

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

(21) **PI0615997-4 A2**

(22) Data de Depósito: 15/08/2006
(43) Data da Publicação: 31/05/2011
(RPI 2108)



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

(54) Título: **MÉTODO PARA PREVER A SENSIBILIDADE DE UMA AMOSTRA DE CÉLULA OU TECIDO, MÉTODO PARA INDUZIR APOPTOSE EM UMA AMOSTRA DE CÉLULA OU TECIDO, MÉTODO DE TRATAMENTO DE UMA DISFUNÇÃO E USO DE APO2L/TRAIL**

(30) Prioridade Unionista: 16/08/2005 US 60/708,677,
24/05/2006 US 60/808,076

(73) Titular(es): Genentech, INC.

(72) Inventor(es): Avi J. Ashkenazi, Klaus W. Wagner

(74) Procurador(es): Paola Calabria Mattioli

(86) Pedido Internacional: PCT US2006031785 de 15/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/022157 de 22/02/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA PREVER A SENSIBILIDADE DE UMA AMOSTRA DE CÉLULA OU TECIDO, MÉTODO PARA INDUZIR APOPTOSE EM UMA AMOSTRA DE CÉLULA OU TECIDO, MÉTODO DE TRATAMENTO DE UMA DISFUNÇÃO E USO DE APO2L/TRAIL A presente invenção refere-se a métodos e testes que examinam expressão de um ou mais biomarcadores em uma amostra de célula ou tecido de mamífero. De acordo com os métodos e testes divulgados, a detecção da expressão de moléculas relacionadas à GalNac-T, tais como GalNac-T14 ou GalNac-T3, é preditiva ou indicativa de que a amostra de célula ou tecido será sensível a agentes de indução de apoptose tais como Apo2L/TRAIL e anticorpos agonistas de anti-DR5. Kits e artigos de fabricação são também fornecidos.

**"MÉTODO PARA PREVER A SENSIBILIDADE DE UMA AMOSTRA DE
CÉLULA OU TECIDO, MÉTODO PARA INDUZIR APOPTOSE EM UMA
AMOSTRA DE CÉLULA OU TECIDO, MÉTODO DE TRATAMENTO DE UMA
DISFUNÇÃO E USO DE APO2L/TRAIL"**

5 Este pedido reivindica prioridade do pedido provisório US número 60/708,677 depositado em 16 de agosto de 2005 e do pedido provisório US número 60/808,076 depositado em 24 de maio de 2006, os conteúdos destes são incorporados no presente pela referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

10 As invenções descritas no presente pedido relacionam-se aos métodos e testes para detectar biomarcadores preditivos de sensibilidade de células de mamíferos para Apo2L/TRAIL e/ou anticorpos agonistas de receptores de morte. Mais particularmente, as realizações do presente pedido relacionam-se aos métodos e testes que detectam moléculas associadas à
15 família de proteínas GalNac-T que são preditivas de sensibilidade de células cancerígenas de mamíferos para Apo2L/TRAIL ou anticorpos agonistas de receptores de morte, tais como anticorpos agonistas de DR4 ou DR5.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Vários ligantes e receptores pertencentes à superfamília do fator
20 de necrose tumoral (TNF) foram identificados no estado da técnica. Incluídos entre tais ligantes estão fator alfa de necrose tumoral ("TNF-alfa"), fator beta de necrose tumoral ("TNF-beta" ou "linfotóxina-alfa"), linfotóxina-beta ("LT-beta"), ligante CD30, ligante CD27, ligante CD40, ligante OX-40, ligante 4-1BB, LIGHT, ligante Apo-1 (também referido como ligante Fas ou ligante CD95),
25 ligante Apo-2 (também referido como Apo2L ou TRAIL), ligante Apo-3 (também referido como TWEAK), APRIL, ligante OPG (também referido como ligante RANK, ODF, ou TRANCE), e TALL-1 (também referido como BlyS, BAFF ou THANK) (Ver, por exemplo, Ashkenazi, *Nature Review*, 2:420-430 (2002);

Ashkenazi e Dixit, *Science*, 281:1305-1308 (1998); Ashkenazi e Dixit, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11:255-260 (2000); Golstein, *Curr. Biol.*, 7:750-753 (1997) Wallach, *Cytokine Reference*, Academic Press, 2000, páginas 377-411; Locksley *et al.*, *Cell*, 104:487-501 (2001); Gruss e Dower, *Blood*, 85:3378-3404
 5 (1995); Schmid *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:1881 (1986); Dealtry *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 17:689 (1987); Pitti *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996); Wiley *et al.*, *Immunity*, 3:673-682 (1995); Browning *et al.*, *Cell*, 72:847-856 (1993); Armitage *et al.* *Nature*, 357:80-82 (1992), documento WO 97/01633 publicado em 16 de janeiro de 1997; documento WO 97/25428 publicado em
 10 17 de julho de 1997; Marsters *et al.*, *Curr. Biol.*, 8:525-528 (1998); Chicheportiche *et al.*, *Biol. Chem.*, 272:32401-32410 (1997); Hahne *et al.*, *J. Exp. Med.*, 188:1185-1190 (1998); documento WO 98/28426 publicado em 2 de julho de 1998; documento WO 98/46751 publicado em 22 de outubro de 1998; documento WO 98/18921 publicado em 7 de maio de 1998; Moore *et al.*,
 15 *Science*, 285:260-263 (1999); Shu *et al.*, *J. Leukocyte Biol.*, 65:680 (1999); Schneider *et al.*, *J. Exp. Med.*, 189:1747-1756 (1999); Mukhopadhyay *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:15978-15981 (1999)).

A indução de várias respostas celulares mediadas por tais ligantes da família TNF é tipicamente iniciada por suas ligações aos receptores
 20 celulares específicos. Alguns, mas não todos os ligantes da família TNF ligam-se a, e induzem várias atividades biológicas através dos “receptores de morte” da superfície celular para ativar caspases ou enzimas que realizam a morte celular ou via da apoptose. (Salvesen *et al.*, *Cell*, 91: 443-446 (1997)). Incluído entre os membros da superfamília de receptores TNF identificados até hoje
 25 estão TNFR1, TNFR2, TACI, GITR, CD27, OX-40, CD30, CD40, HVEM, Fas (também referido como Apo-1 ou CD95), DR4 (também referido como TRAIL-R1), DR5 (também referido como Apo-2 ou TRAIL-R2), DcR1, DcR2, osteoprotegerina (OPG), RANK e Apo-3 (também referido como DR3 ou

TRAMP) (ver, por exemplo, Ashkenazi, *Nature Reviews*, 2:420-430 (2002); Ashkenazi e Dixit, *Science*, 281:1305-1308 (1998); Ashkenazi e Dixit, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11:255-260 (2000); Golstein, *Curr. Biol.*, 7:750-753 (1997) Wallach, *Cytokine Reference*, Academic Press, 2000, pages 377-411; Locksley
 5 *et al.*, *Cell*, 104:487-501 (2001); Gruss e Dower, *Blood*, 85:3378-3404 (1995); Hohman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:14927-14934 (1989); Brockhaus *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:3127-3131 (1990); patente EP 417.563, publicada em 20 de março de 1991; Loetscher *et al.*, *Cell*, 61:351 (1990); Schall *et al.*, *Cell*, 61:361 (1990); Smith *et al.*, *Science*, 248:1019-1023 (1990); Lewis *et al.*, *Proc.*
 10 *Natl. Acad. Sci.*, 88:2830-2834 (1991); Goodwin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 11:3020-3026 (1991); Stamenkovic *et al.*, *EMBO J.*, 8:1403-1410 (1989); Mallett *et al.*, *EMBO J.*, 9:1063-1068 (1990); Anderson *et al.*, *Nature*, 390:175-179 (1997); Chicheportiche *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:32401-32410 (1997); Pan *et al.*, *Science*, 276:111-113 (1997); Pan *et al.*, *Science*, 277:815-818 (1997);
 15 Sheridan *et al.*, *Science*, 277:818-821 (1997); Degli-Esposti *et al.*, *J. Exp. Med.*, 186:1165-1170 (1997); Marsters *et al.*, *Curr. Biol.*, 7:1003-1006 (1997); Tsuda *et al.*, *BBRC*, 234:137-142 (1997); Nocentini *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:6216-6221 (1997); vonBulow *et al.*, *Science*, 278:138-141 (1997)).

A maioria destes membros da superfamília de receptores TNF
 20 compartilha a mesma estrutura típica de receptores de superfície celular incluindo regiões extracelular, de transmembrana e intracelular, enquanto outros são encontrados naturalmente como proteínas solúveis desprovidas de um domínio de transmembrana e intracelular. A porção extracelular de TNFRs típicos contém um padrão de sequência de aminoácido repetitivo de múltiplos
 25 domínios ricos em cisteína (CDRs), começando do NH₂ terminal.

O ligante referido como Apo-2L ou TRAIL foi identificado muitos anos atrás como um membro da família TNF de citocinas. (ver, por exemplo, Wiley *et al.*, *Immunity*, 3:673-682 (1995); Pitti *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:12697-

12690 (1996); documento WO 97/01633; documento WO 97/25428; patente US 5.763.223 emitida em 9 de junho de 1998; patente US 6.284.236 emitida em 4 de setembro de 2001). O polipeptídeo Apo2L/TRAIL humano de sequência nativa de comprimento total é um aminoácido longo 281, de
 5 proteína de transmembrana Tipo II. Algumas células podem produzir uma forma solúvel natural do polipeptídeo, através de clivagem enzimática da região extracelular do polipeptídeo (Mariani *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 137:221-229 (1997)). Estudos cristalográficos de formas solúveis do Apo2L/TRAIL revelam uma estrutura homotrimérica similar às estruturas do TNF e outras proteínas
 10 relacionadas (Hymowitz *et al.*, *Molec. Cell*, 4:563-571 (1999); Cha *et al.*, *Immunity*, 11:253-261 (1999); Mongkolsapaya *et al.*, *Nature Structural Biology*, 6:1048 (1999); Hymowitz *et al.*, *Biochemistry*, 39:633-644 (2000)). Apo2L/TRAIL, diferente de outros meios da família TNF, entretanto, foi descoberto ter um aspecto único de estrutura em que três resíduos de cisteína
 15 (na posição 230 de cada subunidade no homotrímero) juntos coordenam um átomo de zinco, e que a ligação de zinco é importante para a estabilidade do trímero e atividade biológica. (Hymowitz *et al.*, *acima*; Bodmer *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 275:20632-20637 (2000)).

Foi relatado na literatura que Apo2L/TRAIL pode desempenhar
 20 um papel na modulação do sistema imune, incluindo doenças auto-imunes tais como artrite reumatóide (ver, por exemplo, Thomas *et al.*, *J. Immunol.*, 161:2195-2200 (1998); Johnsen *et al.*, *Cytokine*, 11:664-672 (1999); Griffith *et al.*, *J. Exp. Med.*, 189:1343-1353 (1999); Song *et al.*, *J. Exp. Med.*, 191:1095-1103 (2000)).

25 Formas solúveis do Apo2L/TRAIL foram também relatadas para induzir apoptose em uma variedade de células cancerígenas, incluindo cólon, pulmão, mama, próstata, bexiga, rim, ovário e tumores do cérebro, assim como melanoma, leucemia, e mieloma múltiplo (ver, por exemplo, Wiley *et al.*, *acima*;

Pitti *et al.*, acima; patente US 6.030.945 emitida em 29 de fevereiro de 2000; patente US 6.746.668 emitida em 8 de junho de 2004; Rieger *et al.*, *FEBS Letters*, 427:124-128 (1998); Ashkenazi *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 104:155-162 (1999); Walczak *et al.*, *Nature Med.*, 5:157-163 (1999); Keane *et al.*, *Cancer Research*, 59:734-741 (1999); Mizutani *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:2605-2612 (1999); Gazitt, *Leukemia*, 13:1817-1824 (1999); Yu *et al.*, *Cancer Res.*, 60:2384-2389 (2000); Chinnaiyan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:1754-1759 (2000)). Estudos *in vivo* em modelos de tumor murino, além disso, sugerem que Apo2L/TRAIL, em combinação com quimioterapia ou radioterapia, podem exercer efeitos substanciais anti-tumorais (ver, por exemplo, Ashkenazi *et al.*, *supra*; Walczak *et al.*, acima; Gliniak *et al.*, *Cancer Res.*, 59:6153-6158 (1999); Chinnaiyan *et al.*, acima; Roth *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 265:1999 (1999); Pedido PCT US 00/15512; Pedido PCT US 01/23691). Em contraste com muitos tipos de células cancerígenas, muitos tipos de células humanas normais parecem ser resistentes à indução de apoptose por certas formas recombinantes de Apo2L/TRAIL (Ashkenazi *et al.*, acima; Walczak *et al.*, acima). Jo *et al.* relatou que uma forma solúvel de polihistidina marcada de Apo2L/TRAIL induziu apoptose *in vitro* em hepatócitos humanos isolados normais, mas não em hepatócitos não humanos (Jo *et al.*, *Nature Med.*, 6:564-567 (2000); ver também, Nagata, *Nature Med.*, 6:502-503 (2000)). Acredita-se que certas preparações de Apo2L/TRAIL recombinantes podem variar em termos de propriedades bioquímicas e atividades biológicas entre as células normais e doentes, dependendo, por exemplo, da presença ou ausência de uma molécula de marcação, conteúdo de zinco, e % de conteúdo de trímero (Ver, Lawrence *et al.*, *Nature Med.*, Letter to the Editor, 7:383-385 (2001); Qin *et al.*, *Nature Med.*, Letter to the Editor, 7:385-386 (2001)).

