS en condiciones reductoras y no reductoras usando tinción con azul de Coomassie o, preferiblemente, con plata o (3) a homogeneidad mediante técnicas de espectroscopía de masas o mapeo peptídico. Material aislado incluye el péptido o proteína *in situ* dentro de células recombinantes, ya que no se presentará al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo. Sin embargo, generalmente el péptido o proteína aislada se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

[0082] El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias identificadas en este documento se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia de referencia, tras alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas formas que están dentro de las habilidades de la técnica, pueden determinarse parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo la asignación de algoritmos necesarios para lograr un alineamiento máximo a lo largo de las secuencias de longitud completa que se están comparando. A los fines expresados en este documento, los valores del porcentaje de identidad de aminoácidos pueden obtenerse usando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2, que fue creado por Genentech, Inc. y cuyo código fuente ha sido presentado con la documentación del usuario en la oficina de propiedad de derechos de autor de EE. UU., Washington, DC, 20559, registrado con el número de registro de derechos de autor de EE. UU. N ° TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, CA. Todos los parámetros de comparación de secuencias están establecidos en el programa ALIGN-2 y no deberán variarse.

[0083] Un experto en la materia determina fácilmente la "rigurosidad" de las reacciones de hibridación y, generalmente, es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración de sal. En general, las sondas más largas requieren temperaturas más altas para una hibridación apropiada, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para rehibridar cuando se presentan cadenas complementarias en un entorno por debajo de la temperatura de fusión. Cuanto más alto sea el nivel de identidad deseado entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, se entiende que temperaturas relativas más elevadas tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas mientras que temperaturas más bajas lo harían menos. Para obtener más detalles y explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers (1995).

[0084] Las "condiciones muy rigurosas", según se define en este documento, se identifican como aquellas en las que: (1) se emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado; cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) se emplea un agente desnaturalizante durante la hibridación; formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficoll/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón fosfato sódico 50mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C o (3) se emplea formamida al 50%, SSCx5 (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, solución de

Denhardt x5, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en SSCx0,2 (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado en condiciones muy rigurosas compuesto por SSCx0,1 que contiene EDTA a 55°C.

[0085] Las "condiciones moderadamente rigurosas" pueden identificarse como las descritas por Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen la incubación durante la noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, SSCx5 (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt x 5, sulfato de dextrano al 10% y ADN de esperma de salmón desnudo desnaturalizado a 20 mg/ml, seguido de lavado de los filtros con SSCx1 a aproximadamente 37-50°C. El experto reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc., cuando sea necesario para acomodar factores como la longitud de la sonda y similares.

[0086] El término "cebador" o "cebadores" se refiere a secuencias de oligonucleótidos que hibridan con un polinucleótido diana de ARN o ADN complementario y sirve como los puntos iniciales para la síntesis por etapas de un polinucleótido a partir de mononucleótidos mediante la acción de una nucleotidiltransferasa como ocurre, por ejemplo, en una reacción en cadena de la polimerasa.

[0087] El término "secuencias control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificadora unida de forma operativa en un organismo huésped en particular. Entre las secuencias control que son adecuadas para procariotas se incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma. Es sabido que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

[0088] El ácido nucleico está unido "de forma operativa" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretora se une de forma operativa al ADN de un polipéptido si este se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o un potenciador se une de forma operativa a una secuencia codificadora si este afecta a la transcripción de la secuencia o un sitio de unión al ribosoma se une de forma operativa a una secuencia codificadora si se coloca de modo que facilita la traducción. Generalmente, "unido de forma operativa" significa que las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas y, en caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores estén contiguos. La unión se logra por ligamiento a sitios de restricción convenientes. Si estos sitios no existen se usan adaptadores o enlazadores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

[0089] "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, células citotóxicas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen un anticuerpo unido a una célula diana y, posteriormente, causan la lisis de la célula diana. Las células principales que median en la ADCC, las células NK, expresan sólo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en las células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, como el que se describe en las patentes de EE.UU. N ° 5.500.362 o 5.821.337. Entre las células efectoras útiles para estos ensayos se incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células citotóxicas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

[0090] Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizar funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos FcγRIII y llevan a cabo una función efectora de ADCC. Entre los ejemplos de leucocitos humanos que median en la respuesta ADCC se incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células citotóxicas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos, siendo las preferidas las PBMC y las células NK.

[0091] Los términos "Receptor Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de ajuste alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor") que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación a base de tirosinas inmunorreceptor (ITAM, por sus siglas en inglés) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición a base de tirosinas inmunorreceptor (ITIM, por sus siglas en inglés) en su dominio citoplasmático (véase Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, 1991, Ann. Rev. Immunol., 9:457-92; Capel et al., 1994, Immunomethods, 4:25-34 y de Haas y col, 1995, J. Lab. Clin., 126:330-41. Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están incluidos en el término "FcR" de este documento. El término también incluye al receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol., 117:587 (1976) y Kim et al., 1994, J. Immunol., 24:249 (1994)). Los FcR de este documento incluyen polimorfismos como el dimorfismo genético en el gen que codifica FcγRIIIa que resulta en una fenilalanina (F) o valina (V) en la posición de aminoácido 158, localizado en la

región del receptor que se une a IgG1. Se ha demostrado que el FcγRIIIa de valina homocigótico (FcγRIIIa-158V) tiene una afinidad mayor por la IgG1 humana y media un aumento de ADCC *in vitro* en relación con los receptores FcγRIIIa de fenilalanina homocigóticos (FcγRIIIa-158F) o heterocigóticos (FcγRIIIa-158F/V).

[0092] "Citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula para lisar una diana en presencia del complemento. La ruta de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) formando complejo con un antígeno relacionado. Para evaluar la activación del complemento puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996).

II. PROCEDIMIENTOS ILUSTRATIVOS Y MATERIALES DE LA INVENCION

[0093] Los procedimientos y ensayos descritos en este documento se dirigen al examen de la expresión de uno o más biomarcadores en una muestra de tejido o de células de mamíferos, en el que la determinación de dicha expresión de uno o más de estos biomarcadores predice o indica si la muestra de tejido o de células será sensible a agentes como Apo2L/TRAIL y/o anticuerpos frente al receptor de muerte, como anticuerpos agonistas anti-DR5 o anticuerpos agonistas anti-DR4. Entre los procedimientos y ensayos se incluyen aquellos en los que se examina la expresión de miembros de la familia de moléculas GalNac-T, incluyendo GalNac-T14 y GalNac-T3.

[0094] Como se discutió anteriormente, existen algunas poblaciones de tipos de células humanas afectadas (como determinadas poblaciones de células cancerosas) que son resistentes a la muerte celular inducida por los efectos de Apo2L/TRAIL o de anticuerpos frente al receptor de muerte. Por tanto se considera que los procedimientos y ensayos descritos pueden proporcionar sistemas convenientes, eficaces y potencialmente rentables para obtener datos e información útil en la evaluación de terapias apropiadas o eficaces para el tratamiento de los pacientes. Por ejemplo, se podría realizar una biopsia a un paciente que ha sido diagnosticado de cáncer o una enfermedad relacionada con el sistema inmune para obtener una muestra de tejido o de células, y podría examinarse la muestra mediante diversos ensayos *in vitro* para determinar si las células del paciente serían sensibles a un agente terapéutico como Apo2L/TRAIL o un anticuerpo frente a un receptor de muerte.

[0095] La invención proporciona procedimientos para predecir la sensibilidad de una muestra de tejido o de células de mamífero (como una célula cancerosa) frente a Apo2L/TRAIL o un anticuerpo agonista de un receptor de muerte. Opcionalmente, se obtiene una muestra de tejido o de células de mamífero y se examina la expresión de GalNac-T14. Los procedimientos pueden realizarse en diversos formatos de ensayos, como ensayos de detección de expresión de ARNm, expresión de proteínas (como ensayos de inmunohistoquímica) y ensayos bioquímicos para detectar la actividad enzimática de la UDP-N-acetil-D-galactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa. La determinación de la expresión de biomarcadores como GalNac-T14 en estos tejidos o células será predictiva de que estos tejidos o células serán sensibles a la actividad inducida por la apoptosis de Apo2L/TRAIL o/y un anticuerpo frente a un receptor de muerte. Sorprendentemente, los solicitantes han encontrado que la expresión de GalNac-T14 se correlaciona con la sensibilidad de estos tejidos y células a Apo2L/TRAIL y a anticuerpos frente a un receptor de muerte.

[0096] Como se describe a continuación, la expresión de diversos biomarcadores como GalNac-T14 en una muestra puede analizarse mediante diversas metodologías, muchas de las cuales son conocidas en la técnica y comprendidas por los expertos, como, pero sin limitaciones, análisis inmunohistoquímicos y/o por inmunoelectroforesis, análisis de sangre cuantitativos (como por ejemplo, ELISA en suero) (para examinar, por ejemplo, los niveles de expresión de proteínas), ensayos bioquímicos de actividad enzimática, hibridación *in situ*, análisis de transferencia de ARN de tipo Northern y/o por PCR de los ARNm y análisis de transferencia genómica de tipo Southern (para examinar, por ejemplo, la delección o amplificación génica) así como cualquier de la amplia variedad de ensayos que pueden realizarse mediante análisis de matrices de genes y/o tejidos. Los protocolos típicos para evaluar el estado de los genes y los productos génicos se encuentran, por ejemplo, en Ausubel et al. eds., 1995, Current Protocols In Molecular Biology, Unidades 2 (transferencia de ARN de tipo Northern), 4 (transferencia genómica de tipo Southern), 15 (Inmunotransferencia) y 18 (análisis por PCR).

[0097] Los protocolos siguientes relacionados con la detección de GalNac-T14 en una muestra se proporcionan a continuación con fines ilustrativos.

[0098] Los procedimientos opcionales de la invención incluyen protocolos en los que se examina o comprueba la presencia de GalNac-T14 en una muestra de tejido o células de mamíferos. Pueden emplearse diversos procedimientos para detectar GalNac-T14 e incluyen, por ejemplo, análisis inmunohistoquímicos, inmunoprecipitación, análisis por inmunoprecipitación, ensayos de unión molecular, ELISA, ELIFA, clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) e inmunoprecipitación seguida de EM, análisis de monosacáridos. Por ejemplo, un procedimiento opcional de detección de la expresión de GalNac-T14 en un tejido o muestra comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-GalNac-T14 y, a continuación, detectar la unión del anticuerpo frente a GalNac-T14 en la muestra.

[0099] En realizaciones particulares de la invención, se examina la expresión de GalNac-T14 en una muestra usando protocolos de inmunohistoquímica y tinción. Se ha demostrado que la tinción inmunohistoquímica de los

cortes de tejido es un procedimiento fiable para evaluar o detectar la presencia de proteínas en una muestra. Las técnicas de inmunohistoquímica ("IHC") utilizan un anticuerpo como sonda y visualizan los antígenos celulares *in situ*, generalmente mediante procedimientos cromogénicos o fluorescentes.

[0100] Para la preparación de la muestra, puede usarse una muestra de tejido o de células de un mamífero (normalmente un paciente humano). Entre los ejemplos de muestras se incluyen, pero sin limitaciones, células cancerosas como células de cáncer de colon, mama, próstata, ovario, pulmón, estómago, páncreas, linfoma y leucemia. Opcionalmente, las muestras incluyen células de cáncer de pulmón no microcítico, células de cáncer pancreático o células de linfoma no Hodgkin. La muestra puede obtenerse por diversos procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitaciones la escisión quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado. En una realización, la muestra se fija e incluye en parafina o similar.

[0101] La muestra de tejido puede fijarse (es decir, conservarse) mediante metodología convencional (véase por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology," 3ª edición (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, Nueva York; The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.). Un experto en la materia apreciará que la elección de un fijador está determinada por el objetivo para el que tiene que teñirse histológicamente la muestra o analizarse de otra forma. Un experto en la técnica también apreciará que la longitud de la fijación depende del tamaño de la muestra de tejido y el fijador usado. A modo de ejemplo, pueden usarse para fijar una muestra formalina tamponada neutra, solución de Bouin o paraformaldehído.

[0102] Generalmente, la muestra se fija primero y, a continuación, se deshidrata a través de una serie de alcoholes de concentración creciente, se infiltra e incluye en parafina u otros medios para corte de modo que la muestra de tejido pueda cortarse. Alternativamente, puede cortarse el tejido y fijarse los cortes obtenidos. A modo de ejemplo, la muestra de tejido puede incluirse y procesarse en parafina mediante tecnología convencional (véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", *supra*). Entre los ejemplos de parafinas que pueden usarse se incluyen, pero sin limitaciones, Paraplast, Broid y Tissuemay. Una vez que la muestra de tejido se ha incluido, esta puede cortarse mediante un microtomo o similar (véase, por ejemplo "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", *supra*). A modo de ejemplo para este procedimiento, los cortes pueden oscilar de aproximadamente tres micras a aproximadamente cinco micras de espesor. Una vez realizados, los cortes pueden pegarse a portas mediante varios procedimientos convencionales. Entre los ejemplos de adhesivos a porta se incluyen, pero sin limitaciones, silano, gelatina, poli-L-lisina y similares. A modo de ejemplo, los cortes incluidos en parafina puede unirse a portas cargados positivamente y/o portas recubiertos con poli-L-lisina.

[0103] Si se había usado parafina como material de inclusión, los cortes de tejido generalmente se desparafinan y rehidratan en agua. Los cortes de tejido pueden desparafinarse mediante diversas metodologías convencionales. Por ejemplo, xilenos y una serie de alcoholes de concentraciones gradualmente descendientes (véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", *supra*). Alternativamente, pueden usarse agentes de desparafinación disponible en el mercado como Hemo-De7 (CMS, Houston, Texas).

[0104] Opcionalmente, después de la preparación de la muestra, puede analizarse un corte de tejido usando IHC. Puede realizar un estudio por IHC en combinación con técnicas adicionales como tinción morfológica y/o hibridación *in situ* con fluorescencia. Existen dos procedimientos de IHC generales; ensayos directos e indirectos. Según el primer ensayo, la unión del anticuerpo al antígeno diana (por ejemplo, GalNac-T14) se determina directamente. Este ensayo directo usa un reactivo marcado, como una etiqueta fluorescente o un anticuerpo primario marcado con una enzima que puede visualizarse sin interacción adicional con un anticuerpo. En un ensayo indirecto típico, un anticuerpo primario sin conjugar se une al antígeno y, a continuación, un anticuerpo secundario marcado se une al anticuerpo primario. Cuando el anticuerpo secundario está conjugado con un marcador enzimático, un sustrato cromogénico o fluorogénico este se añade para proporcionar la visualización del antígeno. La amplificación de la señal se produce porque pueden reaccionar varios anticuerpos secundarios con diferentes epítopes del anticuerpo primario.

[0105] Los anticuerpos primario y/o secundario usados para inmunohistoquímica normalmente se marcan con un resto detectable. Se dispone de varios marcadores que pueden agruparse dentro de las siguientes categorías:

(a) Isótopos radiactivos, como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I . El anticuerpo puede marcarse con el isótopo radiactivo usando las técnicas descritas en Current Protocols in Immunology, volúmenes 1 y 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, Nueva York, Pubs. (1991) por ejemplo y puede medirse la radiactividad usando recuento de centelleo.

(b) Partículas de oro coloidal.

(c) Marcadores fluorescentes como, pero sin limitaciones, quelatos de tierras raras (quelatos de europio), rojo Texas, rodamina, fluoresceína, dansilo, lisamina, umbeliferona, ficocriterina, ficocianina o fluorófos disponibles en el mercado como SPECTRUM, ORANGE7 y SPECTRUM GREEN7 y/o derivados de uno o más de los anteriores. Los

marcadores fluorescentes pueden conjugarse al anticuerpo usando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, *supra*, por ejemplo. La fluorescencia puede cuantificarse usando un fluorímetro.

(d) Hay disponibles diversas combinaciones enzima-sustrato y la patente de EE. UU. N ° 4.275.149 proporciona una revisión de algunos de estos. La enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse usando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse a nivel espectrofotométrico. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. A continuación se describen técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente mediante una reacción química y, a continuación, puede emitir luz que puede medirse (usando un quimioluminómetro, por ejemplo) o donar energía a un aceptor de fluorescencia. Entre los ejemplos de marcadores enzimáticos se incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana, patente de EE. UU. N ° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa como peroxidada de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), hetrocíclico oxidasas (como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Las técnicas para conjugación de enzimas a anticuerpos se describen en O'Sullivan et al., *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, en *Methods in Enzym.* (ed. J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, Nueva York, 73:147-166 (1981).

[0106] Entre los ejemplos de combinaciones enzima-sustrato se incluyen, por ejemplo:

(i) Peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, en el que la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor del colorante (por ejemplo, diamina de ortofenileno (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB));

(ii) fosfatasa alcalina (FA) con para-nitrofenil fosfato como sustrato cromogénico y

(iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (*por ejemplo*, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o sustrato fluorigénico (*por ejemplo*, 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa).

[0107] Los expertos en la materia disponen de muchas otras combinaciones enzima-sustrato. Para una revisión general de estas, véanse las patentes de EE. UU. N ° 4.275.149 y 4.318.980. Algunas veces, el marcador está indirectamente conjugado con el anticuerpo. El experto conocerá diversas técnicas para conseguir esto. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar conjugado con biotina y cualquier marcador de las cuatro amplias categorías de marcadores mencionadas anteriores puede estar conjugado con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a la avidina y, de este modo, el marcado puede conjugarse con el anticuerpo de esta forma indirecta. Alternativamente, para conseguir la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con un pequeño hapteno y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente con un anticuerpo frente a un hapteno. De este modo, puede lograrse una conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo.

[0108] Aparte de los procedimientos de preparación de la muestra descritos anteriormente, pueden ser deseable un tratamiento adicional del corte de tejido antes, durante o después del ICH. Por ejemplo, pueden realizarse procedimientos de recuperación de epítopes, como calentar la muestra de tejido en tampón citrato (véase, por ejemplo, Leong et al., *Appl. Immunohistochem*, 4(3):201 (1996)).

[0109] Después de una etapa de bloqueo opcional, el corte de tejido se expone a un anticuerpo primario durante un periodo de tiempo suficiente y en condiciones adecuadas de modo que el anticuerpo primario se una al antígeno proteico diana en la muestra de tejido. Las condiciones apropiadas para conseguir esto pueden determinarse mediante experimentación rutinaria. El grado de unión del anticuerpo a la muestra se determina usando cualquiera de los niveles detectables descritos anteriormente. Preferiblemente, el marcador es un marcador enzimático (por ejemplo, HRPO) que cataliza una alteración química del sustrato cromogénico, como el cromógeno 3,3'-diaminobencidina. Preferiblemente, el marcador enzimático se conjuga al anticuerpo el cual se une específicamente al anticuerpo primario (por ejemplo, el anticuerpo primario es un anticuerpo policlonal de conejo y el anticuerpo secundario es un anticuerpo de cabra anti-conejo).

[0110] Opcionalmente, los anticuerpos empleados en el análisis ICH para detectar la expresión de GalNac-T14 son anticuerpos anti-GalNac-T14. Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos frente a otros antígenos GalNac-T que presentan reactividad cruzada con GalNac-T14. Opcionalmente, el anticuerpo anti-GalNac-T14 es un anticuerpo monoclonal.

[0111] Las muestras preparadas de este modo pueden montarse y cubrirse con un cubreobjetos. A continuación, se realiza la evaluación del porta usando, por ejemplo, un microscopia y pueden usarse criterios de intensidad de tinción, usados de forma rutinaria en la técnica. Los criterios de intensidad de tinción pueden evaluarse como sigue:

TABLA 1

Patrón de tinción	Puntuación
No se observa tinción en las células.	0
Se detecta una tinción débil/apenas perceptible en más del 10% de las células.	1+
Se observa una tinción de débil a moderada en más del 10% de las células.	2+
Se observa una tinción de moderado a fuerte en más del 10% de las células.	3+

[0112] Normalmente, se considera que una puntuación en el patrón de tinción de aproximadamente 2+ o superior en un ensayo IHC es predictiva o indicativa de la sensibilidad de una célula de mamífero (como una célula cancerosa de mamífero) a Apo2L/TRAIL o a un anticuerpo agonista de un receptor de muerte.

[0113] En procedimientos alternativos, la muestra puede ponerse en contacto con un anticuerpo específico para dicho biomarcador en condiciones suficientes para formar un complejo anticuerpo-biomarcador y detectar, a continuación, dicho complejo. La presencia del biomarcador puede evidenciarse de diversas formas, como mediante inmunotransferencia (con o sin inmunoprecipitación) y procedimientos de ELISA para probar una amplia variedad de tejidos y muestras, incluyendo plasma o suero. Se dispone de una amplia gama de técnicas de inmunoensayo que usan este formato de ensayo, véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N ° 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653. Estas incluyen ensayos de sitio único y de dos sitios o "sándwich" de los tipos no competitivos, así como en los ensayos tradicionales de unión competitiva. Entre estos ensayos también se incluye la unión directa de un anticuerpo marcado a un biomarcador diana.

[0114] Los ensayos de tipo sándwich están entre los ensayos más útiles y utilizados con mayor frecuencia. Existen diversas variaciones de la técnica de ensayo de tipo sándwich y se pretende que todas ellas estén incluidas en la presente invención. Brevemente, en un ensayo directo típico, un anticuerpo no marcado se inmoviliza en un sustrato sólido y la muestra de prueba se pone en contacto con la molécula unida. Tras un periodo de incubación adecuado, por un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo anticuerpo-antígeno, se añade a continuación un anticuerpo secundario específico para el antígeno, marcado con una molécula indicadora capaz de producir una señal detectable y se incuba entonces, dejando el tiempo suficiente para la formación de otro complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo marcado. Todo el material que no ha reaccionado se elimina mediante lavado y la presencia del antígeno se determina mediante observación de una señal producida por la molécula indicadora. Los resultados pueden ser cualitativos, mediante la simple observación de la señal visible, o pueden cuantificarse en comparación con una muestra control que contiene cantidades conocidas del biomarcador.

[0115] Las variaciones en el ensayo directo incluyen un ensayo simultáneo, en el que tanto la muestra como el anticuerpo marcado se añaden simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la materia, incluyendo cualquier variación menor que sea fácilmente aparente. En un ensayo directo de tipo sándwich típico, un primer anticuerpo que tiene especificidad por el biomarcador está unido de forma covalente o pasiva a una superficie sólida. Normalmente, la superficie sólida es vidrio o un polímero, siendo los polímeros utilizados más frecuentemente celulosa, poliácridamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tubos, perlas, pocillos de microplacas o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procesos de unión son bien conocidos en la técnica y, generalmente, consisten en la unión covalente mediante entrecruzamiento o absorción física, el complejo polímero-anticuerpo se lava en la preparación para la muestra de prueba. A continuación, se añade una alícuota de la muestra de prueba al complejo de la fase sólida y se incuba durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, 2-40 minutos o durante la noche si es más conveniente) y en condiciones adecuadas (por ejemplo, de temperatura ambiente a 40°C, como entre 25°C y 32°C inclusive) para permitir la unión de cualquier subunidad presente en el anticuerpo. Después del periodo de incubación, la subunidad del anticuerpo de la fase sólida se lava, seca e incuba con un anticuerpo secundario específico de una porción del biomarcador. El anticuerpo secundario está unido a una molécula indicadora que se usa para indicar la unión del anticuerpo secundario al marcador molecular.

[0116] Un procedimiento alternativo supone inmovilizar los biomarcadores diana en la muestra y, a continuación, exponer la diana inmovilizada al anticuerpo específico que puede o no estar marcado con una molécula indicadora. Dependiendo de la cantidad de diana y de la potencia de la señal de la molécula indicadora, la diana unida puede ser detectable mediante marcaje directo con el anticuerpo. Alternativamente, un anticuerpo secundario marcado, específico del anticuerpo primario se expone al complejo diana-anticuerpo primario para formar un complejo terciario diana-anticuerpo primario-anticuerpo secundario. El complejo se detecta mediante la señal emitida por la molécula indicadora. Según se usa en la presente memoria descriptiva, por "molécula indicadora" se entiende una molécula

que, debido a su naturaleza química, proporciona una señal analíticamente identificable que permite la detección del anticuerpo unido al antígeno. Las moléculas indicadoras utilizadas más frecuentemente en este tipo de ensayos son enzimas, fluoróforos o molécula que contiene radionúclidos (por ejemplo isótopos radiactivos) y moléculas quimioluminiscentes.

[0117] En el caso de un inmunoensayo enzimático, la enzima se conjuga al anticuerpo secundario, generalmente mediante glutaraldehído o periodato. Sin embargo, como se reconocerá fácilmente, existe una amplia variedad de técnicas de conjugación diferentes que están fácilmente a disposición del experto. Entre las enzimas utilizadas con frecuencia se incluyen peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa, galactosidasa y fosfatasa alcalina, entre otras. Los sustratos utilizados con enzimas específicas generalmente se eligen para la producción, tras la hidrólisis por la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Entre los ejemplos de enzimas adecuadas se incluyen fosfatasa alcalina y peroxidasa. También es posible emplean sustratos fluorogénicos, que dan lugar a un producto fluorescente en lugar de los sustratos cromogénicos mencionados anteriormente. En todos los casos, se añade el anticuerpo marcado con la enzima al complejo anticuerpo primario-marcador molecular, permitiendo su unión y, a continuación, el exceso de reactivo se elimina mediante lavado. Después se añade una solución que contiene el sustrato apropiado al complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo. El sustrato reaccionará con la enzima unida al anticuerpo secundario, dando lugar a una señal visual cualitativa que puede cuantificarse adicionalmente, normalmente mediante espectrofotometría, para obtener una indicación de la cantidad de biomarcador que está presente en la muestra. Alternativamente, los compuestos fluorescentes, como fluoresceína y rodamina, pueden unirse químicamente a los anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa mediante la iluminación con luz de una longitud de onda en particular, el anticuerpo marcado con el fluorocromo absorbe la energía lumínica, lo que induce un estado de excitabilidad en la molécula que va seguido de la emisión de luz con un color característico, visualmente detectable con un microscopio óptico. Como en el EIA, se permite que el anticuerpo con marcaje fluorescente se una al complejo anticuerpo primario-marcador molecular. Tras eliminar mediante lavado el reactivo no unido, el complejo terciario restante se expone a continuación a la luz de longitud de onda adecuada; la fluorescencia observada indica la presencia del marcador molecular de interés. Las técnicas de inmunofluorescencia y EIA están ambas muy bien establecidas en la técnica. Sin embargo, también pueden emplearse otras moléculas indicadoras como isótopos radiactivos, moléculas quimioluminiscentes o bioluminiscentes.

[0118] Se contempla que las técnicas descritas más arriba también pueden emplearse para detectar la expresión de GalNac-T14.

[0119] Los procedimientos de la invención además incluyen protocolos en los que se examina la presencia y/o expresión del ARNm de GalNac-T14 en una muestra de tejido o de células. Los procedimientos para la evaluación de los ARNm en células son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación usando sondas complementarias de ADN (como la hibridación *in situ* usando ribosondas de GalNac-T14 marcadas, transferencia de tipo Northern y técnicas relacionadas) y diversos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (como RT-PCR usando cebadores complementarios específicos para GalNac-T14 y otros procedimientos de detección de tipo amplificación, como por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares).

[0120] Por ejemplo, puede analizarse convenientemente la presencia de ARNm de GalNac-T14 en muestras de tejido o de células de mamíferos usando análisis de transferencia de tipo Northern, transferencia en punto o PCR. Por ejemplo, los ensayos de RT-PCR como ensayos de PCR cuantitativos, son bien conocidos en la técnica. En una realización ilustrativa de la invención, un procedimiento para la detección de un ARNm de GalNac-T14 en una muestra biológica comprende producir ADNc a partir de la muestra mediante transcripción inversa usando al menos un cebador; amplificar el ADNc producido de este modo usando un polinucleótido de GalNac-T14 como cebadores sentido y complementarios para amplificar los ADNc de GalNac-T14 de la misma y detectar la presencia del ADNc de GalNac-T14 amplificado. Además, estos procedimientos pueden incluir una o más etapas que permitan determinar los niveles de ARNm de GalNac-T14 en una muestra biológica (por ejemplo, examinando simultáneamente los niveles de una secuencia de ARNm control comparativa de un gen "constitutivo" como un miembro de la familia de la actina). Opcionalmente, puede determinarse la secuencia del ADNc de GalNac-T14 amplificado.

[0121] Entre las realizaciones materiales de este aspecto de la invención se incluyen cebadores de GalNac-T14 y pares de cebadores, que permiten la amplificación específica de los polinucleótidos de la invención o de cualquier parte específica de los mismos, y sondas que hibridan selectiva o específicamente con las moléculas de ácido nucleico de la invención o con cualquier parte de las mismas. Las sondas pueden estar marcadas con un marcador detectable como, por ejemplo, un isótopo radiactivo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelante metálico o una enzima. Estas sondas y cebadores pueden usarse para detectar la presencia de polinucleótidos GalNac-T14 en una muestra y como medio para detectar una célula que expresa proteínas GalNac-T14. Como entenderá un experto, pueden prepararse muchísimos cebadores y sondas diferentes en base a las secuencias proporcionadas en este documento y usarse de forma eficaz para amplificar, clonar y/o determinar la presencia y/o los niveles de los ARNm de GalNac-T14.

[0122] Entre los procedimientos opcionales de la invención se incluyen protocolos para examinar o detectar ARNm, como los ARNm de GalNac-T14, en una muestra de tejido o de células mediante tecnologías de micromatrices. Usando micromatrices de ácido nucleico, las muestras de ARNm de prueba y control de las muestras

de tejido de prueba y control se transcriben de forma inversa y se marcan para generar sondas de ADNc. A continuación, las sondas se hibridan con una matriz de ácidos nucleicos inmovilizados en un soporte sólido. La matriz está configurada de forma que se conoce la secuencia y posición de cada miembro de la misma. Por ejemplo, puede disponerse sobre un soporte sólido una selección de genes que posiblemente se expresan en una determinada enfermedad. La hibridación de una sonda marcada con un miembro de la matriz en particular indica que la muestra de la que deriva la sonda expresa este gen. El análisis diferencial de la expresión génica del tejido enfermo puede proporcionar información valiosa. La tecnología de micromatrices utiliza las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y la tecnología informática para evaluar el perfil de expresión del ARNm de miles de genes en un único experimento. (véase, por ejemplo, el documento WO 01/75166 publicado el 11 de octubre de 2001; (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 5.700.637, 5.445.934 y 5.807.522, Lockart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680 (1996); Cheung, V.G. et al., Nature Genetics 21(Supl.):15-19 (1999) para una discusión sobre la fabricación de matrices). La micromatrices de ADN son matrices en miniatura que contienen fragmentos de genes que se sintetizan directamente sobre vidrio u otros sustratos, o se reparten sobre ellos. Normalmente están representados miles de genes en una única matriz. Un experimento de micromatrices típico supone las siguientes etapas: 1. preparación de la diana marcada con fluorescencia a partir del ARN aislado de la muestra, 2. hibridación de la diana marcada en la micromatriz, 3. lavado, tinción y escaneo de la matriz, 4. análisis de la imagen escaneada y 5. generación de los perfiles de expresión génica. Actualmente se utilizan dos tipos principales de micromatrices de ADN: matrices de oligonucleótidos (normalmente de 25 a 70 mers) y matrices de expresión génica que contienen productos de PCR preparados a partir de ADNc. Durante la formación de una matriz, los oligonucleótidos pueden fabricarse previamente y repartirse por la superficie o sintetizarse directamente sobre la misma (*in situ*).

