



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

(21) PI 0718413-1 A2



* B R P I 0 7 1 8 4 1 3 A 2 *

(22) Data de Depósito: 23/10/2007

(43) Data da Publicação: 11/03/2014

(RPI 2253)

(51) Int.Cl.:

G01N 33/50

(54) Título: MÉTODOS PARA PREVER A SENSIBILIDADE DE UMA CÉLULA CONCEROSA A UM PRIMEIRO AGENTE ANTICÂNCER, PARA PREVER OU MONITORAR A EFICÁCIA DE UM AGENTE ANTICÂNCER, E PARA DETERMINAR UMA DOSE EFICAZ PARA UM AGENTE ANTICÂNCER, KIT DE DETECÇÃO, E, SISTEMA DE ENSAIO MULTIPLEX

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 23/10/2006 US 60/862,527

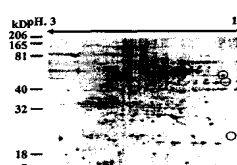
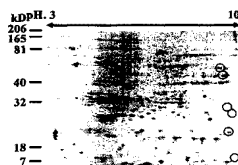
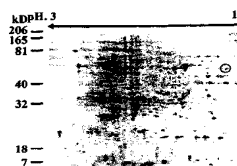
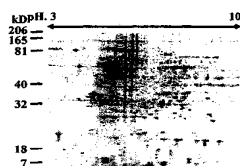
(73) Titular(es): The Uab Research Foundation

(72) Inventor(es): Robert P. Kimberly, Takeshi Isoyama, Tong Zhou

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & Cia.

(86) Pedido Internacional: PCT US2007082228 de 23/10/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/073581 de 19/06/2008



“MÉTODOS PARA PREVER A SENSIBILIDADE DE UMA CÉLULA
CANCEROSA A UM PRIMEIRO AGENTE ANTICÂNCER, PARA
PREVER OU MONITORAR A EFICÁCIA DE UM AGENTE
ANTICÂNCER, E PARA DETERMINAR UMA DOSE EFICAZ PARA UM
5 AGENTE ANTICÂNCER, KIT DE DETECÇÃO, E, SISTEMA DE
ENSAIO MULTIPLEX”

REFERÊNCIA A PEDIDOS RELACIONADOS

O presente pedido reivindica prioridade para U.S. Série No.
60/862.527, depositado em 23 de outubro de 2006, que é incorporado aqui por
10 referência em sua totalidade.

DECLARAÇÃO REFERENTE A PESQUISA FEDERALMENTE PATROCINADA

Esta invenção foi feita como apoio do governo sob as
Subvenções Nos. P50 CA83591, P5089019 e P20 CA101955 concedidas pelo
15 National Institutes of Health. O governo tem certos direitos sobre a invenção.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

O perfil das proteínas associados ao tumor do soro é útil como
um biomarcador na detecção do câncer nos estágios iniciais, monitorando a
progressão da doença e determinando a resposta terapêutica. Os
20 biomarcadores responsivos a medicamento são particularmente críticos para a
seleção de pacientes em quem é esperada a eficácia do medicamento.
Atualmente, não há biomarcadores de soro disponíveis para avaliação da
resposta da célula tumoral prematura durante a apoptose mediada por DR5.

Em muitos casos de terapias anticâncer, os biomarcadores são
25 críticos para prever a eficácia da terapia para sujeitos individuais. Os
biomarcadores podem ser usados para prever a eficácia antes do tratamento
ou podem ser monitorados para prever a resposta terapêutica logo após o
início do tratamento. Estes biomarcadores são úteis para selecionar indivíduos
apropriados para a terapia e para poupar os indivíduos remanescentes, em

quem a terapia é improvável exibir qualquer benefício clínico, de desnecessários efeitos colaterais e custos. Portanto, torna-se um requisito descobrir biomarcadores previsíveis para desenvolvimento de medicamento anticâncer. Contudo, há somente alguns biomarcadores disponíveis para
5 determinar o tratamento, embora muitas terapias de câncer eficazes tenham sido desenvolvidas. Por exemplo, a expressão do receptor de estrogênio e/ou receptores de progesterona em cânceres de mama podem prever resposta terapêutica ao tamoxifeno. Os cânceres de mama com superexpressão do proto-oncogene *HER2/neu(ErbB2)* são mais prováveis responderem ao
10 anticorpo monoclonal anti-HER2 humanizado trastuzumab (Herceptina).

O ligando indutor da apoptose relacionada com o fator de necrose tumoral (TNF) (TRAIL), também chamado Apo21, é um membro da superfamília TNF e tem uma capacidade para acionar a apoptose em uma variedade de linhagens de células transformadas. Cinco receptores para
15 TRAIL foram identificados: dois receptores de mortalidade, DR4 (TRAIL-R1) e DR5 (TRAIL-R2), que transduzem o sinal de apoptose, e três receptores chamariz, DcR1 (TRAIL-53), DcR2 (TRAIL-R4) e osteoprotegrina, que inibe a apoptose induzida por TRAIL. DR4 e DR5 contêm um domínio de mortalidade citoplásmica, que é essencial para indução da apoptose. Após
20 ligação de TRAIL ao DR4 e/ou DR5, estes receptores iniciam a apoptose através do recrutamento do adaptador do domínio da mortalidade associado-Fas e do iniciador caspase-8, para formar o complexo de sinalização indutor da mortalidade, que resulta na ativação da cascata de caspase efetora e eventual morte celular.

25 TRAIL induz a apoptose somente em células tumorigênicas ou transformadas, porém não em células normais, embora mRNA de TRAIL seja expresso constitutivamente em muitos tecidos normais humanos. É sugerido que pode haver alguns mecanismos que protegem as células normais da apoptose induzida por TRAIL. Estudos preclínicos em camundongos e

primatas não humanos mostraram que o TRAIL solúvel recombinante tem uma eficácia antitumor em vários modelos de xenoenxerto de tumor humano e nenhuma toxicidade significativa para os tecidos normais. Entretanto, foi também relatado que algumas formas de TRAIL solúvel recombinante induzem a apoptose em hepatócitos humanos normais in vitro, sugerindo toxicidade potencial do fígado em humanos, embora possa ser causada pela forma de TRAIL solúvel recombinante. O anticorpo monoclonal DR5 anti-humano TRA-8 e versões humanizadas de TRA-8 induzem a apoptose em células cancerosas, tanto in vitro como in vivo, sem toxicidade hepatocelular. Entretanto, vários graus de sensibilidade foram observados entre as células cancerosas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Como corporificado e largamente descrito aqui, esta descrição refere-se a biomarcadores para avaliar a eficácia de terapias ou tratamentos anticâncer. Além disso, são providos biomarcadores para avaliação da resposta de célula tumoral durante a apoptose mediada por DR5. São providos métodos de prever a sensibilidade de uma célula cancerosa a agentes terapêuticos, de prever a eficácia de agentes terapêuticos e de determinar uma dose eficaz de um agente terapêutico pela detecção de um biomarcador, tal como fosfoglicerato quinase 1 (PGK1), frutose-biofosfo aldolase A (ALDOA), peroxirredoxina 1 (PRDX1), cofilina-1 (COF1) e histona H4 (H4).

Vantagens adicionais do método e composições descritos estão na descrição que segue e, em parte, são entendidas pela descrição ou podem ser aprendidas pela prática do método e composições descritos. As vantagens do método e composições descritos são entendidas e obtidas por meio dos elementos e combinações particularmente salientados nas reivindicações anexas. Deve ser entendido que tanto a descrição geral precedente como a seguinte descrição detalhada são somente exemplares e exemplificativas e não são restritivas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra o efeito de TRA-8 nas células COLO 205. Células COLO 205 foram tratadas com nada (A) ou TRA-8 em uma concentração final de 10 (B), 100 (C) ou 1000 ng/ml (D) em condições livres de soro. Os sobrenadantes de cultura foram resolvidos por eletroforese gel bidimensional com subsequente tingimento com SYPRO® Ruby (Molecular Probes, Carlsbad, California). As posições dos marcadores de massa molecular são mostrados na esquerda de cada figura. A faixa de ponto isoeletrico é mostrada no topo de cada figura. os círculos representam proteínas analisadas.

A Figura 2 mostra o efeito do TRA-8 em biomarcadores candidatos em sobrenadante de cultura de células de câncer de cólon. A Figura 2A mostra células COLO 205, WiDr e HT-29 tratadas com nada ou TRA-8 em uma concentração final de 1, 10, 100 ou 1000 ng/ml a 37°C por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada por medição dos níveis de ATP celular e determinada como uma percentagem em relação ao valor de luminescência de células não tratadas usadas como controle. Cada ponto e barra representa o erro médio e padrão de viabilidade celular em experimentos triplicata, respectivamente. A Figura 2B mostra as células COLO 205, WiDr e HT-29 tratadas com nada ou TRA-8 em uma concentração final de 1, 10, 100 ou 1000 ng/ml a 37°C por 24 h. Os sobrenadantes de cultura foram resolvidos por SDS-PAGE, seguido por imunoblotting com anticorpos anti-ALDOA, anti-COF1, anti-histona H4, anti-PGK1 ou anti-PRDX1. As viabilidades celulares são mostradas na base.

A Figura 3 mostra o efeito de TRA-8 em biomarcadores candidatos em sobrenadante de cultura de células de câncer de mama. A Figura 3A mostra células 2LMP e BT-474 tratadas com nada ou TRA-8 em uma concentração final de 1, 10, 100 ou 1000 ng/ml a 37°C por 24 h. A viabilidade celular foi determinada como descrito na Fig. 2A. A Figura 3B

mostra células tratadas com nada ou TRA-8 em uma concentração final de 1, 10, 100 ou 1000 ng/ml a 37°C por 24 h. Os sobrenadantes de cultura foram analisados como descrito na Figura 2B. As viabilidades celulares são mostradas na base.

5 A Figura 4 mostra o efeito de TRA-8 sobre os biomarcadores candidatos em sobrenadante de cultura de células de câncer de pulmão, A Figura 4A mostra células NCI-H2122 e A-427 tratadas com nada ou TRA-8 em uma concentração final de 1, 10, 100 ou 1000 ng/ml a 37°C por 24 h. A viabilidade celular foi determinada como descrito na Fig. 2A. A Figura 4B
10 mostra células tratada com nada ou TRA-8 em uma concentração final de 1, 10, 100 ou 1000 ng/ml a 37°C por 24 h. Sobrenadantes de cultura foram analisados como descrito na Fig. 2B. As viabilidades celulares são mostradas na base.

 A Figura 5 mostra o curso de tempo dos biomarcadores
15 candidatos no sobrenadante de cultura no tratamento com TRA-8. A Figura 5A mostra células COLO 205 (losangos), WiDr (quadrados), 2LMP (triângulos) e NCI-H2122 (cruzes) tratadas com ou sem TRA-8 em uma concentração final de 1 µg/ml a 37°C por 0, 1, 2, 4, 8 ou 24 h. A viabilidade celular foi determinada como descrito na Fig. 2A. A Figura 5B mostra células
20 COLO 205 (alamedas 1 – 6), células WiDr (alamedas 7 – 12), 2LMP (alamedas 13 – 18) e células NCI-H2122 (alamedas 19 – 24) incubadas com TRA-8 em uma concentração final de 1 µg/ml em condições livres de soro a 37°C por 0 (alamedas 1, 7, 13 e 19), 1 hora (alamedas 2, 8, 14 e 20), 2 horas (alamedas 3, 9, 15 e 21), 4 horas (alamedas 4, 10, 16 e 22), 8 horas (alamedas
25 5, 11, 17 e 23) e 24 horas (alamedas 6, 12, 18 e 24). Os sobrenadantes de cultura foram resolvidos por SDS-PAGE seguido por imunoblotting com anticorpos contra ALDOA, COF1, histona H4, PGK1 ou PRDX1.

 A Figura 6 mostra o efeito de agentes quimioterapêuticos sobre biomarcadores candidatos em sobrenadante de cultura de células de

câncer. A Figura 6A mostra células COLO 205, WiDr e hT-29 tratadas com apenas meio (condição 1), 50 μ M CPT-11 (condição 2), 50 μ M oxaliplatina (condição 3) ou 1 μ M paclitaxel (condição 4) a 37°C por 24 (barras abertas) e 48 horas (barras cheias) em condições livres de soro. A viabilidade celular foi determinada como descrito na FIG. 2A. Análise da viabilidade celular foi realizada usando-se o ensaio ATPLite™ (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA). Cada coluna e barra representa o erro médio e padrão dos dados de experimentos triplicata, respectivamente. A Figura 6B mostra células COLO (alamedas 1-4 e 13-16), células WiDr (alamedas 5 – 8 e 17 – 20) e células HT-29 (Alamedas 9 – 12 e 21 – 24) incubadas com apenas meio (alamedas 1, 5, 9, 13, 17 e 21), 50 μ M CPT-11 (alamedas 2, 6, 10, 14, 18 e 22), 50 μ M oxaliplatina (alamedas 3, 7, 11, 15, 19 e 23) ou 1 μ M paclitaxel (alamedas 4, 8, 12, 16, 20 e 24) a 37°C por 24 horas (alamedas 1 – 12) e 48 horas (alamedas 13 – 24) em condições livres de soro. Os sobrenadantes de cultura foram resolvidos por SDS-PAGE seguido por imunoblotting com os anticorpos contra ALDOA, COF1, histona H4, PGK1 ou PRDX1 como descrito na Figura 2B.

A Figura 7 mostra expressão de PRDX1 e PGK1 em linhagens e tecidos de célula de câncer humanos. A Figura 7A mostra análise Western blot de expressão PRDX1 em células de câncer e a Figura 7B mostra análise Western blot de expressão de PGK1 em células cancerosas; proteínas de lisados totais de célula de 13 linhagens de célula cancerosa humanas foram separadas em SDS-PAGE e as manchas foram sondadas com anticorpos monoclonais específicos contra PRDX1 e PGK1 humanas. As alamedas mostradas nas Figuras 7A e 7B correspondem às seguintes linhagens de célula, Alameda 1, MDA231; Alameda 2, UL-3A; Alameda 3, UL-3C; Alameda 4, COLO205; Alameda 5, HT29; Alameda 6, SW480; Alameda 7, SW620; Alameda 8, SW116; Alameda 9, WiDR; Alameda 10, 2-LMP; Alameda 11, BT474; Alameda 12, H2122; Alameda 13, A427. A Figura 7C

mostra tingimento imunoistológico de PGK1 em tecido canceroso ovariano humano. A seção de parafina de um tecido canceroso ovariano humano foi tingida com um anticorpo monoclonal anti-PGK1.

A Fig. 8 mostra a liberação de bioarcadores candidatos de tumores COLO 205 tratada por TRA-8 e CPT-11 em um modelo de xenoenxerto. A Figura 8A mostra os efeitos do tratamento por TRA-8 e CPT-11 em camundongos nus atímicos contendo tumores de COLO 205. TRA-8 (10 mg/kg) foi administrado em camundongos nos dias 16 e 20. CPT-11 (33 mg/kg) foi administrado em camundongos nos dias 17 e 21. Cada ponto e barra representa o erro médio e padrão de dados de tamanho de tumor de cada grupo tratado com nada (losangos), TRA-8 (quadrados), CPT-11 (triângulos) ou TRA-8 em combinação com CPT-11 (círculos), respectivamente. A Fig. 8B mostra biomarcadores candidatos detectados em soros obtidos de camundongos contendo tumor com nada (coluna 1), TRA-8 (coluna 2), CPT-11 (coluna 3) ou TRA-8 mais CPT-11 (coluna 4) no dia 20. O nível de PRDX1 nos soros foi determinado como valor A_{450} usando-se ELISA. Cada coluna e barra representa o erro médio e padrão dos dados, respectivamente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os biomarcadores, que predizem a resposta terapêutica, são essenciais para desenvolvimento da terapia anticâncer. Como descrito aqui, o monitoramento dos efeitos de medicamento anticâncer resulta em predição da resposta terapêutica. Eletroforese gel bidimensional (2-DE) e espectrometria de massa (MS) foram usadas para identificar proteínas que monitoram e predizem o efeito de terapias de câncer. Como descrito aqui, a fosfoglicerato quinase 1 (PGK1), frutose-bisfosfato aldolase A (ALDOA), peroxirredoxina 1 (PRDX1), cofilina-1 (COF1) e histona H4 (H4) são liberadas de células cancerosas em resposta a agentes terapêuticos. A liberação destes biomarcadores candidatos foi correlacionada com o efeito citotóxico dos agentes de quimioterapia, tais como CPT-11, oxaliplatina e paclitaxel. Além

disso, quando agonistas de DR5 e CPT-11 foram administrados duas vezes em camundongos contendo tumor, o nível de PRDX1 nos soros foi aumentado apenas pelo agonista de DR5 ou em combinação com CPT-11. O conjunto de proteínas identificado e descrito aqui compreende biomarcadores
5 úteis para monitorar e prever a eficácia de medicamento anti-câncer.

São descritos aqui biomarcadores e métodos para identificar e utilizar os biomarcadores. Por biomarcador pretendemos significar quaisquer características ou composições ensaiáveis que são usadas para identificar, prever ou monitorar uma condição (p. ex., um tumor ou outro câncer, ou a sua
10 falta) ou uma terapia para dita condição em um indivíduo ou amostra. Um biomarcador é, por exemplo, uma proteína ou combinação de proteínas cuja presença, ausência ou quantidade relativa é usada para identificar uma condição ou status de uma condição em um indivíduo ou amostra. Em um exemplo particular, um biomarcador é uma proteína ou combinação de
15 proteínas cuja concentração relativa em um indivíduo ou amostra é característica de sensibilidade de uma célula cancerosa a um agente terapêutico. Os biomarcadores identificados aqui são medidos para determinar níveis, expressão, atividade ou para detectar variantes. As variantes incluem variantes de aminoácido ou ácido nucleico ou variantes pós
20 translacionalmente modificadas.

É descrito aqui o uso de frutose-bisfosfato aldolase A (ALDOA) como um biomarcador para prever a sensibilidade de uma célula cancerosa a um agente anticâncer. As enzimas de aldolase catalisam a clivagem de fosfatos de açúcar relacionados estruturalmente, incluindo
25 frutose-1-fosfato (F-1-P), que é um intermediário do metabolismo da frutose. Três isoformas da enzima foram identificadas, a saber, aldolase A (isolada de músculo), aldolase B (isolada do fígado) e aldolase C (isolada do cérebro). A aldolase A (Frutose-bisfosfato aldolase (aldolase tipo muscular)) é uma enzima glicolítica ubíqua, que catalisa a clivagem reversível da frutose 1,6-

bifosfato em gliceraldeído 3-fosfato e diidroxiacetona fosfato. A aldolase é transcricionalmente induzida pelo fator-1 indutível por hipoxia (HIF-1) em células cancerosas pancreáticas. A aldolase A é encontrada no embrião em desenvolvimento e é produzida em quantidades mesmo maiores em músculo de adulto. A expressão da aldolase A é reprimida no fígado, rins e intestino de adultos e similar aos níveis de aldolase C no cérebro e outros tecidos nervosos. A união alternativa deste gene resulta em múltiplas variantes transcritas, que codificam a mesma proteína. Os genes associados com o metabolismo anaeróbico Glut1 e aldolase A são altamente expressos em células tumorais com expressão constitutiva de HIF-1 α , tornando estas células resistentes a apoptose induzida por hipoxia e privação de glicose. As células cancerosas empregam enzimas glicolíticas para produzir ATP anaerobicamente, em resposta a hipoxia. A expressão aumentada de mRNAs de Glut-1 e aldolase A sob hipoxia é ab-rogada pelos transfectantes HIF-1 α dominantes negativos (dnHIF-1 α), tornando as células cancerosas pancreáticas sensíveis à apoptose e inibição de crescimento induzidas por hipoxia ou privação de glicose. ALDOA é superexpressa em câncer de pulmão e carcinoma hepatocelular, em comparação com os tecidos normais, e é detectada nos soros de pacientes com câncer.