Foi descoberto que Apo2L/TRAIL liga-se a pelo menos cinco receptores diferentes. Pelo menos dois dos receptores que se ligam ao

Apo2L/TRAIL contém um domínio de morte citoplasmático funcional. Tal receptor foi referido como "DR4" (e alternativamente como TR4 ou TRAIL-R1) (Pan *et al.*, *Science*, 276:111-113 (1997); ver também documento WO 98/32856 publicado em 30 de julho de 1998; documento WO 99/37684
 5 publicado em 29 de julho de 1999; documento WO 00/73349 publicado em 7 de dezembro de 2000; pedido de patente US 2003/0036168 publicada em 20 de fevereiro de 2003; patente US 6.433.147 emitida em 13 de agosto de 2002; patente US 6.461.823 emitida em 8 de outubro de 2002, e patente US 6.342.383 emitida em 29 de janeiro de 2002).

10 Outro tal receptor para Apo2L/TRAIL foi referido como DR5 (e também foi alternativamente referido como Apo-2; TRAIL-R ou TRAIL-R2, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 ou KILLER) (ver, por exemplo, Sheridan *et al.*, *Science*, 277:818-821 (1997), Pan *et al.*, *Science*, 277:815-818 (1997), documento WO 98/51793 publicado em 19 de novembro de 1998; documento
 15 WO 98/41629 publicado em 24 de setembro de 1998; Screatton *et al.*, *Curr. Biol.*, 7:693-696 (1997); Walczak *et al.*, *EMBO J.*, 16:5386-5387 (1997); Wu *et al.*, *Nature Genetics*, 17:141-143 (1997); documento WO 98/35986 publicado em 20 de agosto de 1998; patente EP 870.827 publicada em 14 de outubro de 1998; documento WO 98/46643 publicado em 22 de outubro de 1998;
 20 documento WO 99/02653 publicado em 21 de janeiro de 1999; documento WO 99/09165 publicado em 25 de fevereiro de 1999; documento WO 99/11791 publicado em 11 de março de 1999; documento WO 03/042367 publicado em 22 de maio de 2003; documento WO 02/097033 publicado em 5 de dezembro de 2002; documento WO 03/038043 publicado em 8 de maio de 2003; pedido de patente US 2002/0072091 publicada em 13 de agosto de 2002; pedido de
 25 patente US 2002/0098550 publicada em 7 de dezembro de 2001; patente US 6.313.269 emitida em 6 de dezembro de 2001; pedido de patente US 2001/0010924 publicada em 2 de agosto de 2001; pedido de patente US

2003/01255540 publicada em 3 de julho de 2003; pedido de patente US 2002/0160446 publicada em 31 de outubro de 2002, pedido de patente US 2002/0048785 publicada em 25 de abril de 2002; pedido de patente US 2004/0141952 publicada em 22 de julho de 2004; pedido de patente US 5 2005/0129699 publicada em 16 de junho de 2005; pedido de patente US 2005/0129616 publicada em 16 de junho de 2005; patente US 6.342.369 emitida em fevereiro de 2002; patente US 6.569.642 emitida em 27 de maio de 2003, patente US 6.072.047 emitida em 6 de junho de 2000, patente US 6.642.358 emitida em 4 de novembro de 2003; patente US 6.743.625 emitida 10 em 1 de junho de 2004). Como DR4, DR5 é relatado conter um domínio de morte citoplasmático e ser capaz de sinalizar apoptose sob ligação do ligante (ou sob ligação de uma molécula, tal como um anticorpo agonista que imita a atividade do ligante). A estrutura cristalina do complexo formado entre Apo-2L/TRAIL e DR5 é descrita em Hymowitz *et al.*, *Molecular Cell*, 4:563-571 15 (1999).

Sob ligação do ligante, ambos DR4 e DR5 podem acionar apoptose independentemente pelo recrutamento e ativação do iniciador de apoptose, caspase-8, por meio da molécula adaptadora que contém o domínio de morte referida como FADD/Mort1 (Kischkel *et al.*, *Immunity*, 12:611-620 20 (2000); Sprick *et al.*, *Immunity*, 12:599-609 (2000); Bodmer *et al.*, *Nature Cell Biol.*, 2:241-243 (2000)).

Apo2L/TRAIL foi também relatado ligar-se àqueles receptores referidos como DcR1, DcR2 e OPG, os quais se acredita que funcionem como inibidores, ao invés de transdutores da sinalização (ver, por exemplo, DCR1 25 (também referido como TRID, LIT ou TRAIL-R3) (Pan *et al.*, *Science*, 276:111-113 (1997); Sheridan *et al.*, *Science*, 277:818-821 (1997); McFarlane *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:25417-25420 (1997); Schneider *et al.*, *FEBS Letters*, 416:329-334 (1997); Degli-Esposti *et al.*, *J. Exp. Med.*, 186:1165-1170 (1997); e

Mongkolsapaya *et al.*, *J. Immunol.*, 160:3-6 (1998)); DCR2 (também chamado de TRUNDD ou TRAIL-R4) (Marsters *et al.*, *Curr._Biol.*, 7:1003-1006 (1997); Pan *et al.*, *FEBS Letters*, 424:41-45 (1998); Degli-Esposti *et al.*, *Immunity*, 7:813-820 (1997)), e OPG [Simonet *et al.*, acima]. Em contraste com DR4 e DR5, os receptores DcR1 e DcR2 não sinalizam apoptose.

Certos anticorpos que se ligam aos receptores DR4 e/ou DR5 foram relatados na literatura. Por exemplo, anticorpos anti-DR4 dirigidos ao receptor DR4 e tendo atividade agonística ou apoptótica em certas células de mamíferos estão descritos em, por exemplo, documento WO 99/37684 publicado em 29 de julho de 1999; documento WO 00/73349 publicado em 12 de julho de 2000; documento WO 03/066661 publicado em 14 de agosto de 2003. Ver, também, por exemplo, Griffith *et al.*, *J. Immunol.*, 162:2597-2605 (1999); Chuntharapai *et al.*, *J. Immunol.*, 166:4891-4898 (2001); documento WO 02/097033 publicado em 2 de dezembro de 2002; documento WO 03/042367 publicado em 22 de maio de 2003; documento W0 03/038043 publicado em 8 de maio de 2003; documento W0 03/037913 publicado em 8 de maio de 2003. Certos anticorpos anti-DR5 foram da mesma forma descritos, ver, por exemplo, documento WO 98/51793 publicado em 8 de novembro de 1998; Griffith *et al.*, *J. Immunol.*, 162:2597-2605 (1999); Ichikawa *et al.*, *Nature Med.*, 7:954-960 (2001); Hylander *et al.*, "An Antibody to DR5 (TRAIL-Receptor 2) Suppresses the Growth of Patient Derived Gastrointestinal Tumors Grown in SCID mice", Resumo, 2º Congresso Internacional em Anticorpos Monoclonais em Câncer, 29 de agosto a 1 de setembro de 2002, Banff, Alberta, Canada; documento W0 03/038043 publicado em 8 de maio de 2003; documento W0 03/037913 publicado em 8 de maio de 2003; pedido de patente US 2003/01800296 publicada em 5 de setembro de 2003. Além disso, certos anticorpos que possuem interatividade a ambos os receptores DR4 e DR5 foram descritos (ver, por exemplo, patente US 6.252.050 emitida em 26

de junho de 2001).

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção divulgada no presente pedido fornece métodos e testes que examinam a expressão de um ou mais biomarcadores em uma amostra de célula ou tecido de mamífero, em que a expressão de um ou mais de tais biomarcadores é preditiva da amostra de célula ou tecido ser sensível a agentes tais como Apo2l/TRAIL ou anticorpos agonistas de anti-DR5. Em várias realizações da invenção, os métodos e testes examinam a expressão de moléculas na família de proteínas GalNac-T, em particular GalNac-T14 ou GalNac-T3.

Como discutido acima, a maioria dos tipos celulares humanos normais parecem ser resistentes à indução de apoptose por certas formas recombinantes de Apo2L/TRAIL (Ashkenazi *et al.*, acima; Walzcak *et al.*, acima). Foi também observado que algumas populações de tipos celulares humanos doentes (tais como certas populações de células cancerígenas) são resistentes à indução de apoptose por certas formas recombinantes de Apo2L/TRAIL (Ashkenazi *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 1999, acima; Walzcak *et al.*, *Nature Med.*, 1999, acima). Conseqüentemente, pelo exame de uma amostra de tecido ou célula de mamífero para expressão de biomarcadores selecionados por um ensaio, pode-se convenientemente e de forma eficiente obter informações úteis na avaliação de terapias apropriadas ou eficazes para tratar pacientes. Por exemplo, a informação obtida a partir de um teste para detectar a expressão de GalNac-T14 em uma amostra de tecido ou célula de mamífero pode fornecer aos técnicos no assunto dados úteis que podem ser usados para determinar um regime terapêutico ótimo (usando Apo2l/TRAIL ou anticorpos agonistas de receptores de morte) para pacientes que sofrem de uma disfunção tal como câncer ou doença imune relacionada, tal como uma disfunção auto-imune.

A presente invenção fornece métodos para prever a sensibilidade de uma amostra de célula ou tecido de mamífero (tal como uma célula cancerígena) para Apo2l/TRAIL e/ou anticorpo agonista de receptor de morte. Em certas realizações, os métodos compreendem obter uma amostra de tecido ou célula de mamífero e o exame do tecido ou célula para a expressão de GalNac-T14. Estes métodos podem ser conduzidos em uma variedade de formatos de testes, incluindo testes que detectam mRNA e/ou expressão de proteína, testes de atividade enzimática e outros discutidos no presente. A determinação da expressão de GalNac-T14 em ditos tecidos ou células serão preditivos de forma que tecidos ou células serão sensíveis à atividade que induz apoptose do Apo2l/TRAIL e/ou anticorpo receptor de morte. Em realizações opcionais, os tecidos ou células podem também ser examinados para expressão de receptores DR4, DR5, DcR1 ou DcR2.

Métodos adicionais da invenção incluem métodos de indução de apoptose em uma amostra de célula ou tecido de mamífero, que compreende etapas de obtenção de uma amostra de célula ou tecido de mamífero, examinando a célula ou tecido para a expressão de GalNac-T14, e sob determinação de se dita amostra de célula ou tecido expressar GalNac-T14, expondo dita amostra de célula ou tecido a uma quantidade eficaz de Apo2L/TRAIL ou anticorpo agonista de receptor de morte. Estas etapas nos métodos para examinar a expressão de GalNac-T14 podem ser conduzidas em uma variedade de formatos de testes, incluindo testes que detectam mRNA e/ou expressão de proteína, atividade enzimática e outros discutidos no presente. Em realizações opcionais, os métodos também compreendem examinar a amostra de célula ou tecido para expressão de receptores DR4, DR5, DcR1 ou DcR2. Opcionalmente, a amostra de célula ou tecido compreende tecido ou células cancerígeno. Opcionalmente, a amostra de tecido ou célula cancerígeno compreende células de câncer de pulmão de

célula não pequena, células de câncer de mama ou células de linfoma não-Hodgkin.

Ainda métodos adicionais da invenção incluem métodos de tratamento de uma disfunção em um mamífero, tal como uma disfunção imune relacionada ou câncer, que compreende etapas de obtenção de uma amostra de tecido ou de célula de mamífero, exame do tecido ou célula para a expressão de GalNac-T14, e sob determinação de dita amostra de tecido ou célula que expressa GalNac-T14, administração de uma quantidade eficaz de Apo2L/TRAIL ou anticorpo agonista de receptor de morte para dito mamífero.

Estas etapas nos métodos para exame da expressão de um ou mais biomarcadores podem ser conduzidas em uma variedade de formatos de testes, incluindo testes que detectam mRNA e/ou expressão de proteína, atividade enzimática e outros discutidos no presente pedido. Em realizações opcionais, os métodos também compreendem o exame da amostra de célula ou tecido para a expressão de receptores DR4, DR5, DcR1 ou DcR2. Opcionalmente, os métodos compreendem tratar câncer em um mamífero. Opcionalmente, os métodos compreendem, além da administração de uma quantidade eficaz de Apo2L/TRAIL e/ou anticorpo agonista de receptor de morte, administrar agente(s) quimioterápico(s) ou radioterapia para dito mamífero.

Em realizações adicionais da invenção, os métodos acima mencionados podem compreender o exame de células ou tecidos de mamíferos para expressão de outras moléculas GalNacT, tal como GalNac-T3.