[0123] El sistema GeneChip® de Affymetrix es un sistema de micromatrices disponible en el mercado que comprende matrices fabricadas mediante síntesis directa de oligonucleótidos sobre una superficie de vidrio. Matrices de sondas/genes: los oligonucleótidos, normalmente de 25 mers, se sintetizan directamente sobre una lámina de vidrio mediante una combinación de tecnologías de fotolitografía con semiconductor y síntesis química en fase sólida. Cada matriz contiene hasta 400.000 oligos diferentes y cada oligo se presenta en millones de copias. Puesto que las sondas de oligonucleótidos se sintetizan en localizaciones conocidas de la matriz, los patrones de hibridación y las intensidades de señal pueden interpretarse en términos de identidad de genes y niveles de expresión relativos mediante el software Microarray Suite de Affymetrix. Cada gen se representa en la matriz mediante una serie de sondas de oligonucleótidos diferentes. Cada par de sondas consta de un oligonucleótido de coincidencia perfecta y un oligonucleótido no coincidente. La sonda de coincidencia perfecta tiene una complementariedad exacta con el gen en particular y, por tanto, mide la expresión del gen. La sonda no coincidente difiere de la sonda de coincidencia perfecta en una sustitución de una única base en la posición de la base central, lo que altera la unión del transcrito del gen diana. Esto ayuda a determinar el fondo y la hibridación no específica que contribuye a la medida de la señal del oligo de coincidencia perfecta. El software Microarray Suite resta las intensidades de hibridación de las sondas no coincidentes de las de las sondas de coincidencia perfecta para determinar el valor de intensidad absoluto o específico para cada conjunto de sondas. Las sondas se eligen en función de la información actual de Genbank y de otros bancos de nucleótidos. Se considera que las secuencias reconocen regiones exclusivas del extremo 3' del gen. Se usa un horno de hibridación para GeneChip (horno de cocina) para realizar la hibridación de hasta 64 matrices a la vez. La estación de líquidos realiza los lavados y la tinción de las matrices de sondas. Es completamente automático y contiene cuatro módulos, alojando cada módulo una matriz de sondas. Cada módulo es controlado independientemente a través del software de Microarray Suite usando protocolos de líquidos programados previamente. El escáner es un escáner fluorescente láser confocal que mide la intensidad de fluorescencia emitida por el ARNc marcado unido a las matrices de sondas. El puesto de trabajo del ordenador con el software Microarray Suite controla la estación de líquidos y el escáner. El software Microarray Suite puede controlar hasta ocho estaciones de líquidos usando los protocolos de hibridación, lavado y tinción programados previamente para la matriz de sondas. El software también adquiere y convierte los datos de intensidad de hibridación en una advertencia de presencia/ausencia para cada gen usando algoritmos apropiados. Finalmente, el software detecta cambios en la expresión génica entre experimentos mediante análisis comparativos y a formato a los archivos de salida into.txt, que pueden usarse con otros programas de software para análisis adicionales de los datos.

[0124] También puede usarse el ensayo de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) para detectar la expresión del ARNm del biomarcador usando sondas marcadas. Estos ensayos son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Kallioniemi et al., 1992 y patente de EE. UU. 6.358.682).

[0125] La expresión de un biomarcador seleccionado también pueden evaluarse examinando la delección génica o la amplificación génica. La delección o amplificación génica puede medirse mediante cualquiera de los muchos protocolos diversos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante transferencia de tipo Southern convencional, transferencia genómica de tipo Northern para cuantificar la transcripción del ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)), transferencia en puntos (análisis de ADN) o hibridación *in situ* (por ejemplo, FISH), usando una sonda adecuadamente marcada, procedimientos citogenéticos o hibridación genómica comparativa (CGH) usando una sonda adecuadamente marcada. A modo de ejemplo, estos procedimientos pueden emplearse para detectar la delección de la amplificación de los genes de GalNac-T14.

[0126] Adicionalmente, puede examinarse el estado de metilación del biomarcador, como el gen GalNac-T14, en una muestra de tejido o de células. La desmetilación y/o hipermetilación aberrante de las islas de CpG en regiones

reguladoras del gen 5' se producen con frecuencia en células inmortalizadas y transformadas y pueden dar lugar a la expresión alterada de diversos genes. En la técnica se conocen bien diversos ensayos para examinar el estado de metilación de un gen. Por ejemplo, pueden utilizarse en estrategias de hibridación de tipo Southern enzimas de restricción sensibles a la metilación que no pueden romper secuencias que contienen sitios CpG metilados para evaluar el estado de metilación de las islas CpG. Además, la MSP (PCR específica de metilación) puede realizar rápidamente el perfil del estado de metilación de todos los sitios CpG presentes en una isla CpG de un gen determinado. Este procedimiento implica una modificación inicial del ADN mediante bisulfito sódico (que convertirá todas las citosinas no metiladas en uracilo) seguida de amplificación usando cebadores específicos para el ADN metilado frente al no metilado. Protocolos que impliquen interferencia de metilación también pueden encontrarse por ejemplo en Current Protocols In Molecular Biology, unidad 12, Frederick M. Ausubel et al. eds., 1995; De Marzo et al., Am. J. Pathol. 155(6): 1985-1992 (1999); Brooks y col, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 1998, 7:531-536) y Lethe et al., Int. J. Cancer 76(6): 903-908 (1998).

[0127] La expresión de GalNac-T14 en una muestra de tejido o de células también puede examinarse mediante ensayos funcionales o de actividad. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos conocidos en la técnica para determinar o detectar la presencia de una actividad enzimática N-acetilgalactosaminiltransferasa determinada en la muestra de tejido o de células (véanse, por ejemplo, Bennett et al., J. Biol. Chem., 271:17006-17012 (1996); Wang et al., BBRC, 300:738-744 (2003); Hang et al., *supra*, disponible desde mayo de 2005 en www.sciencedirect.com).

[0128] En los procedimientos de la presente invención, se contempla que también puede examinarse en la muestra de tejido o de células la expresión de Apo2L/TRAIL o de receptores en la muestra que se une a Apo2L/TRAIL. Como se describe anteriormente y en el estado de la técnica, actualmente se considera que Apo2L/TRAIL se une al menos a cinco receptores diferentes: DR4, DR5, DcR1, DcR2 y OPG. Usando procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en este documento, la expresión de Apo2L/TRAIL, DR4, DR5, DcR1, DcR2 y/o OPG puede detectarse a nivel de ARNm o a nivel de proteínas. A modo de ejemplo, las técnicas de IHC descritas anteriormente pueden emplearse para detectar la presencia de una o más de estas moléculas en la muestra. Se contempla que en los procedimientos en los que se está examinando un tejido o una muestra no solo por la presencia del marcador GalNac-T14, sino también por la presencia de por ejemplo, DR4, DR5 o DcR1, pueden prepararse portamuestras independientes del mismo tejido o muestra y cada portamuestras puede analizarse con un reactivo específico para cada biomarcador o receptor específico. Alternativamente, puede prepararse un portamuestras único de muestra de tejido o de células y pueden usarse anticuerpos dirigidos contra cada biomarcador o receptor en conexión con un protocolo de tinción multicolor que permite la visualización y detección de los biomarcadores o receptores respectivos.

[0129] Después de la determinación de que la muestra de tejido o de células expresa GalNac-T14, lo que indica que la muestra de tejido o de células será sensible a Apo2L/TRAIL, se contempla que puede administrarse una cantidad eficaz de Apo2L/TRAIL al mamífero para tratar un trastorno, tal como el cáncer que afecta al mamífero. El diagnóstico en mamíferos de las diversas afecciones patológicas descritas en este documento puede ser realizado por el médico especialista. En la materia existen técnicas de diagnóstico que permiten, por ejemplo, el diagnóstico o detección del cáncer o de la enfermedad relacionada con el sistema inmune en un mamífero. Por ejemplo, los cánceres pueden identificarse a través de técnicas que incluyen, pero sin limitaciones, técnicas de palpación, análisis de sangre, rayos X, RMN y similares. Las enfermedades relacionadas con el sistema inmune también pueden identificarse fácilmente.

[0130] El Apo2L/TRAIL puede administrarse según los procedimientos conocidos, como la administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o inhalación. Opcionalmente, la administración puede realizarse a través de la perfusión con mini bomba usando diversos dispositivos disponibles en el mercado.

[0131] Las dosis eficaces y los programas de administración de Apo2L/TRAIL o anticuerpo frente al receptor de muerte pueden determinarse empíricamente y la realización de estas determinaciones está dentro de las habilidades de la técnica. Pueden emplearse dosis únicas o múltiples. Actualmente se considera que una dosis o cantidad eficaz de Apo2L/TRAIL usada sola puede oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal o más por día. Pueden realizarse aumentos escalonados de dosis interespecie de forma conocida en la materia, por ejemplo, como se describe en Mordenti et al., Pharmaceut. Res., 8:1351 (1991).

[0132] Cuando se utiliza la administración *in vivo* de Apo2L/TRAIL, las cantidades de dosis normales pueden variar desde aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más por día, preferiblemente aproximadamente 1 µg/kg/día hasta 10 mg/kg/día, dependiendo de la ruta de administración. En la literatura se proporciona una guía con respecto a dosis particulares y métodos de administración; véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 4.657.760; 5.206.344 ó 5.225.212. Se anticipa que serán eficaces diferentes formulaciones para diferetens compuestos del tratamiento y diferentes trastornos, que la administración dirigida a un órgano o tejido, por ejemplo, puede necesitar la administración de una manera diferente de la de otro órgano o tejido.

[0133] Está contemplado que aún pueden emplearse terapias adicionales en los procedimientos. Entre una o más terapias diferentes pueden incluirse, pero sin limitaciones, administración de radioterapia, citoquinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes quimioterapéuticos, agentes citotóxicos, inhibidores de la tirosina quinasa, inhibidores de la ras farnesil transferasa, inhibidores de la angiogénesis e inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina que son conocidos en la técnica y se definen adicionalmente a continuación de forma específica. Se contempla que estas otras terapias pueden emplearse como agente independiente de Apo2L/TRAIL o el anticuerpo frente al receptor de muerte. Además, se usan terapias basadas en anticuerpos terapéuticos que se dirigen frente a antígenos tumorales como RituxanTM o HerceptinTM así como anticuerpos antiangiogénicos como anti-VEGF.

[0134] La preparación y los programas de administración de agentes quimioterapéuticos pueden usarse según las instrucciones del fabricante o como determine empíricamente el médico experto. La preparación y los programas de administración para esta quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder, o seguir, a la administración del Apo2L/TRAIL o anticuerpo frente al receptor de muerte, o puede administrarse simultáneamente con éste.

[0135] Puede ser deseable administrar también anticuerpos frente a otros antígenos, como anticuerpos que se unen a CD20, CD11a, CD18, CD40, ErbB2, EGFR, BrbB3, ErbB4, factor del endotelio vascular (VEGF) u otros miembros de la familia del TNFR (como OPG, TNFR1, TNFR2, GITR, Apo-3, TACI, BCMA, BR3).

[0136] En algunas ocasiones, puede ser beneficioso administrar también una o más citoquinas al paciente. Tras la administración, puede analizarse las células tratadas *in vitro*. Cuando se han tratado *in vivo*, puede controlarse a un mamífero tratado de diversas formas bien conocidas por el médico experto. Por ejemplo, puede examinarse patológicamente las células tumorales para analizar la necrosis o pueden analizarse las respuestas del sistema inmune en el suero.

[0137] Para su uso en las aplicaciones descritas o sugeridas anteriormente, pueden usarse kits o artículos de fabricación. Estos kits pueden comprender un medio vehículo que esté compartimentalizado para recibir en reclusión cerrada uno o más medios recipientes como viales, tubos y similares, comprendiendo cada medio recipiente uno de los elementos independientes utilizados en el procedimiento. Por ejemplo, uno de los medios recipientes puede comprender una sonda que esté, o puede estar, marcada de forma detectable. Esta sonda puede ser un anticuerpo o un polinucleótido específico de la proteína GalNac-T14 o un gen o mensaje de GalNac-T14, respectivamente. Cuando el kit utiliza hibridación de ácidos nucleicos para detectar el ácido nucleico diana, dicho kit puede tener también recipientes que contienen nucleótidos para la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana y/o una recipiente que comprende un medio indicador, como una proteína unida a la biotina, como avidina o estreptavidina, unido a una molécula indicadora, como un marcador enzimático, fluorescente o isótopo radiactivo.

[0138] Normalmente, el kit comprende el recipiente descrito anteriormente y uno o más recipientes que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, como tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con las instrucciones de uso. El recipiente puede contener una etiqueta para indicar que la composición se usa para un tratamiento específico o aplicación no terapéutica y también puede indicar orientaciones para su uso *in vivo* o *in vitro*, como los descritos anteriormente.

[0139] Los kits tienen varias realizaciones. Una realización típica es un kit que comprende un recipiente, una etiqueta en dicho recipiente y una composición contenida dentro de dicho recipiente, en la que la composición incluye un anticuerpo primario que se une a una secuencia del polipéptido GalNac-T14, la etiqueta de dicho recipiente indica que la composición puede usarse para evaluar la presencia de proteínas GalNac-T14 en al menos un tipo de células de mamífero y las instrucciones de uso del anticuerpo GalNac-T14 para evaluar la presencia de proteínas en la menos un tipo de células de mamíferos. El kit puede comprender además un conjunto de instrucciones y materiales para preparar una muestra de tejido y aplicar el anticuerpo y la sonda al mismo corte de la muestra de tejido. El kit puede incluir ambos anticuerpos primario y secundario, en el que el anticuerpo secundario está conjugado con un marcador, por ejemplo, un marcador enzimático.

[0140] Otra realización es un kit que comprende un recipiente, una etiqueta en dicho recipiente y una composición contenida dentro de dicho recipiente; en la que la composición incluye un polinucleótido que hibrida con un complementario del polinucleótido de GalNac-T14, la etiqueta de dicho recipiente indica que la composición puede usarse para evaluar la presencia de GalNac-T14 en al menos un tipo de células de mamífero y las instrucciones de uso del polinucleótido de GalNac-T14 para evaluar la presencia de ARN o ADN de GalNac-T14 en la menos un tipo de células de mamíferos.

[0141] Entre otros componentes opcionales del kit se incluyen uno o más tampones (por ejemplo, tampón de bloqueo, tampón de lavado, tampón de sustrato, etc.), otros reactivos como sustrato (por ejemplo, cromógeno), que se ha alterado químicamente mediante un marcador enzimático, solución de recuperación de epítopes, muestras control (controles positivo y/o negativo), portas de control, etc.

EJEMPLOS

[0142] En los ejemplos siguientes se describen e ilustran adicionalmente diversos aspectos de la invención a modo de ejemplo, ninguno de los cuales pretenden limitar el alcance de la invención.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Cultivos celulares y líneas celulares.

[0143] Las siguientes líneas celulares humanas: líneas de cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC): H2122, A427, H647, SK-MES-1, H838, H358, H2126, H460, H1703, H2405, H650, H1568, H1666, H322T, SW1573, H292, H1650, H522, EKVX, H661, H23, LXFL 529, H226, A549, H1781, H1299, HOP 62, H2009, HOP 92, H1793, H1975, H1651, calu-1, H1435, HOP 18, H520, H441, H2030, H1155, H1838, H596 y HLFa; líneas de cáncer pancreático: Panc 05.04, BxPC3, HPAC, SU.86.86, HuP-T3, PSN1, Panc 08.13, MiaPaCa-2, PA-TU-8988T, Panc 03.27, Capan-1, SW 1990, CFPAC-1, PA-TU-8902, Panc 02.03, Panc 04.03, PL45, Aspc-1, Hs766T, Panc 10.05, Panc1, Capan-2, HPAF-II y LNH: JEKO-1, SU-DHL-4, OCI-LY-19, SR, Farage, DOHH-2, Toledo, WSU-LNH, KARPAS-422, GRANTA-519, Pfeiffer, HT y SC-1, DB. Las líneas celulares se obtuvieron de las colecciones ATCC (Manassas, Virginia), DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures), JCRB (Japanese Cell Resources Bank) o ECACC (European Collection of Cell Cultures) y se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10%, L-glutamina 2 mM y HEPES 10 mM.

Ensayos citotóxicos.

[0144] El ensayo MTT (ensayo de proliferación celular no radiactivo CellTiter 96® de Promega), que es un ensayo colorimétrico basado en la capacidad de las células viables para reducir una sal de tetrazolio (MTT) de color amarillo y soluble a cristales de formazán azules, se usó para determinar el número de células viables tras el tratamiento con Apo2L/TRAIL o anticuerpo anti-DR5. El ensayo MTT se realizó mediante la adición de una solución de colorante optimizada premezclada a los pocillos de cultivo de una placa de 96 pocillos que contenían diversas concentraciones (de 0 a 1.000 ng/ml) de Apo2L/TRAIL o anticuerpo anti-DR5. Durante una incubación de 4 horas, las células vivas convierten el compuesto de tetrazolio de la solución de colorante en un producto de formazán. A continuación, se añadió la solución de solubilización/parada a los pocillos del cultivo para solubilizar el producto de formazán y se registró la absorbancia a 570 nm usando un lector de placas de 96 pocillos (SpectraMax). La lectura de la absorbancia a 570 nm es directamente proporcional al número de células utilizadas normalmente en los ensayos de proliferación. Aunque la absorbancia máxima para el producto de formazán es 570 nm y las soluciones puras son azules, puede que este no sea el color final del ensayo ya que depende de la cantidad de formazán presente en relación con otros compuestos (incluyendo suero, rojo fenol acidificado y MTT no reducido) en el medio de cultivo.

[0145] El número de células se optimizó realizando una valoración celular para producir una señal del ensayo próxima al extremo superior del intervalo lineal del ensayo. Puesto que diferentes tipos celulares tienen diferentes niveles de actividad metabólica, esto se hizo para cada línea celular por separado. Para la mayoría de las células tumorales examinadas se usaron de 5.000 células por pocillo a 20.000 células por pocillo.

[0146] A continuación se recoge una descripción por etapas de los ensayos empleados:

1. Las células utilizadas en el bioensayo procedían de cultivos madre.
2. Determinación del número de células y de la viabilidad mediante azul tripán, y suspensión de las células a un número final de 5.000 a 20.000 células por pocillo.
3. Añadir 50 µl de la suspensión celular en placas de 96 pocillos.
4. Incubación de las placas a 37°C en una atmósfera de CO₂ humidificada al 5% durante la noche.
5. Adición de 50 µl de medio de cultivo que contienen diversas concentraciones que oscilan de 0 a 1.000 ng/ml de Apo2L/TRAIL o anticuerpo frente a DR5 a las muestras de la placa de 96 pocillos. Los controles fueron 50 µl de medio de cultivo (sin Apo2L/TRAIL o anticuerpo frente a DR5) y 100 µl de medio de cultivo (sin células).

[0147] Cada experimento se realizó en un conjunto triplicado de pocillos y en tres días diferentes. El volumen total de los pocillos era de 100 µl/pocillo.

6. Incubación de las placas a 37°C durante 72 horas en una atmósfera de CO₂ humidificada al 5%.
7. Adición de 15 µl de solución de colorante a cada pocillo.
8. Incubación de las placas a 37°C durante 4 horas más en una atmósfera de CO₂ humidificada al 5%.
9. Adición de 100 µl de la solución de solubilización/parada a cada pocillo.
10. Incubación de las placas durante la noche a 37°C.
11. Registro de la absorción a una longitud de onda de 570 nm usando un lector de placas de 96 pocillos. Se usará una longitud de onda de referencia de 750 nm para reducir la contribución al fondo de estos celulares, huellas y otra absorción no específica.

12. La media de los valores de absorbancia para el control negativo se usó como valor blanco y se sustrajo de todas las demás lecturas. La media de los valores de absorbancia para cada concentración de Apo2L/TRAIL o anticuerpo anti-DR5 se dividió entre la media de los valores de absorbancia del control positivo (100% de las células viables - no tratadas) para calcular la cantidad de células viables (en %).

- 5 13. Se representaron los porcentajes de células viables (eje Y) frente a la concentración de Apo2L/TRAIL o anticuerpo frente a DR5 (eje X, escala logarítmica) y se determinó el valor de IC50 localizando el valor del eje X (ng/ml) correspondiente al 50% de las células viables.

Protocolo de marcaje de Affimetrix

- 10 **[0148]** Se tomó una lectura de DO 260/280 de todas las muestras y estas se aplicaron en un BioAnalyzer. Se usaron 5 µg de ARN total de alta calidad.

A. Síntesis de la primera cadena de ADNc:

1. Hibridación del cebador

	DEPC-H ₂ O	x µl	Mezcla mediante agitación. Centrifugación rápida.
	ARN (5 µg)	y µl	Incubación a 70°C durante 10 minutos.
15	Tomar (dilución 1:4 de solución madre para 5 µg)	1 µl	Centrifugación rápida y poner en hielo
	Cebador T7-(dT)24	1 µl	
	Volumen	12 µl	

2. Ajuste de la temperatura

- 20 5 veces tampón de la 1ª cadena de ADNc 4 µl
Añadir 7 µl (de la mezcla de la izquierda) a cada muestra.

	DTT 0,1 M	2 µl	Mezcla mediante agitación. Centrifugación rápida.
	Mezcla de dNTP 10 mM	1 µl	Incubar a 42°C durante 2 minutos.
	Volumen	7 µl	

- 25 3. Síntesis de la primera cadena

Añadir 1 µl de SSII RT a cada muestra.

	SSII RT	1 µl	Mezclar pipeteando arriba y abajo O agitar ligeramente.
	Centrifugación rápida.		
	Volumen total	20 µl	Incubar a 42°C durante 1 hora.

- 30 B. Síntesis de la segunda cadena de ADNc

1. Colocar las reacciones de la primera cadena en hielo. Centrifugar brevemente para que descienda la condensación de las paredes del tubo.

2. Hacer la siguiente mezcla principal de la segunda cadena.

	H ₂ O tratada con DEPC	91 µl	
35	5 veces tampón de reacción de la 2ª cadena	30 µl	
	mezcla de dNTP 10 mM	3 µl	
	ADN Ligasa a 10 U/µl	1 µl	
	ADN Polimerasa I a 10 U/µl	4 µl	
	ARNasa H a 2 U/µl	1 µl	
40	Volumen total:	130 µl	

3. Añadir 130 µl de la mezcla principal a 20 µl de la primera cadena de ADNc (volumen final = 150µl).
 4. Mezclar pipeteando arriba y abajo O agitando ligeramente. Centrifugación rápida.
 5. Incubar a 16°C durante 2 horas en un baño de agua fría.
 6. Añadir 2 µl [10 U] de ADN polimerasa de T4. Mezclar pipeteando arriba y abajo O agitar ligeramente. Centrifugación rápida.
 7. Incubar durante 5 minutos a 16°C.
 8. Añadir 10 µl de EDTA 0,5 M. Agitar ligeramente. Centrifugación rápida.
 9. Proceder con el procedimiento de limpieza del ARNc O conservar a -20°C para su uso posterior.
- 10 **[0149]** Limpieza del ADNc de cadena doble (módulo de limpieza de la muestra de GeneChip)
- [0147]**
1. Añadir 600 µl de tampón de unión de ADNc a los 162 µl finales de la preparación de síntesis de ADNc de cadena doble. Mezclar mediante agitación durante 3 segundos.
 2. Comprobar que la mezcla es de color amarillo (similar al tampón de unión del ADNc sin el rxn de síntesis de ADNc). Si la mezcla es de color naranja o violeta, añadir 10 µl de acetato sódico 3 M, pH 5,0 y mezclar. La mezcla se volverá de color amarillo.
 3. Aplicar 500 µl de la muestra a la columna de limpieza de ADNc colocada en un tubo de recogida de 2 ml y centrifugar durante 1 minuto a $\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm). Eliminar el material que pasa por la columna como *residuos peligrosos.
 4. Carga de nuevo la columna con el resto de la mezcla (262 µl) y centrifugar como anteriormente. Eliminar el material que pasa a través de la columna como *residuos peligrosos y tirar el tubo de recogida.
 5. Transferir la columna a un nuevo tubo de recogida de 2 ml (suministrado). Pipetear 750 µl de tampón de lavado de ADNc sobre la columna. Centrifugar durante 1 minuto a $\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm). Eliminar el material que pasa a través de la columna.
 6. Abrir la tapa de la columna y centrifugar durante 5 minutos a velocidad máxima ($\leq 25.000 \times g$). Colocar las columna en la centrífuga usando cada uno de los adaptadores secundarios. Colocar las tapas de los adaptadores colindantes de modo que queden orientadas en dirección opuesta a la rotación, es decir, si la rotación es en el sentido de las agujas del reloj orientar las tapas en dirección contraria a las agujas del reloj. Esto evita que se dañen las tapas. Eliminar el material que pasa a través de la columna y el tubo de recogida.
 7. Transferir la columna a un nuevo tubo de recogida de 1,5 ml. Pipetear 10 µl de tampón de elución de ADNc directamente dentro de la membrana de la columna. Asegurarse de que el tampón de elución del ADNc se dispense directamente sobre la membrana. Incubar durante 1 minuto a TA y centrifugar 1 minuto a velocidad máxima ($\leq 25.000 \times g$) para su elución.

Configuración y desarrollo de la reacción TIV

- 35 **[0150]** Enzo: Kit de marcaje del ARN transcripto de alto rendimiento de matrices (N ° 900182)

1. Usar 10 µl de ADNc de cadena doble limpio
2. Hacer la siguiente mezcla principal de TIV:

	H ₂ O destilada o desionizada	12 µl
	10 veces tampón de reacción HY	4 µl
40	10 veces ribonucleótidos marcados con biotina	4 µl
	10 veces DTT	4 µl
	10 veces de mezcla de inhibidor de ARNasa	4 µl
	20 veces de ARN polimerasa de T7	2 µl
	Volumen total:	30 µl

3. Añadir 30 µl de la mezcla principal de TIV a 10 µl de ADNc de cadena doble. (Volumen total = 40 µl)
4. Mezclar pipeteando arriba y abajo O agitando ligeramente. Centrifugación rápida.
5. Colocar inmediatamente el tubo en un baño de agua a 37°C. Incubar durante 5 horas.
6. Conservar a -20°C si el ARN no se purifica inmediatamente.
- 5 **[0151]** Limpieza del ADNc marcado con biotina (módulo de limpieza de la muestra de GeneChip)
 1. Añadir 60 µl de H₂O a la reacción de TIV y mezclar por agitación durante 3 segundos.
 2. Añadir 350 µl de tampón de unión del ARNc de TIV a la muestra, mezclar por agitación durante 3 segundos.
 3. Añadir 250 µl de etanol (96-100%) al lisado y mezclar bien pipeteando. No centrifugar.
 - 10 4. Aplicar la muestra (700 µl) a la columna de limpieza de ARNc de TIV colocada en un tubo de recogida de 2 ml. Centrifugar durante 15 segundos a ≥8.000xg (≥10.000 rpm).
 5. Pasar el eluido a través de la columna una vez más. Centrifugar durante 15 segundos a ≥8.000xg (≥10.000 rpm). Eliminar el material que pasa a través de la columna como **residuos peligrosos y tirar el tubo de recogida.
 6. Transferir la columna de centrífuga a un nuevo tubo de recogida de 2 ml (proporcionado).
 - 15 7. Añadir 500 µl de tampón de lavado de ARNc de TIV y centrifugar durante 15 segundos a ≥8.000xg (≥10.000 rpm) para lavar. Eliminar el material que pasa a través de la columna.
 8. Pipetear 500 µl de etanol al 80% (v/v) sobre la columna y centrifugar durante 15 segundos a ≥8.000xg (≥10.000 rpm). Eliminar el material que pasa a través de la columna.
 9. Abrir la tapa de la columna y centrifugar durante 5 minutos a velocidad máxima (≤25.000 x g). Eliminar el material que pasa a través de la columna y el tubo de recogida.
 - 20 10. Transferir la columna a un nuevo tubo de recogida de 1,5 ml.
 11. Pipetear 11 µl de agua libre de ARNasas directamente dentro de la membrana de la columna. Dejar reposar durante 1 minuto. Centrifugar durante 1 minuto a velocidad máxima (≤25.000 x g) para eluir.
 12. Pipetear 10 µl de agua libre de ARNasas directamente dentro de la membrana de la columna. Dejar reposar durante 1 minuto. Centrifugar durante 1 minuto a velocidad máxima (≤25.000 x g) para eluir.
 - 25 **Cuantificación del ARNc (producto TIV)**

[0152] Utilizar el análisis espectrofotométrico para determinar el rendimiento de ARN. Aplicar la convención de que una unidad de D.O. a 260 nm equivale a 40 µg/ml de ARN.

[0153] Comprobar la DO a 260 nm y a 280 nm para determinar la concentración y pureza de la muestra.

[0154] Mantener la proporción A260/A280 próxima a 2,0 para el ARN puro (son aceptables proporciones de entre 1,9 y 2,1). Para la cuantificación del ARNc cuando se usa ARN total como material de partida, debería calcularse un rendimiento de ARNc ajustado que refleje el remanente de ARN total no marcado. Usando una estimación de un remanente del 100%, utilice la fórmula siguiente para determinar el rendimiento de ARNc ajustado:

Rendimiento de ARNc ajustado = ARNm – (ARNi total) (y)

ARNm = cantidad de ARNc medido tras TIV (µg)

35 ARNi total = cantidad inicial de ARN total (µg)

y = fracción de reacción de ADNc usando en TIV

Fragmentación del ARNc para la preparación objetivo

[0155] Para la fragmentación, utilizar la concentración de ARNc ajustada.

 1. Añadir 2 µl de tampón de fragmentación 5x para cada 8 µl de ARN más H₂O.
 - 40 20 µg de ARNc 1 a 32 µl
 - 5 veces de tampón de fragmentación 8 µl

Agua libre de ARNasa hasta 40 µl

Volumen total: 40 µl

2. Incubar a 94°C durante 30 minutos. Inmediatamente, colocar en hielo tras la incubación.

Preparación de la diana de hibridación

5 **[0156]**

1. Calentar los controles de hibridación eucariotas 20x y el Oligo B2 durante 5 minutos a 65°C. Kit control de hibridación eucariótica GeneChip de Affymetrix, nº900362 (para 150 rxns)

2. Agitar ligeramente, centrifugar a baja velocidad.

3. Mezcla estándar (asumiendo que la concentración de ARNc fragmentado es de 0,5 µg/µl):

10

Matriz convencional (µl)	Conc. Final
15 µg ARNc fragmentado 30	0,05 µg/µl
Oligo B2 (3 nM) 5	50 pM
Picos de control 20x 15 (Bio B, C, B, Cre)	1,5, 5, 15, 100 pM
ADN de esperma de arenque 3	0,1 mg/ml
BSA acetilada 3	0,5 mg/ml
ADN cot-1 Hu (1m /ml) 30	0,1 mg/ml
Tampón de hibridación MES 2x 150	1 vez
H ₂ O 64	
Volumen final 300	

4. Alicuotar 270 µl de mezcla principal en tubos y añadir 30 µl de ARNc fragmentado a cada uno. Esta es la mezcla de hibridación.