É descrito aqui o uso de fosfoglicerato quinase 1 (PGK1) como um biomarcador para prever a sensibilidade de uma célula cancerosa a um agente anticâncer. A fosfoglicerato quinase 1 (PGK1), também conhecida como ATP:3-fosfoglicerato 1-fosfotransferase, catalisa a conversão reversível de 1,3-difosfoglicerato em 3-fosfoglicerato, gerando uma molécula de ATP. As ligações dissulfeto em proteínas secretadas são consideradas serem inertes por causa da natureza oxidante do ambiente extracelular. Uma exceção para esta regra é uma redutase secretada por células tumorais, que reduz as ligações dissulfeto na serina proteinase, plasmina. A redução da plasmina inicia clivagem proteolítica no domínio kringle 5 e libera a angiostatina

inibidora dos vasos sanguíneos do tumor. Nova formação de vaso sanguíneo ou angiogênese é crítica para a expansão do tumor e metástase. A plasmina redutase isolada de meio condicionado de células de fibrossarcoma é a fosfoglicerato quinase enzimática glicolítica. A fosfoglicerato quinase recombinante tiveram a mesma atividade específica que a proteína derivada de fibrossarcoma. O plasma de camundongos contendo tumores de fibrossarcoma continha diversas-vezes mais fosfoglicerato quinase, em comparação com camundongos sem tumores. A administração de fosfoglicerato quinase em camundongos contendo tumor provocou um aumento nos níveis de plasma da angiostatina e uma diminuição da vascularidade tumoral e taxa de crescimento tumoral. A fosfoglicerato quinase não somente funciona em glicólise, mas é também secretada por células tumorais e participa do processo angiogênico como uma disulfeto redutase. Entretanto, de acordo com Daly et al., o nível de sangue da fosfoglicerato quinase não se imagina ser correlacionado com a presença ou extensão de um tumor (Daly EB et al., *Int. J. Biol. Markers* 19(2): 170-2 2004). PGK1 é transcricionalmente ativada por HIF-1. Níveis aumentados de PGK1 foram encontrados em carcinoma de célula renal, em comparação com córtex de rim normal de pacientes igualados. PGK1 foi secretada de várias células cancerosas cultivadas e o plasma de camundongos contendo tumor de fibrossarcoma HT1080 continha diversas-vezes mais PGK1 do que os camundongos sem os tumores.

É descrito o uso de peroxirredoxina 1 (PRDX1) como um biomarcador para prever a sensibilidade de uma célula cancerosa a um agente anticâncer. A peroxirredoxina 1 (PRDX1) é um membro da família da peroxirredoxina de enzimas antioxidantes que reduzem os oxidantes, tais como peróxido de hidrogênio, a espécie não reativas na célula. Pensa-se que a proteína codificada por PRDX1 represente um papel protetor na célula indicada por tanto sua natureza antioxidativa como seu papel na atividade

antiviral de célula-T. Entretanto, a PRDX1 pode também auxiliar na proliferação do câncer. Há correlações entre o nível de expressão e o estágio da progressão tumoral em carcinoma de célula escamosa da cavidade oral; elevada expressão em tumores da tiróide foliculares, porém não em carcinoma papilar da tiróide. PRDX1 é induzida por estresse oxidativo e constitutivamente expressa na maioria das células humanas e é induzida para níveis mais elevados no estímulo por soro em células não transformadas e transformadas. Níveis elevados de PRDX1 foram observados em câncer da tiróide, câncer de mama, câncer de pulmão, mesotelioma maligno e pacientes com câncer de pulmão não-pequena.

É descrito o uso de cofilina 1 (COF1) como um biomarcador para prever a sensibilidade de uma célula cancerosa a um agente anticâncer. A cofilina é uma proteína moduladora da actina intracelular largamente distribuída, que se liga na e despolimeriza a actina-F filamentosa e inibe a polimerização da actina-G monomérica em uma maneira dependente do pH. Ela está envolvida na translocação do complexo actina-cofilina do citoplasma para o núcleo. COF1 é uma isoforma não muscular do fator/colfilinas despolimerizantes da actina, que são pequenas proteínas de ligação da actina que regulam a polimerização e despolimerização da actina e separa os filamentos da actina. A COF1 é largamente distribuída em vários tecidos. A atividade a cofilina é regulada através de uma variedade de mecanismos, incluindo fosforilação. Níveis aumentados de cofilina foram observados em carcinoma de célula renal, devido à infiltração do linfócito-T expressando cofilina, em comparação com seção de rim normal igualada em paciente.

É descrito o uso de histona H4 como um biomarcador para prever a sensibilidade de uma célula cancerosa a um agente anticâncer. As histonas são proteínas nucleares básicas que são responsáveis pela estrutura do nucleossoma da fibra cromossomal em eucariotos. Os nucleossomas consistem de aproximadamente 146 pares bases de DNA envolvidos em torno

de um octâmero de histona composto de pares de cada uma das quatro histonas de núcleo (H2A, H2B, H3 e H4). A fibra de cromatina é ainda compactada através da interação de uma histona ligadora, H1, com o DNA entre os nucleossomas para formar estruturas de cromatina de ordem mais elevada. Quando a morte celular ocorre, os nucleossomas são liberados dentro da circulação e são detectados em quantidades elevadas no soro ou plasma. O nível elevado de nucleossomas circulantes foi detectado em soros ou plasma de pacientes com vários tumores sólidos, em comparação com pessoas saudáveis. Além disso, o aumento temporal dos nucleossomas circulantes após quimioterapia ou radioterapia foi observado. Mudanças dos nucleossomas circulantes em pacientes com avançado câncer de pulmão de célula não-pequena durante quimioterapia pode prever resposta terapêutica. Como demonstrado por Ono et al., J. Exp. Clin. Cancer Res. 21(3): 377 – 82 (2002), os níveis de expressão de histona H4 acetilada são reduzidos em carcinomas gástricos, em comparação com a mucosa não neoplástica. A histona H4 acetilada é detectada nos núcleos de células epiteliais e estromais não-neoplásticas, enquanto que os níveis de histona H4 acetilada são reduzidos no carcinoma gástrico e adenomas gástricos. A expressão reduzida da histona H4 acetilada foi também observada em algumas áreas de metaplasia intestinal adjacentes a carcinomas. A redução na expressão de histona H4 acetilada foi significativamente correlacionada com metástase de estágio avançado, profundidade de invasão de tumor e linfonodo. Assim, os baixos níveis de acetilação de histona são estreitamente associados com o desenvolvimento e progressão de carcinomas gástricos, possivelmente através da alteração da expressão genética.

É provido aqui um método de prever a sensibilidade de uma célula cancerosa a um agente anticâncer, compreendendo contatar a célula cancerosa com uma quantidade eficaz do agente anticâncer e avaliar a liberação pela célula de um ou mais dos biomarcadores aqui descritos. A

célula cancerosa é contatada in vitro ou in vivo.

Um aumento da liberação dos biomarcadores aqui providos pela célula contatada, em comparação com uma célula de controle, indica que a célula cancerosa é sensível ao agente. Por liberação aumentada pretendemos
5 significar qualquer aumento na quantidade do biomarcador que é detectável fora da célula, em comparação com níveis nativos ou de controle. Assim, o aumento é de cerca de 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% ou qualquer valor de aumento intermediário ou superior, em comparação com os níveis de controle nativo ou de controle.

10 Por exemplo, uma célula ou células cancerosas, tais como de uma biópsia de um indivíduo, é contatada in vitro com um agente anticâncer em um meio de cultura. A presença ou ausência dos biomarcadores aqui descritos é medida no meio de cultura. Esta medição é comparada com os resultados de outras células de câncer e não-câncer de controle e com
15 resultados empregando-se outros agentes anticâncer.

A liberação dos biomarcadores é opcionalmente avaliada em um modelo de xenoenxerto. Por exemplo, tecido humano é transplantado para um camundongo imunodeficiente. A presença ou ausência do(s) biomarcador(es) aqui descrito(s) é medida em um fluido corporal antes e/ou o
20 tratamento com um agente anticâncer.

A liberação dos biomarcadores é opcionalmente avaliada em um indivíduo ou uma amostra de um indivíduo. A presença ou ausência do(s) biomarcador(es) aqui descrito(s) é medida em um tecido (p. ex., biópsia) ou fluido corporal. Os fluidos corporais usados para avaliar a presença ou
25 ausência dos aqui descritos biomarcadores incluem, sem limitação, sangue, urina, soro, lágrimas, linfa, bile, fluido cerebrospinal, fluido intersticial, humor aquoso ou vítreo, colostro, esputo, fluido amniótico, saliva, secreções anais e vaginais, perspiração, sêmen, transudato, exsudato e fluido sinovial. Por exemplo, os níveis de biomarcador são medidos no sangue ou biópsia

ante e após tratamento de um indivíduo.

Biópsia refere-se à remoção de uma amostra de tecido para fins de diagnóstico. Por exemplo, uma biópsia é de um câncer ou tumor, incluindo uma amostra de tecido de uma área anormal ou um inteiro tumor.

5 Uma lista não limitativa de diferentes tipos de cânceres inclui linfoma, linfoma de célula B, linfoma de célula T, micose fungoide, Doença de Hodgkin, leucemia mieloide, câncer da bexiga, câncer do cérebro, câncer do sistema nervoso, câncer da cabeça e pescoço, câncer dos rins, cânceres dos pulmões tais como câncer do pulmão de célula pequena e câncer do pulmão
10 de célula não-pequena, cânceres do cérebro tais como neuroblastoma e glioblastoma, câncer ovariano, câncer pancreático, câncer da próstata, câncer do fígado, melanoma, carcinomas de célula escamosa, carcinoma cervical, câncer da mama, câncer renal, câncer genitourinário, carcinoma esofágico, cânceres hematopoiéticos, câncer testicular ou cânceres do cólon e retal.

15 Como aqui usado, o indivíduo é um vertebrado, mais especificamente um mamífero (p. ex., um humano, cavalo, porco, coelho, cão, carneiro, cabra, primata não-humano, vaca, gato, porquinho da índia ou roedor), um peixe, uma ave ou um réptil ou um anfíbio. O termo não indica uma idade ou sexo particular. Assim, pretende-se abranger indivíduos adultos
20 e recém-nascidos, bem como fetos, quer machos ou fêmeas. Como aqui usado, paciente ou indivíduo são usados intercambiavelmente e referem-se a um indivíduo com uma doença ou distúrbio. O termo paciente ou indivíduo inclui indivíduos humanos ou veterinários.

Os métodos descritos envolvem comparar a liberação dos
25 biomarcadores descritos de uma célula de câncer com a liberação dos mesmos biomarcadores de uma amostra de controle. Entende-se que a amostra de controle é uma célula não-cancerosa concomitantemente examinada ou um padrão criado ensaiando-se uma ou mais células não-cancerosas e coletando-se os dados biomarcadores. Assim, a amostra de controle é opcionalmente um

padrão que é criado e usado continuamente. O padrão inclui, por exemplo, o nível médio de liberação de um biomarcador por uma célula(s) não de câncer ou qualquer outro grupo de controle. A célula cancerosa opcionalmente é contatada com um agente anticâncer antes da detecção dos biomarcadores.

5 Assim, uma amostra de controle é uma célula cancerosa que não é contatada com um agente anticâncer ou uma célula cancerosa antes de contatar com o agente anticâncer.

Também provido é um método de prever ou monitorar a eficácia de um agente anticâncer em um indivíduo. O método compreende
10 adquirir uma amostra biológica, tal como tecido ou fluido corporal, do indivíduo após administrar o agente ao indivíduo. Por exemplo, o tecido ou fluido corporal é coletado do indivíduo 1 a 60 minutos, horas, dias ou semanas após administrar o agente ao indivíduo. O método compreende ainda detectar níveis de um ou mais biomarcadores selecionados do grupo
15 consistindo de ALDOA, PGK1, PRDX1, COF1 e histona H4 na amostra biológica. Um aumento do(s) nível(eis) de um ou mais biomarcadores é evidência de eficácia de tratamento. Assim, um declínio em dito aumento ou tempo é evidência de eficácia decrescente. Assim, prefere-se que as amostras biológicas sejam sistematicamente adquiridas durante o tempo para monitorar
20 mudanças dos níveis de biomarcadores.

Também provido é um método de determinar uma dose eficaz para um agente anticâncer. O método compreende contatar uma ou mais células cancerosas com uma pluralidade de dosagens do agente anticâncer. As condições do método descrito preferivelmente permite a liberação celular de
25 um ou mais dos biomarcadores aqui descritos. O método compreende ainda detectar a liberação de um ou mais dos biomarcadores descritos em cada dosagem. Como descrito aqui, taxas de liberação de biomarcadores mais elevadas indicam uma dosagem eficaz. Pelo menos uma célula é contatada com mais do que uma dosagem ou cada célula é contatada com somente uma

dosagem.

O agente anticâncer dos métodos descritos compreende, por exemplo, um agonista de receptor de mortalidade. Por receptor de mortalidade pretendemos significar um receptor que induz apoptose celular uma vez ligado por um ligando. Os receptores de mortalidade incluem, por exemplo, membros da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNF) tendo domínios de mortalidade (p.ex., TNFRI, Fas, DR3, 4, 5, 6) e membros da superfamília do receptor de TNF sem domínios de mortalidade LT β R, CD40, CD27, HVEM. Assim, o agonista do receptor de mortalidade é selecionado do grupo consistindo de um anticorpo DR5, anticorpo DR4, Ligando Fas, TNF e ligando indutor de apoptose relacionado com o TNF (TRAIL). O anticorpo DR5 é opcionalmente TRA-8 ou um anticorpo tendo o mesmo especificidade de epítipo que TRA-8. O anticorpo DR5 é opcionalmente uma versão humanizada de TRA-8.

A transdução de sinal através, pressão reduzida, de DR5 é um mecanismo chave no controle da apoptose mediada por DR5. Um aspecto comum dos receptores de mortalidade da superfamília TNFR é que eles todos têm um domínio de mortalidade conservado em sua cauda citoplasmática (Zhou, T. et al., 2002. *Immunol Res* 26:323 – 336). É bem estabelecido que a apoptose mediada por DR5 é iniciada no domínio da mortalidade. A reticulação de DR5 na superfície da célula por TRAIL ou anticorpo anti-DR5 agonista resulta em oligomerização de DR5, que imediatamente é seguida pelo recrutamento de FADD para o domínio da mortalidade de DR5 (Bodmer, J.L., et al. 2000. *Nat Cell Biol* 2:241-243; Chaudhary, P.M., et al. 1997. *Immunity* 7:821-830; Kuang, A.A., et al. 2000. *J Biol Chem* 275:25065-25068; Schneider, P., et al. 1997. *Immunity* 7:831-836; Sprick, M.R., et al. 2000. *Immunity* 12:599-609). FADD comprometido com o domínio da mortalidade recruta ainda a procaspase 8 e/ou procaspase 10 iniciadora para formar um DISC através de interações DD homofílicas (Krammer, P.H. 2000.

Nature 407:789-795). As caspase 8 e 10 ativadas podem ativar a caspase 3 diretamente ou clivar a proteína contendo BH3 Bid para ativar um trajeto de apoptose dependente de mitocôndrios através da liberação da ativação do citocromo C e caspase 9 (Desagher, S., e J.C. Martinou. 2000. Trends Cell Biol 10:369-377; Scaffidi, C, et al. 1998. Embo J 17:1675-1687). Em seguida à formação do complexo de domínio da mortalidade, diversos trajetos de transdução de sinal são ativados, tais como caspase, NF- κ B, e JNK/p38. A ativação destes trajetos de sinalização resulta na regulação da apoptose mediada pelo receptor da mortalidade através da família de proteínas Bcl-2 e IAP.

Por agonista pretendemos significar uma substância (molécula, medicamento, proteína etc.) que é capaz de combinar-se com um receptor (p. ex., um receptor da mortalidade) em uma célula e iniciar a mesma reação ou atividade tipicamente produzida pela ligação do ligando endógeno (p. ex., apoptose). O agonista do presente método, por exemplo, é um ligando do receptor da mortalidade, tal como TNF, Ligando Fas, ou TRAIL. O agonista inclui um fragmento destes ligandos compreendendo o domínio de ligação do receptor da mortalidade, de modo que o fragmento capaz de ligar e ativar o receptor da mortalidade. O agonista inclui uma proteína de fusão compreendendo o domínio de ligação do receptor da mortalidade, de modo que a proteína de fusão é capaz de ligar-se ao e ativar o receptor da mortalidade. O agonista inclui um polipeptídeo tendo uma sequência aminoácida com pelo menos 85 – 99 % de homologia (incluindo, p. ex., 90%, 95% e 99% de homologia) com TNF, Fas ou TRAIL, de modo que o homólogo é capaz de ligar-se e ativar o receptor da mortalidade.

O agonista inclui um anticorpo indutor da apoptose que se liga ao receptor da mortalidade. O anticorpo é opcionalmente anticorpo monoclonal, policlonal, quimérico, de cadeia única, humanizado, totalmente humano, ou quaisquer fragmentos Fab ou (F(ab')₂ deles. Por anticorpo

indutor da apoptose pretendemos significar um anticorpo que causa morte celular programada antes ou após ativação, empregando-se os métodos aqui providos. Assim, o agonista do presente método inclui um anticorpo específico para um receptor da mortalidade Fas, TNFR1 ou TRAIL, de modo que o anticorpo ativa o receptor da mortalidade. O agonista inclui um anticorpo específico para DR4 ou DR5. Por exemplo, o agonista é um anticorpo DR5 tendo a mesma especificidade de epítopo que ou é secretado por um hibridoma de camundongo-camundongo tendo Número de Acesso ATCC PTA-1428 (p. ex., o anticorpo TRA-8), Número de Acesso ATCC PTA-1741 (p. ex., o anticorpo TRA-1), Número de Acesso ATCC PTA-1742 (p. ex., o anticorpo TRA-10 antibody). O agonista é opcionalmente um anticorpo tendo a mesma especificidade do epítopo, ou secretado pelo hibridoma tendo Número de Acesso ATCC PTA-3798 (p. ex., o anticorpo 2E12).