Ainda realizações adicionais são ilustradas a título de exemplo nas seguintes reivindicações:

1. Método para prever a sensibilidade de uma amostra de célula ou tecido de mamífero para Apo2L/TRAIL, que compreende etapas de:

obtenção de uma amostra de célula ou tecido de mamífero;

exame da amostra de célula ou tecido para detectar expressão de GalNac-T14, em que a expressão de dito GalNac-T14 é preditiva de que dita amostra de célula ou tecido é sensível à atividade de indução de apoptose de Apo2L/TRAIL.

5 2. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que dita expressão de GalNac-T14 é examinada pela detecção da expressão de mRNA de GalNac-T14.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que dita expressão de GalNac-T14 é examinada por imunohistoquímica.

10 4. Método, de acordo com a reivindicação 1, que compreende a etapa de exame da expressão dos receptores DR4, DR5, DcR1 ou DcR2 em dita amostra de célula ou tecido.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a amostra de célula ou tecido compreende células ou tecidos cancerígenos.

15 6. Método, de acordo com a reivindicação 5, em que ditas células cancerígenas são pancreáticas, linfoma, ou células ou tecidos de câncer de pulmão de célula não pequena.

7. Método para induzir apoptose em uma amostra de célula ou tecido de mamífero, que compreende as etapas de:

20 obtenção de uma amostra de célula ou tecido de mamífero;
exame da amostra de célula ou tecido para detectar expressão de GalNac-T14, e subsequente à detecção da expressão de dito GalNac-T14, exposição da dita amostra de célula ou tecido a uma quantidade eficaz do Apo2L/TRAIL.

25 8. Método, de acordo com a reivindicação 7, em que dita expressão de GalNac-T14 é examinada para expressão de mRNA de GalNac-T14.

9. Método, de acordo com a reivindicação 7, em que dita

expressão de GalNac-T14 é examinada por imunohistoquímica.

10. Método, de acordo com a reivindicação 7, que compreende adicionalmente a etapa de exame da expressão dos receptores DR4, DR5, DcR1 ou DcR2 em dita amostra de célula ou tecido.

5 11. Método, de acordo com a reivindicação 7, em que a amostra de célula ou tecido compreende células ou tecidos cancerígenos.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, em que ditas células cancerígenas são pancreáticas, de linfoma, ou células ou tecidos de câncer de pulmão de célula não pequena.

10 13. Método, de acordo com a reivindicação 7, em que ditas células são expostas a uma quantidade eficaz de polipeptídeo Apo2L/TRAIL que compreende os aminoácidos 114-281 da Figura 1.

14. Método de tratamento de uma disfunção em um mamífero, tal como uma disfunção imune relacionada ou câncer, que compreende as etapas de:

obtenção de uma amostra de célula ou tecido de dito mamífero;

exame da amostra de célula ou tecido para detectar expressão de GalNac-T14, e

subseqüente à detecção da expressão de dito GalNac-T14, administração a dito mamífero uma quantidade eficaz de Apo2L/TRAIL.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, em que dita expressão de GalNac-T14 é examinada pela detecção da expressão de mRNA de GalNac-T14. ,

16. Método, de acordo com a reivindicação 14, em que dita expressão de GalNac-T14 é examinada por imunohistoquímica.

17. Método, de acordo com a reivindicação 14, que também compreende a etapa de exame da expressão dos receptores DR4, DR5, DcR1 ou DcR2 em dito de tecido ou célula.

18. Método, de acordo com a reivindicação 14, em que a amostra de célula ou tecido compreende células ou tecidos cancerígenos.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, em que ditas células ou tecidos cancerígenos compreendem células ou tecidos pancreáticas, linfoma, ou células ou tecidos de câncer de pulmão de célula não
5 pequena.

20. Método, de acordo com a reivindicação 14, em que uma quantidade eficaz de polipeptídeo Apo2L/TRAIL que compreende os aminoácidos 114-281 da Figura 1 é administrada a dito mamífero.

10 21. Método, de acordo com a reivindicação 14, em que um agente(s) quimioterápico(s) ou radioterapia é também administrado a dito mamífero.

22. Método, de acordo com a reivindicação 14, em que uma citocina, agente citotóxicos ou agente inibitório do crescimento é também
15 administrada a dito mamífero.

23. Método, de acordo com a reivindicação 7, em que dito polipeptídeo Apo2L/TRAIL está ligado a uma molécula de polietilenoglicol.

24. Método, de acordo com a reivindicação 14, em que dito polipeptídeo Apo2L/TRAIL está ligado a uma molécula de polietilenoglicol.

20 25. Método para prever a sensibilidade de uma amostra de célula ou tecido de mamífero para anticorpos de receptores de morte, que compreende as etapas de:

obtenção de uma amostra de célula ou tecido de mamífero;

exame da amostra de célula ou tecido para detectar expressão de
25 GalNac-T14 em que a expressão de dito GalNac-T14 é preditiva de que dita amostra de célula ou tecido é sensível à atividade de indução de apoptose dos anticorpos de receptores de morte.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, em que dita

expressão de GalNac-T14 é examinada pela detecção da expressão de mRNA de GalNac-T14.

27. Método, de acordo com a reivindicação 25, em que dita expressão de GalNac-T14 é examinada por imunohistoquímica.

5 28. Método, de acordo com a reivindicação 25, que compreende a etapa de exame da expressão dos receptores DR4, DR5, DcR1 ou DcR2 em dita amostra de célula ou tecido.

29. Método, de acordo com a reivindicação 25, em que a amostra de célula ou tecido compreende células ou tecidos cancerígenos.

10 30. Método, de acordo com a reivindicação 29, em que ditas células cancerígenas são pancreáticas, de linfoma, ou células ou tecidos de câncer de pulmão de célula não pequena.

31. Método, de acordo com a reivindicação 25, em que ditos anticorpos receptores de morte são anticorpos agonistas de anti-DR4 ou anti-
15 DR5.

32. Método para induzir apoptose em uma amostra de célula ou tecido de mamífero que compreende as etapas de:

obtenção de uma amostra de célula ou tecido de mamífero;

20 exame de uma amostra de célula ou tecido para detectar expressão de GalNac-T14, e

subseqüente à detecção da expressão de dito GalNac-T14, exposição da dita amostra de célula ou tecido a uma quantidade eficaz do anticorpo de receptor de morte.

33. Método, de acordo com a reivindicação 32, em que dita
25 expressão de GalNac-T14 é examinada pelo teste para expressão de mRNA de GalNac-T14.

34. Método, de acordo com a reivindicação 32, em que dita expressão de GalNac-T14 é examinada por imunohistoquímica.

35. Método, de acordo com a reivindicação 32, que também compreende a etapa de exame da expressão dos receptores DR4, DR5, DcR1 ou DcR2 em dita amostra de célula ou tecido.

36. Método, de acordo com a reivindicação 32, em que dita amostra de célula ou tecido compreende células ou tecidos cancerígenos.

37. Método, de acordo com a reivindicação 36, em que ditas células cancerígenas são pancreáticas, de linfoma, ou células ou tecidos de câncer de pulmão de célula não pequena.

38. Método, de acordo com a reivindicação 32, em que ditas células são expostas a uma quantidade eficaz de anticorpo agonista de DR4 ou DR5.

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, em que ditas células são expostas a uma quantidade eficaz de anticorpo agonista de DR5 que se liga ao receptor DR5 mostrado na Figura 3A.

40. Método de tratamento de uma disfunção em um mamífero, tal como uma disfunção imune relacionada ou câncer, que compreende as etapas de:

obtenção de uma amostra de célula ou tecido de dito mamífero; exame de uma amostra de célula ou tecido para detectar expressão de GalNac-T14, e

subseqüente à detecção da expressão de dita GalNac-T14, administração a dito mamífero de uma quantidade eficaz de anticorpo de receptor de morte.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40, em que dita expressão de GalNac-T14 é examinada pela detecção da expressão de mRNA de GalNac-T14.

42. Método, de acordo com a reivindicação 40, em que dita expressão de GalNac-T14 é examinada por imunohistoquímica.

43. Método, de acordo com a reivindicação 40, que também compreende a etapa de exame da expressão dos receptores DR4, DR5, DcR1 ou DcR2 em dito tecido ou célula.

44. Método, de acordo com a reivindicação 40, em que a amostra
5 de célula ou tecido compreende células ou tecidos cancerígenos.

45. Método, de acordo com a reivindicação 44, em que ditas células ou tecidos cancerígenos compreendem células ou tecidos pancreáticos, linfoma, ou células ou tecidos de câncer de pulmão de célula não pequena.

10 46. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 40, em que uma quantidade eficaz de anticorpo anti-DR4 ou DR5 é administrada a dito mamífero.

47. Método, de acordo com a reivindicação 40, em que um agente(s) quimioterápico(s) ou radioterapia é também administrada a dito
15 mamífero.

48. Método, de acordo com a reivindicação 40, em que uma citocina, agente citotóxico ou agente inibitório do crescimento é também administrado a dito mamífero.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

20 Figura 1 mostra a sequência de nucleotídeo do cDNA ligante de Apo-2 humano (SEQ ID NO:2) e sua sequência derivada de aminoácido (SEQ ID NO:1). O "N" na posição do nucleotídeo 447 é usado para indicar que a base de nucleotídeo pode ser uma "T" ou "G".

Figura 2A e 2B mostra a sequência de nucleotídeo do cDNA
25 (SEQ ID NO:4) para DR4 humano de comprimento total e sua sequência de aminoácido derivada (SEQ ID NO:3). As respectivas sequências de nucleotídeo e aminoácido para DR4 estão também reportadas em Pan *et al.*, *Science*, 276:111 (1997).

Figura 3A mostra a sequência de aminoácido 411 (SEQ ID NO:5) de DR5 humano como publicado no documento WO 98/51793 em 19 de novembro de 1998. Uma variante unida por transcrição do DR5 humano é conhecida na técnica. Esta variante de junção DR5 codifica a sequência de 440 aminoácidos (SEQ ID NO:6) de DR5 humano mostrada nas Figuras 3B e 3C como publicado no documento WO 98/35986 em 20 de agosto de 1998.

Figura 3D mostra as sequências de nucleotídeo do cDNA (SEQ ID NO:7) para DcR1 humano de comprimento total e sua sequência de aminoácido derivada (SEQ ID NO:8). As respectivas sequências de nucleotídeo e aminoácido para DcR1 humano (e domínios específicos deste) estão também mostradas e descritas no documento WO 98/58062.

Figura 3E mostra as sequências de nucleotídeo do cDNA (SEQ ID NO:9) para DcR2 humano de comprimento total e sua sequência de aminoácido derivada (SEQ ID NO:10). As respectivas sequências de nucleotídeo e aminoácido para DcR2 humano (e domínios específicos deste) estão também mostradas no documento WO 99/10484.

Figura 4A mostra a sequência de nucleotídeo de GalNac-T14 humana (SEQ ID NO:11) e sua sequência de aminoácido derivada (SEQ ID NO:12). Estas sequências estão também descritas em Wang *et al.*, BBRC, 300:738-744 (2003).

Figura 4B mostra a sequência de nucleotídeo de GalNac-T3 humana (SEQ ID NO:13) e sua sequência de aminoácido derivada (SEQ ID NO:14). Estas sequências estão também descritas em Bennett *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:17006-17012 (1996).

Figura 5 fornece uma tabela sumária IC50 dos dados obtidos na análise de linhagens celulares de câncer de pulmão de célula não pequena ("NSCLC") para sensibilidade ou resistência à atividade apoptótica de Apo2L (+ 0,5% de soro fetal bovino "FBS" ou 10% de FBS) ou anticorpo monoclonal DR5

“DR5 ab”, “XL” interligado ou não interligado, (+ 0,5% de soro fetal bovino “FBS” ou 10% de FBS) como medido nos testes de citotoxicidade MTT.

Figura 6 fornece uma tabela sumária IC₅₀ dos dados obtidos na análise de linhagens celulares de câncer pancreático para sensibilidade ou resistência à atividade apoptótica de Apo2L (+ 0,5% de soro fetal bovino “FBS” ou 10% de FBS) ou anticorpo monoclonal DR5 “DR5 ab”, “XL” interligado ou não interligado, (+ 0,5% de soro fetal bovino “FBS” ou 10% de FBS) como medido nos testes de citotoxicidade MTT.

Figura 7 fornece uma tabela sumária IC₅₀ dos dados obtidos na análise de linhagens celulares de câncer de linfoma não-Hodgkin (“NHL”) para sensibilidade ou resistência à atividade apoptótica de Apo2L (+ 10% de soro fetal bovino “FBS”) ou anticorpo monoclonal DR5 “DR5 ab”, “XL” interligado ou não interligado, (+ 10% de soro fetal bovino “FBS”) como medido nos testes de citotoxicidade MTT.

Figura 8 fornece uma comparação de sensibilidade (“sen”) ou resistência (“RES”) de NSCLC selecionada, pancreático, e linhagens celulares de câncer NHL para anticorpo DR5 e a correlação para expressão de GalNac-T14, como medido pela expressão de mRNA de GalNac-T14.