5. Equilibrar la matriz de sondas a temperatura ambiente inmediatamente después de su uso.

15 6. Rellenar la matriz de sondas con tampón de hibridación MES 1x e incubar en el horno de cocina durante 10 minutos a 45°C, 60 rpm.

7. Calentar la mezcla de hibridación en un baño a 99°C durante 5 minutos.

8. Transferir la mezcla de hibridación a un baño a 45°C durante 5 minutos.

9. Centrifugar la mezcla de hibridación durante 5 minutos a velocidad máxima.

20 10. Eliminar el tampón de hibridación MES 1x de las matrices de sondas.

11. Rellenar la matriz de sondas con los 200 µl superiores de la mezcla de hibridación.

12. Sellar los septos con Tough-Spots.

13. Hibridar la matriz de sondas a 45°C, 60 RPM durante 19 horas.

14. Lavar, teñir y escanear la matriz de sondas según los protocolos de Affymetrix.

25 **Materiales de Affymetrix**

[0157]

Artículo Casa comercial Nº de catálogo

cebador T7-(dT)₂₄ cliente Biosearch Technologies

Puntos de control internos

Superscript II/Tampón de la primera cadena 5x/DTT 0,1 M Invitrogen 18064-014

Tampón de la segunda cadena 5X Invitrogen 10812-014

5 dNTP 10 mM Invitrogen 18427-088

ADN ligasa de *E. coli* a 10 U/μl Invitrogen 18052-019

ADN polimerasa de *E. coli* a 10 U/μl Invitrogen 18010-025

ARNasa H a 2U/μl Invitrogen 18021-071

ADN polimerasa de T4 a 10 U/μl Invitrogen 18005-025

10 EDTA 0,5 M Sigma E-7889

Kit de marcaje del ARN transcripto de alto rendimiento ENZO de Affimetrix o ENZO 900182 (ENZO)

Módulo de limpieza de la muestra de GeneChip Affymetrix 900371

Albúmina de suero bovino (BSA) acetilada Invitrogen 15561-020

IgG de cabra – grado de reactivo Sigma I-5256

15 Anticuerpo anti-estreptavidina (cabra) biotilado Vector Labs BA-0500

R-ficoeritrina estreptavidina Molecular Probes S-866

SSPE 20x BioWhittaker 51214

Kit de control eucariótico Affymetrix 900362

Agua, grado biológico molecular Ambion 9934

20 ADN Cot-1 humano Roche 1-581-074

NaCl libre de ARNasas y ADNasas 5 M Ambion 9760

Antiespumante 0-30 Sigma A-8082

Tween-20 al 10% Pierce Chemical 28320

MES monohidrato sin ácido Sigma M5287

25 MES sal sódica Sigma M3885

EDTA sal disódica, solución 0,5 M Sigma E7889

Tough Spots, etiquetas adhesivas con forma de puntos USA Scientific 9902

Horno para hibridación de GeneChip mod. 640 Affymetrix 800139

Escáner 3000w/puesto de trabajo de GeneChip Affimetrix 00-0074

30 Estación de fluidos Affymetrix 00-0081

Cargador automático con lector de códigos de barras externo Affymetrix 00-0129

PCR cuantitativa

Síntesis de ADNc:

[0158]

Componente	Volumen (µl)
10 veces Tampón TA	10
25 veces Mezcla de dNTP	4
10 veces cebadores aleatorios	10
MultiScribe TA (50 U/µl)	5
H ₂ O libre de ARNasas	21
ARN (100 ng)	50
Volumen final	100

Condiciones de incubación:

[0159]

5 25° durante 10 minutos

37° durante 2 horas

Reacción TaqMan usando el detector de secuenciación Prism 7700 de ABI:

[0160]

Componente	Volumen (µl)
Mezcla principal para PCR universal Taqman	25
Sonda TaqMan (20 veces) (Assays-on-Demand™)	2,5
ADNc (100 ng)	2
H ₂ O	20,5
Volumen final	50

10

Condiciones de ciclado térmico

[0161]

95° durante 10 minutos

40 ciclos: 95° durante 15 segundos

15 60° durante 1 minutos

- Sondas TaqMan: Assays-on-Demand™ (sondas MGB Taqman®, marcadas con colorante FAMTM)
- La amplificación del control endógeno, GAPDH (concentración de la sonda 100 nM, concentraciones de cebadores directo e inverso 200 nM) se realizó para estandarizar la cantidad de muestra de ARN (ADNc) añadida a cada reacción.

20 **[0162]** La cuantificación relativa se realizó usando el procedimiento de curva patrón. Para la cuantificación normalizada con respecto a un control endógeno, se prepararon curvas patrón tanto para la diana como para la referencia endógena. Para cada muestra experimental, se determinó la cantidad de diana y referencia endógena a partir de la curva patrón apropiada. A continuación, la cantidad de diana se dividió por la cantidad de referencia endógena para obtener un valor diana normalizado. Una de las muestras experimentales sirvió como calibrador o muestra 1x. Cada uno de los valores diana normalizado se dividió a continuación por el valor diana normalizado del calibrador para generar los niveles de expresión relativa.

25

Resultados experimentales:

[0163] Los experimentos se realizaron usando los procedimientos y materiales descritos anteriormente. Los resultados de estos experimentos se muestran en las figuras 5-9 como se describe a continuación.

5 **[0164]** En la figura 5 se proporciona una gráfica resumen de IC₅₀ de los datos del análisis de sensibilidad o resistencia a la actividad apoptótica de Apo2L (+ suero bovino fetal "SBF" al 0,5% o SBF al 10%) o del anticuerpo monoclonal frente a DR5 "Ac DR5", "XL" entrecruzado o sin entrecruzar, + suero bovino fetal "SBF" al 0,5% o SBF al 10%) obtenidos en líneas celulares de cáncer de pulmón no microcítico ("NSCLC") determinados en un ensayo de citotoxicidad MTT.

10 **[0165]** En la figura 6 se proporciona una gráfica resumen de IC₅₀ de los datos del análisis de sensibilidad o resistencia a la actividad apoptótica de Apo2L (+ suero bovino fetal "SBF" al 0,5% o SBF al 10%) o del anticuerpo monoclonal frente a DR5 "Ac DR5", "XL" entrecruzado o sin entrecruzar, + suero bovino fetal "SBF" al 0,5% o SBF al 10%) obtenidos en líneas celulares de cáncer pancreático determinados en un ensayo de citotoxicidad MTT.

15 **[0166]** En la figura 7 se proporciona una gráfica resumen de IC₅₀ de los datos del análisis de sensibilidad o resistencia a la actividad apoptótica de Apo2L (+ suero bovino fetal "SBF" al 10%) o del anticuerpo monoclonal frente a DR5 "Ac DR5", "XL" entrecruzado o sin entrecruzar, + suero bovino fetal "SBF" al 0,5%) obtenidos en líneas celulares de cáncer linfoma no Hodgkin ("LNH") determinados en un ensayo de citotoxicidad MTT.

[0167] En la figura 8 se proporciona una comparación de sensibilidad ("sen") o resistencia ("RES") de líneas de células de cáncer NSCLC, pancreático y LNH frente al anticuerpo anti DR5 y la correlación con la expresión de GalNac-T14, según se determina mediante la expresión del ARNm de GalNac-T14.

20 **[0168]** En la figura 9 se proporciona un diagrama de barras de diversas líneas celulares de NSCLC, pancreáticas y de LNH ordenadas (en orden descendiente) por niveles de patrones de expresión del ARNm de GalNac-T14.

25 **[0169]** El programa de muerte celular apoptótica tiene una función importante en el desarrollo y homeostasis de organismos multicelulares (Danial et al., Cell, 116:205 (2004)). Los estímulos intracelulares pueden desencadenar la apoptosis a través de la ruta intrínseca celular, que depende de los miembros de la superfamilia del gen Bcl-2 para activar la maquinaria de caspasas apoptóticas (Cory et al., Nat. Rev. Cancer, 2:647 (2002)). Determinadas citoquinas que pertenecen a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) pueden activar la apoptosis a través de la ruta celular extrínseca, interaccionando con algunos receptores que contienen un "dominio de muerte" (DM) que induce apoptosis funcional (Ashkenazi et al., Science, 281:1305 (1998)). El ligando de Fas (FasL) estimula la apoptosis a través de Fas (Apo1/CD95), mientras que el ligando Apo-2/ligando que induce la apoptosis relacionado con TNF (Apo2L/TRAIL) desencadena la apoptosis a través de DR4 (TRAIL-R1) y/o DR5 (TRAIL-R2) (LeBlanc et al., Cell Death Differ, 10:66 (2003)). Tras la unión a su ligando relacionado, estos receptores se unen a la molécula adaptadora FADD (dominio de muerte asociado a Fas), que recluta la caspasa 8 iniciadora de apoptosis para formar el complejo de señalización inductor de muerte (DISC) (véanse, por ejemplo, Kischkel et al., EMBO J., 14:5579 (1995); Kischkel et al., Immunity, 12:611 (2000)). La asociación con DISC estimula a la caspasa-8, que a su vez escinde y activa proteasas efectoras como las caspasas 3, 6 y 7 que ejecutan el programa de muerte apoptótica. En muchos tipos celulares, la interferencia con la ruta celular intrínseca puede amplificar adicionalmente la señal de muerte celular extrínseca (Scaffidi et al., J. Biol. Chem., 274:1541 (1999)). Apo2L/TRAIL induce apoptosis en diversos tipos de células tumorales con un efecto pequeño o nulo sobre tejidos normales, lo que sugiere que puede ser útil para el tratamiento del cáncer (véanse, por ejemplo, Ashkenazi, Nat. Rev. Cancer, 2:420 (2002); Kelley et al., Curr. Opin. Pharmacol., 4:333 (2004)). Las alteraciones en diversos componentes de las rutas de apoptosis pueden reducir la sensibilidad a Apo2L/TRAIL en líneas celulares cancerosas específicas (Igney et al., Nat. Rev. Cancer, 2:227 (2002)).

[0170] Se realizaron diversos experimentos según los procedimientos y protocolos establecidos a continuación y los datos se proporcionan en las figuras 10-15.

45 **[0171]** Para examinar la sensibilidad a la activación del receptor, se comprobó la supervivencia celular como función de la concentración de Apo2/TRAIL en un panel de líneas celulares cancerosas humanas, que incluía 23 adenocarcinomas de páncreas, 18 melanomas malignos y 36 adenocarcinomas colorrectales (figura 10A y datos no mostrados). En este análisis se clasificaron 29/77 (38%) de las líneas celulares como alta o moderadamente sensibles a Apo2L/TRAIL. La concentración de Apo2L/TRAIL requerida para alcanzar una muerte celular del 50% en estas 29 líneas celulares oscilaba de 3 a 800 ng/ml, con una media de 250 ng/ml.

50 **[0172]** También se examinó en el panel de líneas celulares el perfil de expresión génica, usando una micromatriz de 54.613 conjuntos de sondas génicas. Aunque con algunas excepciones, las líneas celulares de cáncer pancreático y melanoma que mostraban una sensibilidad fuerte o intermedia a Apo2L/TRAIL expresaban niveles significativamente más elevados de ARNm de la enzima de O-glucosilación ppGalNacT-14 que las correspondientes líneas celulares resistentes ($p=0,5 \times 10^{-4}$ por la prueba exacta de Fisher, punto de corte asignado de forma iterativa a 750 para carcinoma pancreática y 300 para melanoma) (fig. 10B). La mayoría de las líneas celulares de cancer colorrectal sensible a Apo2L/TRAIL mostraban una expresión alta de ARNm de la enzima de O-glucosilación ppGalNacT-3, aunque varias líneas celulares resistentes también expresaban este gen, lo que daba lugar a una

diferencia débil pero significativa ($p=0,026$, punto de corte asignado a 2.000) (fig. 10C, inferior). Las excepciones en el panel completo fueron: (a) 5/29 (17%) líneas celulares que eran sensitivas aún expresaban ppGalNacT-14 o ppGalNacT-3 por debajo de los niveles de corte; (b) 16/48 (33%) líneas celulares resistentes que, sin embargo, tenían niveles de ppGalNacT-14 o ppGalNacT-3 por encima del nivel de corte. Examinado la expresión de ARNm de otras enzimas de O-glucosilación en las líneas celulares colorrectales, se detectaron niveles más altos de Fut-6 en 10/12 (83%) líneas celulares sensibles en comparación con 6/24 (25%) resistentes ($p=0,013$; punto de corte asignado a 200) (fig. 10C, superior). La expresión combinada de ppGalNacT-14 en cáncer pancreático y melanoma con Fut-6 en líneas celulares de cáncer colorrectal se correlacionaba muy fuertemente con la sensibilidad a Apo2L/TRAIL ($p=1,83 \times 10^{-7}$, $N=77$). Este conjunto de genes predecía correctamente la sensibilidad o resistencia en 23/32 (72%) líneas celulares positivas para el marcador y en 39/45 (87%) líneas negativas para el marcador, respectivamente.

[0173] También se examinó la sensibilidad a Apo2L/TRAIL *in vivo* usando xenoinjertos de tumores. Un tratamiento con Apo2L/TRAIL de 5 días en los ratones portadores de tumores derivados de las líneas celulares de cáncer colorrectal positiva para Fut-6 Colo205 y DLD-1, causaba la regresión del tumor seguida de una progresión tumoral muy retardada (fig. 10D). Por el contrario, los tumores derivados de líneas celulares de cáncer colorrectal negativas para Fut-6 Colo320 y RKO no respondían a este tratamiento.

[0174] La incubación previa de la línea celular Colo 205 positivas para ppGalNacT-3/Fut-6 con bencil-GalNac, un inhibidor de la pan O-glucosiltransferasa, (Delannoy et al., Glycoconj., 13:717 (1996)) reducía notablemente la sensibilidad a Apo2L/TRAIL (fig. 11A) lo que sugería una relación funcional entre la O-glucosilación y la señalización de Apo2L/TRAIL. Para examinar esto adicionalmente, se usaron oligonucleótidos ARN(ic) de interferencia cortos específicos dirigidos frente al ARNm de ppGalNacT-14, ppGalNacT-3 o Fut-6. Para excluir los efectos no específicos, se sintetizaron múltiples ARNics no solapantes para cada gen y se verificó su capacidad para reducir la expresión objetivo mediante RT-PCR cuantitativa (fig. 14A). Se confirmó la especificidad del ARN ic adicionalmente con un mutante de ppGalNacT-14, plásmido que contenía 6 cambios de nucleótidos "silentes" dentro de la región diana de ARN ic (Editorial, Nat. Cell. Biol., 5:489 (2003)) (fig. 14B). La transfección de las líneas celulares de carcinoma pancreático PSN-1 y melanoma Hs294T positivas para ppGalNacT-14 con el ARN ic de ppGalNacT-14 reducía sustancialmente la sensibilidad a Apo2L/TRAIL, mientras que el ARN ic de caspasa-8, como se esperaba, proporcionaba esencialmente una protección completa (fig. 11B). De forma similar, la transfección de las células de cáncer colorrectal DLD-1 o C170 con ARN ic de GalNacT-3 o Fut-6 disminuía significativamente la sensibilidad a Apo2L/TRAIL (fig. 11C y fig. 14C). En resumen, el ARN ic de GalNacT-14 reducía la sensibilidad a Apo2L/TRAIL en 4/5 líneas celulares de cáncer de páncreas y en 2/2 de melanoma, mientras que los ARNics de ppGalNacT-3 o Fut-6 reducían ambos la sensibilidad en 2/3 líneas celulares de cáncer colorrectal. Por el contrario, la transfección de células PSN-1 o Hs294T con ARN ic de GalNacT-14 no alteraba la sensibilidad al inhibidor de la topoisomerasa II etoposido (fig. 14D). De forma similar, la transfección de células PSN-1 o C170 con el ARN ic de GalNacT-14 o GalNacT-3 no afectaba a la sensibilidad al inhibidor de la proteína quinasa de amplio espectro estaurosporina (fig. 14E). Puesto que tanto el etoposido como la estaurosporina estimulan la apoptosis a través de la ruta celular intrínseca (Wei et al., Science, 292:727 (2001)), estos estudios sugieren que las enzimas de O-glucosilación puede modular la señalización de la apoptosis a través de la ruta celular extrínseca.

[0175] La transfección de las células HEK293 con ppGalNacT-14 mostraba muerte celular cuando se transfectaba conjuntamente con DR4 o DR5, pero no con los receptores relacionados Fas y TNFR1 o el agonista de la ruta celular intrínseca Bax (fig. 11D). Adicionalmente, la transfección con ppGalNacT-14 aumentaba la sensibilidad a Apo2L/TRAIL de las líneas celulares resistentes de melanoma H1568 (fig. 11E) y carcinoma pancreático PA-TU-8902 y PL-45 (fig. 14F) pero no alteraba la sensibilidad al etoposido (datos no mostrados). En total, la sobreexpresión de GalNacT-14 sensibilizaba a 4/7 líneas celulares a Apo2L/TRAIL.

[0176] El efecto del silenciamiento con el ARN ic del ppGalNacT-14 o Fut-6 se examinó en el procesamiento de la caspasa inducido por Apo2L/TRAIL. En células PSN-1 y DLD-1 transfectadas con ARN ic control, Apo2L/TRAIL inducía esencialmente el procesamiento completo de la caspasa-8, lo que inducía la escisión de Bid, caspasa-9 y caspasa-3 (fig. 12A). La transfección con ARN ic de la caspasa-8 prevenía estos acontecimientos. El silenciamiento de ppGalNacT-14 en células PSN-1 o de Fut-6 en células DLD-1 también atenuaba notablemente el procedimiento inducido por Apo2L/TRAIL de la caspasa-8, Bid, caspasa-9 y caspasa-3 (fig. 12A) y la estimación de la actividad de las caspasas-3/7 (fig. 12B). Las líneas celulares de cáncer colorrectal RKO y SW1417 resistente a Apo2L/TRAIL que expresan niveles bajos de ppGalNacT-3 y Fut-6, mostraban un bloqueo similar a nivel del procesamiento de la caspasa-8 (fig. 15A). Por tanto, las enzimas de O-glucosilación pueden modular la ruta de Apo2L/TRAIL en etapas anteriores a los acontecimientos que llevan a la activación de la caspasa-8.

[0177] La activación de la caspasa-8 requiere el ensamblaje del DISC (Ashkenazi et al., Science, 281:1305 (1998)). El análisis del DISC de Apo2L/TRAIL (Kischkel et al., Immunity, 12:611 (2000)) en células PSN-1 y DLD-1 indicaba que el silenciamiento de ppGalNacT-14 y Fut-6 reducía el reclutamiento de FADD y de caspasa-8 al DISC, el procesamiento de DISC-unido a caspasa-8 y la estimulación de la actividad de la enzima caspasa-8 asociada a DISC (Sharp et al., J. Biol. Chem., 280:19401 (2005)) (fig. 12C, 12D y fig. 15B). Ninguno de los ARNics de ppGalNacT-14 o de Fut-6 alteraba sustancialmente la cantidad de DR4 y DR5 en el DISC, ni la unión dependiente de dosis de Apo2L/TRAIL a células PSN-1 o DLD-1, las cuales expresan tanto DR4 como DR5 (fig. 12C, fig. 15B y datos no mostrados). Por tanto, no parece que ppGalNacT-14 y Fut-6 modulen la apoptosis afectando a los niveles

del receptor en la superficie celular o a la unión a Apo2L/TRAIL. De acuerdo con esto, la sensibilidad a Apo2L/TRAIL en el panel de 77 líneas celulares no mostraba correlación significativa con expresión en la superficie celular de los receptores de señalización DR4 y DR5 relacionados o los receptores de reclamo DcR1 y DcR2 (datos no mostrados). Adicionalmente, la mayoría de los ARNic frente a ppGalNacT-14, ppGalNacT-3 o fut-6 no alteraban los niveles de DR4 y DR5 en células PSN-1, C170 o DLD-1 (fig. 15C). Dos ARNic no causaban una disminución detectable en DR4 y DR5 en determinadas líneas celulares (fig. 15C). Sin embargo, otros ARNic frente a las mismas enzimas inhibían la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL sin afectar a los niveles del receptor.

[0178] El dominio extracelular (DEC) del DR5 humano se expresó en células de ovario de hámster chino y se analizaron la proteína secretada purificada, sometida a hidrólisis ácida y los monosacáridos asociados (fig. 13A). De acuerdo con la ausencia de sitios de N-glucosilación previstos en la DEC del DR5, no se detectaron oligosacáridos unidos a asparragina. Sin embargo, dos muestras de 2 experimentos independientes mostraron 3 moles de GalNac y 3 moles de Gal por mol de DEC de DR5 (fig. 13A), lo que sugiere la modificación ligada a O de tres sitios en DR5 con el núcleo del polisacárido GalNac-Gal.

[0179] La O-glucosilación de proteínas modifica serinas o treoninas. Usando una herramienta bioinformática previamente establecida para predecir los posibles sitios de O-glucosilación (<http://www.cbe.dtu.dk/services/NetOGlyc>) (Julenius et al., *Glycobiology*, 15:153 (2005)), se identificaron dos de estas regiones en la secuencia de la DEC de las variantes de ajuste larga (DR5-L) y corta (DR5-S) del DR5 humano y un tercer sitio dentro de la región de ajuste alternativo (fig. 13B). El primer segmento de aminoácidos (74-77) contiene 3 serinas, el segundo (130-144) tiene 5 treonina, mientras que el tercero tiene 4 treoninas y 3 serinas. El DR5 murino tiene secuencias similares a los 2 primeros segmentos, con 2 serinas y 4 treoninas, respectivamente, mientras que el DR4 humano también tiene 2 secuencias similares que contiene 1 serina y 5 treoninas. Para comprobar si estos sitios podían ser importantes para la modificación postraducciona de DR5, se obtuvo un conjunto de mutantes de DR5L y DR5S, sustituyendo por alaninas cada una de las 5 treoninas del segmento 130-144 (DR5L-5T, DR5S-5T) o estas mismas 5 treoninas así como las 3 serinas del segmento 74-77 (DR5L-5T3S, DR5S-5T3S). La inmunotransferencia con un anticuerpo anti-DR5 de los lisados de células HEK293 transfectadas con DR5L o DR5S mostró la presencia de las bandas DR5L o DR5S previstas (fig. 13C). El anticuerpo también detectó bandas de DR5 de peso molecular (PM) superior, que fueron más abundantes tras la transfección conjunta de DR5L o DR5S con ppGalNacT-14 en comparación con el control (fig. 13C, asteriscos). La abundancia de estas bandas de más alto PM y su aumento por ppGalNacT-14 disminuían significativamente con DR5L-5T o DR5S-5T y prácticamente desaparecían con DR5L-5T3S o DR5S-5T3S, en comparación con las construcciones de tipo silvestre. Estos resultados sugieren que las bandas de más alto PM representan forma O-glucosiladas de DR5: ppGalNacT-14 promueve su formación y la eliminación progresiva de los sitios de O-glucosilación previstos mediante sustitución de alaninas revierte gradualmente este efecto. La transfección de células HEK293 con DR5 murino o DR4 humano, DR5L o DR5S mostraba muerte celular (fig. 13D); cada mutante de DR5 mostraba menos actividad que su construcción de tipo silvestre correspondiente, teniendo DR5S-5T3S (que carece de los tres sitios) la actividad más débil. La transfección conjunta con ppGalNacT-14 potenciaba notablemente la muerte celular por todas las construcciones de DR4 y DR5 excepto DR5S-5T3S, que mostraba significativamente menos actividad.

[0180] La mayoría de las muestras de tejido normal y tumoral de cánceres de piel, pulmón, páncreas, mama, ovario, endometrio y vejiga o de linfoma no Hodgkin mostraba una expresión del ARNm de ppGalNacT-14 por debajo de los valores de corte (determinado en 500 para la mayoría de los cánceres y en 200 para los cánceres de piel, fig. 13E). Sin embargo, un subgrupo significativo de las muestras tumorales, que oscilaba del 10% de los cánceres de mama lobulares al 30% de los cánceres pulmonares y linfomas difusos de células B grandes, mostró sobreexpresión de ppGalNacT-14. Algunas muestras de cáncer tenían niveles de expresión de ARNm más de 1.000 veces por encima de los tejidos normales correspondientes. La expresión dinámica de ppGalNacT-14 en cáncer sugiera que este gen, y posiblemente otras enzimas relacionadas, puede proporcionar biomarcadores útiles para identificar tumores con mayor sensibilidad a Apo2L/TRAIL.

[0181] Los O-glucanos muestran una amplia diversidad estructural y modulan diversos aspectos de la biología de las proteínas de la membrana plasmática, como conformación, agregación, tráfico, semivida así como adhesión y actividad de señalización (Hang et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 13:5021 (2005); Hanisch, *Biol. Chem.*, 382:143 (2001)). Las células cancerosas a menudo muestran alteraciones drásticas en los perfiles de O-glucanos, creando antígenos de hidratos de carbono exclusivos asociados al tumor (Brochkayusen, *Biochim. Biophys. Acta* 1437:67 (1999); Dube et al., *Nat. Rev. Drug Discovery*, 4:477 (2005); Fuster et al., *Nat. Rev. Cancer*, 5:526 (2005)). La O-glucosilación también tiene una función importante en la migración dirigida de las células tumorales a sitios específicos de metástasis (Fuster et al., *Cancer Res.*, 63:2775 (2003); Ohshima et al., *EMBO J.*, 18:1516 (1999); Takada et al., *Cancer Res.*, 53:354 (1993)). Un subgrupo significativo de muestras de tumores primarios de diversos cánceres humanos muestra una expresión elevada de la enzima de O-glucosilación ppGalNacT-14, incluyendo muestras de células de cáncer de colon y colorrectal, muestras de células de melanoma y muestras de células de condrosarcoma.

MÉTODOS

Materiales.

[0182] Los reactivos para cultivo celular se obtuvieron de Gibco (Invitrogen/Gibco, Carlsbad, CA), el Apo2L/TRAIL soluble no etiquetado se preparó como se describió anteriormente (Lawrence et al., Nat. Med., 7:383 (2001)), el inhibidor de O-glucosilación bencil-a-GalNac se obtuvo de Calbiochem y los demás productos químicos (incluidos etopósido y estaurosporina) se obtuvieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

Cultivos celulares y líneas celulares.

[0183] Las 119 líneas celulares de carcinomas humanos (consultar los datos complementarios sobre nombres y datos de catálogo) se obtuvieron de la ATCC o la DSMZ (Braunschweig, Alemania) y se cultivaron a 37°C y CO₂ al 5% en RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10%, L-glutamina 2 mM y HEPES 10 mM sin antibióticos como penicilina/estreptomicina. Las células renales embrionarias humanas 293 (número de catálogo CRL-1573) se obtuvieron de la ATCC y se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco al 100% suplementado con SBF al 10%. La línea celular CHO mutante para O-glucosilación, IdID CHO, fue patentada por el Dr. Monty Kreiger, MIT (Boston, MA).

Ensayos de viabilidad celular y ensayos de apoptosis

[0184] Para determinar la IC₅₀ de Apo2L/TRAIL, las células se dispusieron por triplicado en placas de 96 pocillos, se dejó que se adhirieran durante 24 horas y, a continuación, se trataron con Apo2L/TRAIL humano recombinante a concentraciones crecientes hasta 1.000 ng/ml. Después de 72 h de incubación, se sometieron a un ensayo de viabilidad (ensayo MTT (Pierce) o a un ensayo de viabilidad celular por luminiscencia CellTiter-Glo (Promega)) según el protocolo del fabricante. Cada experimento de viabilidad celular se repitió al menos tres veces en baja (0,5%) y alta (SBF al 10%) concentración de suero y la sensibilidad intermedia de las líneas celulares se definió mediante la viabilidad entre el IC₅₀ de los experimentos independientes o entre suero a baja y alta concentración. Una línea celular se definió como sensible en función de la inducción de apoptosis de al menos el 50% de las células a una concentración de Apo2L/TRAIL de 1 µg/ml y como sensibilidad intermedia en base a la variabilidad de la cantidad de apoptosis inducida en experimentos independientes o en presencia de baja (0,5%) frente a alta (10%) concentración de suero. La apoptosis se cuantificó mediante análisis citométrico del porcentaje medio de células recogidas (adherencia + flotando en el medio) teñidas con Anexina V (BD Pharmingen).

Hibridación de las micromatrices y análisis de datos.

[0185] El ARN celular total se preparó a partir de células no tratadas (3×10^6) usando el kit RNeasy (Qiagen). El ARNc marcado se preparó e hibridó con las micromatrices de oligonucleótidos (GeneChip U133P, Affymetrix Incorporated, Santa Clara, CA) como se describió previamente (Hoffman et al., Nat. Rev. Genetics, 5:299 (2004); Yauch et al., Clin. Cancer Res., 11:8686 (2005)). Los archivos de imágenes escaneadas se analizaron con GENECHIP 3.1 (Affymetrix), Spotfire, GenePattern y Cluster/TreeView. Para identificar los genes que se expresaban de forma más diferenciada entre líneas celulares sensibles y resistentes, se sometió a los valores de expresión génica a un filtro de variación que excluía genes con una variación mínima en las muestras analizadas comprobando un cambio de plegamiento y variación absoluta entre las muestras, comparando la proporción de máximo y mínimo (máx./mín.) y la diferencia entre máximo y mínimo (máx.-mín) con valores predefinidos y excluyendo genes que no cumplieran ambas condiciones.

Construcciones de expresión y transducción retroviral

[0186] Se clonó un fragmento de ADN que codifica ppGalNacT-14 a partir de una mezcla ADNc de líneas celulares sensibles a Apo2L/TRAIL y se insertó en el plásmido de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen) con una etiqueta Flag en el extremo N-terminal. Esta construcción se sometió a continuación a mutagénesis dirigida a sitio (kit de mutagénesis Quikchange, Stratagene) para generar mutantes silentes de ARNc que tenían de 4-6 alteraciones de pares de bases oscilantes en la secuencia homóloga al ARNc sin cambios en la secuencia de proteínas. Las mutaciones abarcaban una región de 10 pb en el centro del ARNc de 19 pb de la secuencia de unión. Las secuencias de ADN de DR5Largo y DR5Corto, DR4, receptor TRAIL murino, DR4 Fas (variante 1), TNFR1 y Bax (variante beta) se clonaron a partir de mezclas de ADNc y se insertaron en el vector de expresión pRK (Genentech). Se generaron mutantes de O-glucosilación de DR5L y DR5S mediante mutación específica de sitio de cuatro restos de treonina a alanina, Mut4xTA (T130, T131, T132, T135) y cinco restos de treonina a alanina Mut5xTA (T130, T131, T132, T135, T143). La transfección transitoria en células HEK293 con construcciones de expresión de moléculas proapoptóticas se realizó en placas de 6 pocillos a una concentración de 0,5 µg/pocillo de la molécula proapoptótica y 2,0 µg de ppGalNacT-14 o un control del vector. Las células se transfectaron usando Lipofectamina 2000 según el protocolo del fabricante. Después de una incubación de 48 h, las células se sometieron a análisis de apoptosis.