O anticorpo é opcionalmente derivado utilizando-se as cepas de *E. coli* transformantes designadas como *E. coli* JM109/pHA15 (abrigando um plasmídeo contendo cDNA codificando a cadeia pesada tipo H1 de TRA-8 humanizado), *E. coli* JM109/pHB14 (abrigando um plasmídeo contendo cDNA codificando a cadeia pesada de TRA-8 humanizado), *E. coli* JM109/pHC10 (abrigando um plasmídeo contendo cDNA codificando a cadeia pesada tipo H3 de TRA-8 humanizado), *E. coli* JM109/pHD21 (abrigando um plasmídeo contendo cDNA codificando uma cadeia pesada tipo H4 de TRA-8 humanizado), e *E. coli* JM109/pM11 (abrigando um plasmídeo contendo cDNA codificando a cadeia pesada de TRA-8 quimérico), *E. coli* DH5 α /pHSG/M1-2-2 (abrigando um plasmídeo contendo cDNA codificando um fragmento de fusão da região variável da cadeia de luz TRA-8 LM1 humanizada e a região constante da cadeia Ig κ humana). Estas cepas foram depositadas em International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1,

Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japão em 20 de abril de 2001, de acordo com o Budapest Treaty for the Deposit of Microorganisms, e foram-lhe concedidos os números de acesso FERM BP-7555, FERM BP-7556, FERM BP-7557, FERM BP-7558, FERM BP-7559, e FERM BP-7562, respectivamente. O receptor TRAIL alvejado pelo anticorpo do presente método inclui DR4 ou DR5. Tais receptores são descritos nos pedidos de patente publicados WO 99/03992, WO 98/35986, WO 98/41629, WO 98/32856, WO 00/66156, WO 98/46642, WO 98/5173, WO 99/02653, WO 99/09165, WO 99/11791, WO 99/12963 e Patente U.S. publicada No. 6.313.269, que são todos incorporados aqui por referência em sua totalidade para os receptores aqui mostrados. Os anticorpos monoclonais, específicos para estes receptores, são gerados utilizando-se métodos conhecidos na arte. Vide, p. ex., Kohler e Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975) e *Eur. J. Immunol.* 6:511-519 (1976), ambos sendo incorporados por este meio por referência em sua totalidade para estes métodos. Vide também os métodos mostrados no pedido de patente publicado WO 01/83560, que é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

O agente anticâncer dos métodos descritos é opcionalmente um composto anticâncer, tal como um medicamento quimioterapêutico. Geralmente, um composto anticâncer é um composto ou composição eficaz em inibir ou deter o crescimento de uma célula anormalmente crescendo. Exemplos ilustrativos de compostos anticâncer incluem bleomicina, carboplatina, clorambucila, cisplatina, colchicina, CPT-11, ciclofosfamida, daunorrubicina, dactinomicina, dietilestilbestrol doxorrubicina, etoposida, 5-fluorouracila, floxuridina, melfalano, metotrexato, mitomicina, 6-mercaptopurina, oxaliplatina, placlitazel, teniposida, 6-gioguanina, vincristina e vinblastina. Outros exemplos de compostos anticâncer e agentes terapêuticos são encontrados no *The Merck Manual of Diagnosis e Therapy*, 18a. Ed., Beers et al., eds., 2006, Whitehouse Station, NJ. e Sladek et al.

Metabolism and Action of Anti- Cancer Drugs, 1987, Powis et al. eds., Taylor e Francis, New York, N. Y.

De acordo com a American Cancer Society, há 5 categorias principais de medicamentos quimioterápicos. Eles são agentes alquilantes, nitrosuréias, antimetabólitos, antibióticos antitumor e inibidores mitóticos. Os agentes de alquilação trabalham diretamente no DNA da célula cancerosa, para evitar que ela se replique. Bussulfano, ciclofosfamida e melfalano são exemplos de agentes alquilantes. As nitrosuréias inibem as enzimas das células do câncer necessárias para reparo do DNA. A carmustina e lomustina são exemplos de nittrosuréias. Os antimetabólitos interferem com tanto o DNA como o RNA das células cancerosas. 5-fluorouracila, metotrexato e fludarabina são exemplos de antimetabólitos. Os antibióticos antitumor também interferem com um DNA de célula cancerosa além de mudar sua membrana celular – a camada externa do revestimento protetor. A bleomicina, doxorubicina e idarubicina são exemplos de antibióticos antitumor. Inibidores mitóticos são alcalóides de plantas que inibem as enzimas necessárias para síntese da proteína na célula cancerosa. Docetaxel, etoposida e vinorrelbina são exemplos de inibidores mitóticos.

Certos métodos descritos aqui envolvem coletar uma amostra biológica de um indivíduo. A coleta de amostras biológicas é realizada por métodos padrão. Tipicamente, uma vez uma amostra é coletada, os biomarcadores são detectados e medidos. Os biomarcadores descritos são detectados usando-se qualquer técnica adequada. Além disso, as moléculas que interagem com ou ligam-se aos biomarcadores descritos, tais como anticorpos em um biomarcador, são detectadas empregando-se técnicas conhecidas. Muitas técnicas adequadas – tais como técnicas geralmente conhecidas para a detecção de proteínas, peptídeos e outros analisados e antígenos – são conhecidas, algumas das quais são descritas abaixo. Em geral, estas técnicas envolvem imageação direta (p. ex., microscopia), imunoenaios

ou determinação funcional. Por determinação funcional pretendemos significar que um dado biomarcador, tal como uma proteína que tem uma função, é detectado pela detecção de dita função. Por exemplo, uma enzima é detectada avaliando-se sua atividade em seu substrato.

5 Métodos de imunodeteção são usados para detectar, ligar, purificar, remover e quantificar várias moléculas, incluindo os biomarcadores descritos. Além disso, anticorpos e ligandos para os biomarcadores descritos são detectados. Por exemplo, os biomarcadores descritos são empregados para detectar anticorpos tendo reatividade com eles. Técnicas imunológicas padrão
10 são descritas, p. ex., em Hertzberg eal, Weir's Handbook of Experimental Immunology, vols. 1-4 (1996); Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Methods in Enzymology, vols. 70, 73, 74, 84, 92, 93, 108, 116, 121, 132, 150, 162, e 163; e Paul, Fundamental Immunology (3a. ed. 1993), cada um dos quais é incorporado aqui por referência em sua totalidade e
15 especificamente para ensinamentos referentes a métodos de imunodeteção.

As etapas de vários métodos de imunodeteção úteis foram descritos na literatura científica, tais como, p. ex., Maggio et al., Enzyme-Immunoassay, (1987) e Nakamura, et al., Enzyme Immunoassays: Heterogeneous e Homogeneous Systems, Handbook of Experimental
20 Immunology, Vol. 1: Immunochemistry, 27.1-27.20 (1986), cada um dos quais é incorporado aqui por referência em sua totalidade e especificamente por seu ensinamento referente a métodos de imunodeteção. Os imunoensaios, em seu mais simples e direto sentido, são ensaios de ligação envolvendo a ligação entre anticorpos e antígeno. Muitos tipos e formatos de
25 imunoensaios são conhecidos e todos são adequados para detectar os biomarcadores descritos. Exemplos de imunoensaios são ensaios imunoabsorventes ligados por enzima (ELISAs), radioimunoensaios (RIA), ensaios de precipitação radioimune (RIPA), ensaios de precipitação radioimune (RIPA), ensaios de cap'tura de imunocontas, Western blotting,

dot blot, ensaios de mudança de gel, citometria de fluxo, sistemas de proteína, sistemas de contas multiplexados, captura magnética, imageação in vivo, transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET) e recuperação/localização de fluorescência após fotobranqueamento (FRAP/FLAP).

Em geral, os imunoensaios envolvem contatar uma amostra suspeita de conter uma molécula de interesse (tal como os biomarcadores descritos) com um anticorpo na molécula de interesse ou contatar um anticorpo com uma molécula de interesse (tal como anticorpos com os biomarcadores descritos) com uma molécula que é ligada pelo anticorpo, como possa ser o caso, sob condições eficazes para permitir a formação de imunocomplexos. Contatar uma amostra com o anticorpo na molécula de interesse ou com a molécula que é ligada por um anticorpo na molécula de interesse sob condições eficazes e por um período de tempo suficiente para permitir a formação de complexos imunes (complexos imunes primários) é Geralmente uma questão de simplesmente trazer em contato a molécula ou anticorpo e a amostra e incubar a mistura por um período de tempo bastante longo para os anticorpos formarem complexos imunes com, isto é, ligarem-se a quaisquer moléculas (p. ex., antígenos) presentes em que os anticorpos possam ligar-se. Em muitas formas de imunoensaio, a composição de anticorpo de amostra, tal como uma seção de tecido, placa ELISA, dot blot ou Western blot, é lavada para remover qualquer espécie de anticorpo ligado não especificamente, permitindo que somente aqueles anticorpos especificamente ligados dentro dos complexos imunes primários sejam detectados.

Os imunoensaios incluem métodos para detectar ou quantificar a quantidade de uma molécula de interesse (tal como os biomarcadores descritos ou seus anticorpos) em uma amostra, métodos estes geralmente envolvendo a detecção ou quantificação de quaisquer complexos imunes formados durante o processo de ligação. Em geral, a detecção de formação de

imunocomplexo é conseguida através da aplicação de numerosas abordagens. Estes métodos são geralmente baseados na detecção de um rótulo ou marcador, tal como quaisquer etiquetas radioativas, fluorescentes, biológicas ou enzimáticas ou qualquer outro rótulo conhecido. Vide, por exemplo, as

5 Patentes U.S. Nos. 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 e 4.366.241, cada um dos quais é incorporado aqui por referência em sua totalidade e especificamente por ensinamentos referentes a métodos e rótulos de imunodeteção.

Como usado aqui, um rótulo inclui um corante fluorescente,

10 um membro de um par de ligação, tal como biotina/estreptavidina, um metal (p. ex., ouro) ou uma etiqueta de epítipo que especificamente interaja com uma molécula a ser detectada, tal como produzindo um substrato colorido ou fluorescente. Substâncias adequadas para detectavelmente rotular proteínas incluem corantes fluorescentes (também conhecidos como fluorocromos e

15 fluoróforos) e enzimas que reagem com substratos colorométricos (p. ex., peroxidase de rábano silvestre). O uso de corantes fluorescentes é geralmente usado na prática da invenção, visto que eles são detectados em quantidades muito baixas. Os fluoróforos são compostos ou moléculas que luminescem. tipicamente, os fluoróforos absorvem energia eletromagnética em um

20 comprimento de onda e emitem energia eletromagnética em um segundo comprimento de onda. No caso em que múltiplos antígenos são reagidos com uma única formação cada antígeno é rotulado com um distinto composto fluorescente para detecção simultânea. Pontos rotulados na formação são detectados usando-se um fluorímetro, a presença de um sinal indicando um

25 antígeno ligado a um anticorpo específico.

A rotulação é direta ou indireta. Na rotulação direta, o anticorpo de detecção (o anticorpo para a molécula de interesse) ou molécula de detecção (a molécula que é ligada por um anticorpo à molécula de interesse) inclui um rótulo. A detecção do rótulo indica a presença do

anticorpo de detecção ou molécula de detecção, que por sua vez indica a presença da molécula de interesse de um anticorpo para a molécula de interesse, respectivamente. Na rotulação indireta, uma molécula ou componente adicional é trazido para contato com ou gerado no local do imunocomplexo. Por exemplo, uma molécula ou componente gerador de sinal tal como uma enzima é ligado ao ou associado com o anticorpo de detecção ou molécula de detecção. A molécula geradora de sinal então gera um sinal detectável no local do imunocomplexo. Por exemplo, uma enzima, quando suprida com substrato adequado, produz um produto visível ou detectável no local do imunocomplexo. ELISAs utilizam este tipo de rotulação indireta.

Como outro exemplo de rotulação indireta, uma molécula adicional (que é referida como um agente de ligação) que pode ligar-se à molécula de interesse, tal como um segundo anticorpo para o anticorpo primário, é contatada com o imunocomplexo. A molécula adicional opcionalmente tem um rótulo ou molécula ou componente gerador de sinal. A molécula adicional é, por exemplo, um anticorpo, que é denominado um anticorpo secundário. A ligação de um anticorpo secundário a um anticorpo primário forma um chamado sanduíche com o primeiro (ou primário) anticorpo e a molécula de interesse. Os complexos imunes contatados com o rótulo, anticorpo secundário sob condições eficazes e por um período de tempo suficiente para permitir a formação de complexos imunes secundários. Os complexos imunes secundários são geralmente lavados para remover quaisquer anticorpos secundários rotulados não especificamente ligados e o rótulo restante dos complexos imunes secundários pode ser então detectado. A molécula adicional inclui um de um par de moléculas ou componentes que podem ligar-se entre si, tal como o par biotina/avidina. Neste modo, o anticorpo de detecção ou molécula de detecção inclui o outro membro do par.

Outros modos de rotulação indireta incluem a detecção de complexos imunes primários por uma abordagem de duas etapas. Pro

exemplo, uma molécula (que é referida como um primeiro agente de ligação), tal como um anticorpo, que tem afinidade de ligação para a molécula de interesse ou anticorpo correspondente, é usado para formar complexos imunes secundários, como descrito acima. Após lavagem, os complexos imunes secundários é contatado com outra molécula (que é referida como um segundo agente de ligação) que tem afinidade de ligação para o primeiro agente de ligação, novamente sob condições eficazes e eficazes e por um período de tempo suficiente para permitir a formação de complexos imunes (assim formando complexos imunes terciários). O segundo agente de ligação é ligado a um rótulo detectável ou molécula ou componente gerador de sinal, permitindo a detecção dos complexos imunes terciários assim formados. Este sistema provê uma amplificação de sinal.

Os imunoensaios que envolvem a detecção de uma tal proteína ou anticorpo em uma proteína específica, inclui ensaios livres de rótulo, métodos de separação de proteína (isto é, eletroforese), ensaios de captura de suporte sólido ou detecção in vivo. Os ensaios livres de rótulo são geralmente meios diagnósticos de determinar a presença ou ausência de uma proteína específica, ou um anticorpo para uma proteína específica, em uma amostra. Os métodos de separação de proteína são adicionalmente úteis para avaliar as propriedades físicas da proteína, tais como tamanho ou carga líquida. Os ensaios de captura são geralmente mais úteis para quantitativamente avaliar a concentração de uma proteína específica, ou anticorpo para uma proteína específica, em uma amostra. Finalmente, a detecção in vivo é útil para avaliar os padrões de expressão espacial da substância, isto é, onde a substância é encontrada em um indivíduo, tecido ou célula.

Desde que as concentrações sejam suficientes, os complexos moleculares ($[Ab-Ag]_n$) gerados pela interação anticorpo-antígeno são visíveis a olho nu, porém quantidades menores podem também ser detectadas e medidas devido a sua capacidade de dispersar um feixe de luz. A formação

de complexos indica que ambos os reagentes estão presentes e em ensaios de imunoprecipitação uma concentração constante de um anticorpo de reagente é usada para medir antígeno específico ([Ab-Ag] n) e antígenos reagentes são usados para detectar anticorpo específico ([Ab-Ag] n). Se a espécie reagente for previamente revestida sobre células (como no ensaio de hemaglutinação) ou partículas muito pequenas (como no ensaio de aglutinação de látex), formação de grumos das partículas revestidas é visível em concentrações mais baixas. Uma variedade de ensaios baseados nestes princípios elementares é de uso comum, incluindo ensaio de imunodifusão Ouchterlony, imunoeletroforese foguete e ensaios imunoturbidométricos e nefelométricos. As limitações principais de tais ensaios são sensibilidade restringidas (mais baixos limites de detecção) em comparação com ensaios empregando rótulos e, em alguns casos, o fato de que concentrações muito elevadas de analisado podem realmente inibir a formação de complexo, necessitando salvaguardas que tornem os procedimentos mais complexos. Alguns destes ensaios do Grupo 1 datam diretamente atrás à descoberta dos anticorpos e nenhum deles tem um rótulo objetivo (p. ex. Ag-enz). Outras espécies de imunoenaios que são livres de rótulo dependem de imunossensores e uma variedade de instrumentos que possam diretamente detectar interações de anticorpo-antígeno são agora comercialmente disponíveis. A maioria depende da geração de uma onda evanescente em uma superfície sensora com ligando imobilizado, que permita monitoramento contínuo de ligação no ligando. Imunossensores permitem a fácil investigação de interações cinéticas e, com o advento de instrumentos especializados, oferecem larga aplicação em imunoanálise.

O uso de imunoenaios para detectar uma proteína específica envolve, por exemplo, a separação das proteínas por eletroforese. A eletroforese é a migração das moléculas carregadas em solução, em resposta a um campo elétrico. Sua taxa de migração depende da intensidade do campo;

na carga líquida, o tamanho e formato das moléculas e também na intensidade iônica, a viscosidade e temperatura do meio em que as moléculas estão se movendo. como uma ferramenta analítica, a eletroforese é simples, rápida e altamente sensível. Ela é usada analiticamente para estudar as propriedades de uma única espécie carregada e uma técnica de separação.

Geralmente a amostra é examinada em uma matriz de suporte tal como papel, acetato de celulose, gel de amido, agarose ou gel de poliacrilamida. A matriz inibe a mistura convectiva causada pelo aquecimento e provê um registro do exame eletroforético: no final do exame, a matriz, por exemplo, é tingida e usada para escaneamento, autorradiografia ou armazenagem. Além disso, as matrizes de suporte mais comumente usadas – agarose e poliacrilamida – proveem um meio de separar moléculas por tamanho, pelo fato de que elas são géis porosos. Um gel poroso atua como uma peneira para retardar ou, em alguns casos, completamente obstruir o movimento de grandes macromoléculas, enquanto permitindo que moléculas menores migrem livremente. Em razão dos géis de agarose diluídos serem geralmente mais rígidos e de manuseio mais fácil do que o poliacrilamida da mesma concentração, a agarose é usada para separar moléculas maiores, tais como ácidos nucleicos, proteínas grandes e complexos de proteína. Poliacrilamida, que é de manuseio e preparação mais fáceis em concentrações mais elevadas, é usado para separar a maioria das proteínas e pequenos oligonucleotídeos que requerem um pequeno tamanho de poro de gel para retardamento.

As proteínas são compostos anfotéricos; sua carga líquida, portanto, é determinada pelo pH do meio em que elas são suspensas. Em uma solução com um pH acima de seu ponto isoelétrico, uma proteína tem uma carga negativa líquida e migra para o ânodo em um campo elétrico. Abaixo de seu ponto isoelétrico, a proteína é positivamente carregada e migra para o cátodo. A carga líquida transportada por uma proteína é além disso

independente de seu tamanho – isto é, a carga carregada por massa unitária (ou comprimento, dado que as proteínas e ácidos nucleicos são macromoléculas lineares) de molécula difere de proteína para proteína. Em um dado pH, portanto, e sob condições não-desnaturantes, a separação eletroforética das proteínas é determinada por tanto tamanho como carga das moléculas.

O dodecil sulfato de sódio (SDS) é um detergente aniônico que desnatura proteínas por envolvimento em torno da cadeia principal de polipeptídeo e o SDS liga-se às proteínas razoavelmente de modo específico em uma relação de massa de 1,4:1. Ao assim fazer, o SDS confere uma carga negativa ao polipeptídeo em proporção a seu comprimento. Além disso, é usualmente necessário reduzir as pontes dissulfeto nas proteínas (desnaturar) antes de adotarem a configuração de espiral aleatória, necessária para separação por tamanho; isto é feito com 2-mercaptoetanol ou ditioneítritol (DTT). Nas separações SDS-PAGE desnaturante, portanto, a migração é determinada não por carga elétrica intrínseca do polipeptídeo, mas por peso molecular.