Figura 9 fornece um gráfico de diagrama de barra de várias NSCLC, pancreático, e linhagens celulares NHL classificadas (em ordem decrescente) pelos níveis de padrões de expressão de mRNA de GalNac-T14.

Figura 10A-D ilustra expressão diferencial das enzimas de O-glicosilação específicas em linhagens celulares cancerígenas resistentes e sensíveis ao Apo2L/TRAIL: (A) A viabilidade celular foi medida após incubação com doses variáveis do Apo2L/TRAIL. IC₅₀ para cada linhagem celular foi computado como a concentração do Apo2L/TRAIL que fornece 50% de perda de viabilidade. Cada experimento de viabilidade celular foi repetido pelo menos três vezes na presença baixa (0,5%) e alta (10%) de soro fetal bovino. Preto,

cinza ou símbolos abertos descrevem as linhagens celulares são altamente sensíveis, moderadamente sensíveis ou resistentes ao Apo2L/TRAIL, respectivamente. (B) os níveis de expressão do mRNA de ppGalNAcT-14 mRNA (sonda fixa 219271_at) em linhagens celulares de melanoma maligno e pancreático. Linhagens celulares estão dispostas por tipo de tecido e sensibilidade ao Apo2L/TRAIL. Preta, cinza ou barras abertas descrevem linhagens celulares como em A. (C) níveis de expressão do mRNA de Fut-6 (painel superior, sonda fixa 211885_x_at) e ppGalNAcT-3 (painel inferior, sonda fixa 203397_s_at) em linhagens celulares de câncer colorretal. Linhagens celulares estão dispostas em B. As válvulas P nos painéis B e C são baseadas em um teste de Fisher da correlação entre a sensibilidade da linhagem celular (incluindo alta e moderada) e expressão de mRNA isolado acima. (D) Efeito de Apo2L/TRAIL no crescimento de xenoinxertos de tumor estabelecido. Camundongos atímicos nude que carregam tumores GalNAcT-3/Fut-6-positivo (painel esquerdo) ou GalNAcT-3/Fut-6-negativo (painel direito) receberam veículo ou Apo2L/TRAIL (60 mg/kg/dia i.p. nos dias 0–4) e o volume do tumor foi monitorado (média±SE, N=10 camundongos/grupo).

Figura 11 ilustra que a modulação de enzimas de O-glicosilação específicas altera a sensibilidade ao Apo2L/TRAIL. (A) Células Colo205 foram pré-incubadas com todo inibidor de enzima O-glicosilação benzil-GalNAc (bGalNAc), tratadas com Apo2L/TRAIL por 24 h, e a viabilidade celular foi determinada (DMSO=veículo controle). (B) PSN-1 (carcinoma pancreático) e células Hs294T (melanoma) foram transfectadas com caspase-8 ou ppGalNAcT-14 siRNAs por 48 h, incubadas com Apo2L/TRAIL por outras 24 h e a viabilidade celular foi determinada. siRNA dúplice em comparação a uma sequência não alvo (Dharmacon) foram usados como controle (NTC). (C) Células de carcinoma colorretal DLD-1 foram transfectadas com ppGalNAcT-3 ou Fut-6 por siRNAs e testadas como em B. (D) Células HEK293 foram co-

transfectadas com plasmídeos que codificam os genes em combinação com ppGalNAcT-14 ou vetor controle. Apoptose foi medida em 24 horas por coloração Anexina V (painel esquerdo). Células de melanoma H1569 foram transduzidas com retrovírus direcionando expressão de ppGalNAcT-14 ou retrovírus controle; os *pools* de linhagem celular resultantes foram tratados Apo2L/TRAIL por 24 h e a viabilidade celular foi determinada (painel direito). Análise Western blot usando anticorpos anti-FLAG foi usada para verificar expressão do epítipo unido (*tagged*) ppGalNAcT-14.

Figura 12 ilustra (A) Análise da cascata de caspase induzida pelo Apo2L/TRAIL. Células PSN-1 e DLD-1 foram transfectadas com siRNAs contra ppGalNAcT-14 ou Fut-6, respectivamente, por 48 h. As células foram tratadas com Apo2L/TRAIL por 4 ou 8 h, e as células lisadas foram analisadas por imunoblot com anticorpos específicos para caspase caspase-8, Bid, caspase-9, caspase-3, ou actina como um controle de carga. (B) Células PSN-1 foram transfectadas com ppGalNAcT-14 siRNA como em A, tratado com Apo2L/TRAIL por 4 h, e a atividade enzimática de caspase-3/7 nas células lisadas foi determinada. (C) Análises do Apo2L/TRAIL DISC. Células PSN-1 foram transfectadas com ppGalNAcT-14 siRNA como em A. FLAG-Apo2L/TRAIL (1 mg/ml) foi adicionado por 0–60 min, as células foram lisadas e submetidas à imunoprecipitação com um anticorpo anti-FLAG. FADD associado a DISC, caspase-8, DR4, foram detectados por imunoblot. (D) Células PSN-1 foram transfectadas, tratadas, e submetidas à imunoprecipitação DISC como em C, e atividade enzimática caspase-8 associada a DISC foi medida como previamente descrito (Sharp *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280:19401 (2005)).

Figura 13 ilustra (A) Análise de monossacarídeos do DR5 humano recombinante (variante de junção longa) produzida em células CHO c, realizada por HPAEC-PAD (cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada). (B) Comparação de sequência de

receptores Apo2L/TRAIL humanos ("hDR5L" forma de 440 aa longa DR5 humano, "hDR5S" forma de 411 aa curta DR5 humano e hDR4), DR5 murina (mDR5), Fas humano (hFas) e TNFR1 humano (hTNFR1). As caixas indicam supostos sítios de O-glicosilação. (C) Análise imunoblot do total de células lisadas que correspondem a D. DR5L-5T e DR5S-5T são construções contendo 5 substituições de treonina a alanina e DR5L-5T3S e DR5S-5T3S são construções contendo 5 substituições de treonina a alanina e três de serina a alanina, respectivamente, em resíduos que são sítios potenciais de O-glicosilação. (D) Células HEK293 foram co-transfectadas com construções DR5 indicadas junto com vetor ou plasmídeo ppGalNAcT-14 por 48 h e a apoptose foi medida por coloração Anexina V. (E) Níveis de expressão para mRNA para ppGalNAcT-14 (chip Affymetrix, sonda fixa 219271_at) em amostras de tumor humano primário de cânceres de pele (SCC=carcinoma celular escamoso), pulmão, pâncreas (Panc), mama, ovário (Ov), endométrio (Endo), bexiga (Bla, TCC= carcinoma celular transicional) e NHL (FL=linfoma folicular, DLBCL=linfoma de célula B grande difuso). A expressão média de amostras está indicada por uma barra cinza horizontal para cada classe. Um corte de 500 e 200 (melanoma) que correspondem aos dados da linhagem celular da Figura 10B é mostrado.

Figura 14 ilustra (A) Redução na expressão de mRNA de ppGalNAcT-14 ou ppGalNAcT-3 em células PSN-1 ou DLD-1 após 48h siRNA *knockdown* por análise Taqman. (B) Expressão de GalNAcT-14 é reconstituída em células PSN-1 por transfecção do plasmídeo vazio (*Empty*), tipo selvagem GalNAcT-14 (GalNAcT-14) ou GalNAcT-14 contendo mutações silenciosas siRNA (GalNAcT-14 si(1)Mut) subsequente a siGalNAcT-14 (1) mediou *knockdown* de ppGalNAcT-14. (C) Regulação para baixo de ppGalNAcT-3 ou Fut-6 por interferência de RNAs inibe morte celular induzida por Apo2L/TRAIL em células C170 (câncer coloretal). Procedimentos experimentais como em

11C. (Tabela 1) A) Tabela sumária de fenótipos siRNA *knockdown*. Linhagens celulares, nas quais a regulação para baixo de GalNAcT-14 ou ppGalNAcT-3 e Fut-6 resultou na proteção de Apo2L/TRAIL, estão marcados indicando menos (+) ou mais que 50% (++) de proteção com pelo menos um oligonucleotídeo siRNA testado. (0) indica a ausência de proteção contra Apo2L/TRAIL. (D),(E) Subseqüente a 48h *knockdown* com os siRNAs indicados, as células foram tratadas com doses aumentadas de etoposide ou estaurosporina (STS) por 24h e sujeitos a um teste de viabilidade celular. (F) ppGalNAcT-14 retroviral que superexpressa *pools* de linhagens celulares PA-TU-8902 e PL-45 foram submetidas a testes de viabilidade celular após tratamento com Apo2L/TRAIL. Análise Western blot usando anticorpos anti-FLAG indica ppGalNAcT-14 retroviral expressado nestas células.

Figura 15 (A) Análise Western blot do Apo2L/TRAIL induziu cascata de ativação de caspase em Apo2L/TRAIL sensível a Colo205 e linhagens celulares de câncer colorretal resistentes, RKO e SW1417. As células foram tratadas com 1000 ng/ml de Apo2L/TRAIL por 8 e 24h e o total de lisado celular foi sujeito a análise western blot usando anticorpos específicos para caspase-8, Bid, caspase-9, caspase-3 e actina como um controle de carga. (B) *Knockdown* de Fut-6 reduziu o recrutamento e ativação de caspase-8 no Apo2L/TRAIL DISC nas células DLD-1. Procedimentos experimentais conforme 12D. (C) A expressão de superfície celular de DR4 e DR5 foi medida por análise FACS em células que foram submetidas a um siRNA *knockdown* com os genes indicados.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

As técnicas e procedimentos descritos ou com referência no presente pedido são geralmente bem conhecidos e comumente empregados usando-se metodologia convencional pelos técnicos no assunto, tais como, por exemplo, as metodologias de clonagem molecular amplamente utilizadas

descritas em Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2^a.
edição (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
Como apropriado, os procedimentos que envolvem o uso de kits e reagentes
comercialmente disponíveis são geralmente realizados de acordo com os
5 protocolos e/ou parâmetros definidos pelo fabricante a menos que apontado de
outra forma.

Antes dos métodos presentes e testes da presente invenção,
deve ser entendido que esta invenção não está limitada à metodologia
específica, e protocolos, linhagens celulares, espécies ou gêneros de animais,
10 construções e reagentes como descritos, podem, é claro, variar. Deve ser
entendido que a terminologia usada no presente pedido é para os propósitos
de descrever somente realizações específicas, e não tem a intenção de limitar
o escopo da presente invenção que será limitada somente pelas reivindicações
anexas.

15 Deve ser apontado que como usado no presente e nas
reivindicações anexas, as formas singulares “um”, “e”, e “o/a” incluem os
referentes plurais, a menos que o contexto dite claramente de outra forma.
Dessa forma, por exemplo, referindo-se a “uma alteração genética” inclui uma
pluralidade de tais alterações e referindo-se a “uma sonda” inclui referências a
20 uma ou mais sondas e equivalentes destas conhecidas pelos técnicos no
assunto e adiante.

Todas as publicações mencionadas no presente estão
incorporadas no presente pedido como referência para a divulgação e
descrevem os métodos e/ou materiais em conexão com os quais as
25 publicações estão citadas. As publicações citadas no presente pedido são
citadas para suas divulgações anteriores para a data de depósito do presente
pedido. Nada aqui é para ser construído como uma admissão de que os
inventores não são intitulado para preceder as publicações em virtude de uma

data de prioridade anterior ou data anterior da invenção. Além disso, as datas de publicação atuais podem ser diferentes daquelas mostradas e requerem verificação independente.