[0187] Para generar construcciones retrovirales, se clonaron ppGalNacT-14 y los mutantes en el vector retroviral pQCXIP (Clontech). Se generaron sobrenadantes con valores altos de retrovirales usando la línea celular auxiliar ΦNX-Ampho. Las células empaquetadas se transfectaron usando fosfato cálcico (Invitrogen). Se aislaron los sobrenadantes 48 h después de la transfección y se añadieron a células diana junto con 10 microgramos/ml de

polibreno, seguido de un paso de centrifugación de 1 h a 2.700 rpm para potenciar la infección. Tras la transducción, las células se sometieron a selección con puromicina a 2 microgramos/ml.

Diseño de ARNic y protocolos de transfección

- 5 **[0188]** Los ARNic frente a ppGalNacT-14, ppGalNacT-3, Caspasa-8 y DR5 fueron diseñados por Dharmacon (Lafayette, CO) usando sus criterios de selección de propiedad. Las secuencias seleccionadas fueron:

GalNacT-14ic (1): 5' GACCATCCGCGAGTGTATTA-dTdT 3' (=14-4) (SEC ID N ° 15)

GalNacT-14ic (2): 5' ATACAGATATGTTCCGGTGA-dTdT 3' (=14-6) (SEC ID N ° 16)

GalNacT-3ic (1): 5' CCATAGATCTGAACACGTT-dTdT 3' (=3-2) (SEC ID N ° 17)

- 10 GalNacT-3ic (2): 5' GCAAGGATATTATACAGCA-dTdT 3' (=3-7) (SEC ID N ° 18)

Fut-6 (1)ic 5' GUACCAGACACGCGCAUA-dTdT 3' (=6-1) (SEC ID N ° 19)

Fut-6ic (2) 5' ACCGAGAGGUCAUGUACAA-dTdT 3' (=6-2) (SEC ID N ° 20)

Caspasa-8ic: 5' GGACAAAGTTTACCAAATG-dTdT 3' (SE ID N ° 21)

- 15 **[0189]** Los ARNic se obtuvieron como oligonucleótidos de ARN de cadena doble y se transfectaron en las respectivas líneas celulares a una concentración final de 25 nM para cada ARNic. Se usaron como control ARNic dobles frente a una secuencia no diana (Dharmacon). Las células se transfectaron usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) mediante transfección inversa donde las células se añadieron en suspensión a complejos lípido-ARNic colocados previamente en placas. Las concentraciones de la Lipofectamina 2000 fueron según se indica en el protocolo del fabricante. Después de 48 h de incubación, se recogieron las células para el análisis del ARNm o se incubaron con Apo2L/TRAIL humano recombinante, etopósido o estaurosporina durante 24-72 horas para los ensayos de viabilidad y durante 4, 8 o 24 h para análisis de inmunotransferencia.
- 20

Inhibición de O-glucosilación con bencil-a-GalNac.

- 25 **[0190]** Las células Colo205 se crecieron en presencia de bencil-a-GalNac (2 mM o 4 mM) durante 72 horas. En este punto, se dispusieron en placas de 96 pocillos, se dejó que se adhirieran durante 24 horas mientras seguían en presencia del inhibidor. A continuación se estimularon con concentraciones crecientes de Apo2L/TRAIL como se indicó y se sometieron a un ensayo de viabilidad.

PCR cuantitativa.

- 30 **[0191]** Los niveles de expresión de las transcripciones de GalNacT-14 y GalNacT-3 se evaluaron mediante RT-PCR usando técnicas Taqman convencionales. Los niveles de transcripto se normalizaron con respecto al gen constitutivo GAPDH y los resultados se expresaron como valores de expresión normalizados (=2-DC^o). Los conjuntos cebador/sonda para el GalNacT-14 (N ° cat.: Hs00226180_m1_GT14), GalNacT-3 (N ° cat.: Hs00237084_m1_GT3) y GAPDH (N°. cat.: 402869) se obtuvieron de Applied Biosystems (Foster City, CA).

Inmunoprecipitación, análisis de inmunotransferencia y anticuerpos.

- 35 **[0192]** IP: Los anticuerpos monoclonales anti-Apo2L (2E11; N ° de acceso a ATCC HB-12256), anti-DR4 (3G1 y 4G7, N ° de acceso a ATCC PTA-99) y anti-DR5 (3H3, N°. de acceso a ATCC 12534, y 5C7) se obtuvieron en Genentech, Inc. usando proteínas de fusión receptor-Fc como antígenos. Los anticuerpos monoclonales anti-DR4 (4G7) y anti-DR5 (5C7), usados para inmunoprecipitar el DISC de Apo2L/TRAIL, se conjugaron a agarosa usando el kit de orientación ImmunoPure Protein G IgG Plus (N ° de catálogo 44990) de Pierce. Los anticuerpos monoclonales anti-DR4 (3G1) y anti-DR5 (3H3), usado para la inmunodetección de DR4/5 en las inmunoprecipitaciones de DISC, se biotinilaron usando el kit de biotinilación EZ-link Sulfo-NHS-LC (N°. de catálogo 21217) de Pierce. Apo2L/TRAIL etiquetado con FLAG se preparó y entrecruzó con anticuerpo M2 anti-FLAG (Sigma) como se ha descrito (Kischkel, Immunity, 12:611 (2000)). Estos experimentos se realizaron como se ha descrito previamente para los análisis Apo2L/TRAIL-FLAG + anti-FLAG DISC (Kischkel, *supra*). Los experimentos de inmunoprecipitación del DISC de DR4/5 también se realizaron como se ha descrito, excepto porque los anticuerpos monoclonales anti-DR4 (4G7) y anti-DR5 (5C7) se conjugaron directamente a la agarosa para la inmunoprecipitación (Sharp et al., J. Biol. Chem., 280:19401 (2005)).
- 40
- 45

- 50 **[0193]** IT: Se sembraron 5x10⁵ células por pocillo en placas de 6 pocillos. Para los experimentos de silenciamiento de ARNi, las células se trataron con ARNic diferentes durante 48 horas seguido de Apo2L/TRAIL durante 4, 8 o 24 h. Después de los periodos de tiempo indicados, las células se lavaron en PBS enfriado en hielo y se lisaron en tampón de lisis hipotónico que contenía Tritón X-100 al 1% (HEPES 20 mM, pH 7,5, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 1 mM y DTT 1 mM). Para cada muestra, se separaron 40 µg de proteína en condiciones reductoras en geles

de poliacrilamida en gradiente del 10-20% y en presencia de SDS. Tras transferir a membranas de nitrocelulosa (Schleicher y Schuell), estas membranas se incubaron durante 1 h con leche descremada en polvo al 10% seguido de una incubación de 1 h con los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo anti-caspasa 3 de cabra (1:1.000, R&D), anticuerpo anti-caspasa 8 de conejo (1:1.000, Pharmingen), anticuerpo 5B4 anti-caspasa 9 de ratón (1:1.000, MBL), anticuerpo anti-Bid de conejo (1:1.000, Pharmingen), anticuerpo anti-DR5 de conejo (1:500, Cayman) o anticuerpo anti-activa de cabra (1:200, Santa Cruz Biotechnology). Las membranas se lavaron cinco veces con TBS / Tween al 0,05% y, a continuación, se incubaron con el respectivo anticuerpo secundario purificado por afinidad y conjugado con peroxidasa (1:5.000, Biorad) durante 30 min. Las membranas se lavaron de nuevo cinco veces y se desarrollaron usando un potenciador de la quimioluminiscencia (ECL, Amersham) y se expusieron a películas Biomax de Kodak.

Citometría de flujo/análisis por FACS:

[0194] La expresión en superficie de los receptores de la familia del TNF DR4 y DR5 se determinó mediante separación de células activada por fluorescencia (FACS) usando un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA). Las células C170 y PSN-1, transfectadas con los ARNⁱ indicados durante 48 h, se marcaron con anticuerpo primario 4G7 (anti-DR4) o 3H3 (anti-DR5), o un anticuerpo control IgG de ratón, a 10 µg/ml, durante 1 h a 4°C. A continuación, las células se trataron con PBS y después se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con fluoresceína (FITC) (Jackson Laboratories) durante 30 min a 4°C. A continuación, las células se analizaron mediante citometría de flujo usando un citómetro de flujo FACS Calibur.

Ensayos de caspasas.

[0195] Las actividades de las caspasas 3/7 se probaron a 37°C en 40 µl de tampón de caspasa (HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, sacarosa al 10%, EDTA 1 mM, CHAPS al 0,1% y DTT 10 mM) que contenía 100 µM del péptido fluorogénico Ac-DEVD-AFC. La actividad se midió de forma continua durante el tiempo indicado mediante la liberación de AFC a partir de DEVD-AFC usando un fluorómetro de Molecular Devices en modo cinético y con un par de filtros de 405-510. Para la evaluación de la actividad caspasa se usaron 20 µg de proteína celular total (extractos en Tritón X-100) en 40 µl de tampón caspasa (que contenía DEVD-AFC 100 µM).

Análisis de hidratos de carbono de DR5 derivado de CHO.

[0196] La composición de monosacáridos del DR5 derivado de células CHO se obtuvo tras la hidrólisis con TFA 4 N. El análisis de los monosacáridos liberados se realizó en un sistema HPLC BioLC de Dionex usando cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución acoplado a un detector amperimétrico de pulsos.

Estudios en animales y de xenoinjertos s.c.

[0197] Ratones desnudos atímicos hembras (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EE. UU.) se aclimataron al animalario de Genentech durante un mínimo de 1 semana antes de su paso al estudio experimental. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Atención y Uso de Animales (IACAUC) de Genentech. Los ratones fueron inoculados s.c. con 5×10^6 células/ratón de Colo205, DLD-1 y RKO o 20×10^6 células/ratón de células de carcinoma de colon humano Colo320HSR (American Type Culture Collection). Las medidas del tumor se recogieron mediante un calibre digital y los volúmenes del tumor se calcularon usando la fórmula $\frac{4}{3} \pi \left(\frac{A}{2}\right) \left(\frac{B}{2}\right)^2$. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 150-200 mm³, los ratones se agruparon de forma aleatoria y se trataron con la administración intraperitoneal (i.p.) del vehículo o Apo2L/TRAIL 860 mg/kg/día los días 0-4.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para predecir la sensibilidad de una muestra de tejido o de células de cáncer de mamífero a Apo2L/TRAIL, comprendiendo el procedimiento examinar la muestra de tejido o de células para detectar la expresión de GalNac-T14, en el que la expresión de dicho GalNac-T14 es predictiva de que dicha muestra de tejido o de células es sensible a la actividad inductora de apoptosis de Apo2L/TRAIL.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha expresión de GalNac-T14 se examina mediante la detección de la expresión del ARNm de GalNac-T14.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha expresión de GalNac-T14 se examina mediante inmunohistoquímica.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende la etapa de examinar la expresión de los receptores DR4, DR5, DcR1 o DcR2 en dicha muestra de tejido o de células.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas células cancerosas o tejido canceroso son células o tejido pancreático, de linfoma, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer de colon, cáncer colorrectal, melanoma o condrosarcoma.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que dichas células cancerosas o tejido canceroso son células o tejido de cáncer de colon o colorrectal o pulmonar no microcítico.
7. Procedimiento para inducir la apoptosis en una muestra de tejido o una muestra de células de cáncer de mamífero que comprende:
examinar la muestra de tejido o la muestra de células para detectar la expresión de GalNac-T14, y
posteriormente, detectar la expresión de dicho GalNac-T14, exponiendo dicha muestra de tejido o muestra de células a una cantidad eficaz de Apo2L/TRAIL.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicha expresión de GalNac-T14 se examina analizando la expresión del ARNm de GalNac-T14.
9. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicha expresión de GalNac-T14 se examina mediante inmunohistoquímica.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que además comprende la etapa de examinar la expresión de los receptores DR4, DR5, DcR1 o DcR2 en dicha muestra de tejido o de células.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que dichas células cancerosas o tejido canceroso son células o tejido pancreático, de linfoma, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer de colon, cáncer colorrectal, melanoma o condrosarcoma.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que dichas células cancerosas o tejido canceroso son células o tejido de cáncer de colon o colorrectal o pulmonar no microcítico.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en el que dichas células se exponen a una cantidad eficaz de polipéptido Apo2L/TRAIL que comprende los aminoácidos 114-281 de la figura 1.
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en el que dichas células se exponen a una cantidad eficaz de polipéptido Apo2L/TRAIL que comprende los aminoácidos 41-281 de la figura 1 (SEC ID NO: 1) o un fragmento del mismo que tiene actividad apoptótica.
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, en el que dicho polipéptido Apo2L/TRAIL está unido a una molécula de polietilenglicol.
16. Uso de Apo2L/TRAIL en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un sujeto mamífero, en el que se ha determinado que una muestra de tejido o de células del sujeto expresa GalNac-T14 y la expresión de GalNac-T14 es predictiva de que dicha muestra de tejido o de células es sensible a la actividad inductora de apoptosis de Apo2L/TRAIL.
17. Uso de Apo2L/TRAIL según la reivindicación 16, en el que dicha expresión de GalNac-T14 se examina mediante la detección de la expresión del ARNm de GalNac-T14.
18. Uso de Apo2L/TRAIL según la reivindicación 16, en el que dicha expresión de GalNac-T14 se examina mediante inmunohistoquímica.
19. Uso de Apo2L/TRAIL según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, que además comprende la etapa de examinar la expresión de los receptores DR4, DR5, DcR1 o DcR2 en dicha muestra de tejido o células.

20. Uso de Apo2L/TRAIL según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que dichas células cancerosas o tejido canceroso comprenden células o tejido de cáncer pancreático, de linfoma, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer de colon, cáncer colorrectal, melanoma o condrosarcoma.
- 5 21. Uso de Apo2L/TRAIL según la reivindicación 20, en el que dichas células cancerosas o tejido canceroso son células o tejido de cáncer de colon o colorrectal o pulmonar no microcítico.
22. Uso de Apo2L/TRAIL según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en el que el polipéptido Apo2L/TRAIL comprende los aminoácidos 114-281 de la figura 1.
- 10 23. Uso de Apo2L/TRAIL según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, en el que dichas células se exponen a una cantidad eficaz de polipéptido Apo2L/TRAIL que comprende los aminoácidos 41-281 de la figura 1 (SEC ID No: 1) o un fragmento del mismo que tiene actividad apoptótica.
24. Uso de Apo2L/TRAIL según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que el Apo2L/TRAIL es para la administración con un agente o agentes quimioterapéuticos o radioterapia.
25. Uso de Apo2L/TRAIL según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 24, en el que el Apo2L/TRAIL es para la administración con una citoquina, agente citotóxico o agente inhibidor del crecimiento.
- 15 26. Uso de Apo2L/TRAIL según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 25, en el que dicho polipéptido Apo2L/TRAIL está unido a una molécula de polietilenglicol.
27. Apo2L/TRAIL para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer en un sujeto mamífero, en el que se ha determinado que una muestra de tejido o muestra de células del sujeto expresa GalNac-T14 y la expresión de GalNac-T14 es predictiva de que dicha muestra de tejido o muestra de células es sensible a la actividad inductora de apoptosis de Apo2L/TRAIL.
- 20 28. Apo2L/TRAIL para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer según la reivindicación 27, en el que dicha expresión de GalNac-T14 se examina mediante la detección de la expresión del ARNm de GalNac-T14.
29. Apo2L/TRAIL para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer según la reivindicación 27, en el que dicha expresión de GalNac-T14 se examina mediante inmunohistoquímica.
- 25 30. Apo2L/TRAIL para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer según la reivindicación 27 o la reivindicación 28, en el que se determina la expresión de los receptores DR4, DR5, DcR1 o DcR2 en dicha muestra de tejido o de células.
- 30 31. Apo2L/TRAIL para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 30, en el que dichas células cancerosas o tejido canceroso comprenden células o tejido de cáncer pancreático, de linfoma, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer de colon, cáncer colorrectal, melanoma o condrosarcoma.
32. Apo2L/TRAIL para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer según la reivindicación 31, en el que dichas células cancerosas o tejido canceroso son células o tejido de cáncer de colon o colorrectal o pulmonar no microcítico.
- 35 33. Apo2L/TRAIL para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 32, en el que el polipéptido Apo2L/TRAIL comprende los aminoácidos 114-281 de la figura 1.
34. Apo2L/TRAIL para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 32, en el que dichas células se exponen a una cantidad eficaz de polipéptido Apo2L/TRAIL que comprende los aminoácidos 41-281 de la figura 1 (SEC ID No: 1) o un fragmento del mismo que tiene actividad apoptótica.
- 40 35. Apo2L/TRAIL para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 34, en el que el Apo2L/TRAIL es para la administración con un agente o agentes quimioterapéuticos o radioterapia.
36. Apo2L/TRAIL para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 35, en el que el Apo2L/TRAIL es para la administración con una citoquina, agente citotóxico o agente inhibidor del crecimiento.
- 45 37. Apo2L/TRAIL para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 36, en el que dicho polipéptido Apo2L/TRAIL está unido a una molécula de polietilenglicol.
38. Uso in vitro de un anticuerpo o un polinucleótido para detectar la expresión de GalNac-T14 en una muestra de tejido o una muestra de células de mamífero para predecir la sensibilidad de una muestra de tejido o una muestra
- 50

de células de mamífero a Apo2L/TRAIL, en el que la expresión de dicho GalNac-T14 es predictiva de que dicha muestra de tejido o muestra de células es sensible a una actividad inductora de apoptosis de Apo2L/TRAIL.

39. Uso según la reivindicación 38, en el que dicha expresión de GalNac-T14 se examina mediante la detección de la expresión del ARNm de GalNac-T14.

5 40. Uso según la reivindicación 38, en el que dicha expresión de GalNac-T14 se examina mediante inmunohistoquímica para detectar la expresión de GalNac-T14.

41. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 38 a 40, en el que la detección además comprende examinar la expresión de los receptores DR4, DR5, DcR1 o DcR2 en dicha muestra de tejido o de células.

10 42. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 38 a 41, en el que dichas células cancerosas o tejido canceroso son células o tejido de cáncer de colon, colorrectal, pancreático, melanoma, linfoma, condrosarcoma o pulmonar no microcítico.

43. Uso según la reivindicación 42, en el que dichas células cancerosas o tejido canceroso son células o tejido de cáncer de colon o colorrectal o pulmonar no microcítico.

15 44. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 38 a 43, en el que dicho Apo2L/TRAIL es un polipéptido que comprende los aminoácidos 114-281 de la figura 1.

45. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 38 a 43, en el que dicho Apo2L/TRAIL es un polipéptido que comprende los aminoácidos 41-281 de la figura 1 (SEC ID No: 1) o un fragmento biológicamente activo del mismo que tiene actividad apoptótica.

FIG. 1

```

1 ATGGCGCCAC CACCAGCTAG AGTACATCTA GGTGCGTTCC TGGCAGTGAC
TACCGCGGTG GTGGTCGATC TCATGTAGAT CCACGCAAGG ACCGTCAGTG
1 MetAlaProP roProAlaAr gValHisLeu GlyAlaPheL euAlaValTh

51 TCCGAATCCC GGGAGCGCAG CGAGTGGGAC AGAGGCAGCC GCGGCCACAC
AGGCTTAGGG CCCTCGCGTC GCTCACCCCTG TCTCCGTCGG CGCCGGTGTG
rProAsnPro GlySerAlaA laSerGlyTh rGluAlaAla AlaAlaThrPro

101 CCAGCAAAGT GTGGGGCTCT TCCGCGGGGA GGATTGAACC ACGAGGCGGG
GGTCGTTTCA CACCCCGAGA AGGCGCCCTT CCTAACTTGG TGCTCCGCCC
35 SerLysVa lTrpGlySer SerAlaGlyA rgIleGluPr oArgGlyGly

151 GGCCGAGGAG CGCTCCCTAC CTCCATGGGA CAGCACGGAC CCAGTGCCCG
CCGGCTCCTC GCGAGGGATG GAGGTACCCT GTCGTGCCTG GGTCACGGGC
GlyArgGlyA laLeuProTh rSerMetGly GlnHisGlyP roSerAlaArg

201 GGCCCGGGCA GGGCGCGCCC CAGGACCCAG GCCGGCGCGG GAAGCCAGCC
CCGGGCCCCG CCGCGCGCGG GTCCTGGGTC CGGCCGCGCC CTTCGGTCCG
68 AlaArgAla GlyArgAlaP roGlyProAr gProAlaArg GluAlaSerP

251 CTCGGCTCCG GGTCCACAAG ACCTTCAAGT TTGTCGTCGT CGGGGTCCTG
GAGCCGAGGC CCAGGTGTTC TGGAAAGTTCA AACAGCAGCA GCCCCAGGAC
roArgLeuAr gValHisLys ThrPheLysP heValValVa lGlyValLeu

301 CTGCAGGTCG TACCTAGCTC AGCTGCAACC ATGATCAATC AATTGGCACA
GACGTCCAGC ATGGATCGAG TCGACGTTGG TAGTTTGAAG TACTAGTTAG
101 LeuGlnValV alProSerSe rAlaAlaThr IleLysLeuH isAspGlnSe

351 AATTGGCACA CAGCAATGGG AACATAGCCC TTTGGGAGAG TTGTGTCCAC
TTAACCGTGT GTCGTTACCC TTGTATCGGG AAACCTCTC AACACAGGTG
rIleGlyThr GlnGlnTrpG luHisSerPr oLeuGlyGlu LeuCysProPro

401 CAGGATCTCA TAGATCAGAA CGTCCTGGAG CCTGTAACCG GTGCACAGAG
GTCCTAGAGT ATCTAGTCTT GCAGGACCTC GGACATTGGC CACGTGTCTC
135 GlySerHi sArgSerGlu ArgProGlyA laCysAsnAr gCysThrGlu

451 GGTGTGGGTT ACACCAATGC TTCCAACAAT TTGTTTGCTT GCCTCCCATG
CCACACCCAA TGTGGTTACG AAGGTTGTTA AACAAACGAA CGGAGGGTAC
GlyValGlyT yrThrAsnAl aSerAsnAsn LeuPheAlaC ysLeuProCys

501 TACAGCTTGT AAATCAGATG AAGAAGAGAG AAGTCCCTGC ACCACGACCA
ATGTCGAACA TTAGTCTAC TTCTTCTCTC TTCAGGGACG TGGTGCTGGT
168 ThrAlaCys LysSerAspG luGluGluAr gSerProCys ThrThrThrA

551 GGAACACAGC ATGTCAGTGC AAACCAGGAA CTTTCCGGAA TGACAATTCT
CCTGTGTGCG TACAGTCACG TTTGGTCCTT GAAAGGCCTT ACTGTTAAGA
rgAsnThrAl aCysGlnCys LysProGlyT hrPheArgAs nAspAsnSer

601 GCTGAGATGT GCCGGAAGTG CAGCACAGGG TGCCCCAGAG GGATGGTCAA
CGACTCTACA CGGCTTCAC GTCGTGTCCC ACGGGGTCTC CCTACCAGTT
201 AlaGluMetC ysArgLysCy sSerThrGly CysProArgG lyMetValLy

651 GGTCAAGGAT TGACGCCCTT GGAGTGACAT CGAGTGTGTC CACAAAGAAT
CCAGTTCCTA ACATGCGGGA CCTCACTGTA GCTCACACAG GTGTTTCTTA
sValLysAsp CysThrProT rpSerAspIl eGluCysVal HisLysGluSer

```

FIG. 2A

```

701 CAGGCAATGG ACATAATATA TGGGTGATTT TGGTTGTGAC TTTGGTTGTT
GTCCGTTACC TGTATTATAT ACCCACTAAA ACCAACACTG AAACCAACAA
235 GlyAsnGl yHisAsnIle TrpValIleL euValValTh rLeuValVal

751 CCGTTGCTGT TGGTGGCTGT GCTGATTGTC TGTGTGTGCA TCGGCTCAGG
GGCAACGACA ACCACCGACA CGACTAACAG ACAACAACGT AGCCGAGTCC
ProLeuLeuL euValAlaVa lLeuIleVal CysCysCysI leGlySerGly

801 TTGTGGAGGG GACCCCAAGT GCATGGACAG GGTGTGTTTC TGGCGCTTGG
AACACCTCCC CTGGGGTTCA CGTACCTGTC CCAGACAAAG ACCCGGAACC
268 CysGlyGly AspProLysC ysMetAspAr gValCysPhe TrpArgLeuG

851 GTCTCCTACG AGGGCCTGGG GCTGAGGACA ATGCTCACAA CGAGATTCTG
CAGAGGATGC TCCCGGACCC CGACTCCTGT TACGAGTGTT GCTCTAAGAC
lyLeuLeuAr gGlyProGly AlaGluAspa snAlaHisAs nGluIleLeu

901 AGCAACGCAG ACTCGCTGTC CACTTTCGTC TCTGAGCAGC AAATGGAAAG
TCGTTGCGTC TGAGCGACAG GTGAAAGCAG AGACTCGTCG TTTACCTTTC
301 SerAsnAlaA spSerLeuSe rThrPheVal SerGluGlnG lnMetGluSe

951 CCAGGAGCCG GCAGATTTGA CAGGTGTCAC TGTACAGTCC CCAGGGGAGG
GGTCCCTCGC CGTCTAAACT GTCCACATGT ACATGTCAGG GGTCCCCTCC
rGlnGluPro AlaAspLeuT hrGlyValTh rValGlnSer ProGlyGluAla

1001 CACAGTGTCT GCTGGGACCG GCAGAAGCTG AAGGGTCTCA GAGGAGGAGG
GTGTCACAGA CGACCCTGGC CGTCTTCGAC TTCCCAGAGT CTCTCCTCC
335 GlnCysLe uLeuGlyPro AlaGluAlaG luGlySerGl nArgArgArg

1051 CTGCTGGTTC CAGCAAATGG TGCTGACCCC ACTGAGACTC TGATGCTGTT
GACGACCAAG GTCGTTTACC ACGACTG3GG TGACTCTGAG ACTACGACAA
LeuLeuValP roAlaAsnGl yAlaAspPro ThrGluThrL euMetLeuPhe

1101 CTTTGACAAG TTTGCAAACA TCGTGCCCTT TGACTCCTGG GACCAGCTCA
GAAACTGTTC AAACGTTTGT AGCACGGGAA ACTGAGGACC CTGGTCGAGT
368 PheAspLys PheAlaAsnI leValProPh eAspSerTrp AspGlnLeuM

1151 TGAGGCAGCT GGACCTCACG AAAAATGAGA TCGATGTGGT CAGAGCTGGT
ACTCCGTCGA CCTGGAGTGC TTTTACTCT AGCTACACCA GTCTCGACCA
etArgGlnLe uAspLeuThr LysAsnGluI leAspValVa lArgAlaGly

1201 ACAGCAGGCC CAGGGGATGC CTTGTATGCA ATGCTGATGA AATGGGTCAA
TGTCGTCCGG GTCCCCTACG GAACATACGT TACGACTACT TTACCCAGTT
401 ThrAlaGlyP roGlyAspAl aLeuTyrAla MetLeuMetL ysTrpValAs

1251 CAAAACCTGGA CGGAACGCCT CGATCCACAC CCTGCTGGAT GCCTTGAGGA
GTTTTGACCT GCCTTGCGGA GCTAGGTGTG GGACGACCTA CGGAACCTCT
nLysThrGly ArgAsnAlaS erIleHisTh rLeuLeuAsp AlaLeuGluArg

1301 GGATGGAAGA GAGACATGCA AAAGAGAAGA TTCAGGACCT CTTGGTGGAC
CCTACCTTCT CTCTGTACGT TTCTCTTCT AAGTCCTGGA GAACCACCTG
435 MetGluGl uArgHisAla LysGluLysI leGlnAspLe uLeuValAsp

1351 TCTGGAAAGT TCATCTACTT AGAAGATGGC ACAGGCTCTG CCGTGTCTTT
AGACCTTTCAGTAGATGAA TCTTCTACCG TGTCCGAGAC GGCACAGGAA
SerGlyLysP heIleTyrLe uGluAspGly ThrGlySerA laValSerLeu

1401 GGAGTGA
CCTCACT
468 GluOP*

```

FIG. 2B

1 MEQRGQNA~~P~~AASGARKRHGPGPREARGARPG~~L~~RVPKTLVLVVA~~A~~VLLLVSAESALITQQD
 61 LAPQORAAPQ~~Q~~KRSSPSEGLCPPGHHISEDGRDCISCKYGDYSTHWNDLLFCLRCTRCD
 121 SGEVELSPCTTT~~R~~NTVCQCEEGTFREEDSP~~E~~MCRKCR~~T~~GCPRGMVKVGDCTP~~W~~SDIECVH
 181 KE~~S~~GIIIGVTVA~~A~~VVLIVAVFVCKSLL~~W~~KKVLPY~~L~~KGICSGGGGDP~~E~~RVDRSSQRPGAED
 241 NVLNEIVSILQPTQVPEQEME~~V~~QEP~~A~~EPTGVNMLSPGESEHLL~~E~~PAEAERSQRRLLVPA
 301 NEGDPTE~~T~~LRQCFDDFADLV~~P~~FD~~S~~WEPLMRKLG~~L~~MDNEIKVAKAEAAGHRDTLYT~~M~~L~~I~~KW
 361 VNKTGRDASVHTLLDALET~~L~~GERLAKQK~~I~~EDHLLSSGKFMYLEGNADSALS