A determinação do peso molecular é realizada por SDS-PAGE usando-se proteínas de peso molecular conhecido, juntamente com a proteína a ser caracterizada. Uma relação linear existe entre o logaritmo do peso molecular (MW) de um polipeptídeo desnaturado-SDS ou ácido nucleico nativo, e seu R_f . O R_f é calculado como a relação da distância migrada pela molécula para aquela migrada por um frente de corante marcador. Uma maneira simples de determinar o peso molecular relativo por eletroforese (M_r) é plotar uma curva padrão da distância migrada vs. $\log_{10}$ MW para amostras conhecidas e ler o $\log M_r$ da amostra após medir a distância migrada no mesmo gel.

Em eletroforese bidimensional, as proteínas são fracionadas primeiro com base em uma propriedade física e, em uma segunda etapa, com

base em outra. Por exemplo, a focalização isoelétrica é usada para a primeira dimensão, convenientemente realizada em um gel de tubo, e eletroforese SDS em um gel de prancha é usado para a segunda dimensão. Um exemplo de um procedimento é aquele de O'Farrell, P.H., High Resolution Two-dimensional Electrophoresis of Proteins, J. Biol. Chem. 250:4007-4021 (1975), aqui incorporado por referência em sua totalidade pelo seu ensinamento referente a métodos de eletroforese bidimensional. Outros exemplos incluem mas não são limitados àqueles encontrados em Anderson, L e Anderson, NG, High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. 74:5421-5425 (1977), Ornstein, L., Disc electrophoresis, L. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121:321349 (1964), cada um dos quais é aqui incorporado por referência em sua totalidade por seus ensinamentos referentes a métodos de eletroforese.

Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227:680 (1970), que é incorporado aqui por referência em sua totalidade pelos ensinamentos referentes a métodos de eletroforese, descreve um sistema descontínuo para resolver proteínas desnaturadas com SDS. O íon líder no sistema de tampão de Laemmli é cloreto e o íon traseiro é glicina. Portanto, o gel de resolução e o gel de estaqueamento são produzidos em tampões Tris-HCl (de diferentes concentração e pH), enquanto o tampão tanque é Tris-glicina. Todos os tampões contêm 0,1% de SDS.

Um exemplo de um imunoensaio que utilizar eletroforese que é contemplada nos atuais métodos é análise Western blot. A Western blotting ou imunoblotting permite a determinação da massa molecular de uma proteína e a medição das quantidades relativas da proteína presente em diferentes amostras. Os métodos de detecção incluem quimioluminescência e detecção cromagênica. Métodos padrão para análise Western blot são encontrados, por exemplo, em D.M. Bollag et al., Protein Methods (2a. edição 1996) e E.

Harlow & D. Lane, Antibodies, a Laboratory Manual (1988), U.S. Patent 4.452.901, cada um dos quais é aqui incorporado por referência em sua totalidade pelos ensinamentos referentes a métodos de Western blot. Geralmente, as proteínas são separadas por eletroforese de gel, usualmente SDS-PAGE. As proteínas são transferidas para uma folha de papel de blotting especial, p. ex., nitrocelulose, embora outros tipos de papel, ou membranas, sejam usados, p. ex., nitrocelulose, embora outros tipos de papel, ou membranas, sejam usados. As proteínas retêm o mesmo padrão de separação que elas tinham no gel. A mancha é incubada com uma proteína genérica (tal como proteínas de leite) para ligar-se a quaisquer locais pegajosos restantes da nitrocelulose. Um anticorpo é então adicionado à solução que é capaz de ligar-se a sua proteína específica.

A fixação dos anticorpos específicos em antígenos imobilizados específicos é prontamente visualizada por técnicas de imunoensaio de enzima indiretas, usualmente usando-se um substrato cromogênico (p. ex., fosfatase alcalina ou peroxidase de rábano silvestre) ou substratos quimioluminescentes. Outras possibilidades para sondagem incluem o uso de rótulos fluorescentes ou radioisótopos (p. ex., fluoresceína, ¹²⁵I). As sondas para a detecção de ligação de anticorpo são conjugadas, por exemplo, com anti-imunoglobulinas, Proteína A estafilococal conjugada, que se liga a IgG, ou sondas para anticorpos primários biotinilados (p. ex., avidina/estreptavidina conjugada).

A capacidade da técnica situa-se na simultânea detecção de uma proteína específica por meio de sua antigenicidade e sua massa molecular. As proteínas são primeiro separadas por massa no SDS-PAGE, em seguida especificamente detectada na etapa de imunoensaio. Assim, os padrões da proteína (escadas), por exemplo, são realizados simultaneamente a fim de aproximar a massa molecular da proteína de interesse em uma amostra heterogênea.

O ensaio de mudança de gel ou ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) são usados para detectar as interações entre as proteínas de ligação de DNA e suas sequências de reconhecimento de DNA cognatas, em uma maneira tanto qualitativa como quantitativa. Técnicas exemplares são descritas em Ornstein L., Disc electrophoresis - I: Background and theory, Ann. NY Acad. Sci. 121:321-349 (1964), e Matsudaira, PT e DR Burgess, SDS microslab linear gradient polyacrylamide gel electrophoresis, Anal. Biochem. 87:386-396 (1987), cada um dos quais é aqui incorporado por referência em sua totalidade pelos ensinamentos referentes a ensaios de mudança de gel.

Em um ensaio de mudança de gel geral, proteínas purificadas ou extratos celulares brutos são incubados com uma sonda de DNA ou RNA rotulada (p. ex., ^{32}P -radiatorrotulado), seguido por separação dos complexos da sonda livre através de um gel de poliacrilamida não desnaturante. Os complexos migram mais lentamente através do gel do que de sonda não ligada. Dependendo da atividade da proteína de ligação, uma sonda rotulada é de filamento duplo ou filamento único. Para a detecção das proteínas de ligação de DNA tais como fatores de transcrição, proteínas purificadas ou parcialmente purificadas, ou extratos celulares nucleares, são usados. Para detecção de proteínas de ligação de RNA, proteínas purificadas ou parcialmente purificadas, ou extratos celulares nucleares ou citoplásmicos são usados. A especificidade da proteína de ligação de DNA ou RNA para o sítio de ligação putativo é estabelecida por experimentos de competição usando-se fragmentos de DNA ou RNA ou oligonucleotídeos contendo um sítio de ligação para a proteína de interesse, ou outra sequência não relacionada. As diferenças na natureza e intensidade do complexo formado na presença de competidor específico e não específico permite identificação das interações específicas. Referência a Promega, Gel Shift Assay FAQ, disponível em <<http://www.promega.com/faq/gelshfaq.html>> (visitado por último em 25 de

março de 2005), que é aqui incorporado por referência em sua totalidade pelos ensinamentos referentes a métodos de mudança de gel.

Os métodos de mudança de gel incluem a utilização, por exemplo, de formas coloidais de corante azul COOMASSIE (Imperial Chemicals Industries, Ltd) para detectar proteínas em géis, tais como géis de eletroforese de poliacrilamida. Tais métodos são descritos, por exemplo, em Neuhoﬀ et al., *Electrophoresis* 6:427-448 (1985), e Neuhoﬀ et al., *Electrophoresis* 9:255-262 (1988), cada um dos quais é aqui incorporado por referência em sua totalidade pelos ensinamentos referentes a métodos de mudança de gel. Além dos métodos de ensaio de proteína convencional referenciados acima, uma composição de limpeza e tingimento de proteína de combinação é descrito na Patente U.S. No. 5.424.000, aqui incorporada por referência em sua totalidade por seus ensinamentos referentes a métodos de mudança de gel. As soluções incluem ácidos fosfórico, sulfúrico e nítrico e corante violeta ácido.

Ensaio de Precipitação Radioimune (RIPA) é um ensaio sensível empregando antígenos radiorrotulados para detectar anticorpos específicos no soro. Os antígenos são permitidos reagir com o soro e então precipitados usando-se um reagente especial, tal como, por exemplo, contas de sefarose de proteína A. O imunoprecipitado radiorrotulado ligado é então comumente analisado por eletroforese gel. Ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) é com frequência usado como um teste confirmatório para diagnosticar a presença de anticorpos HIV. RIPA é também referido na arte como Farr Assay, Precipitin Assay, Radioimmune Precipitin Assay; Análise de Radioimunoprecipitação; Análise de Radioimunoprecipitação e Análise de Radioimunoprecipitação.

Embora os imunoensaios acima que utilizam eletroforese para separar e detectar as proteínas específicas de interesse permitam avaliação do tamanho da proteína, eles não são muito sensíveis para avaliar a concentração

de proteína. Entretanto, também contemplados são imunoensaios em que a proteína ou anticorpo específico para a proteína é ligado a um suporte sólido (p. ex., tubo, poço, conta ou célula) para capturar o anticorpo ou proteína de interesse, respectivamente, de uma amostra, combinados com um método de

5 detectar a proteína ou anticorpo específico para a proteína no suporte. Exemplos de tais imunoensaios incluem Radioimunoensaio (RIA), Ensaio Imunoabsorvente Ligado por Enzima (ELISA), citometria de fluxo, formação de proteína, ensaio de conta multiplexado e captura magnética.

O radioimunoensaio (RIA) é um ensaio quantitativo clássico

10 para detecção de reações antígeno-anticorpo usando-se uma substância radioativamente rotulada (radioligando), direta ou indiretamente, para medir a ligação da substância não rotulada a um anticorpo específico ou outro sistema receptor. O radioimunoensaio é usado, por exemplo, para testar os níveis de hormônio no sangue sem a necessidade de utilizar-se um bioensaio.

15 Substâncias não imunogênicas (p. ex., haptenos) são também medidas se acopladas a proteínas veículo maiores (p. ex., gamaglobulina bovina ou albumina de soro humano) capazes de induzirem formação anticorpo. RIA envolve mistura um antígeno radioativo (por causa da facilidade com que os átomos de iodo são introduzidos dentro dos resíduos de tirosina em uma

20 proteína, os isótopos radioativos ^{125}I ou ^{131}I são com frequência usados) com anticorpo àquele antígeno. O anticorpo é geralmente ligado a um suporte sólido, tal como uma coluna ou contas. Antígeno não rotulado ou frio é então adicionado em quantidades conhecidas e a quantidade de antígeno rotulado deslocada é medida. Inicialmente, o antígeno radioativo é ligado aos

25 anticorpos. Quando antígeno frio é adicionado, os dois competem pelos sítios de ligação de anticorpo. Em concentrações mais elevadas do antígeno frio, mais ligações ao anticorpo, deslocando a variante radioativa. Os antígenos ligados são separados dos não ligados em solução e a radioatividade de cada um usada para plotar a curva de ligação. A técnica é tanto extremamente

sensível como específica.

O Ensaio Imunoabsorvente Ligado por Enzima (ELISA), ou, mais genericamente, denominado EIA (ImunoEnsaio de Enzima), é um imunoensaio que pode detectar um anticorpo específico para uma proteína.

5 Em tal ensaio, um rótulo detectável ligado a um reagente de ligação de anticorpo ou ligação de antígeno é uma enzima. Quando exposto a seu substrato, esta enzima reage de tal maneira a fim de produzir um componente químico que é detectado, por exemplo, por meio espectrofotométrico, fluorométrico ou visual. As enzimas que são usadas para detectavelmente

10 rotular reagentes úteis para detecção incluem mas não são limitadas a peroxidase rábano silvestre, fosfatase alcalina, glicose oxidase, β -galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, malato desidrogenase, nuclease estafilocócica, asparaginase, desidrogenase de álcool de levedura, alfa-glicerofosfato desidrogenase, triose fosfato isomerase, glicose-t-fosfato

15 desidrogenase, glicoamilase e acetilcolinesterase. Para descrições de procedimentos ELISA, vide Voller, A. et al., J. Clin. Pathol. 31: 507-520 (1978); Butler, J. E., Meth. Enzymol. 73:482-523 (1981); Maggio, E. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, 1980; Butler, J. E., em: Structure of Antigens, Vol: 1 (Van Regenmortel; M., CRC Press, 13oca

20 Raton, 1992, pp. 209-259; Butler, J. E., em: van Oss, C. J. et al., (eds), Immunochemistry, Marcel Dekker, Inc., New York, 1994, pp. 759-803; Butler, J. E. (ed.), Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, 1991); Crowther, "ELISA: Theory and Practice," em: Methods in Molecule Biology, Vol. 42, Humana Press; New Jersey, 1995;

25 U.S. Patent 4,376,110, cada um dos quais é aqui incorporado por referência em sua totalidade e especificamente pelos ensinamentos referentes a métodos ELISA.

Variações de técnicas ELISA são conhecidas daqueles hábeis na arte. Em uma variação, os anticorpos que se ligam a proteínas são

imobilizados em uma superfície selecionada exibindo afinidade de proteína, tal como um poço de uma placa de microtítulo de poliestireno. Em seguida, uma composição de teste suspeita de conter um antígeno marcador é adicionada aos poços. Após ligação e lavagem para remover imunocomplexos não especificamente ligados, o antígeno ligado é detectado. A detecção é conseguida, por exemplo, pela adição de um segundo anticorpo específico para a proteína alvo, que é ligada a um rótulo detectável. Este tipo de ELISA é um ELISA de sanduíche simples. A detecção é também conseguida pela adição de um segundo anticorpo, seguido pela adição de um terceiro anticorpo que tem afinidade de ligação para o segundo anticorpo, com o terceiro anticorpo sendo ligado a um rótulo detectável.

Outra variação é um ELISA de competição. Nos ELISAs de competição, as amostras de teste competem para ligação com quantidades conhecidas de antígenos ou anticorpos rotulados. A quantidade de espécies reativas na amostra é determinada misturando-se a amostra com as espécies rotuladas antes ou durante a incubação com poços revestidos. A presença de espécies reativas na amostra atua para reduzir a quantidade de espécies rotuladas disponíveis para ligação ao poço e, assim, reduz o último sinal.

Independente do formato empregado, os ELISAs têm certos aspectos em comum, tais como revestimento, incubação ou ligação, lavagem para remover espécies não especificamente ligadas e detecção dos imunocomplexos ligados. O antígeno ou anticorpos são ligados a um suporte sólido, tal como na forma de placa, contas, vareta de imersão, matriz de membrana ou coluna e a amostra a ser analisada aplicada ao antígeno ou anticorpo imobilizado. Ao revestir uma placa com antígeno ou anticorpo, Geralmente incuba-se os poços da placa com uma solução do antígeno ou anticorpo, durante a noite ou durante um período de horas especificado. Os poços da placa são então lavados para remover material incompletamente adsorvido. Quaisquer superfícies disponíveis remanescentes dos poços são

revestidas com uma proteína não-específica, que é antigenicamente neutro com respeito aos antissoros de teste. Estes incluem albumina de soro bovino (BSA), caseína e soluções de leite em pó. O revestimento permite o bloqueio de sítios de adsorção não específicos na superfície imobilizante e, assim, reduz o segundo plano causado por ligação não específica de antissoros na superfície.

Em ELISAs, um meio de detecção secundário ou terciário, em vez de um procedimento direto, é opcionalmente usado. Assim, após ligação de uma proteína ou anticorpo ao poço, o revestimento com um material não-reativo para reduzir o segundo plano e lavagem para remover material não ligado, a superfície imobilizante é contatada com a amostra clínica ou biológica de controle a ser testada sob condições eficazes para permitir formação de imunocomplexo (antígeno/anticorpo). A detecção do imunocomplexo então requer um agente de ligação secundário rotulado ou um agente de ligação secundário em conjunto com um terceiro agente de ligação rotulado.

Sob condições eficazes para permitir a formação de imunocomplexo (antígeno/anticorpo) significa que as condições incluem diluir os antígenos e anticorpos com soluções tais como BSA, gama globulina bovina (BGG) e solução salina tamponada com fosfato (PBS)/Tween, a fim de reduzir ligação não específica e promover uma razoável relação sinal para ruído.

Condições adequadas significa que a incubação é em uma temperatura e por um período de tempo suficientes para permitir ligação eficaz. As etapas de incubação são tipicamente de cerca de 1 minuto a doze horas, em temperaturas de cerca de 20 a 30°C ou incubadas durante a noite a cerca de 0°C a cerca de 10°C.

Em seguida a todas as etapas de incubação em um ELISA, a superfície de contato é lavada a fim de remover material não complexado. Um

procedimento de lavagem inclui lavagem com uma solução tal como PBS/Tween ou tampão de borato. Em seguida à formação de imunocomplexos específicos entre a amostra de teste e o material originalmente ligado e subsequente lavagem, a ocorrência de mesmo

5 quantidades pequenas de imunocomplexos é determinada.

Para prover um meio de detecção, o segundo ou terceiro anticorpo tem, por exemplo, um rótulo associado para permitir a detecção, como descrito acima. Este é opcionalmente uma enzima que gera revelação de cor na incubação com um apropriado substrato cromogênico. Assim, por

10 exemplo, contata-se e incuba-se o primeiro ou segundo imunocomplexo com um anticorpo rotulado por um período de tempo e sob condições que favoreçam o desenvolvimento de outra formação de imunocomplexo (p. ex., incubação por 2 horas em temperatura ambiente em uma solução contendo PBS, tal como PBS-Tween).

Após incubação com o anticorpo rotulado e subsequente lavagem para remover material não ligado, a quantidade de rótulo é opcionalmente quantificada, p. ex., por incubação com um substrato cromogênico, tal como uréia e bromocresol púrpura ou ácido 2,2'-azido-di-(3-etil-benzotiazolino-6-sulfônico [ABTS] e H_2O_2 , no caso de peroxidase como o

15

20 rótulo de enzima. A quantificação é conseguida medindo-se o grau de geração de cor, p. ex., usando-se um espectrofotômetro de espectros visíveis.

Os arranjos de proteína são sistemas de formação de ligação de ligando de fase sólida, empregando proteínas imobilizadas em superfícies que incluem vidro, membranas, poços de microtítulo, placas de espectrômetro de

25 massa e contas ou outras partículas. Os ensaios são altamente paralelos (multiplexados) e com frequência miniaturizados (microformações, lacas de proteínas). Suas vantagens incluem serem rápidos e automatizáveis, capazes de alta sensibilidade, econômicos em reagentes e fornecendo uma abundância de dados por um único experimento. Suporte de bioinformática é importante;

o manuseio de dados demanda software sofisticado e análise de comparação de dados. Entretanto, o software é adaptado daquele usado para formações de DNA, como pode muito dos hardware e sistemas de detecção.

Um dos formatos principais é a formação de captura, em que reagentes de ligação de ligando, que são usualmente anticorpos mas podem também ser esqueletos de proteína alternativos, peptídeos ou aptâmeros de ácido nucleico, são usados para detectar moléculas alvo em misturas, tais como extratos de plasma ou tecido. Em diagnósticos, os arranjos de captura são usadas para realizar múltiplos imunoensaios em paralelo, tanto teste para diversos analisados em soros individuais por exemplo como teste de muitas amostras de soro simultaneamente. Em proteômicos, os arranjos de captura são usadas para quantificar e comparar os níveis de proteínas em diferentes amostras de perfilação de saúde e doença, isto é, expressão de proteína. Proteínas outras que não aglutinantes de ligando específicos são usadas no formato de formação para avaliações de interação funcional in vitro, tais como proteína-proteína, proteína-DNA, proteína-medicamento, receptor-ligando, enzima-substrato etc. Os próprios reagentes de captura são selecionados e avaliados em relação a muitas proteínas, opcionalmente em um formato de formação multiplex em relação aos múltiplos alvo de proteína.