I. DEFINIÇÕES

5 Os termos "Apo2L/TRAIL", "Apo-2L", e "TRAIL" são usados no presente para referir-se a uma sequência de polipeptídeo que inclui resíduos de aminoácidos 114-281, incluído, 95-281, incluído, resíduos 92-281, incluído, resíduos 91-281, incluído, resíduos 41-281, incluído, resíduos 15-281, incluído, ou resíduos 1-281, incluído, da sequência de aminoácido mostrado na Figura 1, assim como fragmentos ativos biologicamente, variantes deletoriais, insercionais, ou substitucionais das sequências acima. Em uma realização, a sequência de polipeptídeo compreende resíduos 114-281 da Figura 1, e opcionalmente, consiste de resíduos 114-281 da Figura 1. Opcionalmente, a sequência de polipeptídeo compreende resíduos 92-281 ou resíduos 91-281 da Figura 1. Os polipeptídeos Apo-2L, podem ser codificados pela sequência de nucleotídeo nativa mostrada na Figura 1. Opcionalmente, o códon que codifica resíduo Pro119 (Figura 1) pode ser "CCT" ou "CCG". Em outras realizações, os fragmentos ou variantes são biologicamente ativos e têm pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácido, mais preferivelmente pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência, e até mais preferivelmente, pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade de sequência com qualquer uma das sequências Apo2L/TRAIL citadas acima. Opcionalmente, o polipeptídeo Apo2L/TRAIL é codificado por uma sequência de nucleotídeo que hibridiza sob condições de estricência com a sequência de polinucleotídeo de codificação fornecida na Figura 1. A definição engloba variantes substitucionais do Apo-2L/TRAIL em que pelo menos um destes aminoácidos nativos são substituídos por um resíduo alanina. Variantes substitucionais específicas do Apo-2L/TRAIL incluem aquelas na qual pelo menos um destes aminoácidos é

substituído por um resíduo alanina. Estas variantes substitucionais incluída aquelas identificadas, por exemplo, como “D203A”; “D218A” e “D269A.” Esta nomenclatura é usada para identificar variantes Apo2L/TRAIL nas quais os resíduos de ácido aspártico nas posições 203, 218, e/ou 269 (usando a
5 numeração mostrada na Figura 1) são substituídos por resíduos alanina. Opcionalmente, os Apo2L variantes podem compreender uma ou mais das substituições alanina que são citadas na Tabela I do pedido PCT publicado no documento WO 01/00832. Variantes substitucionais incluem uma ou mais substituições do resíduo identificado na Tabela I do documento WO/00832
10 publicado em 04 de janeiro de 2001. A definição também engloba uma sequência nativa Apo2L/TRAIL isolada de uma fonte Apo2L/TRAIL ou preparado por métodos recombinantes ou sintéticos. O Apo2L/TRAIL da invenção inclui os polipeptídeos referidos como Apo2L/TRAIL ou TRAIL revelados na Publicação PCT documento WO97/01633 e documento
15 WO97/25428. Os termos “Apo2L/TRAIL” ou “Apo2L” são usados para se referir geralmente a formas do Apo2L/TRAIL que incluem monômeros, dímeros ou trímeros do polipeptídeo. Toda numeração de resíduos de aminoácidos referida na sequência Apo2L usa a numeração de acordo com a Figura 1, a menos que especificamente declarado de outra forma. Por exemplo, “D203”
20 ou “Asp203” refere-se ao resíduo de ácido aspártico na posição 203 na sequência fornecida na Figura 1.

O termo “domínio extracelular Apo2L/TRAIL” ou “Apo2L/TRAIL ECD” refere-se a uma forma do Apo2L/TRAIL que é essencialmente livre de domínios transmembrana e citoplasmáticos. Geralmente, o ECD terá menos
25 que 1% de tais domínios de transmembrana e citoplasmático, e preferivelmente, terão menos que 0,5% de tais domínios. Será entendido que qualquer domínio(s) de transmembrana identificado(s) para os polipeptídeos da presente invenção são identificados de acordo com critérios rotineiramente

empregados na técnica para identificação desse tipo de domínio hidrofóbico. Os limites exatos de um domínio de transmembrana podem variar, mas mais provavelmente por não mais que cerca de 5 aminoácidos tanto no final do domínio como inicialmente identificados. Em realizações preferidas, o ECD irá
5 consistir de uma sequência de domínio extracelular solúvel do polipeptídeo que é livre da transmembrana e domínios citoplásmicos ou intracelulares (e não é ligado à membrana). Sequências específicas de domínio extracelular de Apo-2L/TRAIL estão descritas em Publicações PCT documento WO 97/01633 e documento WO 97/25428.

10 O termo “monômero Apo2L/TRAIL” ou “monômero Apo2L” refere-se a uma cadeia covalente de uma sequência de domínio extracelular de Apo2L.

O termo “dímero Apo2L/TRAIL” ou “dímero Apo2L” refere-se a dois monômeros Apo-2L unidos numa ligação covalente via ligação bissulfeto.
15 O termo como usado no presente pedido inclui dímeros Apo2L livres e dímeros Apo2L que estão contidos em formas triméricas de Apo2L (isto é, associado com outro, terceiro monômero Apo2L).

O termo “trímero Apo2L/TRAIL” ou “trímero Apo2L” refere-se a três monômeros Apo2L que estão associados não covalentemente.

20 O termo “agregado Apo2L/TRAIL” é usado para se referir a formas oligoméricas mais altas auto-associadas de Apo2L/TRAIL, tal como Apo2L/TRAIL trímeros, que formam, por exemplo, formas hexaméricas e nanoméricas de Apo2L/TRAIL. A determinação da presença e quantificação do monômero Apo2L/TRAIL, dímero ou trímeros (ou outros agregados) pode
25 ser feita usando-se métodos e testes conhecidos na técnica (e usando-se materiais disponíveis comercialmente), tal como exclusão por tamanho nativo HPLC (“SEC”), desnaturação de exclusão por tamanho usando-se dodecil sulfato de sódio (“SDS-SEC”), HPLC de fase reversa e eletroforese capilar.

“Receptor do ligante Apo-2” inclui os receptores referidos na técnica como “DR4” e “DR5” cujo polinucleotídeo e sequências de polipeptídeos estão mostrados nas Figuras 2 e 3 respectivamente. Pan *et al.* descreveram o membro da família do receptor TNF referido como “DR4” (Pan *et al.*, *Science*, 276:111-113 (1997); ver também documento WO 98/32856 publicado em 30 de julho de 1998; documento WO 99/37684 publicado em 29 de julho de 1999; documento WO 00/73349 publicado em 7 de dezembro de 2000; patente US 6.433.147 depositada em 13 de agosto de 2002; patente US 6.461.823 emitida em outubro de 2002, e patente US 6.342.383 emitida em 9 de janeiro de 2002). Sheridan *et al.*, *Science*, 277:818-821 (1997) e Pan *et al.*, *Science*, 277:815-818 (1997) descreveram outro receptor para Apo2L/TRAIL (ver também, documento WO 98/51793 publicado em 19 de novembro de 1998; documento WO 98/41629 publicado em 24 de setembro de 1998). Este receptor é referido como DR5 (o receptor também foi alternativamente referido como Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 ou KILLER; Screaton *et al.*, *Curr._Biol.*, 7:693-696 (1997); Walczak *et al.*, *EMBO J.*, 16:5386-5387 (1997); Wu *et al.*, *Nature Genetics*, 17:141-143 (1997); documento WO 98/35986 publicado em 20 de agosto de 1998; EP870,827 publicado em 14 de outubro de 1998; documento WO 98/46643 publicado em 22 de outubro de 1998; documento WO 99/02653 publicado em 21 de janeiro de 1999; documento WO 99/09165 publicado em 25 de fevereiro de 1999; documento WO 99/11791 publicado em 11 de março de 1999; pedido de patente US 2002/0072091 publicada em 13 de agosto de 2002; pedido de patente US 2002/0098550 publicada em 7 de dezembro de 2001; patente US 6.313.269 depositada em 6 de dezembro de 2001; pedido de patente US 2001/0010924 publicada em 2 de agosto de 2001; pedido de patente US 2003/0125540 publicada em 3 de julho de 2003; pedido de patente US 2002/0160446 publicada em 31 de outubro de 2002, pedido de patente US 2002/0048785

publicada em 25 de abril de 2002; patente US 6.569.642 emitida em 27 de maio de 2003, patente US 6.072.047 emitida em 6 de junho de 2000, patente US 6.642.358 emitida em 4 de novembro de 2003). Como descrito acima, outros receptores para Apo-2L incluem DcR1, DcR2, e OPG (ver, Sheridan *et al.*, acima; Marsters *et al.*, acima; e Simonet *et al.*, acima). O termo "receptor Apo-2L" quando usado no presente pedido engloba receptor de sequência nativa e receptores variantes. Estes termos englobam receptor Apo-2L expressado em uma variedade de mamíferos, incluindo humanos. Receptor Apo-2L pode ser expresso de maneira endógena como ocorre naturalmente em uma variedade de linhagens de tecidos humanos, ou pode ser expresso por métodos recombinantes ou sintéticos. Um "receptor Apo-2L de sequência nativa" compreende um polipeptídeo que tem a mesma sequência de aminoácido de um receptor Apo-2L derivado da natureza. Dessa forma, um receptor Apo-2L de sequência nativa pode ter a sequência de aminoácido do receptor Apo-2L que ocorre naturalmente de qualquer mamífero. Tal receptor Apo-2L de sequência nativa pode ser isolado da natureza ou pode ser produzido por meios recombinantes ou sintéticos. O termo "receptor Apo-2L de sequência nativa" especificamente engloba formas retiradas ou secretadas do receptor que ocorrem naturalmente (por exemplo, uma forma solúvel que contém, por exemplo, uma sequência de domínio extracelular), formas variantes que ocorrem naturalmente (por exemplo, alternativamente formas unidas) e variantes alélicas que ocorrem naturalmente. Receptores variantes podem incluir fragmentos ou deleção de mutantes do receptor Apo-2L de sequência nativa. Figura 3A mostra a sequência de 411 aminoácidos de DR5 humano como publicado no documento WO 98/51793 em 19 de novembro de 1998. Uma variante unida por transcrição do DR5 humano é conhecida na técnica. Esta variante de união DR5 codifica a sequência de 440 aminoácidos de DR5 humano exibida nas Figuras 3B e 3C como publicado no documento

WO 98/35986 em 20 de agosto de 1998.

“Anticorpo de receptor de morte” é usado no presente pedido para geralmente referir-se ao anticorpo ou anticorpos direcionados a um receptor na superfamília do receptor do fator de necrose tumoral e que contém um domínio
5 de morte capaz de sinalizar apoptose, e tais anticorpos incluem anticorpo de DR5 e anticorpo de DR4.

“Anticorpo receptor de DR5”, “anticorpo de DR5”, ou “anticorpo anti-DR5” é usado em um amplo senso para referir-se aos anticorpos que se ligam a pelo menos uma forma de um receptor DR5, tal como a sequência 1-
10 411 mostrada nas Figuras 3A ou a sequência mostrada nas Figuras 3B-3C, ou domínio extracelular deste. Opcionalmente o anticorpo DR5 é fundido ou ligado a uma sequência ou molécula heteróloga. Preferivelmente a sequência heteróloga permite ou ajuda o anticorpo a formar complexos de ordem mais alta ou oligoméricos. Opcionalmente, o anticorpo DR5 liga-se ao receptor
15 DR5, mas não se liga ou interage com qualquer receptor Apo-2L adicional (por exemplo, DR4, DcR1, ou DcR2). Opcionalmente o anticorpo é um agonista da atividade de sinalização do DR5.

Opcionalmente, o anticorpo de DR5 da invenção liga-se a um receptor DR5 na faixa de concentração de aproximadamente 0,1 nM para
20 cerca de 20 mM como medida em um ensaio de ligação BIAcore. Opcionalmente, os anticorpos de DR5 da invenção exibem um valor IC50 de cerca de 0,6 nM para cerca de 18 mM como medido em um ensaio de ligação BIAcore.

“Anticorpo receptor de DR4”, “anticorpo de DR4”, ou “anticorpo
25 anti-DR4” é usado em um amplo senso para referir-se aos anticorpos que se ligam a pelo menos uma forma de um receptor DR4 ou domínio extracelular deste. Opcionalmente o anticorpo de DR4 é fundido ou ligado a uma sequência ou molécula heteróloga. Preferivelmente a sequência heteróloga

permite ou ajuda o anticorpo a formar complexos de ordem mais alta ou oligoméricos. Opcionalmente, o anticorpo de DR4 liga-se ao receptor DR4, mas não se liga ou interage com qualquer receptor Apo-2L adicional (por exemplo, DR5, DcR1, ou DcR2). Opcionalmente o anticorpo é um agonista da
5 atividade de sinalização de DR4.

Opcionalmente, o anticorpo de DR4 da invenção liga-se a um receptor DR4 na faixa de concentração de cerca de 0,1 nM para cerca de 20 mM como medida em um ensaio de ligação BIAcore. Opcionalmente, os anticorpos de DR4 da invenção exibem um valor IC₅₀ de cerca de 0,6 nM para
10 cerca de 18 mM, como medido em um ensaio de ligação BIAcore.

O termo "agonista" é usado no mais amplo senso, e inclui qualquer molécula que aumenta parcialmente ou completamente, estimula ou ativa uma ou mais atividades biológicas de Apo2L/TRAIL, DR4 ou DR5, *in vitro*, *in situ*, ou *in vivo*. Exemplos de tais atividades biológicas de ligação de
15 Apo2L/TRAIL para DR4 ou DR5, incluindo apoptose assim como aquelas mais adiante relatadas na literatura. Um agonista pode funcionar de uma maneira direta ou indireta. Por exemplo, o agonista pode funcionar para aumentar parcialmente ou completamente, estimular ou ativar uma ou mais atividades biológicas de DR4 ou DR5, *in vitro*, *in situ* ou *in vivo* como um resultado de sua
20 ligação direta para DR4 ou DR5, que causa ativação do receptor ou sinal de transdução. O agonista pode também funcionar indiretamente para aumentar parcialmente ou completamente, estimular ou ativar uma ou mais atividades biológicas de DR4 ou DR5, *in vitro*, *in situ* ou *in vivo* como um resultado de, por exemplo, estimulando outra molécula efetora que então causa ativação de
25 DR4 ou DR5 ou sinal de transdução. É contemplado que um agonista pode agir como uma molécula de aumento que funciona indiretamente para aumentar ou intensificar a ativação ou atividade de DR4 ou DR5. Por exemplo, o agonista pode aumentar a atividade de Apo-2L endógeno em um mamífero.