FIG. 3A

Met	Glu	Gln	Arg	Gly	Gln	Asn	Ala	Pro	Ala	Ala	Ser	Gly	Ala	Arg	Lys	1	5	10	15
Arg	His	Gly	Pro	Gly	Pro	Arg	Glu	Ala	Arg	Gly	Ala	Arg	Pro	Gly	Pro	20	25	30	
Arg	Val	Pro	Lys	Thr	Leu	Val	Leu	Val	Val	Ala	Ala	Val	Leu	Leu	Leu	35	40	45	
Val	Ser	Ala	Glu	Ser	Ala	Leu	Ile	Thr	Gln	Gln	Asp	Leu	Ala	Pro	Gln	50	55	60	
Gln	Arg	Ala	Ala	Pro	Gln	Gln	Lys	Arg	Ser	Ser	Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	65	70	75	80
Cys	Pro	Pro	Gly	His	His	Ile	Ser	Glu	Asp	Gly	Arg	Asp	Cys	Ile	Ser	85	90	95	
Cys	Lys	Tyr	Gly	Gln	Asp	Tyr	Ser	Thr	His	Trp	Asn	Asp	Leu	Leu	Phe	100	105	110	
Cys	Leu	Arg	Cys	Thr	Arg	Cys	Asp	Ser	Gly	Glu	Val	Glu	Leu	Ser	Pro	115	120	125	
Cys	Thr	Thr	Thr	Arg	Asn	Thr	Val	Cys	Gln	Cys	Glu	Glu	Gly	Thr	Phe	130	135	140	
Arg	Glu	Glu	Asp	Ser	Pro	Glu	Met	Cys	Arg	Lys	Cys	Arg	Thr	Gly	Cys	145	150	155	160
Pro	Arg	Gly	Met	Val	Lys	Val	Gly	Asp	Cys	Thr	Pro	Trp	Ser	Asp	Ile	165	170	175	
Glu	Cys	Val	His	Lys	Glu	Ser	Gly	Thr	Lys	His	Ser	Gly	Glu	Ala	Pro	180	185	190	
Ala	Val	Glu	Glu	Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Ser	Pro	195	200	205	
Cys	Ser	Leu	Ser	Gly	Ile	Ile	Ile	Gly	Val	Thr	Val	Ala	Ala	Val	Val	210	215	220	
Leu	Ile	Val	Ala	Val	Phe	Val	Cys	Lys	Ser	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Val	225	230	235	240
Leu	Pro	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ile	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp	Pro	Glu	245	250	255	
Arg	Val	Asp	Arg	Ser	Ser	Gln	Arg	Pro	Gly	Ala	Glu	Asp	Asn	Val	Leu	260	265	270	
Asn	Glu	Ile	Val	Ser	Ile	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Val	Pro	Glu	Gln	Glu	275	280	285	

FIG. 3B

Met 290	Glu	Val	Gln	Glu	Pro	Ala 295	Glu	Pro	Thr	Gly	Val 300	Asn	Met	Leu	Ser
Pro 305	Gly	Glu	Ser	Glu	His 310	Leu	Leu	Glu	Pro	Ala 315	Glu	Ala	Glu	Arg	Ser 320
Gln	Arg	Arg	Arg	Leu 325	Leu	Val	Pro	Ala	Asn 330	Glu	Gly	Asp	Pro	Thr 335	Glu
Thr	Leu	Arg	Gln 340	Cys	Phe	Asp	Asp	Phe 345	Ala	Asp	Leu	Val	Pro 350	Phe	Asp
Ser	Trp	Glu 355	Pro	Leu	Met	Arg	Lys 360	Leu	Gly	Leu	Met	Asp 365	Asn	Glu	Ile
Lys 370	Val	Ala	Lys	Ala	Glu	Ala 375	Ala	Gly	His	Arg	Asp 380	Thr	Leu	Tyr	Thr
Met 385	Leu	Ile	Lys	Trp	Val 390	Asn	Lys	Thr	Gly	Arg 395	Asp	Ala	Ser	Val	His 400
Thr	Leu	Leu	Asp	Ala 405	Leu	Glu	Thr	Leu	Gly 410	Glu	Arg	Leu	Ala	Lys 415	Gln
Lys	Ile	Glu	Asp 420	His	Leu	Leu	Ser	Ser 425	Gly	Lys	Phe	Met	Tyr 430	Leu	Glu
Gly	Asn	Ala 435	Asp	Ser	Ala	Met	Ser 440	*							

FIG. 3C

1 GCTGTGGAA CCTCTCCAG CGACGAACT CAGCCAAAG TTTCTATAG ATTTTGGGA GTTGACACAG AGATGAAG GGTGAAGAG CGTTCTCTAC
 CGACACCTT GGAGAGGTGC GCGTGCTTGA GTGGTTGCT AAAGACTATC TAAAAACCTT CAACCTGCTC CCACCTCTCC GCGAAGGATG
 101 CTTAGGGAA CTCTGGGGAC AGAGCGCCCC GCGCGCTGA TGGCCGAGGC AGGTGCGAC CCAGGACCCA GGACGGCGTC GGAACCATTA CCATGGCCCCG
 GCAATCCCTT GAGACCCCTG TCTCGCGGG TCTCGCGGG CCGCGGACT ACCGGCTCG TCCACGGCTG GGTCTGGGT CCTGCGCAG CCCTTGGTAT GGTACCGGGC
 1 MetalAlaArg
 201 CATCCCCAAG ACCCTAAAGT TCGTGTGCTG CATCGTGGG GTCTGTGTC CACTCTGTC TTACTCTGC ACCACTGCC GCGAGGAGGA AGTTCCCCCAG
 CPAGGGGTTT TGGGATTCA AGCAGCAGCA GPAGCAGCG CAGGACAGC GTACGATCG ATGACAGCG TGGTACGGG CCGTCTCTCT TCAAGGGGTC
 4 IleProLys ThrLeuLys heValValVa lIleValAla ValLeuLeuP roValLeuAl aTySerAla ThrThrAlaA rGlnGluGln uValProGln
 301 CACACAGTG CCCACAGCA ACAGAGGCAC ACCTTCAAG GGGAGGAGTG TCCAGCAGGA TCTCATAGAT CAGAACATAC TGGAGCCTGT AACCCGTGCA
 GTCTGTCACC GGGGTGCTGT TGTCTCCGTG TCGAAGTTC TCGTCTCAC CCTCTCTCAC AGGTGCTCT AGAGTATCTA GTCTGTATG ACCTCGACA TTGGGCACGT
 37 GlnThrVala laProGlnG l nGlnArgHis SerPheLysG lyGluGluCy sProAlaGly SerHisArgS erGluHisTh rGlyAlaCys AsnProCysThr
 401 CACAGGGTGT GGATTACACC AACGCTTCCA ACAATGAACC TTCTTGCTTC CCAATGTACAG TTTGTAAATC AGATCAAAA CATAAAGTT CCTGCACCAT
 GTCTCCCA CA CCTAATGTGG TTGCAAGGT TGTACTTGG AAGAACAAG GGTACATGTC AAACATTAG TCTAGTTTTT GTATTTTCAA GGAGTGGTA
 71 GluGlyVa lAspTyThr AsnAlaSerA snAsnGluP r oSerCysPhe ProCysThrV a lCysLysSe rAspGlnLys HisLysSerS erCysThrMet
 501 GACCAGAGAC ACAGTGCTC AGTCTAAAGA AGGCACCTTC CGGAATGAAA ACTCCCCAGA GATGTGCCGG AAGTGTAGCA GGTGCCCTAG TGGGCAAGTC
 CTGGTCTCTG TGTACACAG TCACATTCTT TCGGTGGAAG GCCTTACTTT TGAGGGGTCT CTACACGGCC TTACATCGT CCACGGGATC ACCCCTCAG
 104 ThrArgasp ThrValcysG l nCysLysG l uGlyThrPhe ArgAsnGluA snSerProG l uMetCysArg LysCysSerA rGysProse rGlyGluVal
 601 CAAGTCAGTA ATTGTACGTC CTGGATGAT ATCCAGTGTG TTGAAGAATT TGCTGCCAAT GCCACTGCG AAACCCAGC TGCTGAAGAG ACAATGAACA
 GTTCAGTCAT TAACATCCAG GACCTACTA TAGGTACAC AACTTCTTAA ACCACGGTTA CCGTGACACC TTGCGGGTGG ACGACTTCTC TGTACTTGT
 137 GlnValserA snCysThrSe rTrpAspAsp lIeGlnCysV a lGluGluPh eGlyAlaAsn AlaThrValG luThrProAl aAlaGluGlu ThrMetAsnThr
 701 CCAGCCCGGG GACTCCTGCC CCAGTGTCTG AAGAGACAAT GAACACAGC CAGGGGACTC CTGCCCCAGC TGCTGAAGAG ACAATGACCA CCAGCCCGGG
 GGTCGGGGCC CTGAGGAGCG GGTGACGAC TTCTCTGTTA CTGTGCTCG GGTCCCTGAG GACGGGCTCG ACGACTTCTC TGTACTTGT GGTGGGGCCC
 171 SerProG l yThrProAla ProAlaAlaG luGluThrMe tAsnThrSe rProGlyThrP roAlaProAl aAlaGluGlu ThrMetThrT hrSerProGly

FIG. 3D-1

```

801 GACTCTGTC CCAGCTGCTG AAGAGACAAAT GACCACACAGC CCGGGGACTC TGCTGAAGAG ACAATGACCA CCAGCCCGGG GACTCTCTGCC
CTGAGGACGG GCTGACGAC TCTCTCTGTA CTGCTGCTG GCGCCCTGAG GACGGGTGCG ACGACTTCTC TGTTACTGCT GGTGCGGGCC CTGAGGACGG
204 ThrProala ProalaAla luGluThrMe tThrThrSer ProGlyThrP roAlaProAl aAlaGluGlu ThrMetThrT hrSerProGl yThrProAla
901 TCTTCTCATT ACCTCTCATG CACCATCGTA GGGATCATAG TTCTAATTGT GCTTCGATT GTGTTTGT TT GAAAGACTTC ACTGTGGAAG AAATTCTCTC
AGAAGAGTAA TGGAGAGTAC GTGGTAGCAT CCTAGTATC AGATTAAACA CGAAGACTAA CACAACAAA CTTTCTGAAG TGACACCTTC TTAAAGGAAG
237 SerSerHis tYrLeuSerCy sThrIleVal GlyIleIleVal lleuLeuIle ValPheVal
1001 CTTACTGAA AGGTTGAGT AGGCGTGGC TGAGGGCGGG GGGCGTGA CACTCTGTC CCGCTCTCC TCTGCTGCT TCCACAGAC AGAAACGGCT
GAATGGACTT TCCAAGTCCA TCCGGGACCG ACTCCGGCC CCGCGACCT GTGAGAGACG GGACGGAGGG AGACGACACA AGGTGTCTG TCTTGGCGGA
1101 GCCCTGCCC CAAAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA
CGGGACGGG GTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT
1 GCTGTGGAA CTTCTCCAG CGCAGAACT CAGCCACGA TTCTGTATG ATTTTGGGA GTTTGACCAG AGATGCAAG GGTGAAGGAG CGCTTCTCTAC
CGACACCTT GGAGAGGTGC GGTGCTTGA GTGCTGTGCT AAGACTATC TAAACCCCT CAATCTGTC TCTACGTTCC CCACTCTCTC CGAAGGATG
MetGlnI yValLysGlu ArgPheLeuPro
-40
101 CGTTAGGAA CTCTGGGAC AGAGCGCCC GGCCGCTGA TGCCCGAGG AGGTGCGAC CCAGGACCCA GGACGGGCTC GGAACCATTA CCATGGCCCG
GCAATCCCTT GACACCCCTG TCTCGGGGG CCGGGGACT ACCGGCTCG TCCACGCTG GGTCTGGGT CCTGCCGAG CCTGTGGTAT GGTACCGGGC
-30 LeuGlyAs nserGlyAsp ArgAlaProA rgProProAs pGlyArgGly ArgValArgP roArgThrGl naspGlyVal GlyAsnHisT hrMetAlaArg
201 GATCCCAAG ACCCTAAAGT TCGTCTGCT CATCTGCGG GTCTGCTGC CAGTCTTAGC TTACTCTGCC ACCACTGCCC GGACGGAGGA AGTTCCCGCAG
CTAGGGGTTT TGGGATTTC AGCAGCAGCA GTAGCAGCC GTACGAGACG GTCAGGATCG AATCAGACGG TGGTGACGG CCGTCTCTCT TCAAGGGGTC
4 IleProLys ThrLeuLysp heValValva lIleValAla ValLeuLeup roValLeuAl aTySerAla ThrThrAlaA rgGlnGluGl uValProGln
301 CAGACACTGG CCCACAGCA ACAGAGGCAC AGCTTCAAG GGGAGGAGTG TCCAGCAGGA TCTCATAGAT CAGACATAC TCGAGCCTGT AACCCGTCA
GTCTGTCAAC GGGGTGCTG TGTCTCCCTG TCGAAGTCC CCTCCTCAC AGGTGCTCT AGATATCTA GTCTGTATG ACCTCGGACA TTGGGACCGT
37 GlnThrVala laProGlnI nGlnArgHis serPheLysG lyGluGluCy sProAlaGly serHisArg sArgLysHisTh rGlyAlaCys AsnProCysThr

```

FIG. 3D-2

401 CAGAGGGTGT GGATTACACC AACGCTTCCA ACAATGAACC TTCTTGCTTC CCATGTACAG TTGTAAATC AGATCAAAA CATAAAGTT CTCCACCAT
 GTCTCCACA CCTAATGCG TTGCGAAGGT TGTACTGG AGAACGAAG GGTACATGTC AACATTTAG TCTAGTTTTT GTATTTTCAA GGACGTGGTA
 71 Gluglyva laspTyThr AsnAlaSerA snAsnGluPr oSerCysPhe ProCysThrv alCysLyase rAspGlnLys HisLysers erCysThrMet
 501 GACCAGAGAC ACAGTGCTC AGGTAAAGA AGGCACCTTC CGGAATGAAA ACTCCACAGA GATGTGCCG GGTGCCCTAG TGGGGAAGTC
 CTGGTCTCTG TGTACACAG TCACATTTCT TCCGTGAAG GCCTTACTTT TGAGGGTCT CTACACGGCC TTACATCGT CCACGGGATC ACCCTTTCAG
 104 ThrArgasp ThrValcysG lncysLysG1 uglyThrPhe ArgAsnGluA snSerProG1 uMetCysArg LysCysSera rGysProse rGlyGluVal
 601 CAAGTCAGTA ATTGTACGTC CTGGGATGAT ATCCAGTGTG TTGAAGAATT TGGTGCCAAT GCACCTGTGG AAACCCAGC TGCTGAAGAG ACAATGAACA
 GTTCAGTCAT TAACATGACG GACCTACTA TAGGTACAC AACTCTTAA ACCACGGTTA CGGTGACACC TTGTGGGTG ACGACTTCTC TGTACTTGT
 137 GlnValserA snCysThrse rTrpAspasp IleGlnCysV alGluGluPhe eGlyAlaasn AlaThrValG luThrProAl aAlaGluGlu ThrMetAsnThr
 701 CCAGCCCGGG GACTCCTGCC CCAGCTGCTG AAGAGACAAT GAACACCAGC CCAGGGACTC CTGCCCCAGC TGCTGAAGAG ACAATGACCA CCAGCCCGGG GACTCCTGCC
 GGTCCGGGGC CTGAGGACGG GGTGACGAC TTCTCTCTTA CTGTGCTGTC GGTCCCTGAG GACGGGTGCG ACGACTTCTC TGTACTGCTG GGTCCGGGGC
 171 SerProG1 yThrProAla ProAlaAlaG luGluThrMe tAsnThrSer ProGlyThrP roAlaProAl aAlaGluGlu ThrMetThrT hrSerProGly
 801 GACTCCTGCC CCAGCTGCTG AAGAGACAAT GACCACGAGC CCGGGGACTC CTGCCCCAGC TGCTGAAGAG ACAATGACCA CCAGCCCGGG GACTCCTGCC
 CTGAGGACCG GGTCCAGCAC TTCTCTGTTA CTGGTGTGTC GGTCCCTGAG GACGGGTGCG ACGACTTCTC TGTACTGCTG GGTCCGGGGC CTGAGGACCG
 204 ThrProAla ProAlaAlaG luGluThrMe tThrThrSer ProGlyThrP roAlaProAl aAlaGluGlu ThrMetThrT hrSerProG1 yThrProAla
 901 TCTTCTCATT ACCTCTCATG CACCATCGTA GGGATCATAG TTCTAATTGT GCTTCTGATT GTGTTTGTGT GAAAGACTTC ACTGTGAAG AAATTCCTTC
 AGAAGAGTAA TGGAGAGTAC GTGGTAGCAT CCTACTATC AAGATTACA CGAAGACTAA CACAAACAAA CTTTCTGAAG TGACACCTTC TTAAAGGAAG
 237 SerSerHisT yLeuSerCy sThrIleVal GlyIleIleV alLeuIleVal lLeuIleVal ValPheVal
 1001 CTTACCTCAA AGGTCAGGT AGGCGCTGCC TGAGGCGGG GGGCGCTGCA CACTCTCTGC CTGCTCTGCC TCTCTGTGT TCCCACAGAC AGAAACGCCT
 GAATGGACTT TCCAGTCCA TCCGCGACCG ACTCCCGCCC CCGCGGACCT GTACAGAGCG GCACGGAGGG AGACGACACA AGGCTGTCTG TCTTTCGGGA
 1101 GCCCCTGCCC CAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA
 CCGGGACGGG GTTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT

FIG. 3D-3

```

1  CCAACTGCAC CTCGGTTCTA TCGATTGAAT TCCCGGGGGA TCCTCTAGAG ATCCCTCGAC
61 CTCGACCCAC GCGTCCGGAA CCTTTGCAGC CGCACAAACT ACGGGGACGA TTCTGATTG
121 ATTTTGGCG CTTTCGATCC ACCCTCCTCC CTTCTCATGG GACTTTGGG ACAAAGCGTC
1  M G L W G Q S V
181 CCGACCGCCT CGAGCGCTCG AGCAGGGCGC TATCCAGGAG CCAGGACAGC GTCGGGAACC
9 P T A S S A R A G R Y P G A R T A S G T
241 AGACCATGGC TCCTGGACCC CAAGATCCTT AAGTTCTGTCG TCTTCATCTGT CGCGGTTCTG
29 R P W L L D F K I L K F V V F I V A V L
301 CTGCGGTCC GGGTTGACTC TGCCACCATC CCCC GGCGAGG ACGAAGTTCC CCAGCAGACA
49 L P V R V D S A T I P R Q D E V P Q Q T
361 GTGGCCCCAC AGCAACAGAG GCGCAGCCTC AAGGAGGAGG AGTGTCAGC AGGATCTCAT
69 V A P Q Q R R S L K E E C P A G S H
421 AGATCAGAAT ATACTGGAGC CTGTAACCG TGCACAGAGG GTGTGGATTA CACCATCTGT
89 R S E Y T G A C N P C T E G V D Y T I A
481 TCCAACAATT TGCCTTCTTG CCTGCTATGT ACAGTTTGTA AATCAGGTCA AACAAATAAA
109 S N N L P S C L L C T V C K S G Q T N K
541 AGTTCCTGTA CCACGACCAG AGACACCGTG TGTCAGTGTG AAAAAAGGAG CTTCCAGGAT
129 S S C T T R D T V C Q C E K G S F Q D
601 AAAA ACTCCC CTGAGATGTG CCGGACGTGT AGAACAGGGT GTCCCAGAGG GATGGTCAAG
149 K N S P E M C R T C R T G C P R G M V K
661 GTCAGTAATT GTACGCCCCG GAGTGACATC AAGTGCAAAA ATGAATCAGC TGCCAGTTCC
169 V S N C T P R S D I K C K N E S A A S S
721 ACTGGGAAAA CCCCAGCAGC GGAGGAGACA GTGACCACCA TCCTGGGGAT GCTTGCCTCT
189 T G K T P A A E E T V T T I L G M L A S
781 CCCTATCACT ACCTTATCAT CATAGTGGTT TTAGTCATCA TTTTAGCTGT GGTGTGGTT
209 P Y H Y L I I I V V L V I I L A V V V V
841 GGCTTTTCAT GTCGGAAGAA ATTCAATTCTT TACCTCAAAG GCATCTGCTC AGGTGGTGGG
229 G F S C R K K F I S Y L K G I C S G G G

```

FIG. 3E-1

901 GGAGGTCCCG AACGTGTGCA CAGATCCTT TTCCGGCGG GTTCATGTCC TTCACGAGTT
 249 G G P E R V H R V L F R R R S C P S R V
 961 CCTGGGCGG AGGACAATGC CCGAACGAG ACCCTGAGTA ACAGATACTT GCAGCCCACC
 269 P G A E D N A R N E T L S N R Y L Q P T
 1021 CAGGTCTCTG AGCAGGAAT CCAAGTCCAG GAGCTGGCAG AGCTAACAGG TGTGACTGTA
 289 Q V S E Q E I Q G Q E L A E L T G V T V
 1081 GAGTYGCCAG AGGAGCCACA GCGTCTGCTG GAACAGGCAG AAGCTGAAGG GTGTCAGAGG
 309 E Xaa P E E P Q R L L E Q A E A E G C Q R
 1141 AGGAGGCTGC TGGTTCCAGT GAATGACGCT GACTCCGCTG ACATCAGCAC CTTGCTGGAT
 329 R R L L V P V N D A D S A D I S T L L D
 1201 GCCTCGGCAA CACTGGAAGA AGGACATGCA AAGGAACAA TTCAGGACCA ACTGGTGGGC
 349 A S A T L E E G H A K E T I Q D Q L V G
 1261 TCCGAAAGC TCTTTTATGA AGAAGATGAG GCAGGCTCTG CTACGCTCTG CCTGTGAAAG
 369 S E K L F Y E E D E A G S A T S C L
 1321 AATCTCTTCA GGAACCCAGA GCTTCCCTCA TTTACCTTTT CTCCTACAAA GGAAGCAGC
 1381 CTGGAAGAA CAGTCCAGTA CTTGACCCAT GCCCCAACAA ACTCTACTAT CCAATATGGG
 1441 GCAGCTTACC AATGGTCCTA GAACCTTGTT AACGCACCTG GAGTAATTTT TATGAAATAC
 1501 TCGGTGTGAT AAGCAAACGG GAGAAATTTA TATCAGATTC TTGGCTGCAT AGTTATACGA
 1561 TTGTGTATTA AGGGTCGTTT TAGGCCACAT GCGGTGGCTC ATGCCCTGTAA TCCCAGCACT
 1621 TTGATAGGCT GAGGCAGGTG GATGCTTGA GCTCGGGAGT TTGAGACCAG CCTCATCAAC
 1681 ACAGTGAAC TCCATCTCAA TTTAAAAAGA AAAAAAGTG TTTTAGGATG TCATTCTTTG
 1741 CAGTTCTTCA TCATGAGACA AGTCTTTTCTT TCTGCTTCTT ATATTGCAAG CTCCATCTCT
 1801 ACTGGTGTGT GCATTTAATG ACATCTAACT ACAGATGCCG CACAGCCACA ATGCTTTGCC
 1861 TTATAGTTTT TTAACCTTAG AACGGGATTA TCTTGTTATT ACCTGTATTT TCAGTTTCGG
 1921 ATATTTTTGA CTTAATGATG AGATTATCAA GACGTACCCC TATGCTAAGT CATGAGCATA
 1981 TGGACTTACG AGGTTTCGAC TTAGAGTTTT GAGCTTTAAG ATAGGATAT TGGGGGCTTA
 2041 CCCCCACCTT AATTAGAAGA AACATTTTAT ATTGCTTTAC TA

FIG. 3E-2

FIG. 4A



FIG. 4A-1

-640 CCCAACCCACGATGGTCTGGGAGCTGCGCCACAGGGCTTGGCGGTGGCGGCCCCGCAACAGCACCGAGCGTTTCGGTCCGGC
-450 GTCGGGCCCGCCCTCCCGCTCACTCCCTCCCGCTCGTGTCTCTCCCGGGTGTGGCACAGCCCTGGGATTCCTCCCT
-300 GTGGCGCGGTGGGAACATCTCGGCAGCCACCGCTTCTCCCGCTGGAGCGGGCTCCAGCTTGGCTGCCCTCGGTCCCT
-150 CTGCAGGATCCTGCGGCCCTCCAAACCGGATCCTGGGTCTAGAGCTCCCGAGAGCGAGCGCTCGCCAGGACTCCTCGCC

1 ATGCGGCGCCTGACTCGTCGGCTGGTTCTGCCAGTCTTCCGGGTGCTCTGGATCACGGTGTCTTCTTCTGGGTAAC
M R R L T R R L V L P V F G V L W I T V L L F F W V T

151 GACCTGTGGACCAAGTTGATGAGCGGGGTATCTGAATGCCAAAAGTGGCGCGTTGGTGACGACCCCTATAAGCTGTA
D L W D Q F D E R R Y L N A K K W R V G D D P Y K L Y

301 TGCACACTGCTGGTGATTTGCACGGGACCTTCCACCCACTAGCATCATCACCTTCCACAACGAGGCCCGCTCCACGCT
C T L L V Y C T D L P P T S I I I T F H N E A R S T L
Exon6 ← Exon7

451 GACTTCAGCAATGATCTGTGACTGTAAACAGCTCATCAAGTTGCCCAAGGTGAAATGCTTGGCGCAATAATGAACGGCA
D F S N D P D C K Q L I K L P K V K C L R N N E R Q
Exon8 ← Exon9

601 CACTGTGAGGTGAACAGGGACTGGCTCCAGCCCTCTGTGTCACAGGGTCAAGAGGACTACACGCGGGTGGTGTGCCCTGT
H C E V N R D W L Q P L L H R V K E D Y T R V V C P V
Exon10 ←

751 TGGAGCCTCCACTTCCAGTGGGAGCAGCTCTCCCGAGAGCAGAAGGCTCGGCGCTGGACCCACGAGGCCCATCAGGAC
W S L H F Q W E Q L S P E Q K A R R L D P T E P I R T

GGCATCCGAGTGACCGCTCCCCGCCCGCCCGCCTTGC
GGCGCGGGTAGCGCCCTCTCAGAGCCCCTCACTCCACTCGGCTCGCTCCGAGTCGGCCTGTCT
CTCGCTGCTCGAGTCAATTCTCGGCGAGCGGAAGCGGCGCGGCGGCGGCGAGCCGCG
TCCCTGCCACGTTTCGGGTCGCCCTGCACCCCAAGCTCGCTTCTTTCGAAAGCGGGAAGGCGC
CCGCCAACCTGACCGCCCGGGGTGCCCCCGGACGTAGCGCGGAGAGGAAGCGGCAAGGGGACC

Exon1 ← Exon4

K R K L E V P T G P E V Q T P K P S D A D W D

▲▲

← Exon4 → Exon5

TGCTTTCAAC CAGCGGAGAGTGAGCGGATCTCCAGCAATCGGGCCATCCCGGACACTCGCCATCTGAGA
A F N Q R E S E R I S S N R A I P D T R H L R

Exon5 ← Exon6

GCTCAGGACCATCCGCAGTGTATTAAACCGCACCCCTACGCATCTGATCCGGGAAATCATATTAGTGGAT
L R T I R S V L N R T P T H L I R E I I L V D

→ Exon8

AGTCTGGTCCGGTCCCGGATTCCGGGCGCTGACATCGCCCAGGGCACCACTCTGACTTTCCTCGACAGC
G L V R S R I R G A D I A Q G T T L T F L D S

Exon9 ← Exon10

GATCGATATCAATAACCTGGACACCTTCACTACATCGAGTCTGCCTCGGAGCTCAGAGGGGGTTTGAC
I D I I N L D T F T Y I E S A S E L R G G F D

→ Exon11

TCCTATCATAGCTGGAGGGCTCTTCGTGATCGACAAGCTTGTTGATTACCTGGGGAATATGATATG
P I I A G G L F V I D K A W F D Y L G K Y D M

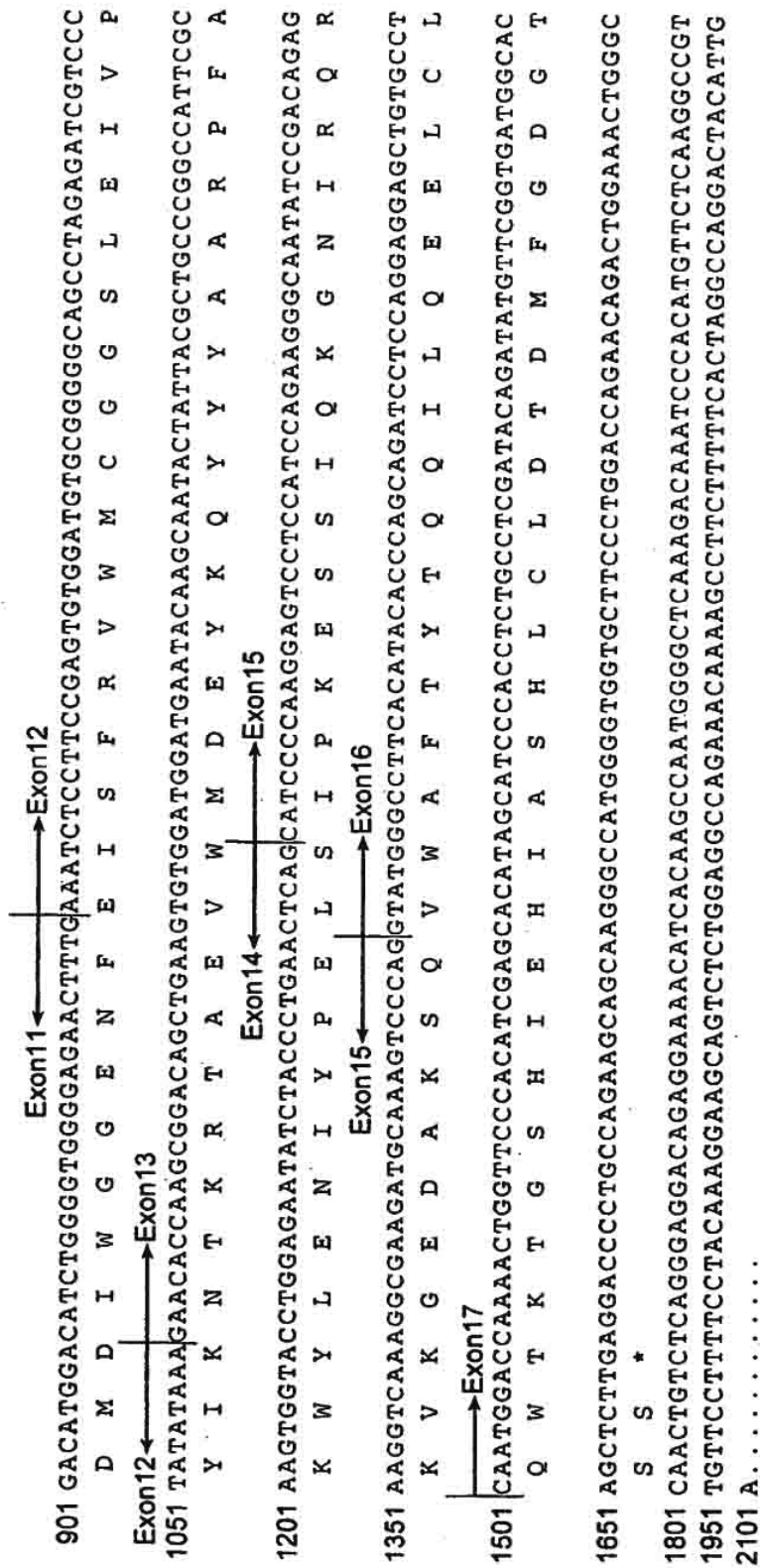


FIG. 4A-3

CTGCAGCCGAGTGGGACGTCCTCCGGAAGAAGCACCCCTACGTTTCCCTGATGGAAATGCCAACACG
 C S R V G H V F R K K H P Y V F P D G N A N T
 CCTGGAGAGGCCCTTCGGGAATGTTGAGAGCAGATGGACCTGAGGAAGAAATCTGCGCTGCCAGAGCTTC
 L E R P F G N V E S R L D L R K N L R C Q S F
 ACAGAAGTGCCCTGGAAATCTCAAAGGCAGAACCAAGAAACCCCAACCTAAAGTTGAGCCCTGTGCC
 Q K C L E S Q R Q N N Q E T P N L K L S P C A
 GTCAGTCATCACCTTGTTCCCTGGCGCCCCAGTGGTCTTGTCTCTTGCAAGAATGGAGATGACCGACAG
 S V I T L F P G A P V V L V L C K N G D D R Q
 CGAGAACGGCAAGGAAATCGTCGTCAACCCATGTGAGTCCTCACTCATGAGCCAGCACTGGGACATGGTG
 E N G K E I V V N P C E S S L M S Q H W D M V
 AGCAAGCAGCCTGCAACCACCTCAGACATCCTGGACTGGGAGGTCCAGGCAGAGCCCCCAGGACAGGAG
 TAAGTCCAGTCCTGGCCAGTCATTCCTGATTGGTATCTGGAGACAGAAACCTAATGGGAAGTGTAT
 AGAGATGAAGAAATGGAGGTGTTCCAAAGAAATAAGAGAACTTAGAAGTTGAAAAAATAAAAAA

Secuencia de nucleótidos del ADNc de pp-GalNAc-T14 y secuencia de aminoácidos prevista de pp-GalNAc-T14. Se indican las uniones entre exón e intrón. Se ha recuadrado el posible dominio transmembrana del extremo N-terminal. Un posible sitio de N-glucosilación aparece con doble subrayado. La posición inicial de la forma truncada está indicada con un triángulo.