Para construção de formações, as fontes de proteínas incluem sistemas de expressão baseados em célula para proteínas recombinantes, purificação de fontes naturais, produção in vitro por sistemas de translação livres de célula e métodos sintéticos para peptídeos. Muitos destes métodos são automatizados para elevada produção. Para formações de captura e análise de função de proteína, é importante que as proteínas sejam corretamente dobradas e funcionais; este não é sempre o caso, p. ex., onde proteínas recombinantes são extraídas de bactérias sob condições desnaturantes. Contudo, as arranjos de proteínas desnaturadas são úteis na triagem de anticorpos quanto reatividade cruzada, identificação de

autoanticorpos e seleção de proteínas de ligação de ligando.

Os arranjos de proteína foram projetados como uma miniaturização de métodos de imunoensaio familiar, tais como ELISA e dot blot, com frequência utilizando-se leituras fluorescentes e facilitados por sistemas de detecção robótico e de alta produção, para possibilitar que múltiplos ensaios sejam realizados em paralelo. Os suportes físicos incluem lâminas de vidro, membranas de silício, micropoços, nitrocelulose ou PVDF e microcontas magnéticas e outras. Embora microgotas de proteína supridas sobre as superfícies planas sejam o formato mais familiar, arquiteturas alternativas incluem dispositivos de centrifugação CD baseados em desenvolvimentos em microfluídicos (Gyros, Monmouth Junction, NJ) e projetos de chips especializados, tais como microcanaís construídos em uma placa (p. ex., The Living Chip™, Biotrove, Woburn, MA) e postes 3D pequeninos em uma superfície de silício (Zyomyx, Haywar CA). Partículas em suspensão são também usadas como a base de formações, desde que elas sejam codificadas para identificação; os sistemas incluem codificação de cor para microcontas (Luminex, Austin, TX; Bio-Rad Laboratories), nanocristais semicondutores (p. ex., QDOTS™, Quantum Dot, Hayward, CA), codificação de barras para contas (contas ULTRAPLEX™, SmartBead Technologies Ltd, Babraham, Cambridge, UK) e microbastões de multimetaís (p. ex., partículas NANOBARCODES™, Nanoplex Technologies, Mountain View, CA). As contas são opcionalmente agrupadas em formações planares em chips semicondutores (LEAPS™ technology, BioArray Solutions, Warren, NJ).

A imobilização de proteínas envolve tanto o reagente de acoplamento como a natureza da superfície sendo acoplada. Um bom suporte de formação de proteína é quimicamente estável antes e após os procedimentos de acoplamento, permite boa morfologia de mancha, exhibe mínima ligação não específica, não contribui para um segundo plano em sistemas de detecção e é compatível com diferentes sistemas de detecção. O

método de imobilização usado é reprodutível, aplicável a proteínas de diferentes propriedades (tamanho, hidrofílicas, hidrofóbicas), receptivo a alta produção e automação e compatível com a retenção de atividade proteica totalmente funcional. A orientação da proteína ligada na superfície é reconhecida como um importante fator em sua apresentação ao ligando ou substrato em um estado ativo; para sistemas de captura, os mais eficientes resultados de ligação são obtidos com reagentes de captura orientados, que geralmente requerem rotulação específica de sítio da proteína.

Métodos tanto covalentes como não-covalentes de imobilização de proteína são usados e têm vários prós e contras. A absorção passiva das superfícies é metodologicamente simples, porém permite pouco controle quantitativo ou orientacional. Ela pode ou não alterar as propriedades funcionais da proteína e a reprodutibilidade e eficiência são variáveis. Os métodos de acoplamento covalente fornecem uma ligação estável, são aplicados a uma faixa de proteínas e têm boa reprodutibilidade. Entretanto, a orientação é variável. Além disso, a derivatização química pode alterar a função da proteína e requer uma superfície interativa estável. Os métodos de captura biológica utilizando uma etiqueta na proteína suprem uma ligação estável e ligam a proteína especificamente e em orientação reprodutível, porém o reagente biológico deve primeiro ser imobilizado adequadamente e a formação pode requerer especial manuseio e ter estabilidade variável.

Diversas químicas e etiquetas de imobilização foram descritas para fabricação de arranjos de proteína. Os substratos para ligação covalente incluem lâminas de vidro revestidas com reagentes de silano contendo amino ou aldeído. No sistema VERSALINXTM (Prolix, Bothell, WA) acoplamento covalente reversível é obtido por interação entre a proteína derivatizada com ácido fenildiborônico e ácido salicildroxâmico imobilizado na superfície de suporte. Este tem também baixa ligação de segundo plano e baixa fluorescência intrínseca e permite que as proteínas imobilizadas retenham a

função. A ligação não-covalente da proteína não modificada ocorre dentro das estruturas porosas, tais como HYDROGELTM (PerkinElmer, Wellesley, MA), com base em um gel de poliacrilamida 3-dimensional; este substrato é reportado fornecer um segundo plano particularmente baixo nas microformações de vidro, com uma alta capacidade e retenção da função proteína. Métodos de acoplamento biológicos largamente usados são através de interações de biotina/estreptavidina ou hexa-histidina/Ni, tendo-se modificado a proteína apropriadamente. A biotina pode ser conjugada com uma cadeia principal de poli-lisina imobilizada em uma superfície tal como bióxido de titânio (Zyomyx, Inc., Hayward, CA) ou pentóxido de tântalo (Zeptosens, Witterswil, Suíça).

Os métodos de fabricação de formação incluem impressão de contato robótica, jato de tinta, manchamento piezoelétrico e fotolitografia. Numerosos formadores comerciais são disponíveis [p. ex., Packard Biosciences, Affymetrix Inc. e Genetix] bem como equipamento manual [p. ex., V & P Scientific]. Colônias bacterianas são opcionalmente roboticamente engradadas em membranas PVDF para indução de expressão de proteína in situ.

No limite do tamanho de tamanho e densidade da mancha estão as nanoformações, com manchas na escala espacial nanométrica, possibilitando que milhares de formações sejam realizadas em um único chip menor do que 1 mm quadrado. BioForce Nanosciences Inc. e Nanolink Inc., por exemplo, desenvolveram nanoformações comercialmente disponíveis.

Métodos de rotulação e detecção de fluorescência são largamente usados. A mesma instrumentação como usada para ler microformações de DNA é aplicável a arranjos de proteína. Para exibição diferencial, sistemas de captura (p. ex., anticorpo) são sondados com proteínas fluorescentemente rotuladas de dois diferentes estados de célula, em que os lisados de célula são diretamente conjugados com diferentes fluoróforos (p.

ex., Cy-3, Cy-5) e misturados, de modo que a cor atua como uma leitura de mudanças da abundância de alvo. A sensibilidade de leitura fluorescente é amplificada 10 – 100 vezes por amplificação do sinal de tiramida (TSA) (PerkinElmer Lifesciences). A tecnologia de guia de ondas planar (Zeptosens) possibilita detecção de fluorescência ultrassensível, com a vantagem adicional de procedimentos de lavagem não intervenientes. Alta sensibilidade é conseguida com contas e partículas em suspensão, empregando-se ficoeritrina como rótulo (Luminex) ou as propriedades de nanocristais semicondutores (Quantum Dot). Numerosas leituras alternativas foram desenvolvidas, especialmente na arena biotech comercial. Estas incluem adaptações de ressonância plasmônio de superfície (HTS Biosystems, Intrinsic Bioprobes, Tempe, AZ), amplificação de DNA de círculo rolante (Molecular Staging, New Haven, CT), espectrometria de massa (Intrinsic Bioprobes; Ciphergen, Fremont, CA), dispersão de luz de ressonância (Genicon Sciences, San Diego, CA) e microscopia de força atômica [BioForce Laboratories].

Os arranjos de captura formam a base dos chips e formações diagnósticas para perfilação de expressão. Elas empregam reagentes de captura de alta afinidade, tais como anticorpos convencionais, domínios únicos, esqueletos, peptídeos ou aptâmeros de ácido nucleico construídos, para ligar e detectar ligandos alvo específicos em modo de alta produtividade.

Os arranjos de anticorpo têm as propriedades requeridas de especificidade e segundo plano aceitável e algumas são comercialmente disponíveis (BD Biosciences, San Jose, CA; Clontech, Mountain View, CA; BioRad; Sigma, St. Louis, MO). Os anticorpos de formações de captura são produzidos por imunização convencional (soros policlonais e hibridomas) ou como fragmentos recombinantes, usualmente expressos em *E. coli*, após seleção de bibliotecas de exibição de fago ou ribossomo (Cambridge Antibody Technology, Cambridge, UK; BioInvent, Lund, Suécia; Affitech, Walnut Creek, CA; Biosite, San Diego, CA). Além dos anticorpos

convencionais, os fragmentos Fab e scFv, domínios-V únicos de camelids ou equivalentes humanos construídos (Domantis Waltham, MA) são opcionalmente úteis nos arranjos.

O termo esqueleto refere-se a domínios de ligando-ligação de proteínas, que são construídos em múltiplas variantes capazes de ligarem diversas moléculas alvo com propriedades semelhantes às de anticorpo de especificidade e afinidade. As variantes são produzidas em um formato de biblioteca genética e selecionadas em relação a alvos individuais por exibição de fago, bacteriana ou de ribossomo. Tais esqueletos de ligando-ligação ou estruturas incluem Affibodies baseados em proteína A de *S. aureus* (Affibody, Bromma, Suécia), Trinectinas baseadas em fibronectinas (Phylos, Lexington, MA) e Anticalinas baseadas na estrutura da lipocalina (Pieris Proteolab, Freising-Weiherstephan, Alemanha). Estas são usadas em formações de captura de um modo similar a anticorpos e têm vantagens de robustez e facilidade de produção.

Moléculas de captura não-proteicas, notavelmente os aptâmeros de ácido nucleico de filamento único que ligam-se aos ligandos de proteína com altas especificidade e afinidade, são também usadas nos arranjos (SomaLogic, Boulder, CO). Os aptâmeros são selecionados de bibliotecas de oligonucleotídeos pelo procedimento SelexTM (SomaLogic, Boulder, CO) e sua interação com proteína é aumentada por ligação covalente, através da incorporação de deoxiuridina bromada e reticulação ativada por UV (fotoaptâmeros). A fotorreticulação de ligando reduz a reatividade cruzada dos aptâmeros devido a exigências estéricas específicas. Os aptâmeros têm as vantagens de facilidade de produção por síntese de oligonucleotídeo automatizada e a estabilidade e robustez do DNA; em formações de foto aptâmero, manchas de proteína fluorescente universais são usadas para detectar a ligação.

Os analisados de proteína ligando-se às formações de

anticorpo são detectados direta ou indiretamente, por exemplo, via um anticorpo secundário. Rotulação direta é usada para comparação de diferentes amostras com diferentes cores. Onde pares de anticorpos direcionados para o mesmo ligando de proteína estão disponíveis, imunoensaios de sanduíche
5 provêm altas especificidade e sensibilidade e são, portanto, o método de escolha para proteínas de baixa abundância, tais como citocinas; Eles também fornecem a possibilidade de detecção de modificações de proteína. Os métodos de detecção livres de rótulo, incluindo espectrometria de massa, ressonância de plasmônio de superfície e microscopia de força atômica,
10 evitam alteração do ligando. O que é exigido de qualquer método é as sensibilidade e especificidade ótimas, com baixo segundo plano para fornecer elevado sinal para ruído. Uma vez que as concentrações de analisado cobrem uma larga faixa, a sensibilidade tem que ser adaptada apropriadamente. Diluição serial da amostra ou uso de anticorpos de diferentes afinidades são
15 soluções para este problema. Proteínas de interesse são frequentemente aquelas de baixa concentração em fluidos e extratos corporais, requerendo detecção na faixa pg ou inferior, tais como citocinas ou os produtos de baixa expressão de células.

Uma alternativa para uma formação de moléculas de captura é
20 uma feita através de tecnologia de impressão molecular, em que peptídeos (p. ex., das regiões de terminal-C de proteínas) são usados como padrões para gerar cavidades específicas de sequência estruturalmente complementares em uma matriz polimerizável; as cavidades podem então especificamente capturar proteínas (desnaturadas) que têm a apropriada sequência aminoácida
25 primária (ProteinPint™, Aspira Biosystems, Burlingame, CA).

Outra metodologia que é útil diagnosticamente e em perfilamento de expressão é o sistema ProteinChip® (CIPHERgen, Fremont, CA), em que superfícies cromatográficas de fase sólida ligam-se a proteínas com características similares de carga ou hidrofobicidade de misturas tais

como extratos de plasma ou tumor, e espectrometria de massa SELDI-TOF é usada para detecção das proteínas retidas.

Chips funcionais de larga escala têm sido construídos imobilizando-se grandes números de proteínas purificadas e são usados para ensaiar uma larga faixa de funções bioquímicas, tais como interações de proteína com outras proteínas, interações alvo-medicamento, substratos de enzima etc. Geralmente eles requerem uma biblioteca de expressão, clonada em *E. coli*, levedura ou similar de que as proteínas de expressão são então purificadas, p. ex., via uma etiqueta His, e imobilizadas.

Transcrição/translação de proteína livre de célula é uma alternativa viável para síntese de proteínas que não se expressam bem em sistemas bacterianos ou outros in vivo.

Para detectar interações de proteína-proteína, as arranjos de proteína são alternativas in vitro para o sistema bi-híbrido de levedura baseado em célula e são úteis onde a última é deficiente, tais como interações envolvendo proteínas secretadas ou proteínas com pontes dissulfeto. Análise de alta produtividade de atividades bioquímicas em formações foi descrita para quinases de proteína de levedura e para várias funções (interações proteína-proteína e proteína-lipídio) do proteoma de levedura, onde uma grande proporção de todas as estruturas de leitura aberta de levedura foram expressas e imobilizadas em uma microformação. Chips de proteoma de larga escala são também úteis na identificação de interações funcionais, seleção de medicamento etc. (Proteometrix, Branford, CT).

Como uma exibição bidimensional de elementos individuais, uma formação de proteína é usada para selecionar bibliotecas de exibição de fago ou ribossomo, a fim de selecionar parceiros de ligação específicos, incluindo anticorpos, esqueletos sintéticos, peptídeos e aptâmeros. Desta maneira, seleção de biblioteca contra biblioteca é realizada. A seleção de candidatos de medicamento em bibliotecas químicas combinatoriais em

relação a uma formação de alvos de proteína identificados de projetos de genoma é outra aplicação da abordagem.

Os ensaios de conta multiplexados utilizam uma série de partículas espectralmente distintas que são usadas para capturar e quantificar analisados solúveis. O analisado é então medido por detecção de uma emissão baseada em fluorescência e análise citométrica de fluxo. Os ensaios de contas multiplexados geram dados que são comparáveis aos ensaios baseados em ELISA, porém em um modo multiplexado ou simultâneo. A concentração de desconhecidos é calculada para a formação de contas citométrica como com qualquer ensaio de formato sanduíche, isto é, através do uso de padrões conhecidos e por plotagem de desconhecidos em relação a uma curva padrão. Além disso, ensaios de conta multiplexados permitem a quantificação de analisados solúveis nas amostras, nunca anteriormente considerados devido a limitações de volume da amostra. Além dos dados quantitativos, imagens visuais poderosas são geradas revelando perfis ou assinaturas únicas que fornecem ao usuário informação adicional em um relance.

Em alguns exemplos dos métodos descritos, quando o nível de expressão de um biomarcador(es) é avaliado, o nível é comparado com o nível de expressão do(s) biomarcador(es) em um padrão de referência. Por padrão de referência pretendemos significar o nível de expressão de um biomarcador(es) particular(es) de uma amostra ou indivíduo sem câncer, em um estado selecionado de câncer ou na ausência de uma variável particular, tal como um agente terapêutico. Alternativamente, o padrão de referência compreende uma quantidade conhecida de biomarcador. Tal quantidade conhecida correlaciona-se com um nível médio de indivíduos sem câncer, em um estágio selecionado de câncer ou na ausência de uma variável particular, tal como um agente terapêutico. Um padrão de referência também inclui o nível de expressão de um ou mais biomarcadores de uma ou mais amostras ou indivíduos selecionados, como descrito aqui. Por exemplo, um padrão de

referência inclui uma avaliação do nível de expressão de um ou mais biomarcadores em uma amostra de um indivíduo que não tem um câncer, está em um estágio selecionado de progressão de um câncer ou não recebeu tratamento para um câncer. Outro padrão de referência exemplar inclui uma

5 avaliação do nível de expressão de um ou mais biomarcadores de amostras retiradas de múltiplos indivíduos que não têm um câncer, estão em um estágio selecionado de progressão de um câncer ou não receberam tratamento para câncer.

Quando o padrão de referência inclui o nível de expressão de

10 um ou mais biomarcadores de uma amostra ou indivíduo na ausência de um agente terapêutico, a amostra ou indivíduo de controle é opcionalmente a mesma amostra ou indivíduo a ser testado antes ou após o tratamento com um agente terapêutico ou é uma amostra selecionada na ausência do agente terapêutico. Alternativamente, um padrão de referência é um nível de

15 expressão médio de um número de indivíduos sem um câncer particular. Um padrão de referência também inclui um nível de controle conhecido ou valor desconhecido na arte. Em um aspecto dos métodos aqui descritos, é desejável igualar em idade um padrão de referência com o diagnóstico do indivíduo com um câncer.

20 Em uma técnica para comparar níveis de proteína de expressão de duas diferentes amostras (p. ex., uma amostra de um indivíduo diagnosticado com um câncer e um padrão de referência), cada amostra é separadamente submetida a eletroforese gel 2D. Alternativamente, cada amostra é diferentemente rotulada e ambas as amostras são carregadas sobre o

25 mesmo gel 2D). Vide, p. ex., Unlu et al. Electrophoresis, 1997; 18:2071-2077, que é incorporado aqui por referência por pelo menos seus ensinamentos de métodos para avaliar e comparar níveis de expressão de proteína. A mesma proteína ou grupo de proteínas de cada amostra é identificado pela posição relativa dentro do padrão de proteínas resolvidas por eletroforese 2D. Os

níveis de expressão de uma ou mais proteínas de uma primeira amostra são então comparados com o nível de expressão da(s) mesma(s) proteína(s) da segunda amostra, desse modo permitindo a identificação de uma proteína ou grupo de proteínas que é expresso diferentemente entre as duas amostras (p. ex., um biomarcador). Esta comparação é feita para indivíduos antes e após eles serem suspeitos de ter um câncer, antes e após eles começarem um regime terapêutico e durante o curso daquele regime.

Em outra técnica, o nível de expressão de uma ou mais proteínas está em uma única amostra como uma percentagem das proteínas totais expressas. Este nível de expressão avaliado é comparado com um padrão de referência preexistente, desse modo permitindo a identificação de proteínas que são diferentemente expressas na amostra relativa ao padrão de referência.

Há uma variedade de sequências relacionadas com biomarcadores, bem como qualquer outra proteína descrita aqui, que são descritos no Genbank e estas sequências e outras são aqui incorporadas por referência em suas totalidades, bem como para subsequências individuais contida ali. Assim, uma variedade de sequências é provida aqui e estas e outras são encontradas no Genbank em <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi>. Aqueles de habilidade na arte entendem como resolver discrepâncias de sequência e diferenças e ajustar as composições e métodos relativos a uma sequência particular com outras sequências relacionadas. Imprimadores e/ou sondas são projetados para qualquer sequência, dadas as informações descritas aqui e conhecidas na arte. Por exemplo, a sequência genética para ALDOA humana é encontrada em GenBank Accession No. NM 000034. A sequência genética para PGK1 human é encontrada no GenBank Accession No. NM_000291. A sequência genética para PRDX1 humana é encontrada no GenBank Accession No. NM_002574. A sequência genética para COF1 humana é encontrada em

GenBank Accession No. NM 005507. A sequência genética para a histona humana H4 é encontrada no GenBank Accession No. NM 175054.