Isto poderia ser realizado, por exemplo, por pré-complexo DR4 ou DR5 ou pela estabilização dos complexos do respectivo ligante com o receptor DR4 ou DR5 (tal como complexo nativo de estabilização formado entre Apo-2L e DR4 ou DR5).

5 O termo “biomarcador” como usado no presente pedido refere-se geralmente a uma molécula, incluindo um gene, proteína, estrutura de carboidrato, ou glicolípido, a expressão destes no ou em um tecido ou célula de mamífero pode ser detectada por métodos padrão (ou métodos divulgados no presente pedido) e é preditivo para uma sensibilidade de célula ou tecido de
10 mamífero para Apo2L/TRAIL ou anticorpo de receptor de morte. Tais biomarcadores contemplados pela presente invenção incluem, mas não estão limitados a moléculas na família de proteínas GalNac-T. Membros da família de genes e proteínas (“GalNac-T”) N-acetilgalactosaminiltransferase humanas foram descritas (ver, por exemplo, Hang *et al.*, “The chemistry and biology of
15 mucin-type O-linked glycosylation initiated by the polypeptide N-acetyl-galactosaminyltransferases”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (disponível em maio de 2005 em www.sciencedirect.com) e referências citadas neste; Wang *et al.*, *BBRC*, 300:738-744 (2003) e referências citadas neste), e acredita-se funcionar na determinação do número e posição de cadeias de açúcar O-
20 ligadas em proteínas. Opcionalmente, a expressão de tal biomarcador é determinada para ser mais alta do que observada para uma amostra de célula ou tecido controle. Opcionalmente, por exemplo, a expressão de tal biomarcador será determinada usando-se um microarranjo (*microarray*) de expressão gênica, PCR quantitativo ou teste de imunohistoquímica (IHC).
25 Opcionalmente, expressão de um biomarcador GalNac-T, tal como GalNac-T14 ou GalNac-T3, será detectado em um nível de pelo menos 750, como medido por análise de microarranjo Affymetrix U133P, ou 500 vezes, ou preferivelmente pelo menos 1000 vezes mais alto, na amostra de célula ou

tecido de teste quando detectar expressão do biomarcador usando-se PCR quantitativo.

“UDP-N-acetil-D-galactosamina:polipeptídeo N-acetilgalactosaminiltransferase-T14”, “pp-GalNac-T14”, “GalNac-T14”, “GALNT14” são usados
 5 no presente pedido para referir-se a uma proteína de membrana tipo II que tem traços de característica da família GalNac-T de moléculas que compreendem um domínio citoplasmático N-terminal, domínio de transmembrana, região tronco e domínio catalítico. Em uma realização opcional, a molécula GalNac-T14 humana contém 1659 pares de base que codificam uma proteína de 552
 10 aminoácidos, como mostrado na Figura 4A. O cDNA humano de comprimento total foi depositado no GenBank conforme No. de Acesso AB078144. Como divulgado em Wang *et al.*, *BBRC*, 300:738-744 (2003), isoformas unidas de GalNac-T14 foram identificadas, as quais incluem (ou não incluem) éxons específicos, tais como éxons 2, 3, e/ou 4. A presente invenção contempla o
 15 exame da expressão de qualquer de tais isoformas diversas de GalNac-T14, e essa expressão de qualquer uma de tais isoformas é preditiva da sensibilidade da amostra de células ou tecido mamífero ao Apo2L/TRAIL ou anticorpo de receptor de morte.

“UDP-N-acetil-D-galactosamina:polipeptídeo N-acetilgalactosaminiltransferase-T3”, “pp-GalNac-T3”, “GalNac-T3”, “GALNT3” são usados no
 20 presente para referir-se a uma proteína de membrana tipo II que tem traços de característica da família GalNac-T de moléculas que compreendem um domínio citoplasmático N-terminal, domínio de transmembrana, região tronco e domínio catalítico. Em uma realização opcional, o polipeptídeo GalNac-T3
 25 humano compreende a sequência de aminoácido mostrado na Figura 4B. GalNac-T3 é mais adiante descrita em Bennett *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:17006-17012 (1996).

Por “sujeito” ou “paciente” entende-se qualquer sujeito único para

os quais a terapia é desejada, incluindo humanos. Também se pretende incluir como um sujeito quaisquer sujeitos envolvidos em testes de pesquisa clínica não mostrando qualquer sinal clínico da doença, ou sujeitos envolvidos em estudos epidemiológicos, ou sujeitos usados como controle.

5 O termo “mamífero” como usado no presente refere-se a qualquer mamífero classificado como um mamífero, incluindo humanos, vacas, cavalos, cachorros e gatos. Em uma realização preferida da invenção, o mamífero é humano.

 Por “amostra de célula ou tecido” entende-se uma coleção de
10 células similares obtidas de um tecido de um sujeito ou paciente. A fonte da amostra de célula ou tecido pode ser tecido sólido a partir de uma amostra de um órgão ou tecido fresco, congelado e/ou preservado ou biópsia ou aspirado; sangue ou quaisquer componentes do sangue; fluidos corporais tais como fluido cérebro-espinhal, fluido amniótico, fluido peritoneal, ou fluido intersticial,
15 células de qualquer tempo na gestação ou desenvolvimento do sujeito. A amostra de tecido pode também ser células primárias ou cultivadas ou linhagens celulares. Opcionalmente, a amostra de célula ou tecido é obtida a partir de um tumor primário ou metastático. A amostra de tecido pode conter compostos no qual não são mesclados naturalmente com o tecido na natureza
20 tais como conservantes, anticoagulantes, tampões, fixadores, nutrientes, antibióticos, ou similares.

 Para os propósitos no presente pedido um “corte” de uma amostra de tecido significa uma parte única ou pedaço de uma amostra de um tecido, por exemplo, uma porção fina de tecido ou corte de células a partir de
25 uma amostra de tecido. Entende-se que cortes múltiplos de amostras de tecido podem ser extraídos e submetidos à análise de acordo com a presente invenção, ficando estabelecido que se entenda que a presente invenção compreende um método pelo qual o mesmo corte de amostra de tecido é

analisado tanto em níveis morfológicos como molecular, ou é analisada tanto em relação à proteína como ácido nucléico.

Por “correlação” ou “correlacionar” entende-se comparar, de qualquer forma, o desempenho e/ou resultados de uma primeira análise ou protocolo com o desempenho e/ou resultados de uma segunda análise ou protocolo. Por exemplo, pode-se usar os resultados de uma primeira análise ou protocolo em resultado a um segundo protocolo e/ou pode-se usar os resultados de uma primeira análise ou protocolo para determinar se uma segunda análise ou protocolo deve ser executada. Com relação a diversas realizações no presente, pode-se usar resultados de uma análise analítica tal como expressão de mRNA ou IHC para determinar se um regime terapêutico específico usando Apo2L/TRAIL ou anticorpo de receptor de morte deve ser realizado.

Por “ácido nucléico” tem-se a intenção de incluir qualquer DNA ou RNA. Por exemplo, ácido nucléico cromossômico, mitocondrial, viral e/ou bacteriano presente na amostra de tecido. O termo “ácido nucléico” engloba tanto ou ambas as fitas de uma molécula de ácido nucléico de fita dupla e inclui qualquer fragmento ou porção de uma molécula de ácido nucléico intacta.

Por “gene” entende-se qualquer sequência de ácido nucléico ou porção desta com um papel funcional na codificação ou transcrição de uma proteína ou regulação da expressão de outro gene. O gene pode consistir de todos os ácidos nucléicos responsáveis pela codificação de uma proteína funcional ou somente uma porção dos ácidos nucléicos responsáveis pela codificação ou expressão de uma proteína. A sequência de ácido nucléico pode compreender uma anormalidade genética nos éxons, íntrons, regiões iniciais ou de terminação, sequências promotoras, outras sequências reguladoras ou regiões adjacentes únicas para o gene.

A palavra "marcador" quando usada no presente refere-se a um composto ou composição que é conjugada ou fundida diretamente ou indiretamente a um reagente, tal como uma sonda de ácido nucléico ou um anticorpo e facilita a detecção do reagente ao qual está conjugado ou fundido.

- 5 O marcador pode ser detectável por si mesmo (por exemplo, marcadores de radioisótopos ou marcadores fluorescentes) ou, no caso de um marcador enzimático, pode catalisar alteração química de um composto ou composição do substrato que é detectável.

O termo "anticorpo" no presente pedido é usado no senso mais
10 amplo e especificamente abrange anticorpos monoclonais intactos, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos) formados por pelo menos dois anticorpos intactos e fragmentos de anticorpo, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada.

"Fragmentos de anticorpo" compreendem uma porção de um
15 anticorpo intacto, preferivelmente que compreende a região de ligação de antígeno ou região variável deste. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, e fragmentos Fv; diacorpos, anticorpos lineares; moléculas de anticorpo de cadeia única e anticorpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticorpo.

20 "Anticorpos nativos" são usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150.000 daltons, compostas de duas cadeias leves idênticas (L) e duas cadeias pesadas idênticas (H). Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada por uma ligação bissulfeto covalente, enquanto o número de ligações bissulfeto varia entre as cadeias pesadas de diferentes
25 isotipos de imunoglobulina. Cada cadeia pesada e leve também tem regularmente pontes bissulfeto espaçadas entre cadeias. Cada cadeia pesada tem em uma terminação um domínio variável (V_H) seguida por um número de domínios constantes. Cada cadeia leve possui um domínio variável em uma

terminação (V_L) e um domínio constante na sua outra terminação, o domínio constante da cadeia leve está alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável de cadeia leve está alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. Acredita-se que resíduos de aminoácidos específicos formem uma interface entre os domínios variáveis de cadeia leve e cadeia pesada.

O termo “variável” refere-se ao fato que certas porções do domínio variável diferenciam-se extensivamente na sequência entre anticorpos e são usadas na ligação e especificidade de cada anticorpo específico para seu antígeno específico. No entanto, a variabilidade não é distribuída uniformemente por todos os domínios variáveis dos anticorpos. Ela está concentrada em três segmentos chamados regiões hipervariáveis ou regiões determinadas por complementaridade ambos nos domínios variáveis de cadeia leve e cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas de domínios variáveis são chamadas de regiões de estrutura (*framework*) (FRs). Os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas nativas, cada um compreende quatro FRs adotando amplamente uma configuração folha β , conectada por três regiões hipervariáveis, na qual formam *loops* que se conectam, e em alguns casos formam parte da estrutura folha β . As regiões hipervariáveis em cada cadeia são mantidas juntas em íntima proximidade pelas FRs e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação do antígeno com anticorpos. (ver Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Os domínios constantes não estão diretamente envolvidos na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efectoras, tal como participação do anticorpo na citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC).

Digestão de anticorpos por papaína produz dois fragmentos de

ligação de antígeno idênticos, chamados fragmentos “Fab”, cada um com um único sítio de ligação de antígeno, e um fragmento “Fc” residual, cujo nome reflete sua habilidade para cristalizar de imediato. Tratamento por pepsina rende um fragmento $F(ab')_2$ que possui dois sítios de ligação de antígeno e é
5 ainda capaz de interligar-se ao antígeno.

“Fv” é um fragmento mínimo de anticorpo que contém um sítio completo de reconhecimento de antígeno e de ligação de antígeno. Esta região consiste de um dímero de uma cadeia pesada e um domínio variável de cadeia leve em associação não covalente estreita. É nesta configuração que
10 as três regiões hipervariáveis de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação de antígeno na superfície do dímero V_H-V_L . Coletivamente, as seis regiões hipervariáveis conferem especificidade de ligação de antígeno ao anticorpo. No entanto, até um único domínio variável (ou metade de uma Fv que compreende somente três regiões hipervariáveis específicas para um
15 antígeno) possui a habilidade de reconhecer e ligar-se a um antígeno, embora com afinidade mais baixa que o sítio de ligação inteiro.

O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Fragmentos Fab' diferem de fragmentos Fab pela adição de poucos resíduos na terminação
20 carboxila de um domínio CH1 de cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas da região de dobradiça do anticorpo. Fab'-SH é a designação no presente para Fab' na qual o(s) resíduo(s) cisteína(s) dos domínios constantes produz pelo menos um grupo tiol livre. Fragmentos do anticorpo $F(ab')_2$ originalmente foram produzidos como pares de fragmentos Fab' que possuem
25 dobradiça de cisteínas entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpo são também conhecidos.

As “cadeias leves” de anticorpos (imunoglobulinas) de qualquer espécie de vertebrado podem ser designadas para um ou dois tipos

claramente distintos, chamados kappa (κ) e lambda (λ), baseados na sequência de aminoácidos de seus domínios constantes.

Dependendo da sequência de aminoácido do domínio constante de suas cadeias pesadas, os anticorpos podem ser designados para diferentes classes. Existem cinco classes principais de anticorpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e várias destas podem também ser divididas em subclasses (isotipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA₁, e IgA₂. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de anticorpos são chamados de α , δ , ϵ , γ , e μ , respectivamente. As subunidades de estruturas e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

Fragmentos de anticorpo "Fv de cadeia única" ou "scFv" compreendem os domínios V_H e V_L do anticorpo, em que estes domínios estão presentes em uma única cadeia de polipeptídeo. Preferivelmente, o polipeptídeo Fv, além disso, compreende um ligante polipeptídeo entre os domínios V_H e V_L que permite o scFv formar a estrutura desejada para a ligação de antígeno. Para uma revisão de scFv ver Plückthun em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg e Moore eds., Springer-Verlag, Nova York, páginas 269-315 (1994).