FIG. 4A-4

FIG. 4B

FIG. 4B-1

FIG. 4B-2

FIG. 4B-3

FIG. 4B-4

FIG. 4B-1

GalINAc-T3

-49

1 M A H L K R L V K L H I K R H Y H K...K...F W K L G A V I
 1 ATGGCTCACCTAAAGCGACTAGTAAATTACACATTAAAGACATTACCATAAAAGTTCTGGAAAGCTTGGTGCAGTAAT
 51 R M E R N M K N K N K M L D L M L E A V N N I K D A M
 151 AGGATGGAAAGGAACATGAAAAACAAAAACAAGATGTTGGATTAAATGCTAGAAAGCTGTAAACAATATTAAGGATGCCAT
 101 Y Y T A A E L K P V L D R P P Q D S N A P G A S G K A
 301 TATTATACAGCAGCAGAATTGAAGCCTGTCCCTTGACCGTCCACCTCAGGATTCAAATGCACCTGGTGTCTTCTGGTAAAGC
 151 N A F A S D R I S L H R D L G P D T R P P E C I E Q K
 451 AATGCTTTCGCAAGTGACAGGATTCTTTGACCGAGATCTTGGACCAGACACTCGACCTCCTGAATGTATTGAACAAAA
 201 L L R T V H S V L Y S S P A I L L K E I I L V D D A S
 601 TTGCTTAGAACTGTCCACAGTGTGCTCTATTTCTTCCCTGCAATACTGCTGAAGGAAATCATTTTGGTGGATGATGCTAG
 251 Q R E R K G L I T A R L L G A T V A T A E T L T F L D
 751 CAAAGAGAAAGAAAGGTCTGATCACTGCTCGGTGCTAGGAGCAACAGTCGCAACAGCTGAAACGCTCACATTTTTAGA
 301 V V S P D I A S I D L N T F E F N K P S P Y G S N H N
 901 GTCGTAAGTCCAGATATTGCATCCATAGATCTGAACACGTTTGAATTCAACAAACCTTCTCCTTATGGAAGTAACCATAA
 351 K D E T Y P I K T P T F A G G L F S I S K E Y F E Y I
 1051 AAAGATGAAACCTACCCAATTAAACACCCACTTTTGCAGGAGGACTTTTTCCTCATATCAAAAGAATATTTTGAGTATAT
 401 C G G Q L E I M P C S V V G N V F R S K S P N S F P K
 1201 TGTGGTGGCAGTTGGAGATTATGCCCTTGTCTGTGTTGGACATGTTTTTCGCGAGCAAAAGCCCTCATAGCTTTCCCAA
 451 F Y R R N T D A A K I V K Q K A F G D L S K R F E I K
 1351 TTTTATAGGAGAAATACAGATGCAGCAAAAAATTTGTTAAACAAAAAGCATTTGGTGATCTTTTCAAAAAAGATTTGAAATAAA

FIG. 4B-2

.....GAAGAAGAAATAACTGTTATTGTGTCAAGTGACAAGCTTTTAATGTCAGA
F F F I I V L V L M Q.....R E V S V Q Y S K E E S
TTTTTCTTTATAATAGTTTGGTTTTTAATGCAAAGAGAAGTAAGTGTTCATAATATCCAAAGAGGAATCA
 P K M Q I G A P V R Q N I D A G E R P C L Q G
 GCCAAAATGCAAAATAGGAGCACCTGTGAGGCAAAACATTGATGCTGGTGAGAGACCTTGTGTGCAAGGA
 F K T T N* L S V E E Q K E K E R G E A K H C F
 ATCAAGACAAACCAATTAAAGTGTGAAGAGCAAAAGGAAAGGAAACGTGGGAAGCTAAACACTGCTTT
 F K R C P P L P T T S V I I V F H N E A W S T
 ATTAAGCGCTGCCCTCCCTGCCACCACCGTGTGATGTTTTCATAATGAAGCGTGGTCCACG
 V D E Y L H D K L D E Y V K Q F S I V K I V R
 TGTAGATGAGTACTTACATGATAAACTAGATGAATATGTAAACAAATTTTCTATAGTAAATAATAGTCAGA
 A H C E C F Y G W L E P L L A R I A E N* Y T A
 TGCTCACTGTGAGTGTTCCTATGTTGGCTAGAACCTCTGTTGGCCAGAAATAGCTGAGAACTACACGGCT
 R G N F D W S L S F G W E S L P D H E K Q R R
 CCGTGGAAATTTTGACTGGAGTCTTTCATTGGCTGGGAGTCGCTTCCTGATCATGAGAAAGCAAGAAGG
 G S Y D E E M E I W G G E N I E M S P R V W Q
 TGGAAAGCTATGATGAAGAAATGGAAATCTGGGGAGGTGAAAATATAGAAATGTCTTTCAGAGTATGGCAA
 G T Q V I A R N Q V R L A E V W M D E Y K E I
 AGGCACTCAGGTGATTGCTAGAAACCAAGTTCGCCCTTGCAAGAAGTCTGGATGGATGAATACAAGGAATA
 H R L R C K N* F T W Y L N N I Y P E V Y V P D
 ACACCGTCTTCGGTGTAAATAATTTTACATGGTATCTGAACAACATTTATCCAGAGGTGTATGTGCCAGAC

501 L N P V I S G Y I K S V G Q P L C L D V G E N N Q G G
 1501 CTTAATCCTGTATATCTGGATACATTAAAGCGTTGGTCAGCCTCTATGTCTGGATGTTGGAGAAAACAATCAAGGAGG

 551 E I R H N I Q K E L C L H A A Q G L V Q L K A C T Y K
 1651 GAAATTCGGCACAAACATCCAGAAAGGAATTATGTCTTTCATGCTGCTCAAGGTCTCGTTTCAGCTGAAGGCATGTACCTACAA

 601 F L K M C L S A N G E H P S L V S C N* P S D P L Q K W
 1801 TTCTTAAAAATGTGCCCTTTCAGCAAAATGGAGAGCATCCCAAGTTTAGTGTCAATGCAACCCATCAGATCCACTCCAAAAAATG

 1951 CTGTGACTAGGCATACACTGTAGTTTTTGAAAAATTATGCAAAAGCAGCTAAATGTAACTTATTTCCAAAGTGCAATTTTCTT
 2101 ATACCAAAGACTATTTCAAATGTCCAGATGTAGGGGAAGAGATGTTTACAGTATGATGAAAAATAATTTTCCAAAGTAAAG
 2251 TATTTCCCTAGTTTTTTGGGGGATAGGAAGAAAGATTGTACTGTATTTTAACTACATAAAAAATAGATCAATAA
 2401 GGTGAACCTTTTTTGGCGTTTGTCTGTCATAATGTTTCCCTTAAACATGAACCTGAATAAGGAGAGAGTATT
 2551 TAAGTCTTCCCTTAAATGACTTTTCTTAAAGTAATGATACTGTGTGTTTTCCTCAAGCACCTTTTAAAAAATTTTATATAAT
 2701 TGAATGTTGTGATATTAAATTTCAAATGCAGAAATACCTGACTCATTTTAAAGCTAAATTTTGTACTGATTCAATTATAA
 2851 AACACAAATATAAAATCCCTCAACACTAAAAAATAAA

FIG. 4B-3

```

K P L I M Y T C H G L G N Q Y F E Y S A Q H
CAAACCATTAATTATGTATACATGTCTATGGGAAACCAAGTACTTTGAATACTCTGCTCAACAT

G H K T V V T G E Q I W E I Q K D Q L L Y N P
AGGTCACAAGACAGTTGTCACTGGAGAGCAGATATGGGAGATCCAGAAGGATCAACTTCTATACAATCCA

I L S Q N D *
ZATACTTAGCCAAAATGATTAAAGTGTTCCCTTAAATAAGTTGAAAAAGGAAATATTCTTTCTCATAAAA

ATTATATCTTTATGTAGCACTATCTACAGAAAATTCTGCAAGTTTCTGTTTCAAAGCACAAATAACTAGTA
TGAAGTTTGTGTTTGTACACCTTAGGGATATATATATAGCTACATTACACACTCACAAATTAAAAA
ATGTCAGCATTTGGCCTCTGTGTACAAACCAAGAGCTTTTACAGATCCAGAAATTATTAGTTTAAATGCA
TTAACACACTTAAATTTCTTGGCAAAATTTTAAACATTTTTTAGTCTGTAATACACTCCACTTGAAGCACT
TACTATCTGTTGAAAAGGTGTCCTTTCTCTTAGTATTTTTTTTCTTACCAGAAATTCACATAATCT
TTGTAATGGATTTTGTGACTTTGTAAATGGATTCTTTTCATCAAAAAGCCTTATTTTTTATCTATGTGGAA

```

La secuencia de aminoácidos se muestra en código de una letra. El segmento hidrófobo que representa el posible dominio transmembrana aparece subrayado con una línea doble (Kyte y Doolittle, ventana 8) (32) y los aminoácidos cargados adyacentes subrayados con una línea de puntos. Se indican mediante asteriscos cuatro posibles sitios de N-glucosilación.

FIG. 4B-4

Resumen de IC50 de NSCLS			Apo 2L SBF al 0,5% MTT		SBF al 10%		Ac DR5+XL SBF al 0,5% MTT		SBF al 10%	
			Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT
1	H2122	adenocarcinoma	10,7	0,7	3,1	1,5	148,9	64,8	205,3	92,1
2	A427		12,4	2,8	9,6	1,4	5,8	5,6	46,3	58,1
3	H647	adenoesquamoso	14,9	1,1	31,7	5,3	326,9	57,8	741,6	263,8
4	SK-MES-1	esquamoso	73,4	14,8	16,6	1,2	450,3	112,9	288,3	12,2
5	H838	adenocarcinoma	63,2	0,7	90,0	2,5	1000,0	0,0	1000,0	0,0
6	H358	bronquioalveolar	126,7	62,3	224,2	209,8	1000,0	0,0	1000,0	0,0
7	H2126		364,4	21,1	171,6	89,3	1000,0	0,0	1000,0	0,0
8	H460	células grandes	47,8	16,7	623,7	532,2	543,9	185,0	1000,0	0,0
9	H1703	adenocarcinoma	509,9	693,2	1000,0	0,0	345,5	420,0	658,3	483,2
10	H2405	adenocarcinoma	567,1	510,1	1000,0	0,0	433,0	261,5	1000,0	0,0
11	H650	bronquioalveolar	287,6	30,8	1000,0	0,0	231,8	69,5	1000,0	0,0
12	H1568	adenocarcinoma	69,8	14,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
13	H1666	bronquioalveolar	1000,0	0,0	249,8	84,5	1000,0	0,0	897,5	145,0
14	H322T	bronquioalveolar	1000,0	0,0	509,1	694,2	1000,0	0,0	1000,0	0,0
15	SW1573	células alveolares	1000,0	0,0	1000,0	0,0	466,6	157,3	1000,0	0,0
16	H292	mucoepidermoide	1000,0	0,0	1000,0	0,0	293,3	69,3	1000,0	0,0
17	H1650	bronquioalveolar	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	760,1	339,3
18	H522	adenocarcinoma	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
19	EKVX	adenocarcinoma	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
20	H661	células grandes	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
21	H23	adenocarcinoma	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
22	LXFL 529	células grandes	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
23	H226	esquamoso	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
24	A549		1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
25	H1781	bronquioalveolar	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
26	H1299		1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
27	HOP 62	adenocarcinoma	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
28	H2009	adenocarcinoma	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
29	HOP 92	células grandes	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
30	H1793	adenocarcinoma	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
31	H1975	adenocarcinoma	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
32	H1651	adenocarcinoma	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
33	calu-1	epidermoide c	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
34	H1435	adenocarcinoma	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
35	HOP 18	células grandes	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
36	H520	esquamoso	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
37	H441	adenocarcinoma	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
38	H2030	adenocarcinoma	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
39	H1155		1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
40	H1838	adenocarcinoma	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
41	H596	adenopidermoide	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
42	HLF α	epidermoide	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0

FIG. 5

Resumen de IC50 de cáncer pancreático		Apo 2L SBF al 0,5% MTT		SBF al 10%		Ac DR5+XL SBF al 0,5% MTT		SBF al 10%	
		Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT
1	Panc 05.04	40,1	5,3	26,8	20,1	24,9	4,3	23,3	12,8
2	BxPC3	247,0	117,6	34,3	11,6	364,6	113,5	411,8	12,7
3	HPAC	1000,0	0,0	10,8	1,3	1000,0	0,0	580,8	323,7
4	SU.86.86	68,5	69,3	27,8	9,9	247,6	162,3	390,6	10,9
5	HuP-T3	629,3	524,3	57,5	62,3	421,0	271,5	367,7	95,7
6	PSN1	715,7	492,4	357,5	556,9	305,0	163,7	423,4	223,4
7	MiaPaCa-2	563,5	617,3	1000,0	0,0	66,0	16,1	137,4	50,8
8	Panc 08.13	1000,0	0,0	1000,0	0,0	44,8	28,7	17,0	3,1
9	PA-TU-8988T	1000,0	0,0	1000,0	0,0	368,0	133,8	375,4	119,4
10	Panc 03.27	1000,0	0,0	288,7	189,1	1000,0	0,0	1000,0	0,0
11	Capan-1	371,2	545,1	681,2	552,2	613,4	437,1	793,6	357,4
12	SW 1990	158,3	20,5	844,7	269,0	467,8	416,0	913,6	149,7
13	CFPAC-1	883,4	164,9	535,4	657,1	381,9	22,6	925,5	105,4
14	PL45	1000,0	0,0	1000,0	0,0	538,7	652,4	1000,0	0,0
15	PA-TU-8902	871,5	181,8	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
16	Aspc-1	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
17	Hs766T	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
18	Panc 10.05	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
19	Panc1	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
20	Capan-2	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
21	HPAF-II	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
22	Panc 02.03	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0
23	Panc 04.03	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0	1000,0	0,0

FIG. 6

Resumen de IC50 de LNH			Apo2L SBF al 10% MTT		Ac DR5+XL SBF al 10% MTT		
			Media	DT	Media	DT	
1	JEKO-1	MCL	11,5	6,4	61,8	10,7	7% Apo2L
2	SU-DHL-4	DLBCL	1504,1	1727,4	13,6	5,6	
3	OCI-LY-19	DLBCL	3000	0	26,2	15,8	+Ac DR5 al 29%
4	SR	DLBCL	3000	0	187,8	43,7	
5	Farage	DLBCL	3000	0	1269,1	1504,1	
6	DOHH-2	DLBCL, FL	3000	0	84% de muerte	anti-hu IgG	
7	Toledo	DLBCL	3000	0	3000	0	
8	WSU-NHL	FL	3000	0	3000	0	
9	KARPAS-422	DLBCL, FL	3000	0	3000	0	
10	GRANTA-519	NHL, MCL	3000	0	3000	0	
11	Pfeiffer	DLBCL	3000	0	3000	0	
12	HT	DLBCL	3000	0	3000	0	
13	SC-1	FL	3000	0	3000	0	
14	DB	DLBCL	3000	0	3000	0	

FIG. 7

FIG. 8
FIG. 8A FIG. 8B

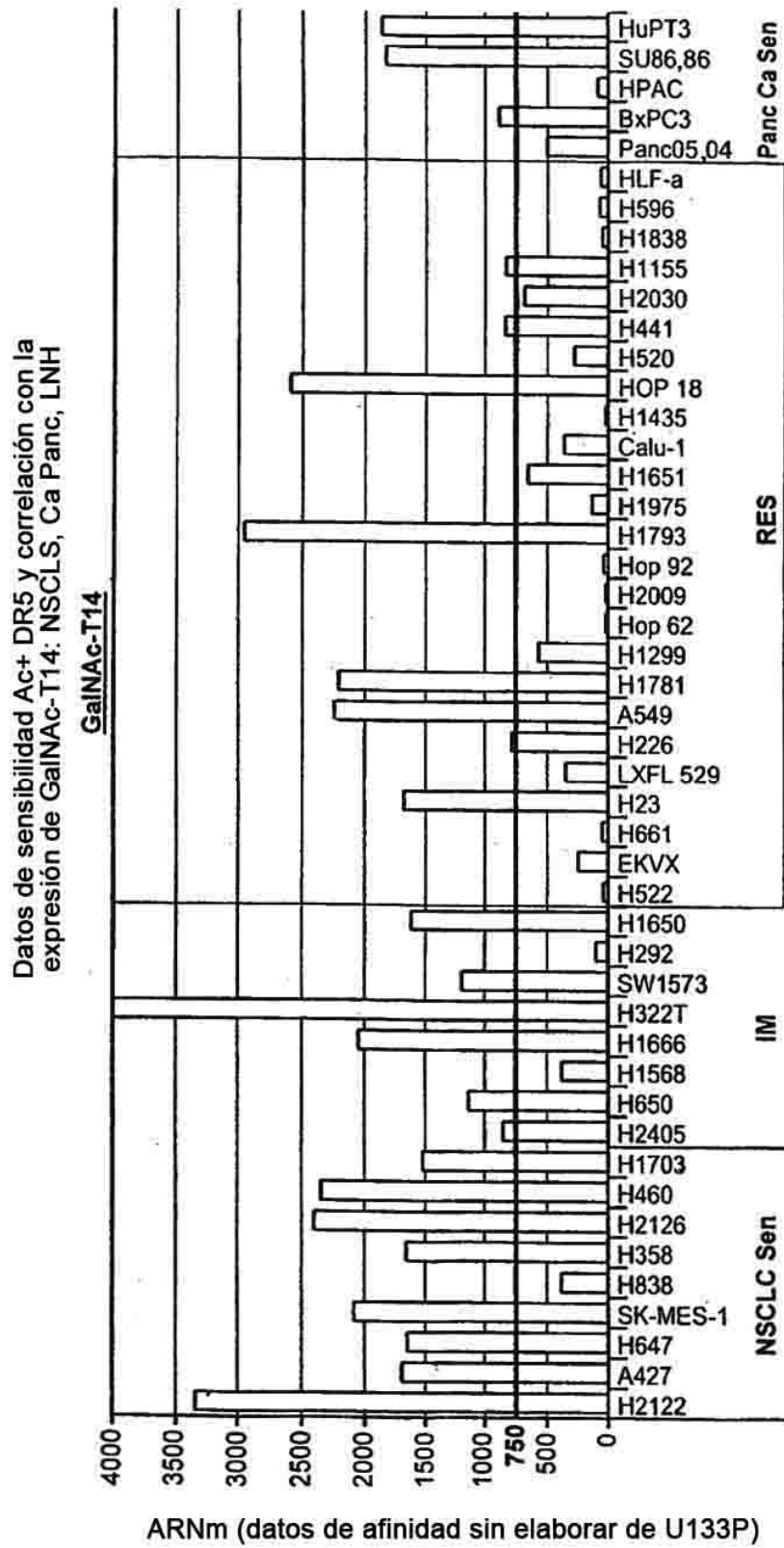


FIG. 8A

Sensibilidad 27/34=79%
 Especificidad 35/43=81%
 Valor predictivo positivo 27/35=77%
 Valor predictivo negativo 35/42=83%

	Sen/IM	Res
>750	27	8
<750	7	35
	34	43
		77

Prueba exacta de Fisher

Valor de p = 8,251603801901834e-8 (para Apo2L: 0,000054)

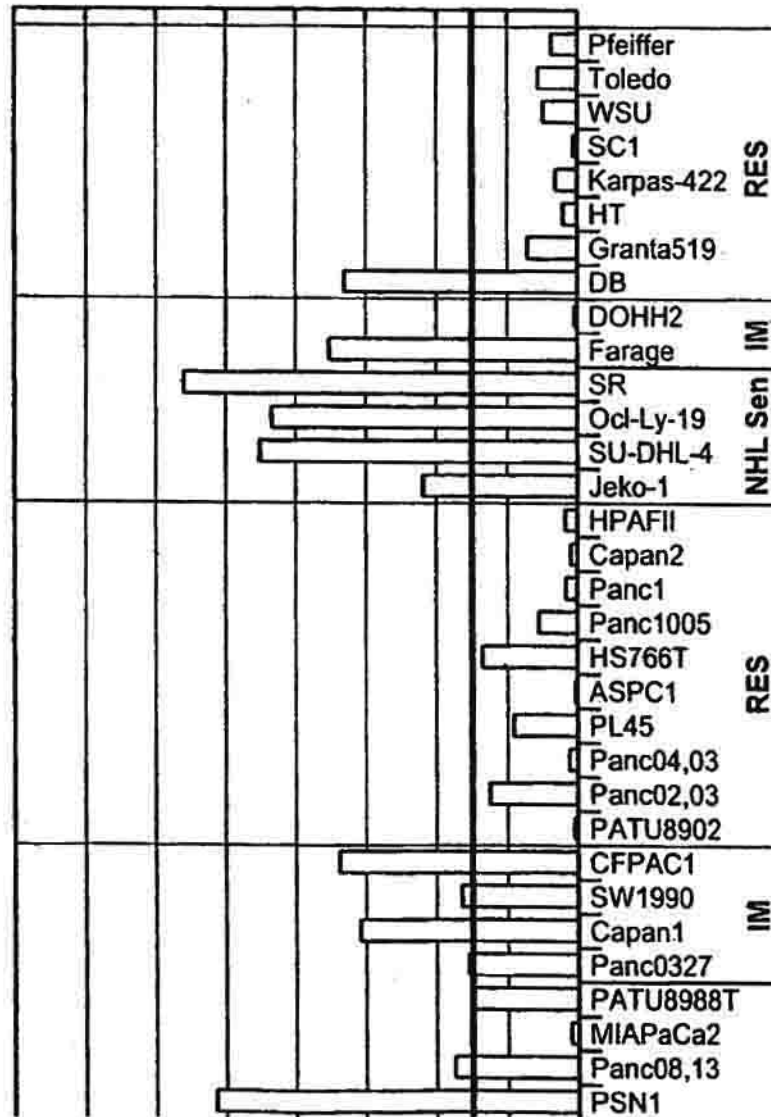
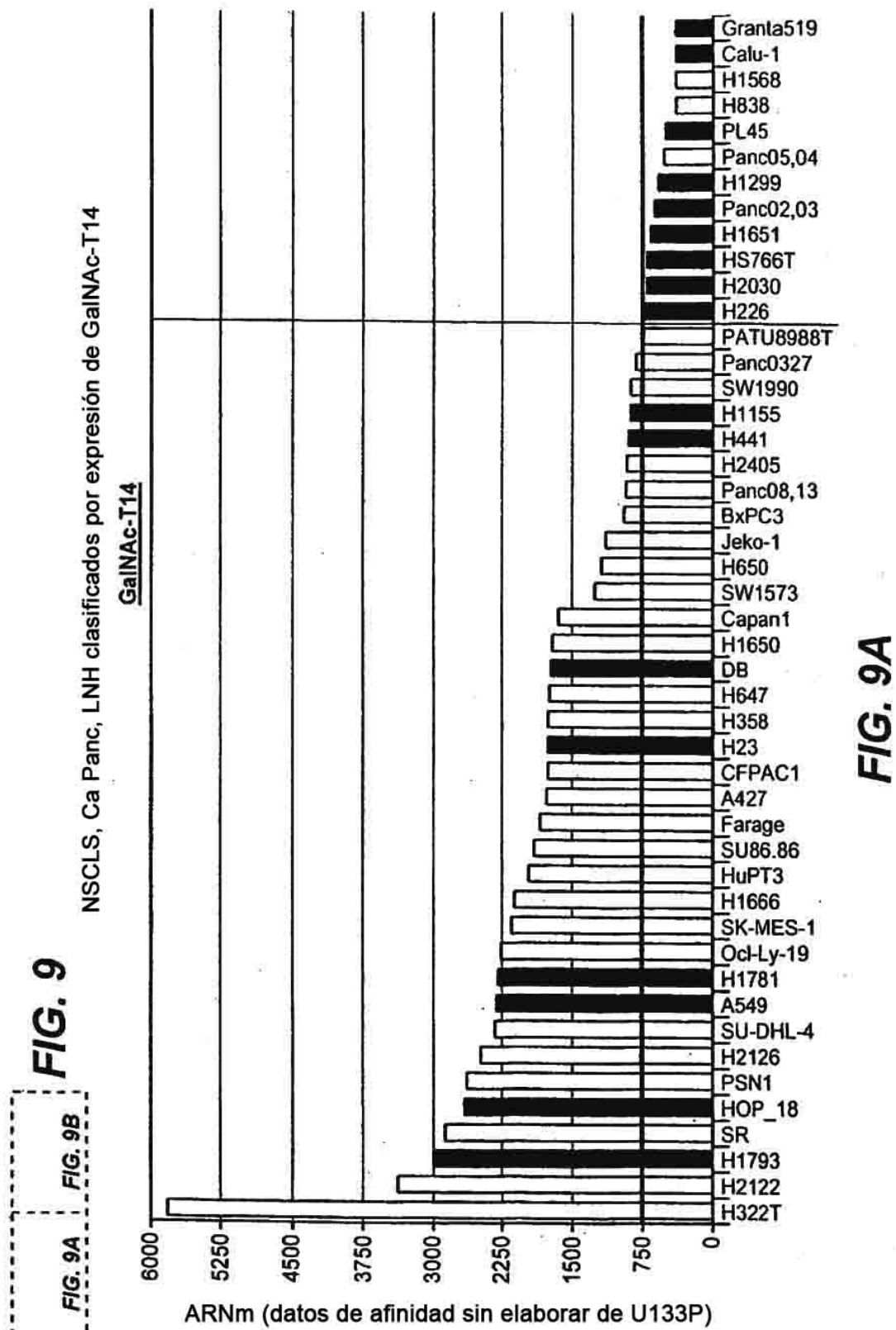


FIG. 8B



N=77							
Sensible Resistente							
							ASPC1
							Hop_62
							H1435
							DOHH2
							PATU8902
							H2009
							SC1
							Hop_92
							MIAPaCa2
							Capan2
							H661
							H522
							H1838
							HLF-a
							Panc04,03
							H596
							HPAC
							Panc1
							HPAFII
							HT
							H292
							H1975
							Karpas-422
							Pfeiffer
							WSU
							EKVX
							Panc1005
							Toledo
							H520
							LXFL 529

FIG. 9B

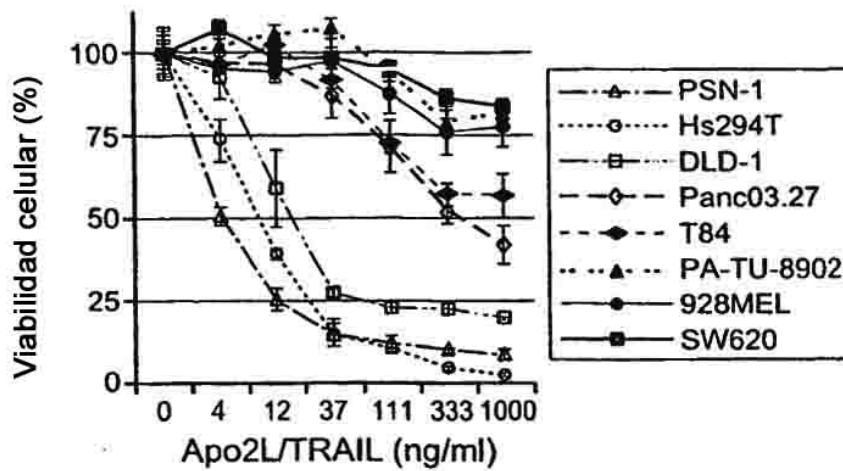


FIG. 10A

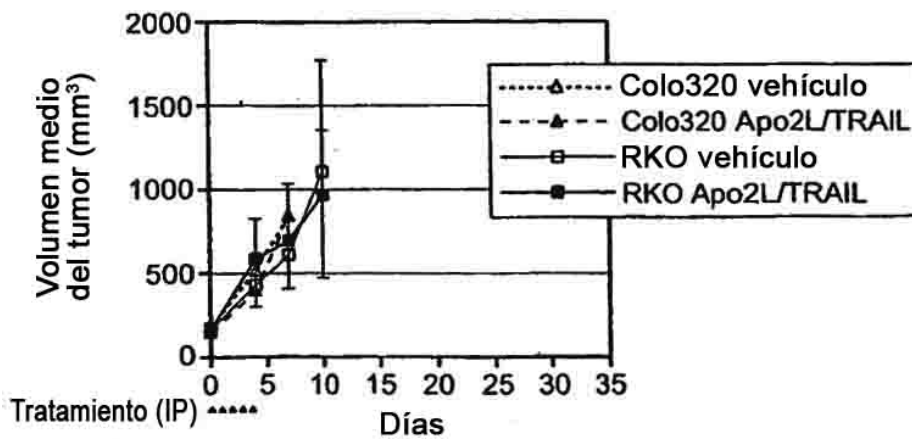
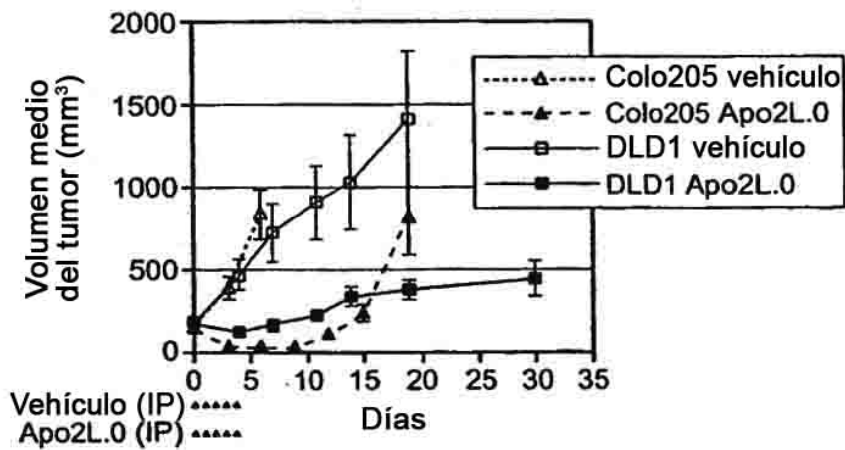