Também provido é um kit de detecção compreendendo anticorpos específicos para duas ou mais de ALDOA, PGK1, PRDX1, COF1 e histona H4. Opcionalmente, o kit de detecção compreende anticorpos específicos para ALDOA, PGK1 e PRDX1. Opcionalmente, o kit de detecção compreende anticorpos específicos para duas ou mais de ALDA, PGK1, PRDX1, COF1 e histona H4 em um sistema de ensaio. Kits, por exemplo, compreendem ainda instruções para realizar os métodos descritos aqui. Tal kit
10 opcionalmente compreende um meio de rotulação e/ou um agente terapêutico.

Também provido é um sistema de ensaio multiplex compreendendo um suporte sólido e um meio de detecção para determinar os níveis de duas ou mais de ALDOA, PGK1, PRDX1, COF1 e histona H4 em uma amostra. O meio de detecção é quaisquer composições ou sistemas
15 conhecidos ou recentemente descobertos para determinar os níveis de ALDOA, PGK1 e PRDX1. Por exemplo, os meios de detecção incluem anticorpos ou outros ligandos específicos para os biomarcadores. Os suportes sólidos incluem qualquer forma útil, tal como películas ou membranas finas, contas, frascos, pratos, fibras, fibras ópticas, fibras tecidas, chips, discos
20 compactos, polímeros, partículas e micropartículas conformados. Um chip é um pedaço de material pequeno retangular ou quadrado. Formas preferidas para substratos de estado sólido são películas finas, contas ou chips.

Exemplos

Exemplo 1

Materiais e Métodos

Anticorpos: Um anticorpo DR5 anti-humano agonista, TRA-8, foi preparado como descrito em (Ichikawa et al., Nat. Med. 7:954-60 2001). Os anticorpos anti-ALDOA, anti-COF1 e anti-PGK1 foram comprdos de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Os anticorpos anti-histona

H4 e anti-PRDX1 foram comprados de Upstate Group, Inc. (Charlottesville, VA). O derivativo de camptotecina CPT-11 (Pfizer Inc., New York, NY) e oxaliplatina composto de platina (Sanofi-Aventis, Bridgewater, NJ) foram obtidos da University of Alabama at Birmingham Hospital Pharmacy (Birmingham, AL). O paclitaxel taxóide foi comprado da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO).

Células: Células de câncer de cólon humanas COLO 205 e células de câncer de pulmão humano NCI-H2122 foram mantidas em meio RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com 4,5 g/l de glicose, 10 mM HEPES, 1 mM piruvato de sódio e 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor (FBS; HyClone Laboratories, Logan, UT). Células de câncer de cólon humanas e células de câncer de pulmão humanas A-427 foram cultivadas em meio essencial Mínimum (Invitrogen) suplementado com 0,1 mM aminoácidos não essenciais, 1 mM piruvato de sódio e 10% FBS. As células de câncer de cólon humanas HT-29 foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10 mM HEPES, 1 mM piruvato de sódio e 10% FBS. O subclone 2LMP de linhagem de célula de câncer de mama humana MDA-MB-231 foi mantido em Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen) com 10% FBS. Células de câncer de mama humanas BT-474 foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10 mg/ml de insulina, 4,5 g/l glicose, 10 mM HEPES, 1 mM piruvato de sódio e 10% FBS. Todas as linhagens de célula foram cultivadas a 37°C em uma atmosfera umidificada de 5% CO₂.

Preparação de amostra de sobrenadante de cultura: Para células 2-DE, COLO 205 (2×10^6 células) foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato DPBS (Mediatech, Herndon, VA) e incubadas na condição com fome de soro a 37°C por 24 horas. Após lavar com meio livre de soro, as células foram tratadas com ou sem TRA-8 em 10 ml de meio livre de soro a 37°C por 24 horas. Os sobrenadantes de cultura foram recuperados

por centrifugação a 10.000xg por 30 minutos a 4 °C, concentrados por Centriplus (Millipore, Billerica, MA) e precipitados com acetona. Os precipitados foram ressolubilizados em reidratação READYPREP™/tampão de amostra (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Para análise de imunoblotting, as células (1 x 10⁶ células) foram revestidas em placa e cultivadas em meio de cultura completo a 37°C por 24 h. As células foram lavadas com meio livre de soro e tratadas com ou sem TRA-8 ou agentes quimioterapêuticos em 5 ml de meio livre de soro a 37°C por 24 h. Os sobrenadantes de cultura foram recuperados por centrifugação, concentrados e precipitados com acetona. Os precipitados foram ressolubilizados em tampão de amostra de dodecil sulfato de sódio (SDS) (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 5% 2-mercaptoetanol 2% SDS, 10% glicerol e 0,002% azul de bromofenol).

Eletroforese em gel bidimensional: Amostras de sobrenadante de cultura foram carregadas em tira READYSTRIPTM IPG, pH 3 – 10 (Bio-Rad Laboratories) por reidratação passiva durante a noite. Focalização isoeletrica (IEF) foi realizada usando-se célula PROTEAN® IEF (Bio-Rad Laboratories). Voltagem IEF foi aplicada de acordo com o seguinte paradigma: 250 V por 20 min, 8000 V por 2,5 h e 8000 V para obter-se 20 kVh. Após IEF, as tiras foram equilibradas em tampão de equilíbrio READYPREPTM I (Bio-Rad Laboratories) em temperatura ambiente por 10 min e então incubadas em tampão de equilíbrio II READYPREPTM (Bio-Rad Laboratories, Inc.) em temperatura ambiente por 10 min. Eletroforese de segunda dimensão foi realizada com CRITERION® Tris-HCl Gel, 8 – 16% (Bio-Rad Laboratories). Os géis foram manchados tingidos com corante de gel de proteína Ruby (Bio-Rad laboratories) SYPRO® (Molecular Probes, Carlsbad, California) de acordo com instruções do fabricante.

Análise e identificação de mancha de proteína: software de análise PDQUEST® 2-D (Bio-Rad Laboratories) foi usado para detecção de mancha e igualação entre géis. As manchas selecionadas foram excisadas dos

géis, destingidas com 20 mM NH_4HCO_3 contendo 50% CH_3CN , desidratadas com CH_3CN e secadas. Os pedaços de gel foram reidratados e digeridos com 10 μl de 20 mM NH_4HCO_3 , pH 8,0, contendo 10 ng/ml de tripsina modificada por grade de sequenciamento (Promega Co., Madison, WI) a 37°C por 12 h.

Os peptídeos resultantes foram extraídos uma vez com 0,05% de ácido fórmico e duas vezes com 0,05 % de ácido fórmico em CH_3CN . As amostras reunidas foram evaporadas a 2 – 3 μl , adicionadas com 10 μl de 0,05% de ácido fórmico e analisadas por cromatografia líquida equipada com MS em tandem (LC-MS/MS).

Experimentos LC-MS/MS foram realizados em um espectrômetro de massa A-ToF Ultima API (Waters Co., Milford, MA) equipado com DiNa (KYA Technologies Co., Tokyo, Japão) usando-se uma coluna de ponta ESI feita em casa guarnecida com Develosil ODS-HG (3 μm , Nomura Chemical Co., Ltd., Aichi, Japão). Eluição de peptídeos foi realizada com um gradiente linear de 0 – 35 % CH_3CN durante 35 min em uma taxa de fluxo de 200 nl/min. O volume das amostras foi de 5 μl . Os espectros de MS/MS foram pesquisados em relação ao banco de dados de proteína não-redudante GenBank usando-se Mascot (Matriz Science Inc., Boston, MA).

Análise de Immunoblotting: Amostras de sobrenadantes de cultura foram resolvidas em eletroforese de gel de poliacrilamida-SDS (PAGE), seguido por imunoblotting. ALDOA, COF1 ou PGK1 foram detectados com anticorpos anti-ALDOA, anti-COF1 ou anti-PGK1 de cabra e IgG anti-cabra de coelho conjugado com peroxidase (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL), como anticorpos primários e secundários, respectivamente. Histona H4 ou PRDX1 foi detectada com anticorpos anti-histona H4 ou anti-PRDX1 e IgG anti-coelho de cabra conjugado com peroxidase, ads-HRP de camundongo/humano (Southern Biotechnology Associates), como anticorpos primários e secundários, respectivamente. Reagentes de detecção de Western blotting ECL (GE Healthcare, Chalfont St.

Giles, UK) foram usados de acordo com instruções do fabricante.

Análise citométrica de fluxo. Para detectar a expressão de DR5 na superfície da célula, as células (1×10^6) foram lavadas com PBS contendo 5% FBS e incubadas com 5 $\mu\text{g/ml}$ de TRA-8 ou um IgG1 de camundongo específico de isótipo (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, Alabama) a 4°C por 30 min. Após lavar com PBS contendo 5% de FBS, as células foram tratadas com 5 $\mu\text{g/ml}$ de IgG1 de anti-camundongo de cabra conjugado com ficoeritrina (PE) (Southern Biotechnology Associates, Inc.) a 4 °C por 30 min. Em seguida, as células foram lavadas, fixadas com 1% de paraformaldeído e analisadas em citômetro de fluxo FACSscan e software CellQuest (BD, Franklin Lakes, NJ).

Análise de viabilidade de célula: Para examinar o efeito do soro, as células (2×10^4) foram revestidas em placa em poço de uma microplaca de 96-poços e cultivadas em meio de cultura completo a 37°C por 24 h, lavadas com meio livre de soro e ainda incubadas em 100 μl de meio completo ou meio livre de soro a 37°C durante os tempos indicados. A viabilidade celular foi avaliada por medição dos níveis ATP celulares usando-se sistema de ensaio de luminescência ATPlite™-M (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA) de acordo com instruções do fabricante e determinada como uma percentagem relativa ao valor de luminescência das células, que foram cultivadas em meio completo, usadas como um controle. O ensaio da viabilidade celular foi repetido em experimentos em triplicata. Os dados foram estatisticamente analisados pelo teste Student *t*. No caso do teste Student *t*, se a variância da homogeneidade fosse rejeitada ($P < 0,05$ pelo teste F), o teste Welch era aplicado. Os valores de probabilidade (valores-P) menores do que 0,05 foram considerados ser estatisticamente significantes. Todos os valores *P* foram arredondados para locais de quatro decimais.

Para avaliar o efeito da condição livre de soro de TRA-8, as células foram cultivadas como descrito acima, lavadas com meio livre de soro

e tratadas com ou sem TRA-8 ou agentes quimioterapêuticos em 100 µl de meio livre de soro a 37°C durante os tempos indicados. A viabilidade celular foi avaliada usando-se ensaio ATPLite™ (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA) e determinada como uma percentagem relativa ao valor de luminescência das células não tratadas usadas como um controle. O ensaio de viabilidade celular foi repetido em experimentos em triplicata.

Preparação de soros de camundongos contendo tumor.

Células COLO 205 (1×10^7) foram inoculadas subcutaneamente em camundongos nus atímicos no dia 0. Os camundongos foram agrupados aleatoriamente. Cada um dos grupos consistiu de 3 camundongos. TRA-8 (10 mg/kg) foi administrado intraperitonealmente em camundongos nos dias 16 e 20. CPT-11 (33 mg/kg) foi administrado intravenosamente em camundongos nos dias 17 e 21. O comprimento e largura dos tumores sólidos foram medidos duas vezes semanalmente. O volume do tumor (mm^3) foi calculado como $axb^2/2$, onde a e b são o comprimento e a largura (mm) do tumor, respectivamente. O tamanho do tumor foi determinado como uma percentagem em relação ao volume do tumor no dia 16. Os soros foram obtidos de camundongos contendo tumor no dia 23.

Estabelecimento de ELISA. Camundongos BALB/c fêmeas

foram imunizados com PRDX1 recombinante. Linfócitos de linfonodos locais foram fundidos com células de mieloma NS-1. Os hibridomas positivos foram avaliados em relação a PRDX1 por ELISA. Após obterem-se diversos anticorpos, as placas de ELISA foram revestidas com anticorpo capturado e bloqueadas com 3% BSA em PBS. Cada proteína foi detectada com anticorpo conjugado com biotina, seguido por estreptavidina conjugada com peroxidase. A absorvência a 450 nm (A_{450}) foi medida usando-se uma leitora de microplaca. Cada nível de proteína nos soros foi determinado como valor A_{450} .

Resultados

O anticorpo monoclonal anti-DR5 TRA-8 tem uma atividade agonista intrínseca sem agentes reticulantes ou aderência de superfície e induz apoptose em uma variedade de células cancerosas *in vitro*. Além disso, TRA-8 tem atividade antitumor tanto sozinho como em combinação com quimioterapia e/ou terapia de radiação em vários modelos de xenoenxerto de tumor humano. Entretanto, diferentes graus de sensibilidade a TRA-8 foram observados entre as células cancerosas, embora DRA seja expresso nas células. Não existe atualmente biomarcador para predição do efeito de TRA-8.

Proteínas podem ser liberadas ou secretadas de células de câncer durante a apoptose e níveis trocados resultantes destas proteínas podem refletir a resposta de células cancerosas a agentes terapêuticos. É possível que estas proteínas possam ser usadas como biomarcadores para monitorar e prever o efeito dos agentes terapêuticos, tais como, por exemplo, TRA-8. Para descobrir tais proteínas, 2-DE acoplado com MS foi selecionado de algumas tecnologias proteômicas para focalizar-se em proteínas abundantes relativas. Uma vez determinado que a linhagem de célula de câncer de cólon humana COLO 205 expressa DR5 na superfície e é uma das mais sensíveis linhagens de célula para TRA-8, esta linhagem de célula foi usada para descobrir proteínas liberadas de células sensíveis a TRA-8. As proteínas liberadas ou secretadas são valiosas como biomarcadores potenciais porque estas proteínas são detectadas nos soros ou plasma de pacientes, que são amostras prontamente acessíveis. Após os sobrenadantes de cultura para células COLO 205 tratadas com TRA-8 terem sido resolvidos por 2-DE com subsequente tingimento com SYPRO Ruby, perfis proteômicos dos sobrenadantes de cultura foram obtidos com base na comparação entre géis usando-se software de análise PDQUEST® 2-D (Fig. 1). Constatamos que 6 manchas de proteína emergiram nos sobrenadantes de cultura no tratamento de TRA-8. Estas proteínas foram identificadas como PGK1, ALDOA,

subunidade beta 1 de proteassoma (PSB1), PRDX1, COF1 e histona H4 por MS (Tabela 2). Estes dados sugerem que estas proteínas, que são liberadas de células COLO 205 dentro do sobrenadante de cultura no tratamento TRA-8, são biomarcadores para monitorar o efeito citotóxico do anticorpo.

5 Para a finalidade da descoberta de biomarcador para prever a sensibilidade de células cancerosas a medicamento anti-câncer, anticorpo anti-DR5 (TRA-8) foi usado como um medicamento anti-câncer. Um painel de 15 linhagens de células cancerosas de cólon humano foi avaliado quanto à susceptibilidade in vitro à apoptose mediada por TRA-8 (Tabela 1). Para
10 determinar o perfil das proteínas liberadas durante apoptose mediada-TRA-8, células COLO 205 foram selecionadas para seleção inicial visto que elas eram muito sensíveis a tratamento com TRA-8. Após células de câncer de cólon humanas COLO205 terem sido tratadas com ou sem TRA-8, os sobrenadantes de cultura foram resolvidos por eletroforese gel bidimensional e as proteínas
15 diferencialmente expressas que se liberaram das células COLO 205 tratadas com TRA-8 foram determinadas usando-se software de análise PDQuest 2-D (Figura 1). Houve um aumento das proteínas liberadas com dose aumentada de tratamento TRA-8 em comparação com aquele das células não tratadas (Figura 1, círculos). Análise espectrométrica indicou que estas proteínas
20 recentemente liberadas no sobrenadante de cultura de células COLO205 tratadas com TRA-8 eram aldolase A (ALDOA) de frutose-bifosfato, cofilina 1 (COF1), histona H4, fosfoglicerato quinase 1 (PGK1) e peroxirredoxina 1 (PRDX1) (Tabela 2). Os níveis aumentados de expressão destas proteínas foram ainda confirmados por análise Western Blot usando-se anticorpos
25 específicos.

Tabela 1

Linhagem de células de cancer de cólon	IC ₅₀ de TRA-8 (ng/ml)	
	Sequencial	Simultâneo
COLO 205	1,22	0.322
SW480	4,01	1.56
HCT116	9,04	1.91
SW948	12,6	0.51
HCT15	17,8	3.56
DLD1	19,8	1.21
SW403	65,7	1.07
SW1116	68,7	10.4
WiDr	87,3	14.8
LS174T	2,250	16.4
T84	>10,000	79.1
HT-29	>10,000	106
SW620	>10,000	>10,000
Caco2	>10,000	>10,000
SNUC1	>10,000	>10,000

Método Sequencial: espalhar células --> 37°C / 24 h, adicionar anticorpo --> 37°C/24 h, ensaiar viabilidade da célula

Método Simultâneo: espalhar células, adicionar anticorpo --> 37°C/24h, ensaiar viabilidade da célula

Tabela 2

Nome da proteína	No. de acesso	Escore Mascot	Peptídeos conjugados	MW (kD)	pI
Frutose-bisfosfato aldolase A (ALDOA)	P04075	1200	53	39,3	8,39
Cofilina-1 (COF1)	P23528	813	30	18,4	8,26
Histona H4	P62805	280	4	11,2	11,36

Fosfoglicerato quinase 1 (PGK1)	P00558	1166	44	44,5	8,30
Peroxiredoxina 1 (PRDX1)	Q06830	486	16	22,1	8,27
Proteassoma subunidade tipo 1 (PSMB1)	P20618	451	18	26,5	8,27

Para determinar se estas proteínas identificadas na cultura de célula COLO205 são correlacionadas com susceptibilidade TRA-8 de células tumorais, três linhagens de célula de cólon humanas, COLO205, WiDr e HT29, que representam uma diferente susceptibilidade para apoptose mediada por TRA-8, foram selecionadas. Uma vez que as células foram tratadas com TRA-8 na condição com fome de soro, o efeito da inanição de soro na viabilidade celular foi examinado. A inanição de soro teve pouco ou nenhum efeito sobre a viabilidade celular de três linhagens de célula e o padrão da susceptibilidade TRA-8 entre as três linhagens de célula não foi alterado (Fig. 2A). Os níveis da linha de referência das proteínas liberadas foram significativamente diferentes entre as três linhagens de célula, que pareceram estar correlacionados com a susceptibilidade de célula tumoral à apoptose mediada por TRA-8. Células de COLO205 altamente susceptíveis, liberaram os níveis de linha de referência mais elevados de ALDOA, COF1, PGK1 e PRDX1. As células susceptíveis intermediárias TRA-8, WiDr, liberaram os níveis de linha de referência de duas proteínas, PGK1 e PRDX1, enquanto que as células resistentes a TRA-8, HT29, não liberaram quaisquer níveis de linha de referência detectáveis destas proteínas (Fig. 2B). No tratamento com diferentes doses de TRA-8, a liberação de todas cinco proteínas de células de COLO205 dentro dos sobrenadantes de cultura foi aumentada por incubação com uma dose muito baixa (10 ng/ml) de TRA-8. Um significativo aumento destas proteínas foi observado em células WiDr nas doses mais elevadas (> 100 ng/ml) de tratamento TRA-8. Ao contrário, as células HT29 resistentes a TRA-8 não liberaram níveis significativos destas proteínas em baixas doses

de tratamento com TRA-8 (exceto PGK1) e altas doses (1 µg/ml) de TRA-8 foram necessárias para a liberação de COF1 e PRDX1. Estes resultados sugerem que tanto a linha de referência como os níveis induzidos por TRA-8 destas proteínas podem estar correlacionados com a susceptibilidade das células tumorais à apoptose mediada por TRA-8.