O termo "diacorpos" refere-se a fragmentos de anticorpo pequeno com dois sítios de ligação de antígeno, cujos fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) na mesma cadeia de polipeptídeo ($V_H - V_L$). Pelo uso de um ligante que é muito curto para permitir pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a parear com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação de antígeno. Diacorpos estão descritos mais completamente em, por exemplo, patente EP 404.097; documento WO 93/11161; e Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA, 90:6444-6448 (1993).

O termo "anticorpo monoclonal" como utilizado no presente refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, isto é, os anticorpos individuais que
5 compreendem a população são idênticos, exceto por possível ocorrência natural de mutações que podem estar presentes em menores quantidades. Anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionado a um único sítio antigênico. Além disto, em contraste com preparações de anticorpo convencional (policlonal) que tipicamente incluem diferentes anticorpos
10 direcionados contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante no antígeno. Além disso, para suas especificidades, os anticorpos monoclonais são vantajosos, pois eles são sintetizados pela cultura de hibridoma, não contaminada por outras imunoglobulinas. O modificador "monoclonal" indica o caráter do
15 anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não sendo construído como produção requerida do anticorpo por qualquer método específico. Por exemplo, os anticorpos monoclonais para serem usados de acordo com a presente invenção podem ser produzidos pelo método de hibridoma, primeiro descrito por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495
20 (1975), ou podem ser produzidos por métodos de DNA recombinante (ver, por exemplo, patente US 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" podem também ser isolados de bibliotecas de anticorpo em fago que utilizam as técnicas descritas em Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) e Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por exemplo.

25 Os anticorpos monoclonais no presente pedido especificamente incluem anticorpos "quiméricos" (imunoglobulinas), nos quais uma porção da cadeia leve e/ou pesada é idêntica a, ou homóloga às sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica ou

pertencendo a uma classe ou subclasse de anticorpo específica, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico a, ou homólogo às sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma outra espécie ou pertencendo a uma outra classe ou subclasse de anticorpo, assim como
5 fragmentos de tais anticorpos, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada (patente US 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Anticorpos quiméricos de interesse no presente pedido incluem anticorpos "primatizados" que compreendem sequências de ligação de antígeno de domínio variável derivadas de um primata não humano (por
10 exemplo, Macaco do Velho Mundo, tal como babuíno, rhesus ou macaco cynomolgus) e sequências de região constante humana (patente US 5.693.780).

Formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (por exemplo, murino) são anticorpos quiméricos que contêm sequência mínima derivada de
15 imunoglobulina não humana. Na maior parte, anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) em que resíduos de uma região hipervariável do receptor são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo doador) tal como camundongo, rato, coelho ou primata não humano tendo especificidade,
20 afinidade e capacidade desejadas. Em alguns exemplos, resíduos da região de estrutura (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos correspondentes não humanos. Além disto, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor ou no anticorpo doador. Estas modificações são feitas para, além disto, refinar o
25 desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado irá compreender substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que todos ou substancialmente todos os *loops* hipervariáveis correspondem àqueles de uma imunoglobulina não humana e todas ou

substancialmente todas as FRs são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado opcionalmente irá também compreender pelo menos uma porção de uma região constante (Fc) da imunoglobulina, tipicamente de uma imunoglobulina humana. Para detalhes
 5 adicionais, ver Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

O termo “região hipervariável” quando usado no presente refere-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis por ligação de antígeno. A região hipervariável compreende resíduos de
 10 aminoácido de uma “região determinada por complementaridade” ou “CDR” (por exemplo, resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.
 15 (1991)) e/ou aqueles resíduos de um “loop hipervariável” (por exemplo, resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Chothia e Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). “Região de estrutura” ou resíduos “FR” são aqueles resíduos de domínio variável, exceto os resíduos de
 20 região hipervariável como definido no presente.

Um anticorpo “que se liga” a um antígeno de interesse é aquele capaz de se ligar a esse antígeno com afinidade e/ou avidéz suficiente, tal que o anticorpo seja útil como um agente terapêutico ou de diagnóstico para atingir uma célula que expressa o antígeno.

25 Para os propósitos do presente, “imunoterapia” irá se referir a um método de tratamento de um mamífero (preferivelmente um paciente humano) com um anticorpo, em que o anticorpo pode ser um anticorpo não conjugado ou “nu”, ou o anticorpo pode ser conjugado ou fundido com molécula(s) ou

agente(s) heterólogo(s), tal como um ou mais agente(s) citotóxico(s), através disso gerando um "imunocjugado".

Um anticorpo "isolado" é aquele que foi identificado e separado e/ou recuperado a partir de um componente de seu ambiente natural.

- 5 Componentes contaminantes de seu ambiente natural são materiais que poderiam interferir no uso diagnóstico ou terapêutico para o anticorpo, e podem incluir enzimas, hormônios, e outros solutos proteináceos ou não proteináceos. Em realizações preferidas, o anticorpo será purificado (1) para mais que 95% por peso de anticorpo como determinado pelo método Lowry, e
- 10 mais preferivelmente mais que 99% por peso, (2) para um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de N-terminal ou sequência de aminoácido interna pelo uso de um sequenciador de copo giratório, ou (3) para homogeneidade por FAGO-SDS sob condições de redução ou não redução utilizando-se *Coomassie blue* ou, preferivelmente, *silver stain*. Anticorpo
- 15 isolado inclui o anticorpo *in situ* dentro de células recombinantes desde que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não esteja presente. Normalmente, no entanto, o anticorpo isolado será preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

- A expressão "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade de
- 20 um agente (por exemplo, anticorpo Apo2L/TRAIL, anti-DR4 ou anticorpo DR5, etc.) que é eficaz para prevenir, melhorar ou tratar a doença ou condição em questão.

- Os termos "tratar", "tratamento" e "terapia" como usados no presente referem-se à terapia curativa, terapia profilática e terapia preventiva.
- 25 Tratamento consecutivo ou administração refere-se ao tratamento em pelo menos uma base diária, sem interrupção no tratamento por um ou mais dias. Tratamento ou administração intermitente, ou tratamento ou administração em um modo intermitente, refere-se ao tratamento que não é consecutivo, mas de

preferência cíclico na natureza.

O termo "citocina" é um termo genérico para proteínas liberadas por uma população de células que agem em outra célula como mediadoras intercelulares. Exemplos de tais citocinas são linfocinas, monocinas, e

5 hormônios polipeptídicos tradicionais. Incluídos entre as citocinas estão os hormônios de crescimento, tais como hormônio de crescimento humano, hormônio de crescimento humano N-metionil, e hormônio de crescimento bovino; hormônio da paratiróide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormônios de glicoproteína tais como hormônio folículo

10 estimulante (FSH), hormônio estimulante da tireóide (TSH), hormônio luteinizante (LH); fator de crescimento hepático; fator de crescimento do fibroblasto; prolactina; lactogênio placentário; fator- α e - β de necrose tumoral; substância de inibição mulleriana; peptídeo associado a gonadotropina de camundongo; inibina; activina; fator de crescimento endotelial vascular;

15 integrina; trombopoietina (TPO); fatores de crescimento do nervo, fator de crescimento de plaqueta; fatores transformantes do crescimento (TGFs) tais como TGF- α e TGF- β ; fator-I e -II de crescimento similar a insulina; eritropoietina (EPO); fatores osteoindutivos; interferons tais como interferon- α , - β , e - γ ; fatores de estimulação de colônia (CSFs) tal como macrófago-CSF (M-

20 CSF); granulócito-macrófago-CSF (GM-CSF); e granulócito-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs) tais como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17; e outros fatores polipeptídicos incluindo LIF e kit ligante (KL). Como usado no presente pedido, o termo citocina inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura celular recombinante e equivalentes

25 biologicamente ativos de citocinas de sequência nativa.

O termo "agente citotóxico" como usado no presente pedido refere-se a uma substância que inibe ou previne a função de células e/ou causa destruição de células. O termo tem a intenção de incluir isótopos

radioativos (por exemplo, I^{131} , I^{125} , Y^{90} , e Re^{186}), agentes quimioterápicos, e toxinas tais como toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou fragmentos destas.

Um "agente quimioterápico" é um componente químico útil no
 5 tratamento de câncer. Exemplos de agentes quimioterápicos incluem agentes
 alquilantes tais como tiotepa e (CYTOXANTM); alquil sulfonados tais como
 busulfan, improsulfan e piposulfan; aziridinas tais como benzodopa,
 carboquona, meturedopa, e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo
 altretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamida, trietilenetiofosforamida e
 10 trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacin e bulatacinona);
 uma camptotecina (incluindo a sintética análoga topotecan), briostatina;
 calistatina; CC-1065 (incluindo suas análogas adozelesina, carzelesina e
 bizelesina sintéticas análogas); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e
 criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo as sintéticas análogas, KW-
 15 2189 e CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; uma sarcodictina;
 espongistatina; mostardas de nitrogênio tais como clorambucila, clornafazina,
 clolofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto óxido de
 mecloretamina, melfalan, novembiquin, fenesterina, prednimustina,
 trofosfamida, mostarda de uracil; nitrosureas tais como carmustina,
 20 clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina e ranimustina; antibióticos tais
 como os antibióticos enedina (por exemplo, caliqueamicina, especialmente
 caliqueamicina gama1I e caliqueamicina phil1, ver, por exemplo, Agnew, Chem
 Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994); dinemicina, incluindo dinemicina A;
 bifosfonatos, tal como clodronato, uma esperamicina; assim como cromóforos
 25 de neocarzinostatina e cromóforos de antibióticos enedina cromoproteínas
 relacionadas), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina,
 bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina,
 cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-

norleucina, doxorubicina (AdriamycinTM) (incluindo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina e deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tal como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabólitos tais como metotrexato, e 5-fluorouracil (5-FU); análogos de ácido fólico tais como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; anti-adrenais tais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; ácido fólico restabelecedor tais como ácido frolínico; aceglatona; glicosídeo de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracil; ansacrina; bestrabucila; bisantrena; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínio; um epotileno, etoglucideo; nitrato de gálio; hidroxíurea; lentinan; lonidamina; maitansinoides tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico, 2-etil hidrazida; procarbazona; PSK[®]; razoxana; rizoxina; sizofirana; espirogermanio; ácido tenuazonico; triaziquona; 2,2'2"-triclóro trietil amina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromana; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida, tiotepa; taxóides, por exemplo, paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) e doxetaxel (TAXOTERE[®], Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); cloranbucila; gencitabina (GemzarTM); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina tais como

cisplatina e carboplatina; vinblastina; platina; etoposido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (NavelbineTM); novantrona, teniposide; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinóides tais como ácido retinóico; capecitabina; e sais farmaceuticamente aceitáveis, ácidos ou derivados de qualquer um dos acima. Também incluído nesta definição estão os agentes anti-hormonais que agem para regular ou inibir a ação dos hormônios em tumores tal como anti-estrógenos e moduladores seletivos do receptor de estrógeno (SERMs), incluindo, por exemplo, tamoxifen (incluindo NolvadexTM), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, e toremifeno (FarestonTM); inibidores de aromatase que inibem a enzima aromatase, que regula a produção de estrógeno nas glândulas adrenais, tais como, por exemplo, 4(5)-imidazolas, aminoglutetimida, acetato de megestrol (MegaceTM), exemestano, formestano, fadrozola, vorozola (RivisorTM), letrozola (FemaraTM), e anastrozola (ArimidexTM); e anti-andrógenos, tais como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, e goserelina; e sais farmaceuticamente aceitáveis, ácidos ou derivados de qualquer dos acima.

Um "agente inibitório de crescimento" quando usado no presente pedido refere-se a um componente ou composição que inibe o crescimento de uma célula, especialmente célula cancerígena que superexpressa qualquer um dos genes identificados no presente, tanto *in vitro* como *in vivo*. Dessa forma, o agente inibitório de crescimento pode ser aquele que reduz significativamente a porcentagem de células que superexpressam tais genes na fase S. Exemplos de agentes inibitórios de crescimento incluem agentes que bloqueiam a progressão do ciclo celular (em um local, exceto na fase S), tais como agentes que induzem a interrupção G1 e interrupção da fase M. Bloqueadores clássicos da fase M incluem as vincas (vincristina e vinblastina),

taxol, e inibidores topo II, tais como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposido e bleomicina. Aqueles agentes que capturam G1 também se espalham na captura da fase S, por exemplo, agentes alquilantes de DNA tais como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-flúor uracila, e ara-C. Informações adicionais podem ser encontradas em *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, intitulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente p. 13.