FIG. 10D

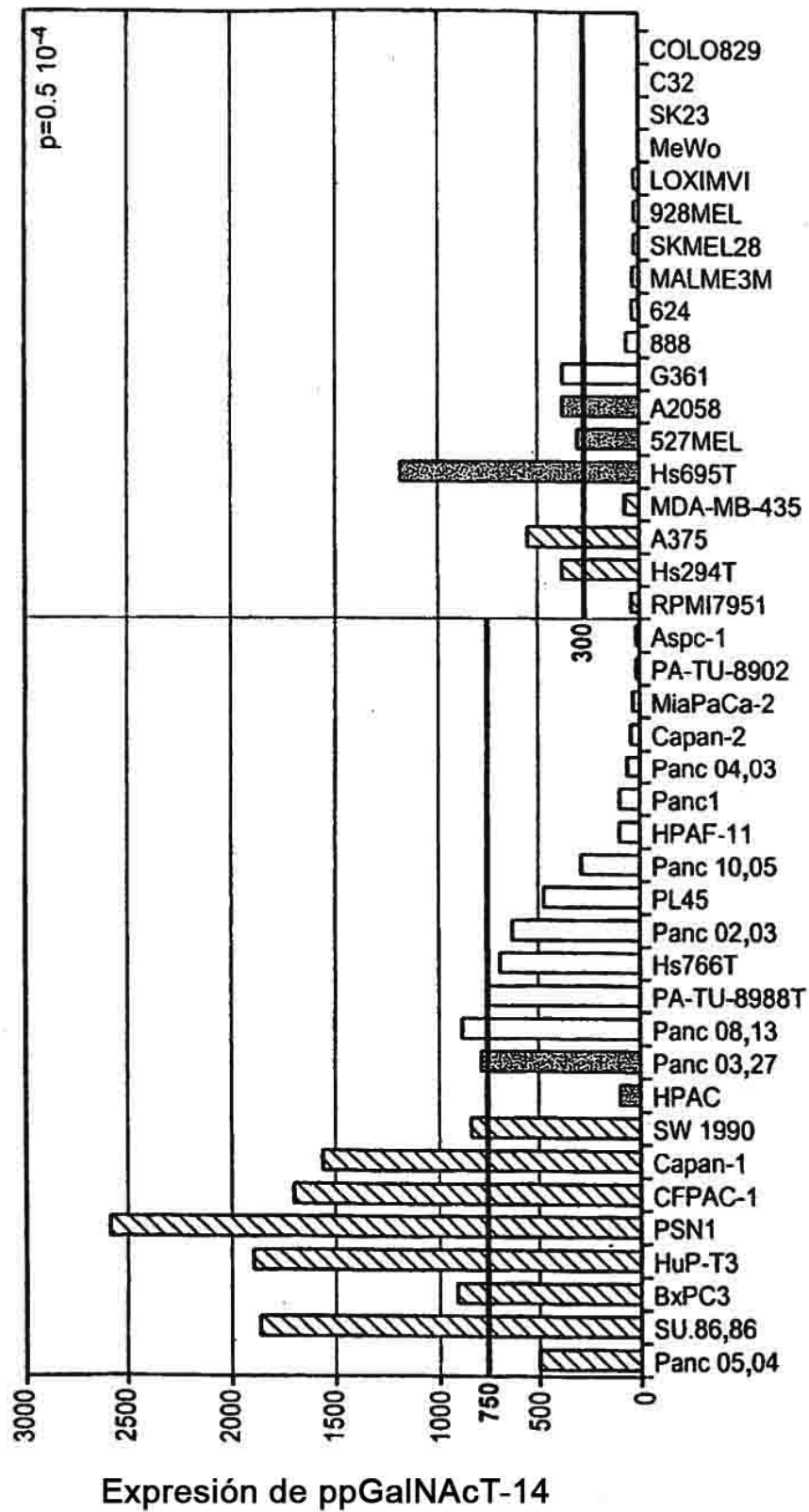
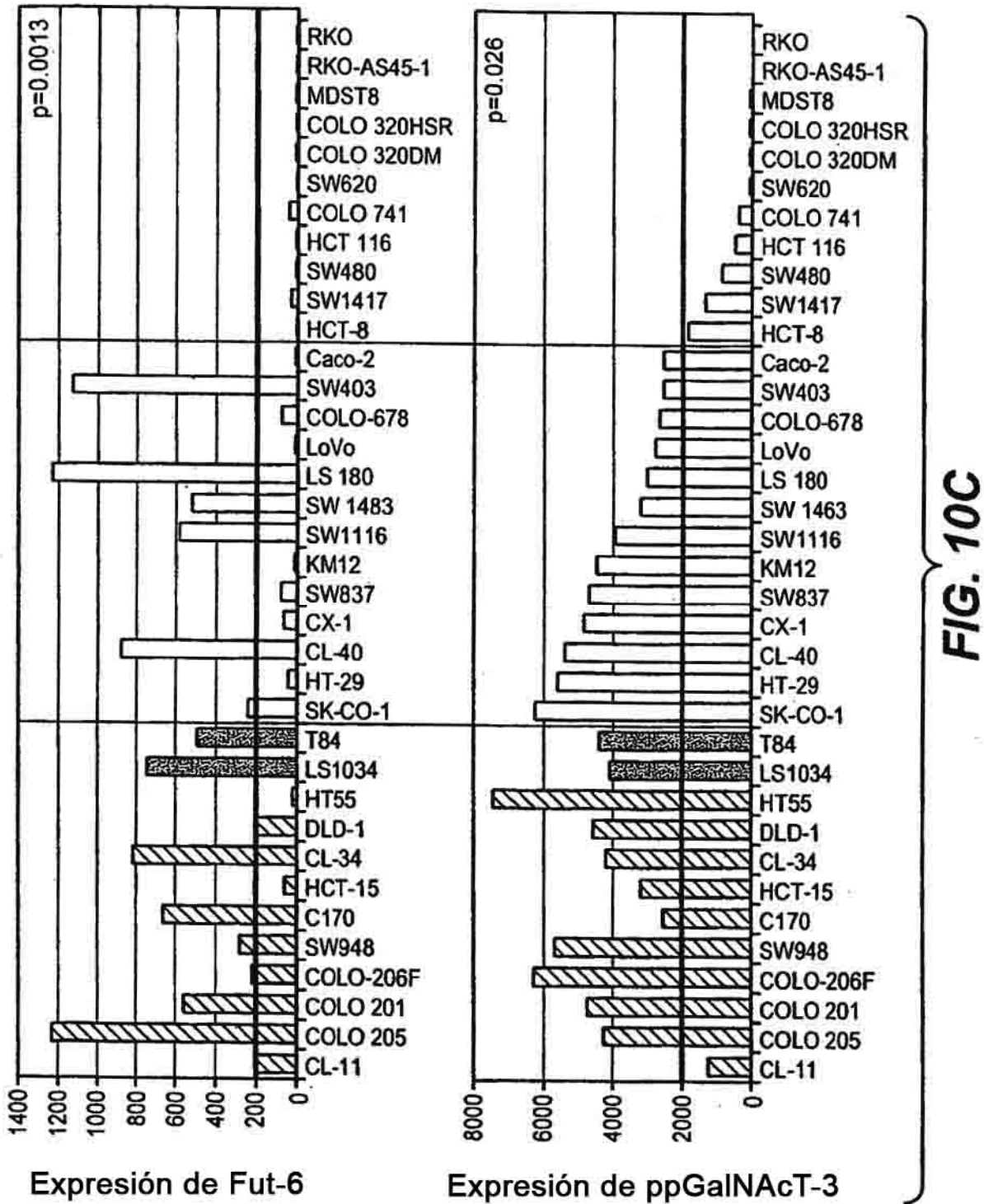