Para determinar se estas proteínas identificadas são universais para outros tipos de células cancerosas humanas, a alteração destas proteínas foi examinada em linhagens de célula de câncer de mama humanas 2LMP e BT-474. A inanição de soro teve pouco efeito sobre a viabilidade celular de 2LMP (96%) e BT-474 (87%). Nesta condição, TRA-8 teve um efeito citotóxico significativo sobre células 2LMP, porém não em células BT-474 (Fig. 3A). No tratamento de células 2LMP com TRA-8, a liberação de ALDOA, COF1, histona H4, PGK1 e PRDX1 dentro do sobrenadante de cultura foi significativamente aumentada (Fig. 3B). Quando células BT-474 foram tratadas com uma alta concentração de TRA-8 (1 µg/ml) foi mostrado o aumento de COF1 e histona H4 no sobrenadante de cultura. PGK1 foi aumentada minimamente no sobrenadante de cultura. Estes dados demonstram que a liberação de ALDOA, COF1, histona H4, PGK1 e PRDX1 é relacionada com a eficácia citotóxica de anticorpo anti-DR5 em células cancerosas de mama humanas.

Em seguida, linhagens de célula de câncer de pulmão humanas NCI-H2122 e A-427 foram utilizadas. Como com células cancerosas de cólon e mama humanas, a inanição de soro teve pouco efeito sobre a viabilidade celular de NCI-H2122 (87%) e A-427 (82%). Como mostrado na Fig. 4, TRA-8 teve um efeito citotóxico significativo sobre as células NCI-H2122 nesta condição, porém não sobre as células A-427. No tratamento de TRA-8, a liberação de ALDOA, COF1, histona H4, PGK1 e PRDX1 dentro do sobrenadante de cultura foi aumentada de células NCI-H2122 (Fig. 4B). Quando células A-427 foram tratadas com TRA-8, o aumento da PRDX1 foi

detectado. Somente no tratamento de TRA-8 em uma concentração final de 1 $\mu\text{g/ml}$ foi o aumento de ALDOA, COF1 e histona H4 no sobrenadante de cultura mostrado. A PGK1 foi aumentada ligeiramente no sobrenadante de cultura. Estes resultados indicam que a liberação de ALDOA, COF1, histona H4, PGK1 e PRDX1 é correlacionada com a eficácia citotóxica do anticorpo anti-DR5 em células cancerosas de pulmão humanas.

Quando os cursos de tempo dos biomarcadores candidatos foram analisados no sobrenadante de cultura após tratamento com TRA-8, os biomarcadores eram bastante sensíveis para prever a eficácia de TRA-8 (Fig. 5). ALDOA, COF1, histona H4, PGK1 e PRDX1 foram identificadas como biomarcadores potenciais para monitorar o efeito de TRA-8 usando-se células cancerosas humanas sobre as quais vários graus de sensibilidade a TRA-8 foram observados. Para examinar quão cedo estas moléculas liberadas podem ser detectadas no tratamento TRA-8, linhagens de célula sensíveis a TRA-8 COLO 205, WiDr, 2LMP e NCI-H2122 foram utilizadas. Como mostrado na Fig. 5A, TRA-8 teve um significativo efeito citotóxico sobre estas linhagens de célula em uma maneira dependente do tempo. Uma vez que o crescimento das células NCI-H2122 é mais lento do que de outras, foi mostrado que o efeito TRA-8 sobre as células NCI-H2122 parece ser mais fraco do que em outras células sensíveis a TRA-8. Durante a apoptose mediada por TRA-8, todos os biomarcadores candidatos foram liberados das células em uma maneira dependente do tempo, embora os graus de biomarcadores liberados variassem entre as células (Fig. 5B). O aumento de ALDOA e PRDX1 liberadas foi observado após 1 ou 2 horas de tratamento com TRA-8, enquanto TRA-8 não mostrasse um efeito significativo sobre a viabilidade celular nestes pontos do tempo. Embora outras moléculas tenham também sido aumentadas no tratamento com TRA-8, os níveis liberados de COF1 e H4 foram baixos em pontos iniciais do tempo e as mudanças da PGK1 liberada eram pequenas. Estes resultados sugerem que ALDOA e PRDX1 são

biomarcadores mais sensíveis e detectáveis para prever o efeito citotóxico de TRA-8 entre os biomarcadores candidatos.

Em seguida, o efeito dos agentes quimioterápicos sobre os biomarcadores candidatos foi avaliado. Alguns agente quimioterápicos precisam de uma incubação de longo termo para obter-se um efeito citotóxico sobre as células. A inanição de soro por 24 h teve efeito mínimo sobre a viabilidade celular de COLO 205, WiDr e HT-29. Ao contrário, a inanição de soro por 48 h teve um efeito sobre as células. Nesta condição, foram usados CPT-11, oxaliplatina e paclitaxel como agentes quimioterápicos. Quando as células foram tratadas com agentes quimioterapêuticos por 24 h, oxaliplatina teve um efeito significativo sobre as células WiDr (Fig. 6A). CPT-11 matou 71% das células COLO 205, oxaliplatina matou 41% das células de COLO 205 e 99% das células WiDr e paclitaxel matou 62% de células COLO 205 e 72% de células WiDr. A imunoblotting mostrou que a liberação de ALDOA, COF1, histona H4, PGK1 e PRDX1 dentro do sobrenadante de cultura foi aumentada no tratamento de oxaliplatina (Fig. 6B). Na incubação com agentes quimioterapêuticos por 48 h. oxaliplatina e paclitaxel afetaram a viabilidade celular das células COLO 205 e WiDr e CPT-11 teve um efeito significativo sobre as células COLO 205 (Fig. 6C). Nesta condição, os níveis de ALDOA, COF1, histona H4, PGK1 e PRDX1, detectados no sobrenadante de cultura, eram dependentes do efeito citotóxico dos agentes quimioterapêuticos (Fig. 6D). O aumento de biomarcadores liberados das células correlacionou-se com o efeito citotóxico dos agentes de quimioterapia. Estes dados demonstram que ALDOA, COF1, histona H4, PGK1 e PRDX1 são úteis como biomarcadores para prever a eficácia citotóxica dos agentes quimioterapêuticos sobre células cancerosas humanas.

Para determinar se as células e tecidos cancerosos expressavam níveis elevados de PRDX1 e PGK1, um painel de anticorpos monoclonais contra estas proteínas foi desenvolvido. Análise Western blot

usando-se um painel de linhagens de célula de câncer humanas demonstrou que todas as células cancerosas humanas testadas expressaram altos níveis de PRDX1 (Figura 7A) e PGK1 (Figura 7B). O tingimento imunoistológico de um painel de tecidos de câncer ovarianos humanos mostra que as células cancerosas seletivamente expressavam elevados níveis de PGK1 (Figura 7C). A correlação dos níveis de expressão de PGK1 e outras proteínas de apoptose com apoptose mediada por TRA-8 de células cancerosas derivadas de ascites e resposta quimioterapêutica dos pacientes é resumida na Tabela 3.

Tabela 3

No	Sensibilidade		Expressão							
	TRA-8	Cisplatin	DR5	PGK1	cIAP1	cIAP2	XIAP	Bcl-2	Bcl-XL	Bax
1	+	+	+	+	++++	++++	++	+	+	+
2	+	-	++	++	++++	++++	+++	-	+++	++
3	+++	+	+++	+++	++++	++++	+++	+	+++	+++
4	+++	+	++	++++	++++	++++	++++	++	+++	++
5	+++	+	+++	++++	++++	++	+	++++	-	+++
6	+++	?	++	++++	++++	++++	++++	+	++++	+++

Para determinar se os biomarcadores são úteis para monitorar e prever a eficácia de agentes in vivo, foram usados camundongos contendo tumor COLO 205, para examinar se os biomarcadores candidatos podem prever a eficácia de um medicamento anti-câncer em tumor COLO 205 in vivo. Após TRA-8 e/ou CPT-11 serem administrados duas vezes por semana em camundongos contendo tumor COLO 205 por somente uma semana, os soros foram recuperados do camundongo e analisados por ELISA. Embora TRA-8 ou TRA-8 mais CPT-11 tivessem ligeira eficácia antitumor, CPT-11 sozinho não mostrou efeitos antitumor (Figura 8A). A quantidade de ALDOA, PGK1 e PRDX1 nos soros foi aumentada por administração concomitante de TRA-8 ou TRA-8 mais CPT-11 (Figura 8B). Assim,

ALDOA, COF1, histona H4, PGK1, PRDX1 ou uma sua combinação são úteis como biomarcadores para prever a sensibilidade das células de câncer a medicamento anti-câncer.

São descritos materiais, composições e componentes usados para, usados em conjunto com, usados na preparação para ou são produtos do método e composições descritos. Estes e outros materiais são descritos aqui e é entendido que, quando combinações, subconjuntos, interações, grupos etc. destes materiais são descritos, embora referência específica de cada uma das várias combinações individuais e coletivas e permutação destes compostos, não podem ser explicitamente descritas, cada um é especificamente contemplado e descrito aqui. Por exemplo, se um biomarcador for descrito e examinado e numerosas das modificações que podem ser feitas de numerosas das moléculas incluindo o biomarcador forem examinadas, cada um e toda combinação e permutação do biomarcador e as modificações que são possíveis são especificamente contempladas, a menos que especificamente indicado ao contrário. Assim, se uma classe de moléculas A, B e C for descrita bem como uma classe de moléculas D, E e F e um exemplo de molécula de combinação, A-D forem descritos, então, mesmo se cada uma não for individualmente citada, cada uma é individual e coletivamente contemplada. Assim, neste exemplo, cada uma das combinações A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E e C-F são especialmente contempladas e deve ser considerada descrita pela descrição de A, B e C; D, E e F; e a combinação exemplo A-D. Igualmente, cada subconjunto ou combinação destas é também especificamente contemplada e descrita. Assim, por exemplo, os subgrupos de A-E, B-F e C-4 são especificamente contemplados e devem ser considerados descritos pela descrição de A, B e C; D, E e F; e a combinação exemplo A-D. Esta concepção aplica-se a todos os aspectos deste pedido, incluindo mas não limitado a etapas dos métodos de produzir e utilizar as composições descritas. Assim, se houver uma variedade de etapas adicionais que possam ser

realizadas, é entendido que cada uma destas etapas adicionais pode ser realizada com qualquer forma de realização ou combinação de formas de realização específicas dos métodos descritos e que cada tal combinação é especificamente contemplada e deve ser considerada descrita.

5 Deve ser citado que, como aqui usadas e nas reivindicações anexas, as formas singulares um, uma, o, a incluem a referência plural, a menos que o contexto claramente dite de outro modo. Assim, por exemplo, referência a um biomarcador inclui uma pluralidade de tais biomarcadores, referência ao biomarcador é referência a um ou mais biomarcadores e seus
10 equivalentes conhecidos daqueles hábeis na arte e assim em diante.

 Opcional ou opcionalmente significa o evento, circunstância ou material subsequentemente descrito pode ou não ocorrer ou estar presente e que a descrição inclui exemplos em que o evento, circunstância ou material ocorre ou está presente e exemplos em que ele não ocorre ou não está
15 presente.

 A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm os mesmos significados como comumente entendidos por uma pessoa hábil na arte a que o método e composições descritos pertencem. Publicações citadas aqui e o material para o qual elas são
20 citadas são por este meio especificamente incorporados por referência. Não é feita admissão de que qualquer referência constitua arte anterior. O exame das referências afirmam o que seus autores declaram e os requerentes reservam-se o direito de desafiar a precisão e pertinência dos documentos citados. Será claramente entendido que, embora numerosas publicações sejam referidas
25 aqui, tal referência não constitui uma admissão de que qualquer um destes documentos faz parte do conhecimento geral comum da arte.

 Por todas a descrição e reivindicações deste relatório, a palavra compreendem e variações da palavra, tais como compreendendo e compreende, significa incluindo mas não limitado a e não se pretende excluir,

por exemplo, outros aditivos, componentes, inteiros ou etapas.

Aqueles hábeis na arte reconhecerão ou serão capazes de verificar, empregando não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes das formas de realização específicas do método e composições aqui descritos. Tais equivalentes destinam-se a ser abrangidos pelas seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para prever a sensibilidade de uma célula cancerosa a um primeiro agente anticâncer, dito método caracterizado pelo fato de compreender:

5 (a) contatar a célula cancerosa com uma quantidade eficaz do agente anticâncer e

(b) avaliar a liberação pela célula de um ou mais biomarcadores selecionados do grupo consistindo de frutose-bisfosfato aldolase A (ALDOA), fosfoglicerato quinase 1 (PGK1), peroxirredoxina 1
10 (PRDX1), colfilina 1 (COF1) e histona H4, um aumento na liberação pela célula contatada, em comparação com uma célula de controle, indicando que a célula cancerosa é sensível ao agente.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a célula cancerosa ser contatada *in vivo*.

15 3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a célula cancerosa ser contatada *in vitro*.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 – 3, caracterizado pelo fato de o agente anticâncer compreender um agonista do receptor da mortalidade.

20 5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de o agonista ser selecionado do grupo consistindo de um anticorpo DR5, anticorpo DR4, Ligando Fas, TNF e ligando indutor da apoptose relacionada com TNF (TRAIL).

25 6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de o anticorpo DR5 ser TRA-8 ou um anticorpo tendo a mesma especificidade de epítipo que TRA-8.

7. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de o anticorpo DR5 ser uma versão humanizada de TRA-8.

8. Método para prever ou monitorar a eficácia de um agente

anticâncer, dito método caracterizado pelo fato de compreender:

- (a) administrar o agente ao indivíduo;
- (b) adquirir uma amostra biológica do indivíduo; e
- (c) detectar níveis de um ou mais biomarcadores selecionados

5 do grupo consistindo de ALDOA, PGK1, PRDX1, COF1 e histona H4, um aumento nos níveis em comparação com os níveis de linha de referência indicando eficácia.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de o agente anticâncer compreender um agonista do receptor da
10 mortalidade.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de o agonista ser selecionado do grupo consistindo de um anticorpo DR5, anticorpo DR4. Ligando Fas, TNF e ligando indutor da apoptose relacionada com TNF (TRAIL).

15 11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de o anticorpo DR5 ser TRA-8 ou um anticorpo tendo a mesma especificidade de epítipo que TRA-8.

12. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de o anticorpo DR5 ser uma versão humanizada de TRA-8.

20 13. Kit de detecção, caracterizado pelo fato de compreender ligandos específicos para dois ou mais de ALDOA, PGK1, PRDX1, COF1 e histona H4.

14. Kit de detecção de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de compreender ligandos específicos para ALDOA,
25 PGK1, e PRDX1.

15. Kit de detecção de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de os ligandos serem anticorpos.

16. Kit de detecção de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de os ligandos serem anticorpos.

17. Sistema de ensaio multiplex, caracterizado pelo fato de compreender um suporte sólido e um meio de detecção para determinar os níveis de dois ou mais de ALDOA, PGK1, PRDX1, COF1, e histona H4 em uma amostra.

5 18. Ensaio multiplex de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de o meio de detecção determinar os níveis de ALDOA, PGK1, e PRDX1.

19. Método para determinar uma dose eficaz para um agente anticâncer, dito método caracterizado pelo fato de compreender:

10 (a) contatar uma ou mais células cancerosas com uma pluralidade de dosagens do agente anticâncer sob condições que permitam a liberação celular de um ou mais biomarcadores selecionados do grupo consistindo de frutose-bisfosfato aldolase A (ALDOA), fosfoglicerato quinase 1 (PGK1), peroxirredoxina 1 (PRDX1), colfilina 1 (COF1) e histona H4;

15 (b) detectar a liberação em cada dosagem de mais elevada liberação indicando uma dosagem eficaz.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de o agente anticâncer compreender um agonista do receptor da mortalidade.

20 21. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de o agonista ser selecionado do grupo consistindo de um anticorpo DR5, anticorpo DR4, Ligando Fas, TNF e ligando indutor da apoptose relacionada com TNF (TRAIL).

25 22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de o anticorpo DR5 ser TRA-8 ou um anticorpo tendo a mesma especificidade de epítipo que TRA-8.

23. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de o anticorpo DR5 ser uma versão humanizada de TRA-8.

24. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

19 – 23, caracterizado pelo fato de pelo menos uma célula ser contatada com mais do que uma dosagem.

25. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

19 – 23, caracterizado pelo fato de cada célula ser contatada com somente
5 uma dosagem.