FIG. 10B



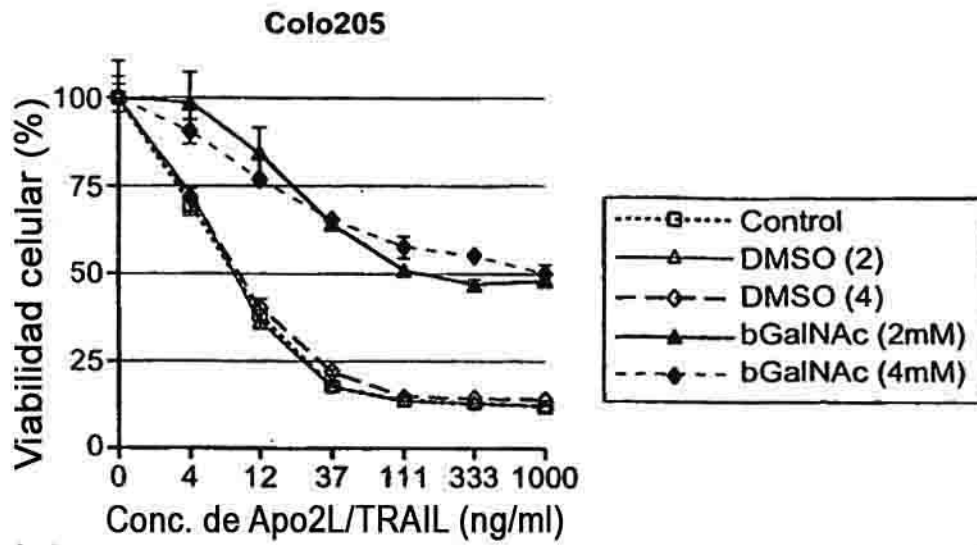


FIG. 11A

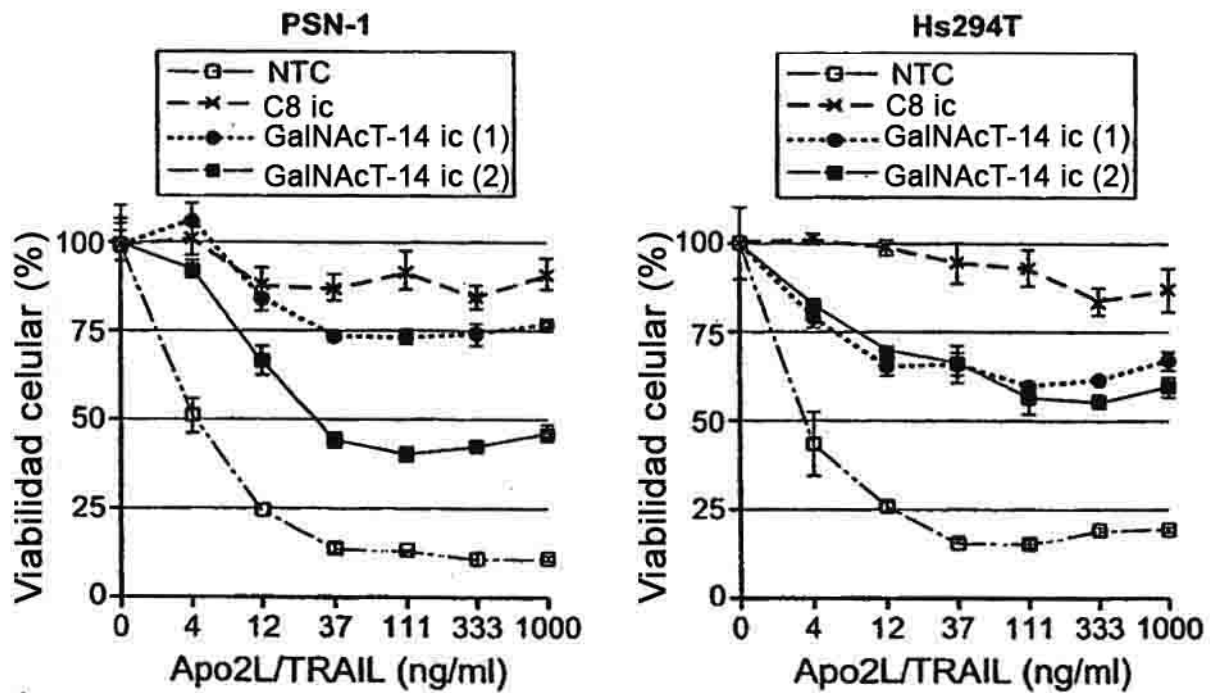


FIG. 11B

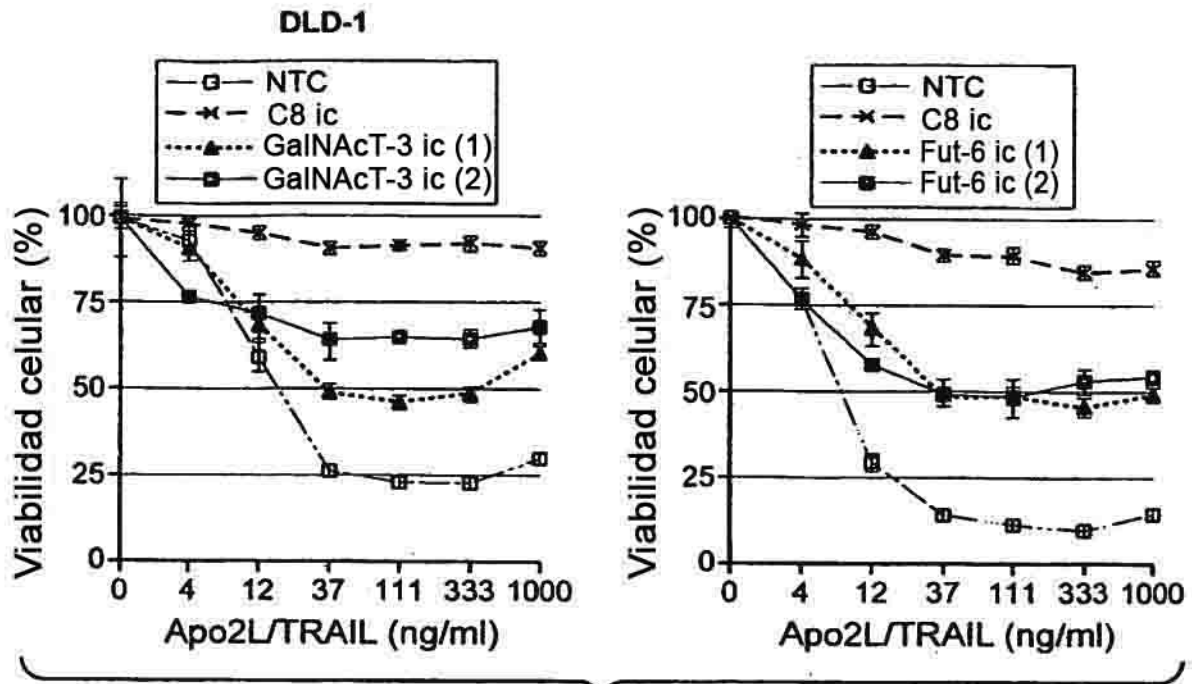


FIG. 11C

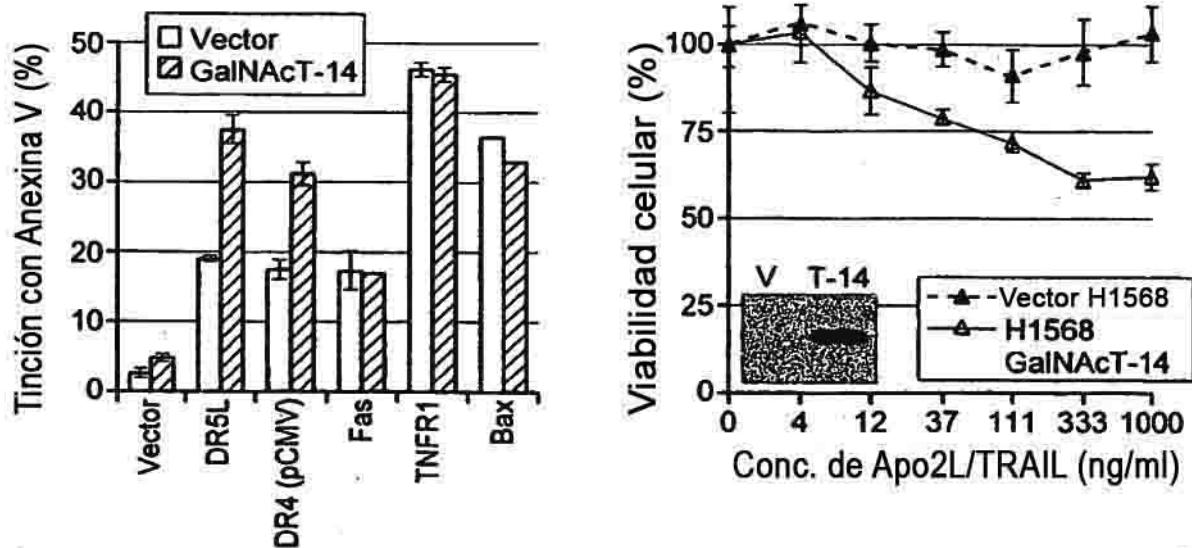


FIG. 11D

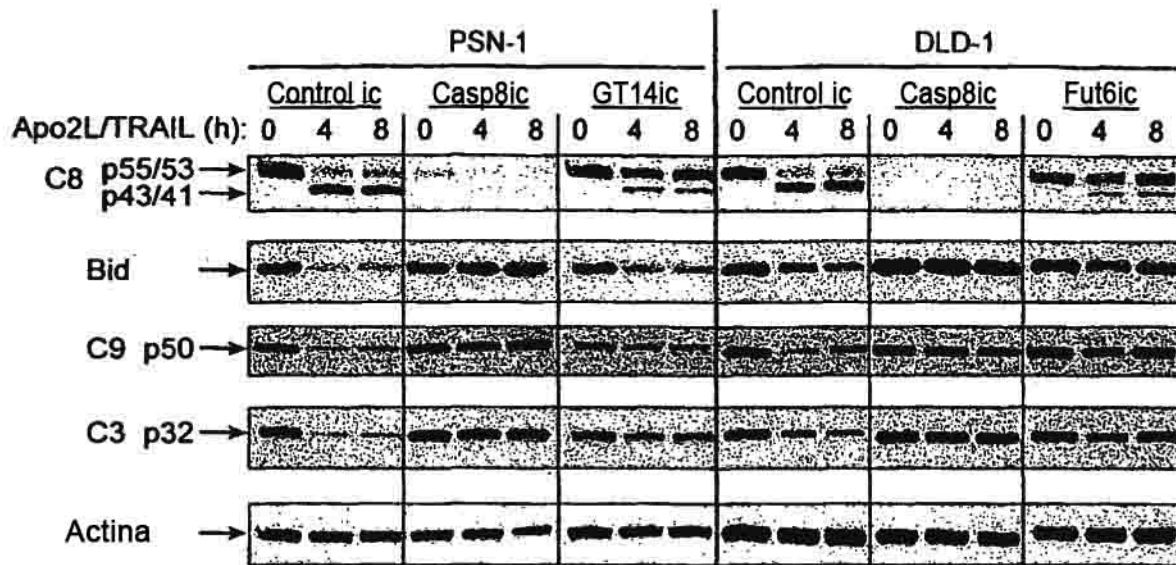


FIG. 12A

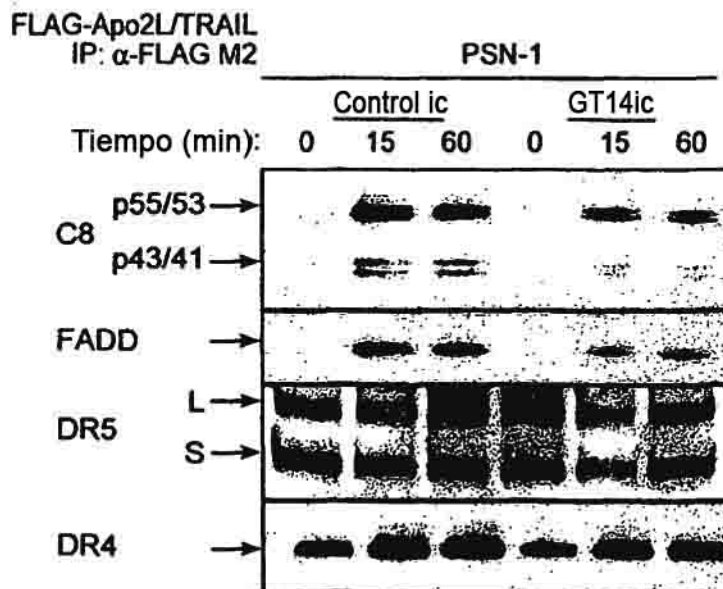


FIG. 12C

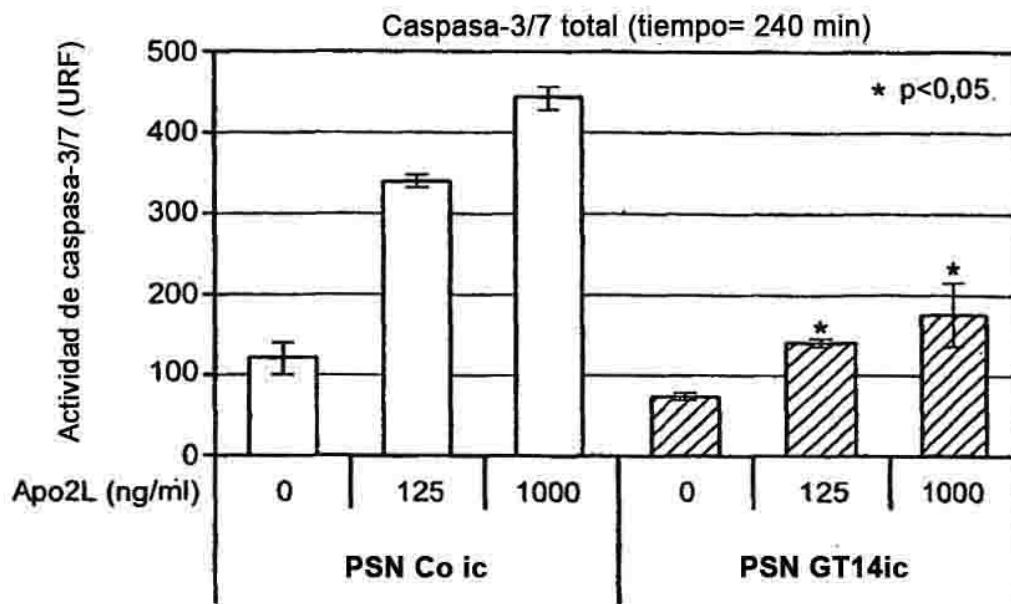


FIG. 12B

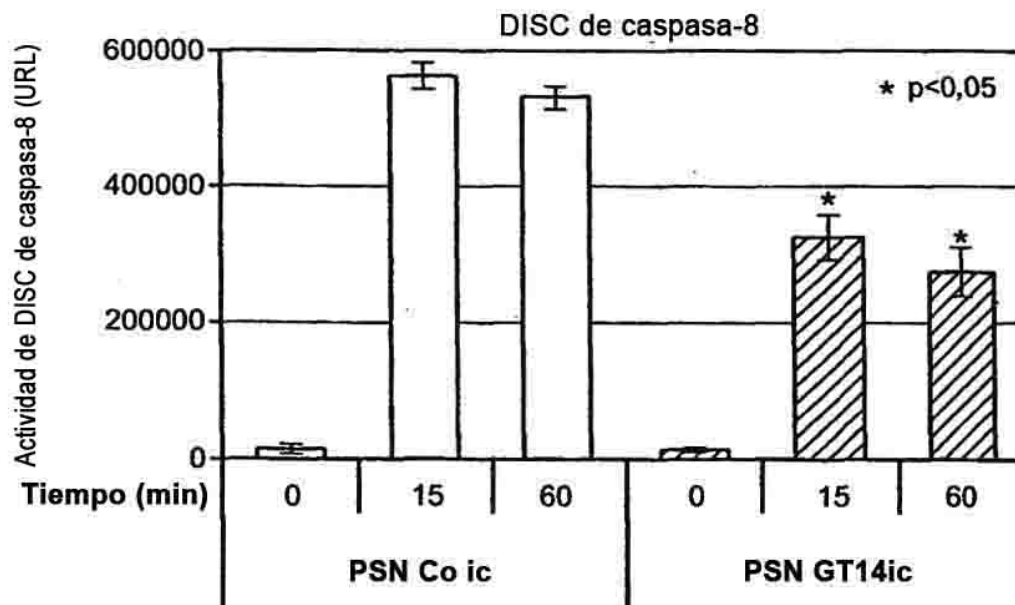


FIG. 12D

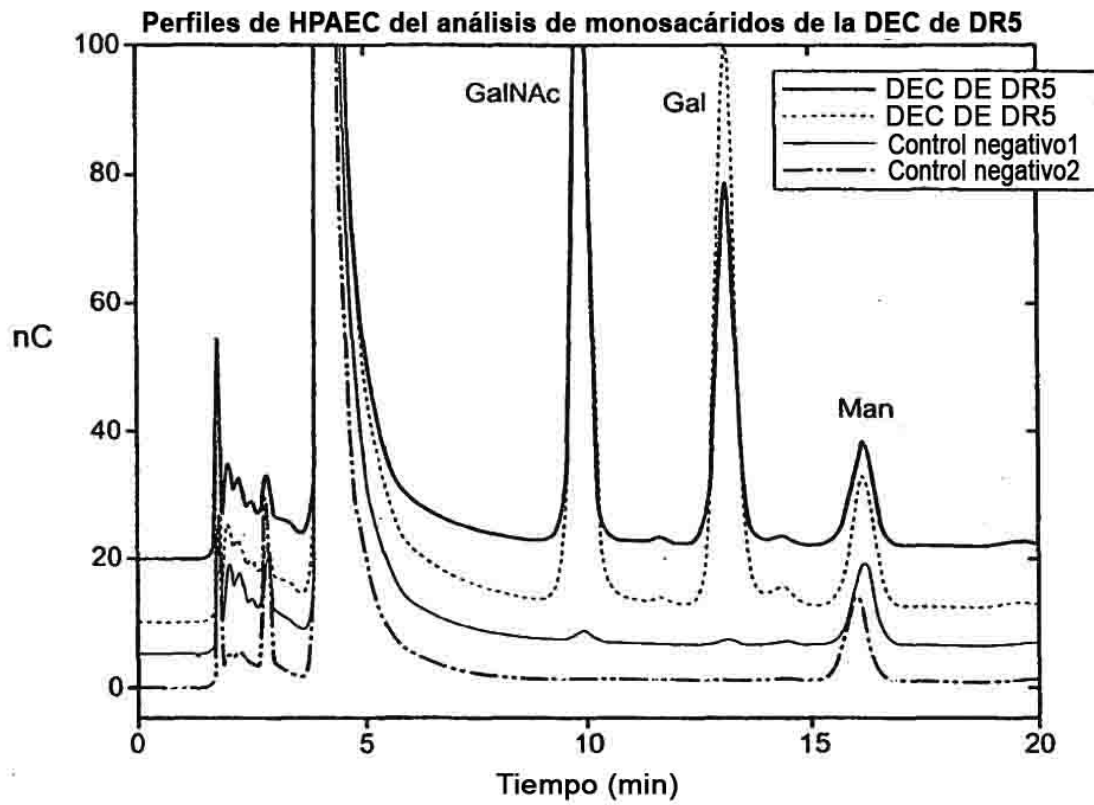


FIG. 13A

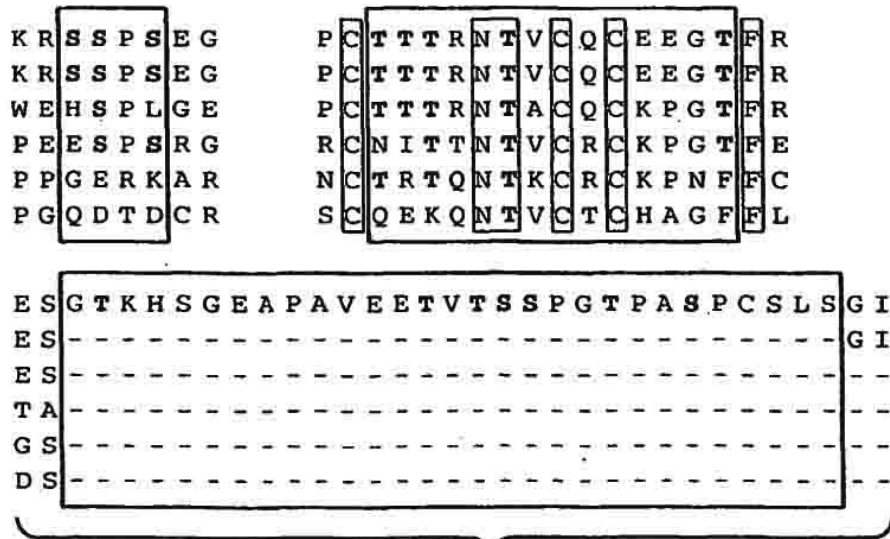


FIG. 13B

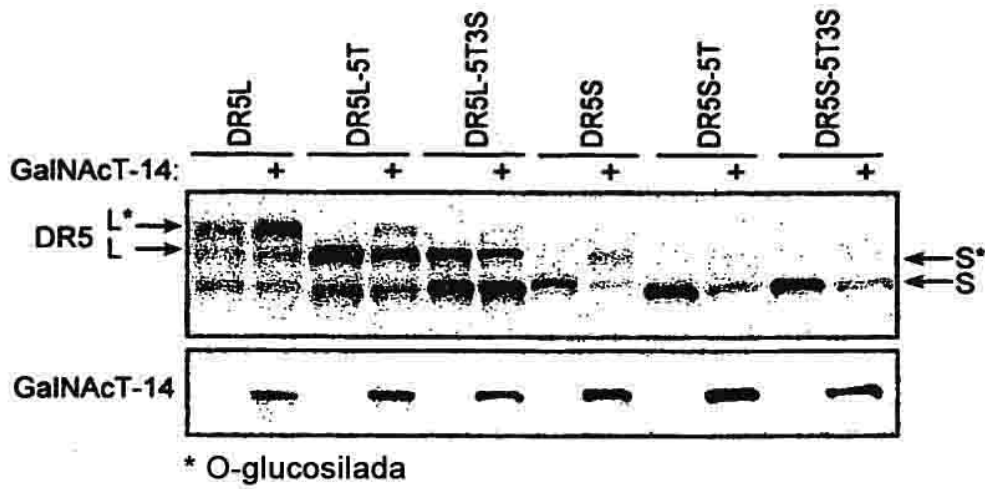


FIG. 13C

Expresión del ARNm de ppGalNAcT-14

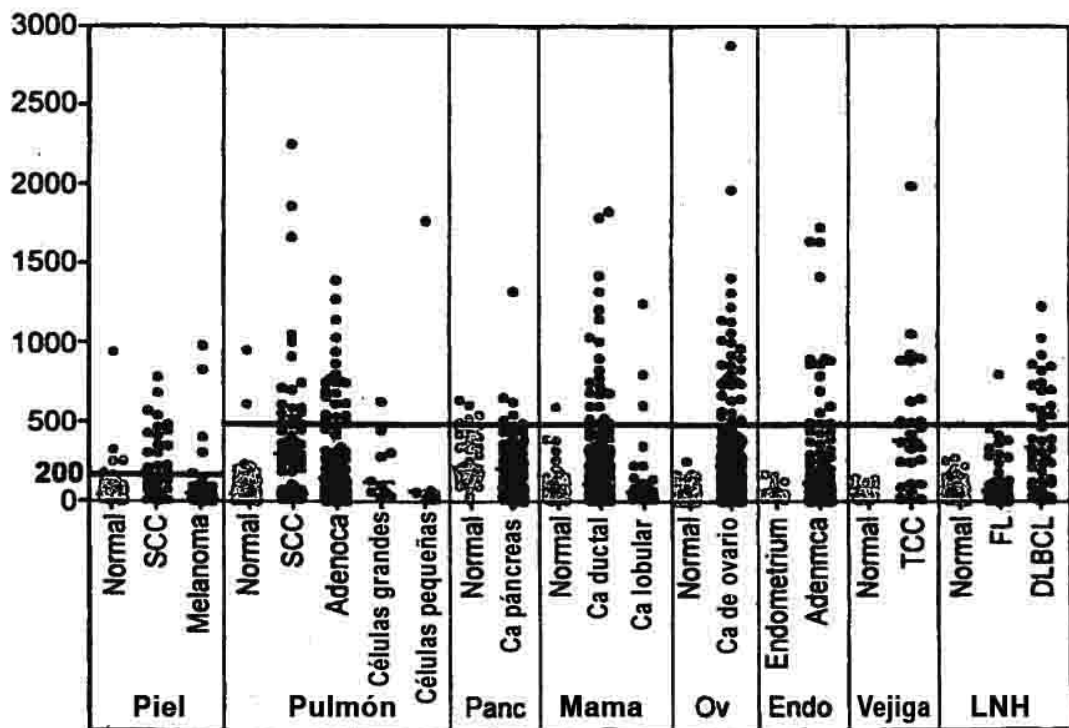


FIG. 13E

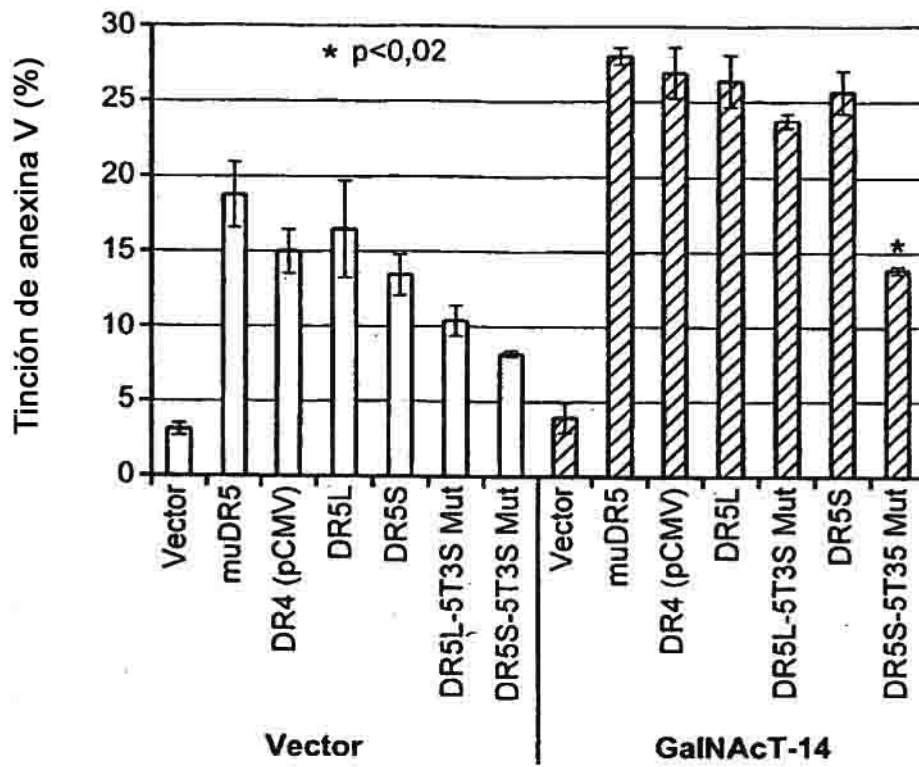


FIG. 13D

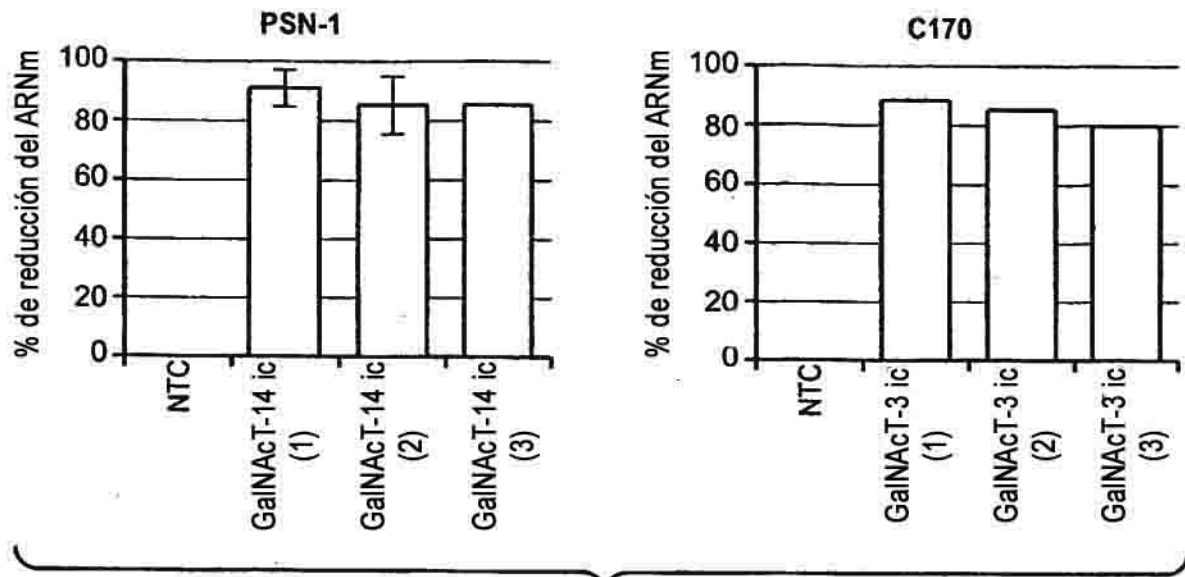


FIG. 14A

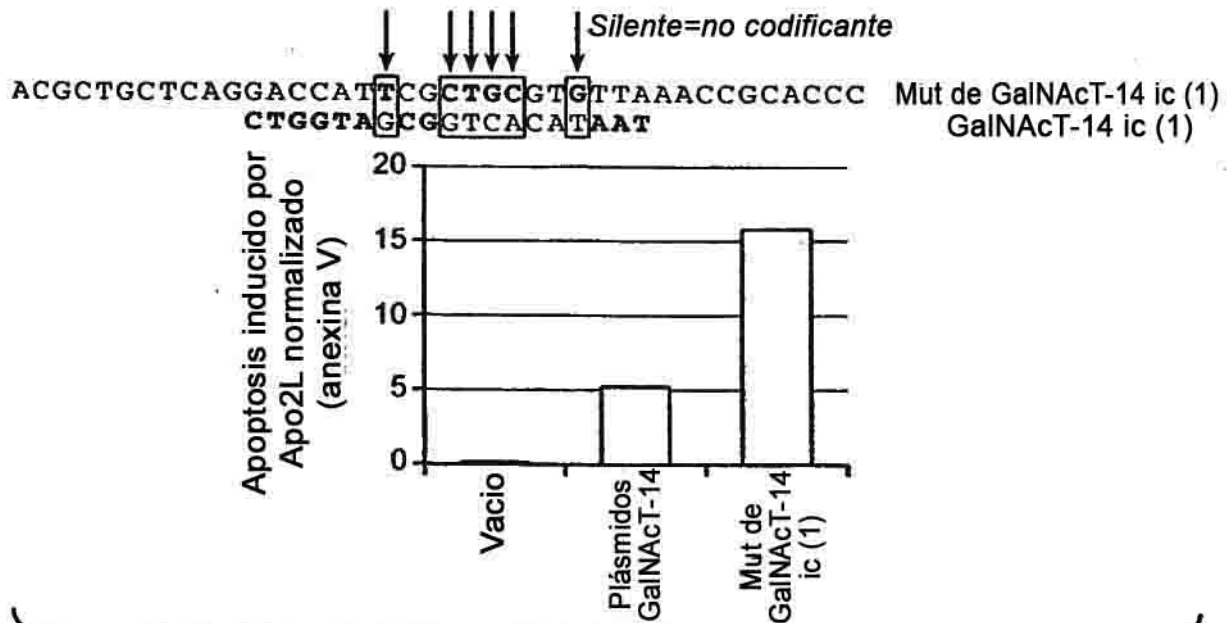
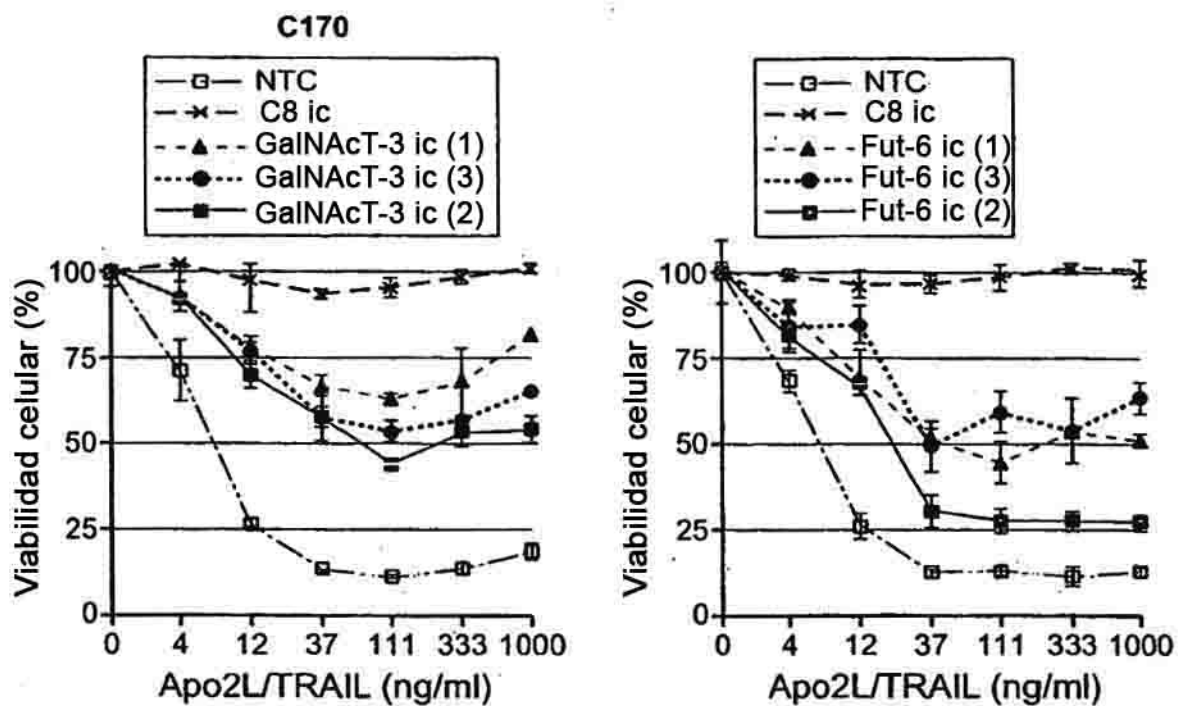


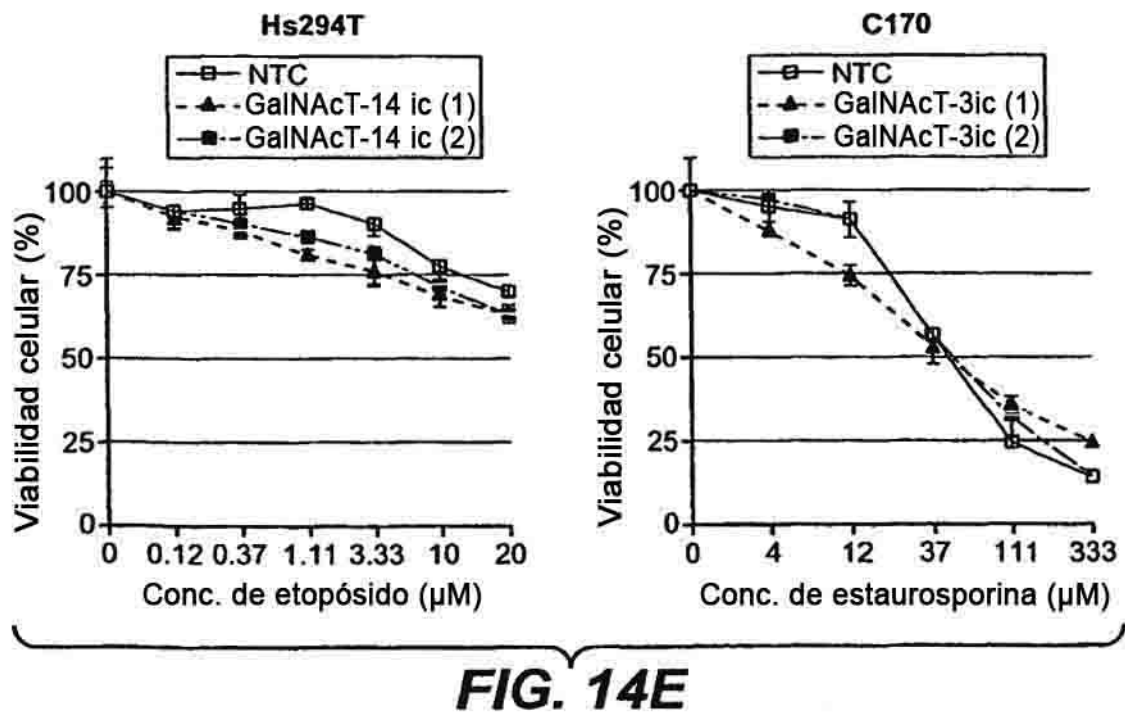
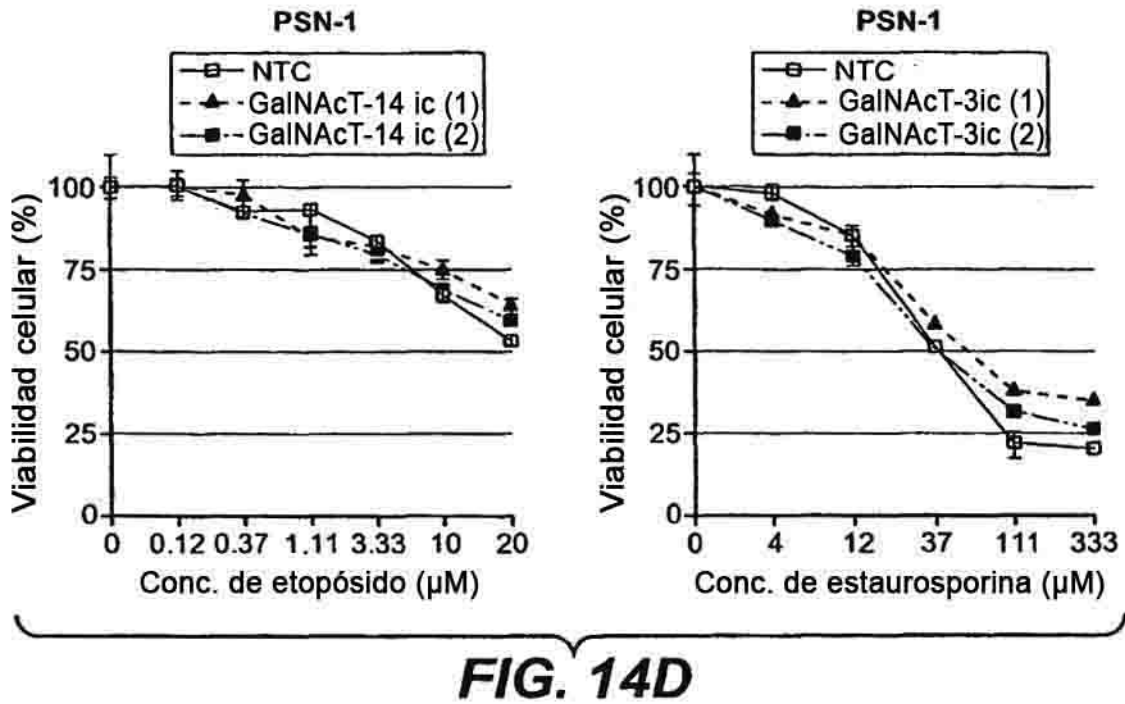
FIG. 14B



T1

Tipo de tumor	Línea celular	ARNi transitorio	ARNsh retroviral	Protección frente a Apo2L/TRAIL mediante silenciamiento		
				ppGalNAcT-14	ppGalNAcT-13	Fut-6
Cáncer pancreático	PSN-1 Panc 05,04 Panc 03,27 Su.86,8 Hup-13	Sí Sí Sí No Sí	Sí	++ ++ + + 0		
				4/5		
Melanoma	A375 Hs294T	Sí Sí		++ ++		
				2/2		
Cáncer colorrectal	C170 DLD-1 SW948	Sí Sí Sí			++ ++ 0	++ ++ 0
					2/3	2/3

FIG. 14C



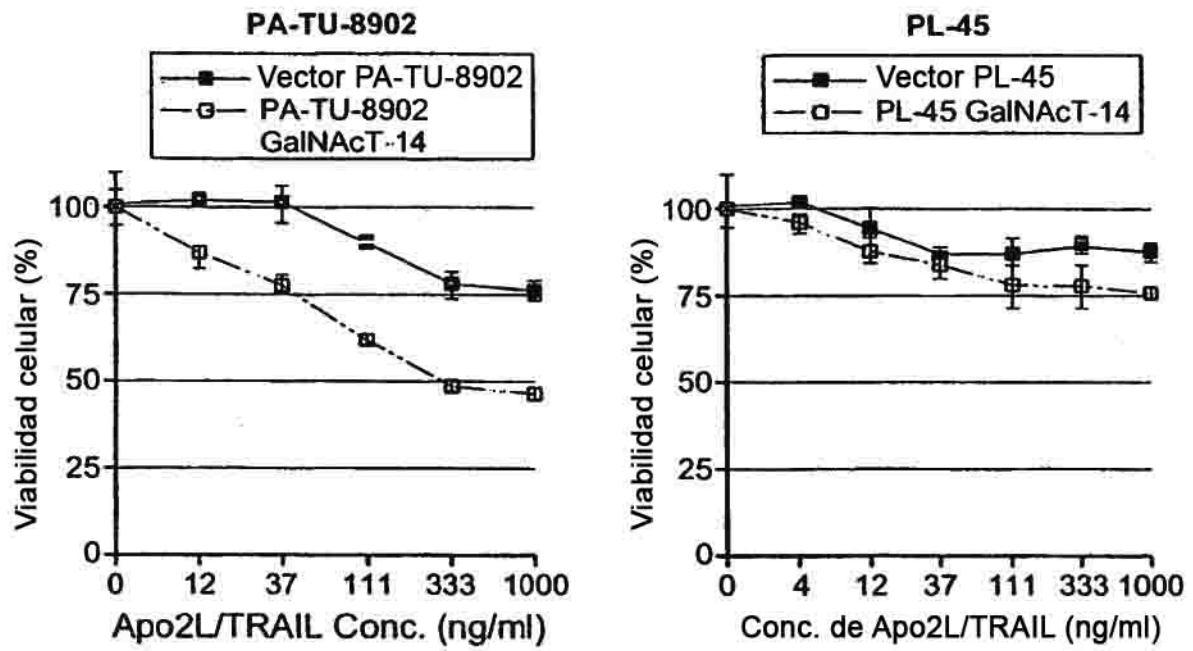


FIG. 14F

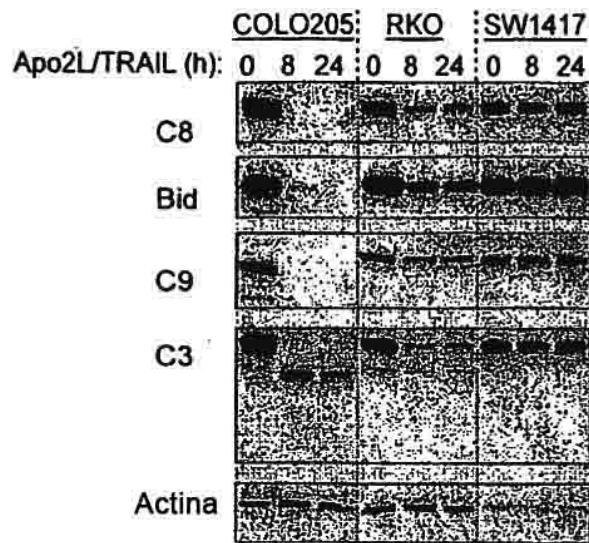


FIG. 15A

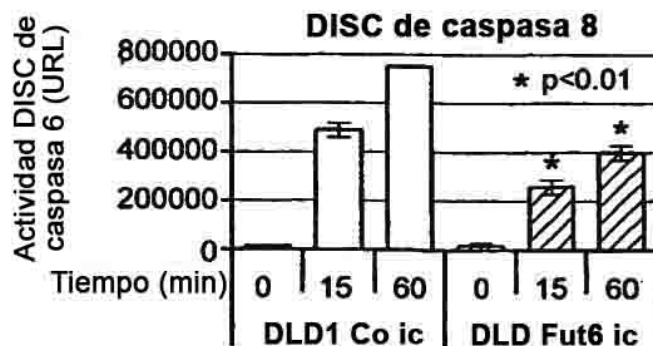
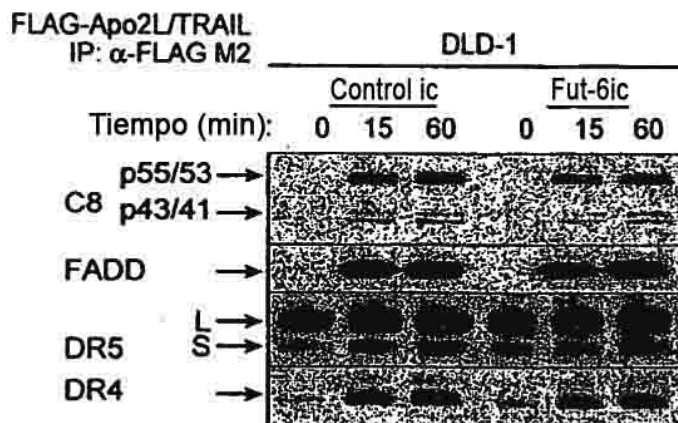


FIG. 15B

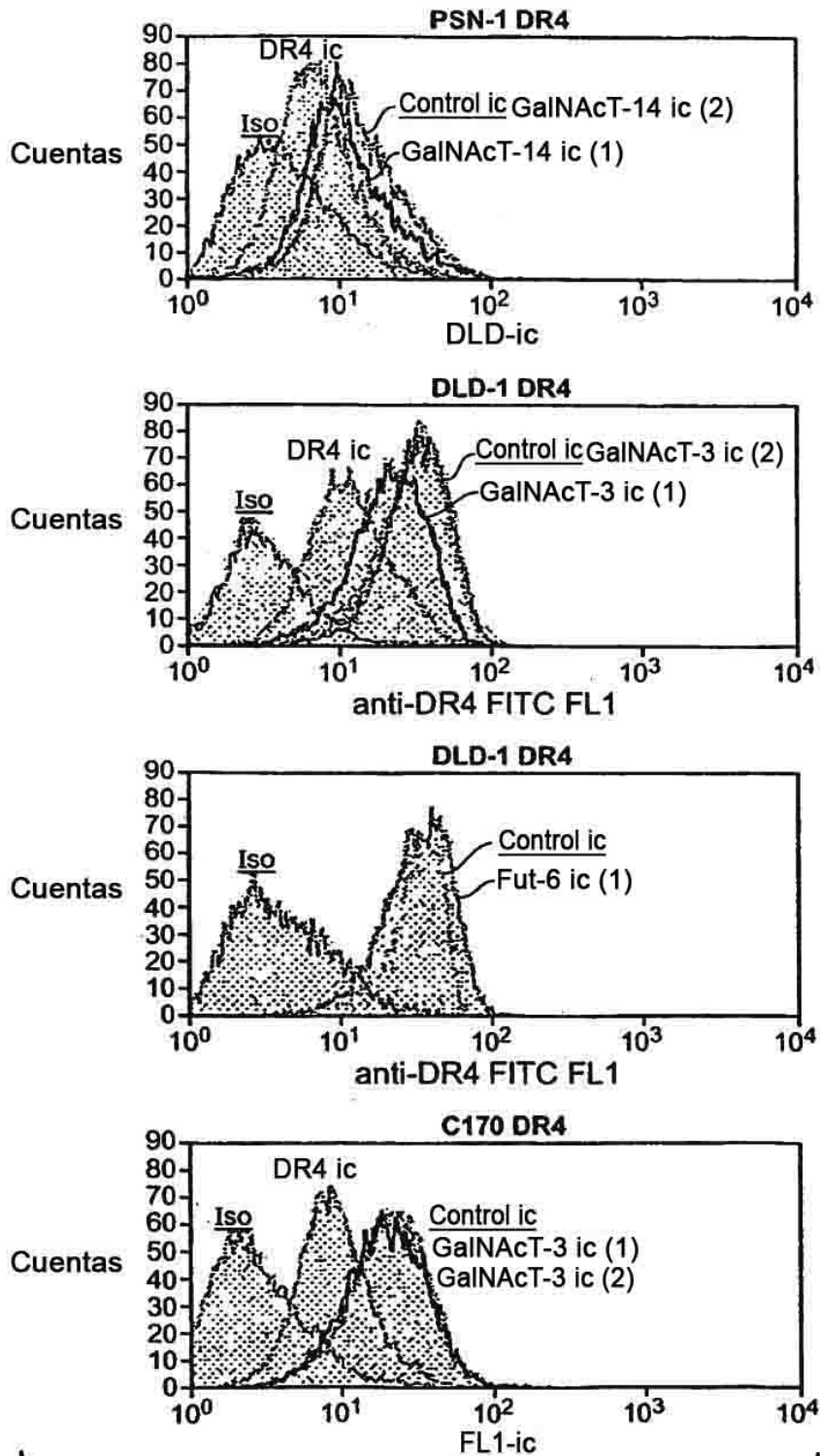


FIG. 15C-1

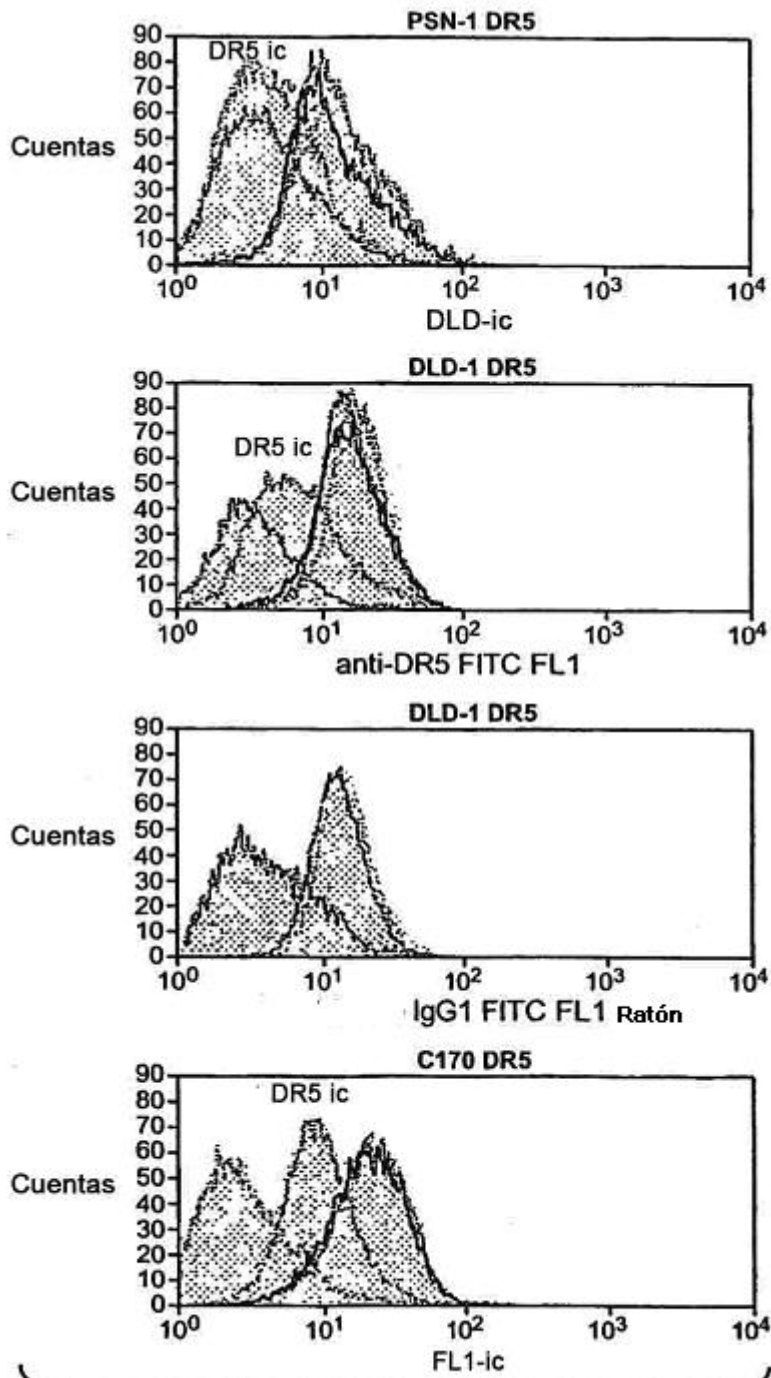


FIG. 15C-2