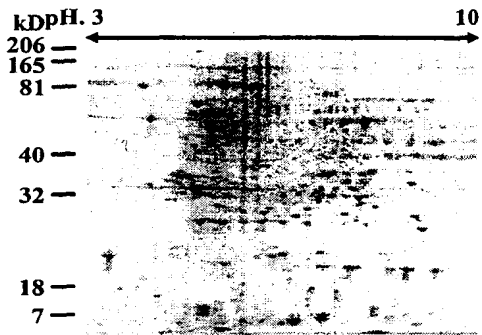


FIG. 1A

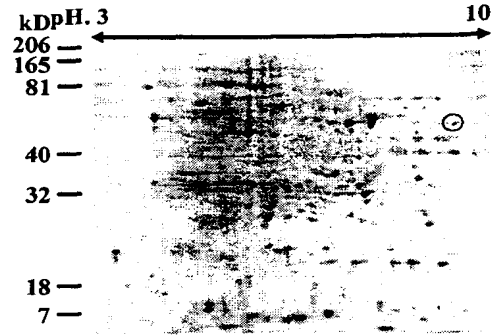


FIG. 1B

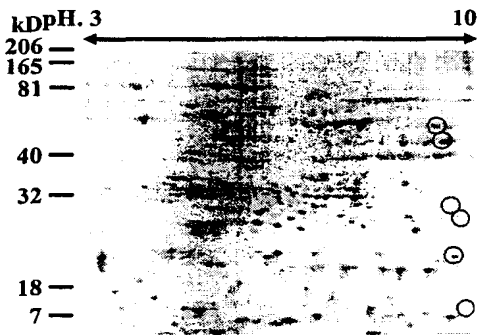


FIG. 1C

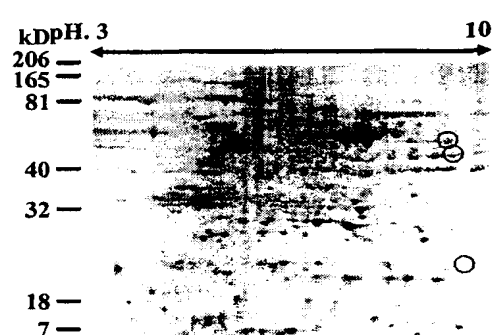


FIG. 1D

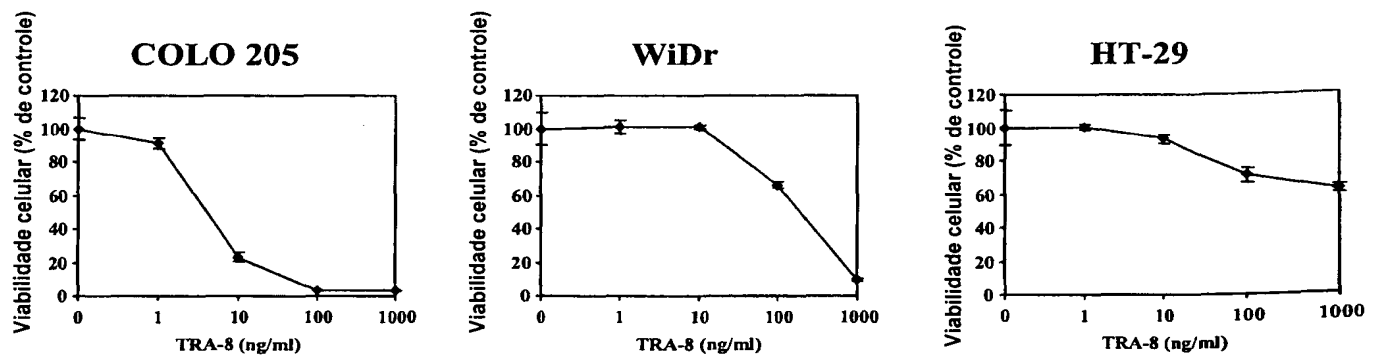


FIG. 2A

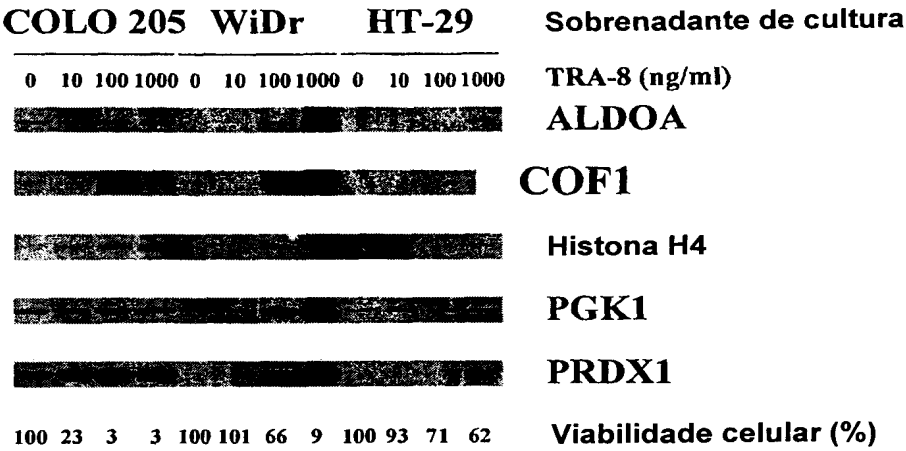


FIG. 2B

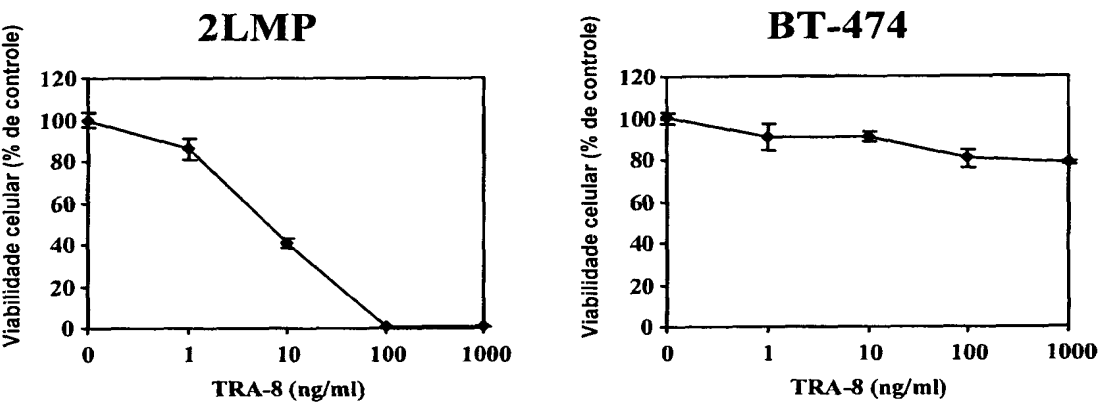


FIG. 3A

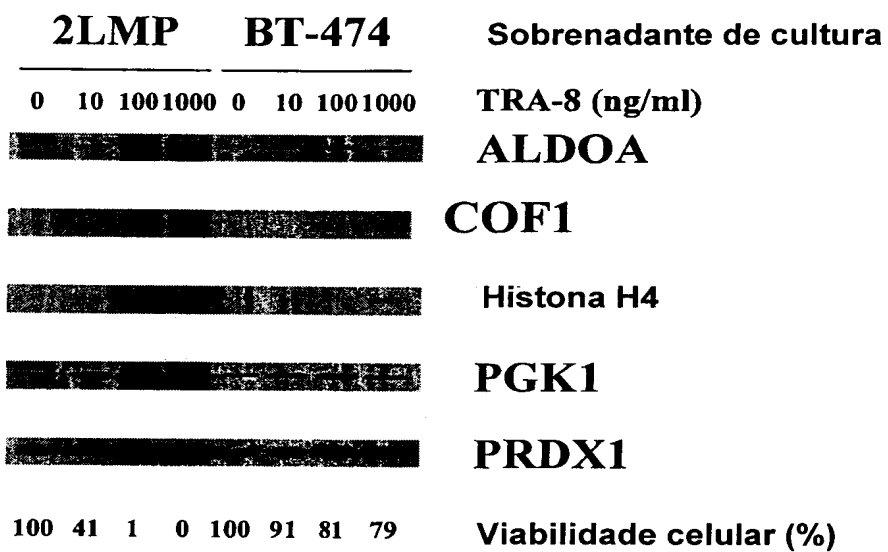


FIG. 3B

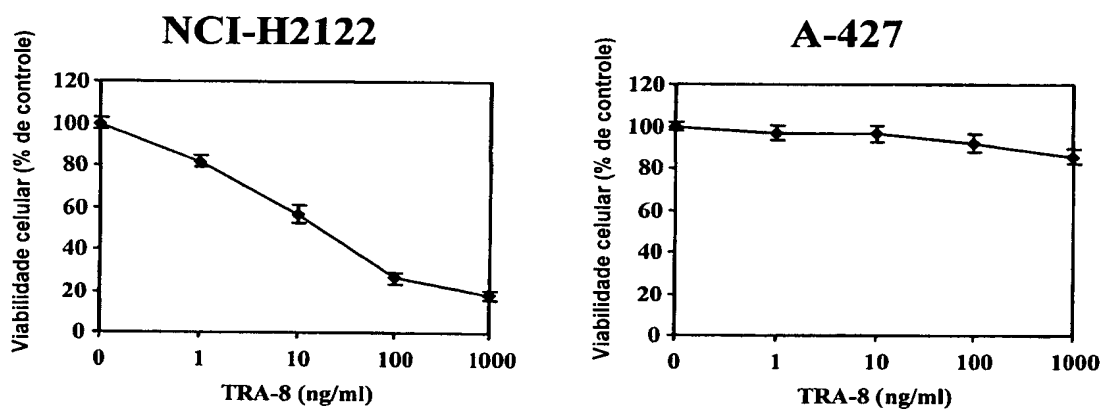


FIG. 4A

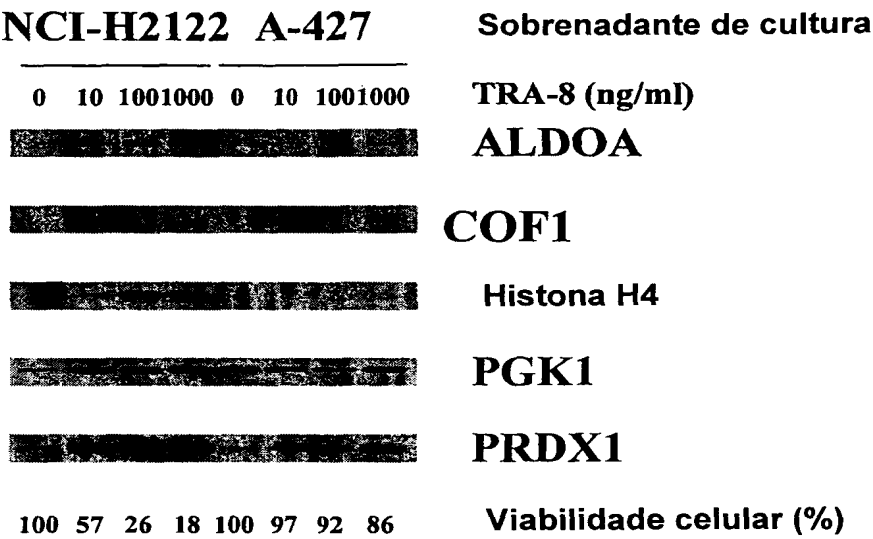


FIG. 4B

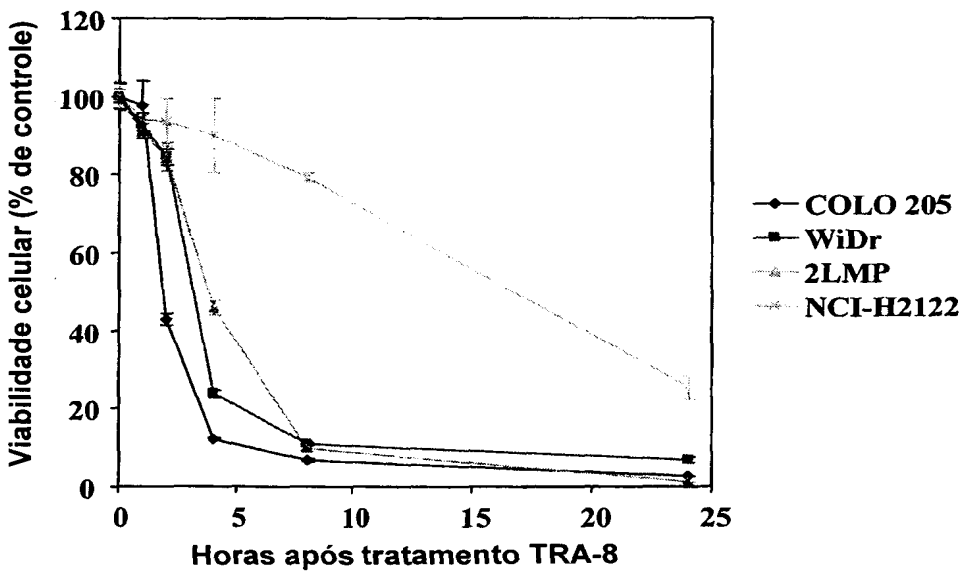


FIG. 5A

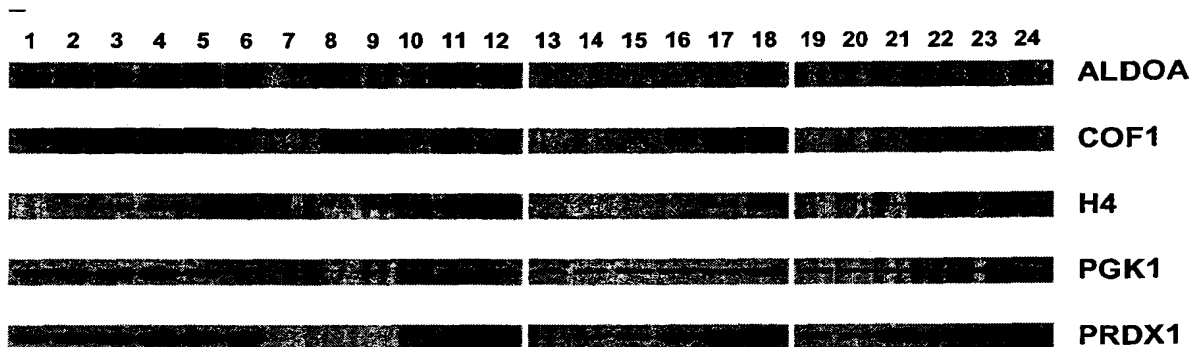


FIG. 5B

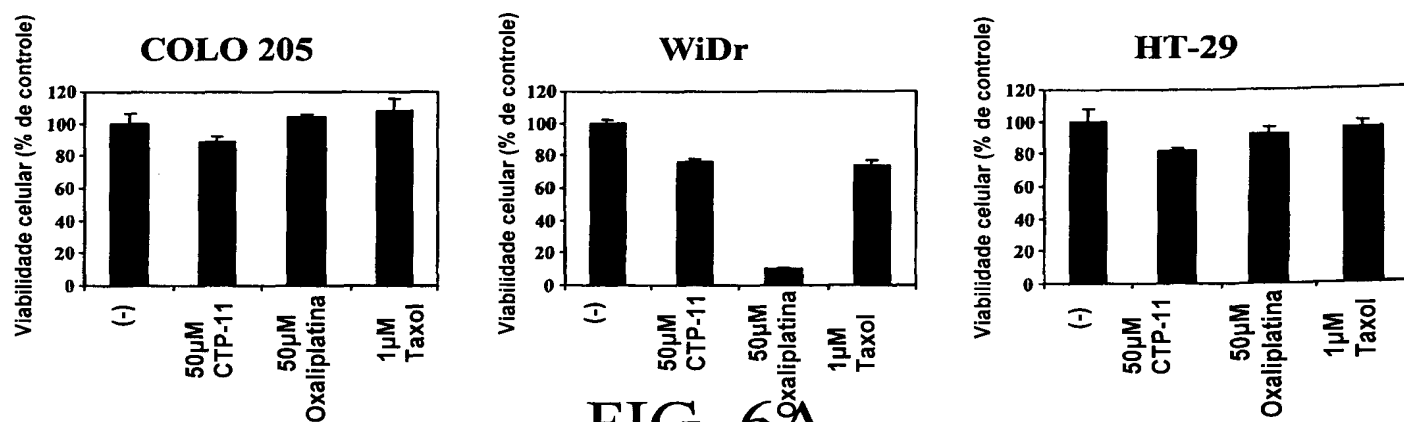


FIG. 6A

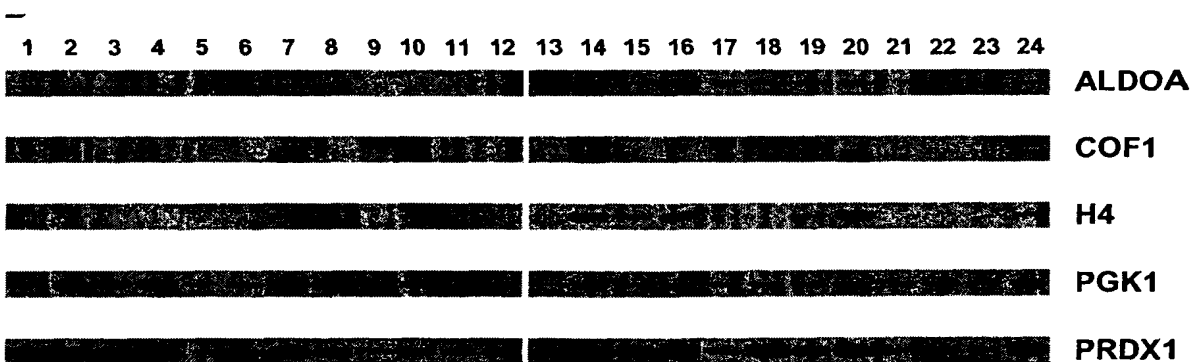


FIG. 6B



FIG. 7A

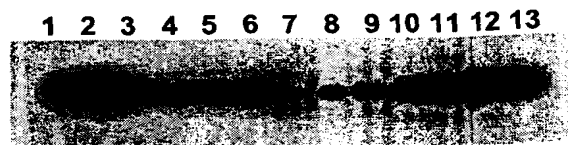
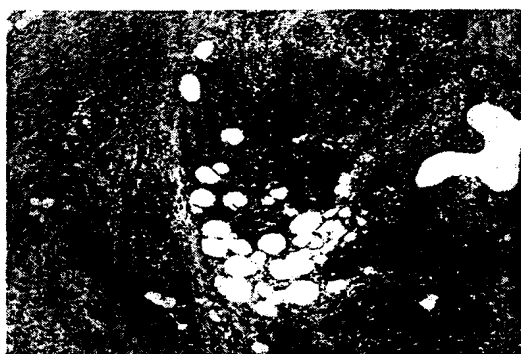


FIG. 7B



100x



400x

FIG. 7C

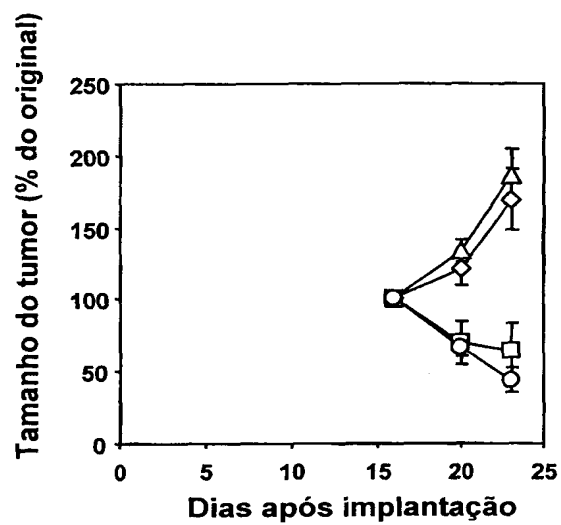


FIG. 8A

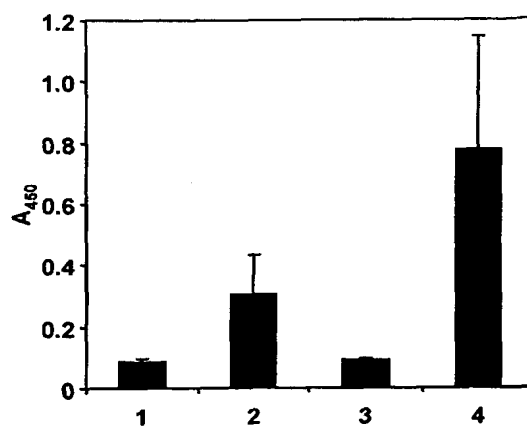


FIG. 8B

RESUMO

“MÉTODOS PARA PREVER A SENSIBILIDADE DE UMA CÉLULA
CANCEROSA A UM PRIMEIRO AGENTE ANTICÂNCER, PARA
PREVER OU MONITORAR A EFICÁCIA DE UM AGENTE
5 ANTICÂNCER, E PARA DETERMINAR UMA DOSE EFICAZ PARA UM
AGENTE ANTICÂNCER, KIT DE DETECÇÃO, E, SISTEMA DE
ENSAIO MULTIPLEX”

São descritos aqui biomarcadores e seus usos para avaliar a
eficácia e sensibilidade anticâncer.