Os termos "apoptose" e "atividade apoptótica" são usados no mais amplo sentido e referem-se à forma sistemática ou controlada de morte celular em mamíferos, que é tipicamente acompanhada por uma ou mais características de modificações celulares, incluindo condensação de citoplasma, perda de microvilosidades da membrana plasmática, segmentação dos núcleos, degradação de DNA cromossômico ou perda de função mitocondrial. A atividade pode ser determinada e medida, por exemplo, por testes de viabilidade celular (tal como testes *Alamar blue* ou testes MTT), análise FACS, ativação da caspase, fragmentação de DNA (ver, por exemplo, Nicoletti *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 139:271-279 (1991), e poli(ADP ribose polimerase), "PARP", testes de clivagem conhecidos na técnica.

Como usado no presente pedido, o termo "disfunção" em geral refere-se a qualquer condição que se beneficiaria do tratamento com as composições descritas no presente, incluindo qualquer doença ou disfunção que pode ser tratada por quantidades eficazes de Apo2L/TRAIL, um anticorpo anti-DR4, e/ou um anticorpo anti-DR5. Isto inclui disfunções crônicas e agudas, como também aquelas condições patológicas que predisõem o mamífero à disfunção em questão. Exemplos não limitantes de disfunções a serem tratadas no presente incluem cânceres benignos e malignos; inflamatórios, disfunções angiogênicas e imunológicas, doenças auto-imune,

artrite (incluindo artrite reumatóide), esclerose múltipla, e HIV/AIDS.

Os termos "câncer", "cancerígeno" ou "maligno" referem-se a ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada pela desregulação do crescimento celular. Exemplos de câncer incluem, mas não estão limitados a, carcinoma, linfoma, leucemia, blastoma e sarcoma. Exemplos mais específicos de tais cânceres incluem carcinoma celular escamoso, mieloma, câncer de pulmão de célula pequena, câncer de pulmão de célula não-pequena, glioma, linfoma de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin, câncer (trato) gastrointestinal, câncer renal, câncer ovariano, câncer de fígado, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, câncer colorretal, câncer endometrial, câncer de rim, câncer de próstata, câncer de tireóide, melanoma, condrosarcoma, neuroblastoma, câncer pancreático, glioblastoma multiforme, câncer cervical, câncer do cérebro, câncer de estômago, câncer de bexiga, hepatoma, câncer de mama, carcinoma de cólon, câncer de cabeça e pescoço.

O termo "doença imune relacionada" significa uma doença na qual um componente do sistema imune de um mamífero causa, media ou de outra forma contribui para uma morbidade no mamífero. Também são incluídas doenças em que a estimulação ou intervenção da resposta imune tem um efeito de melhora na progressão da doença. Incluído neste termo estão as doenças auto-imunes, doenças inflamatórias imune mediadas, doenças inflamatórias não imune mediadas, doenças infecciosas, e doenças de imunodeficiência. Exemplos de doenças imune relacionadas e inflamatórias, algumas destas são imune ou mediadas por célula T, que podem ser tratadas de acordo com a invenção incluem lúpus sistêmico, lúpus eritematoso, artrite reumatóide, artrite crônica juvenil, espondiloartropatias, esclerose sistêmica (escleroderma), miopatias inflamatórias idiopáticas (dermatomiosite, polimiosite), síndrome de Sjogren, vasculite sistêmica, sarcoidose, anemia hemolítica auto-imune (pancitopenia imune,

hemoglobinúria paroxismal noturna), trombocitopenia auto-imune (púrpura trombocitopênica idiopática, trombocitopenia imune mediada), tireoidite (doença de Grave, tireoidite de Hashimoto, tireoidite linfocítica juvenil, tireoidite atrófica), diabetes mellitus, doença renal imune mediada (glomerulonefrite, nefrite tubulointersticial), doenças de demielinação do sistema nervoso central e periférico tal como esclerose múltipla, polineuropatia de demielinação idiopática ou síndrome de Guillain-Barré, e polineuropatia de demielinação inflamatória crônica, doenças hepatobiliares tais como hepatite infecciosa (hepatite A, B, C, D, E e outras viroses não hepatotrópicas), hepatite ativa crônica auto-imune, cirrose biliar primária, hepatite granulomatosa, e colangite esclerosante, doenças inflamatórias e fibróticas de pulmão tal como doença inflamatória de intestino (colite ulcerativa: doença de Crohn), enteropatia glúten-sensível, e doença de Whipple, doenças de pele auto-imune ou imune mediada incluindo doenças de pele vesiculares, eritema multiforme e dermatite de contato, psoríase, doenças alérgicas tais como asma, rinite alérgica, dermatite atópica, hipersensibilidade alimentar e urticária, doenças imunológicas do pulmão tal como pneumonia eosinofílica, fibrose pulmonar idiopática e pneumonite de hipersensibilidade, doenças associadas a transplantes incluindo rejeição de enxerto e doença do enxerto contra hospedeiro. Doenças infecciosas incluem AIDS (infecção HIV), hepatite A, B, C, D, e E, infecções por bactérias, infecções por fungos, infecções por protozoários e infecções por parasitas.

"Doença auto-imune" é usada no presente em um sentido geral e amplo para se referir a disfunções ou condições em mamíferos em que a destruição dos tecidos saudáveis ou normais é proveniente de respostas humorais ou celulares do indivíduo mamífero para seus próprios tecidos de constituição. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, lúpus eritematoso, tireoidite, artrite reumatóide, psoríase, esclerose múltipla, diabetes auto-imune, e doença

inflamatória do intestino (IBD).

O termo “marcado” quando usado no presente refere-se a uma molécula quimérica que compreende um anticorpo ou um polipeptídeo unido a um “polipeptídeo de marcação (*tag*)”. O polipeptídeo de marcação possui
5 resíduos suficientes para fornecer um epítipo contra o qual um anticorpo pode ser feito ou para fornecer alguma outra função, tal como a habilidade para oligomerizar (por exemplo, como ocorre com peptídeos que possuem domínios de fecho de leucina), ainda é curto o bastante tal que geralmente não interfere na atividade do anticorpo ou polipeptídeo. O polipeptídeo de marcação
10 também é bastante exclusivo, de forma que o anticorpo não interaja substancialmente com outros epítopos. Polipeptídeos de marcação adequados geralmente possuem pelo menos seis resíduos de aminoácidos e usualmente entre aproximadamente 8 a cerca de 50 resíduos de aminoácido (preferivelmente, entre aproximadamente 10 a cerca de 20 resíduos).

15 O termo “íon de metal bivalente” refere-se a um íon de metal que tem duas cargas positivas. Exemplos de íons de metal bivalente incluem mas não estão limitados a zinco, cobalto, níquel, cádmio, magnésio, e manganês. Formas específicas de tais metais que podem ser empregados incluem formas salinas (por exemplo, formas salinas farmaceuticamente aceitáveis), tais como
20 cloreto, acetato, carbonato, citrato e formas de sulfato de íons de metal bivalentes mencionados acima. Opcionalmente, um íon de metal bivalente para uso na presente invenção é zinco, e preferivelmente, a forma salina, sulfato de zinco ou cloreto de zinco.

25 “Isolado” quando usado para descrever vários peptídeos ou proteínas divulgadas no presente, significa peptídeo ou proteína que foi identificada e separada e/ou recuperada de um componente de seu meio natural. Componentes contaminantes de seu meio natural são materiais que poderiam tipicamente interferir no diagnóstico ou usos terapêuticos para o

peptídeo ou proteína, e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteináceos ou não-proteináceos. Em realizações preferidas, o peptídeo ou proteína será purificado (1) para um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácido N-terminal ou interna pelo uso de um seqüenciador de copo giratório, ou (2) para homogeneidade por SDS-PAGE sob condições de redução ou não redução usando-se *Coomassie blue* ou, preferivelmente, *silver stain*, ou (3) para homogeneidade por espectroscopia de massa ou técnicas de mapeamento de peptídeo. O material isolado inclui peptídeo ou proteína *in situ* em células recombinantes, desde que pelo menos um componente de seu meio natural não esteja presente. Geralmente, no entanto, o peptídeo ou proteína isolada será preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

"Porcentagem (%) de identidade de sequência aminoácido" com relação às sequências identificadas no presente pedido é definido como a porcentagem de resíduos de aminoácidos em uma sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácidos na sequência de referência, após alinhamento das sequências e introdução de *gaps*, se necessário, para alcançar a porcentagem máxima de identidade de sequência, e não considerando qualquer substituição conservativa como parte da identidade de sequência. Alinhamento para os propósitos de determinação da porcentagem de identidade de sequência de aminoácido pode ser alcançado de várias maneiras que estão dentro da técnica e podem determinar parâmetros apropriados para medição de alinhamento, incluindo determinação de algoritmos necessários para alcançar o máximo alinhamento sobre o comprimento total das sequências sendo comparadas. Para os propósitos no presente, os valores de porcentagem de aminoácido idênticos podem ser obtidos usando-se o programa de computador de comparação de sequência, ALIGN-2, que foi desenvolvido pela Genentech, Inc. e o código da fonte do

qual foi depositado com documentação de usuário no US Copyright Office, Washington, DC, 20559, registrado com base em US Copyright Número de Registro TXU510087. O programa ALIGN-2 está publicamente disponível através da Genentech, Inc., South San Francisco, CA. Todos os parâmetros de comparação de sequência são estabelecidos pelo programa ALIGN-2 e não variam.

"Estringência" de reações de hibridização é determinada de imediato por um técnico no assunto, e geralmente é um cálculo empírico dependendo do comprimento da sonda, temperatura de lavagem e concentração de sal. Em geral, sondas mais longas exigem temperaturas mais altas para anelamento apropriado, enquanto que sondas mais curtas precisam de temperaturas mais baixas. A hibridização geralmente depende da habilidade do DNA denaturado reanelar quando fitas complementares estão presentes em um ambiente abaixo de sua temperatura de fusão. Quanto maior o grau de desejada identidade entre a sonda e sequência hibridizável, maior a temperatura relativa que pode ser usada. Como um resultado, segue que temperaturas relativas mais altas tenderiam a fazer as condições da reação mais estridentes, enquanto temperaturas mais baixas, menos. Para detalhes adicionais e explicações de estringência de reações de hibridização, ver Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Condições de alta estringência", como definido no presente, são identificadas por aquelas que: (1) empregam alta força iônica e alta temperatura para lavagem, 0,015 M de cloreto de sódio/0,0015 M de citrato de sódio/0,1% de dodecil sulfato de sódio a 50°C; (2) empregam durante a hibridização um agente denaturante, 50% (v/v) de formamida com 0,1% albumina de soro bovino/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/50mM de tampão fosfato de sódio em pH 6,5 com 750 mM de cloreto de sódio, 75 mM

de citrato de sódio a 42°C; ou (3) empregam 50% de formamida, 5 x SSC (0,75 M de NaCl, 0,075 M de citrato de sódio), 50 mM de fosfato de sódio (pH 6.8), 0,1% de pirofosfato de sódio, 5 x solução de Denhardt, DNA de esperma de salmão sonificado (50 µg/ml), 0.1% de SDS, e 10% de sulfato de dextrana a 42°C, com lavagens a 42°C em 0,2 x SSC (cloreto de sódio/citrato de sódio) e 50% de formamida a 55°C, seguido por uma lavagem de alta estringência consistindo de 0,1 x SSC contendo EDTA a 55°C.

"Condições de estringência moderada" podem ser identificadas como descrito por Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nova York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluem incubação durante a noite a 37°C em uma solução que compreende: 20% de formamida, 5 x SSC (150 mM de NaCl, 15 mM de citrato trissódico), 50 mM de fosfato de sódio (pH 7.6), 5 x solução de Denhardt, 10% de sulfato de dextrana, e 20 mg/ml de DNA de esperma de salmão cortado denaturado, seguido por lavagem dos filtros em 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. O técnico no assunto irá reconhecer como ajustar temperatura, força iônica, etc., conforme necessário para acomodar fatores tais como comprimento da sonda e similares.

O termo "*primer*" ou "*primers*" refere-se à sequências de oligonucleotídeos que hibridizam a um polinucleotídeo alvo RNA ou DNA complementar e serve como o ponto de início para a síntese passo a passo de um polinucleotídeo de mononucleotídeos pela ação de uma nucleotidiltransferase, como ocorre, por exemplo, em uma reação em cadeia da polimerase.

O termo "sequências controle" refere-se à sequências de DNA necessárias para a expressão de uma sequência de codificação operacionalmente ligada em um organismo hospedeiro específico. As sequências controle que são adequadas para procariotos, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma sequência operadora, e um sítio de

ligação de ribossomo. Células eucariontes são conhecidas por utilizar promotores, sinais de poliadenilação, e amplificadores.

Ácido nucléico está "operacionalmente ligado" quando é colocado em uma relação funcional com outra sequência de ácido nucléico. Por exemplo, o DNA para uma pré-sequência ou líder secretório está operacionalmente ligado ao DNA para um polipeptídeo se este é expresso como uma pré-proteína que participa da secreção do polipeptídeo; um promotor ou amplificador está operacionalmente ligado a uma sequência de codificação se afeta a transcrição da sequência; ou um sítio de ligação de ribossomo está operacionalmente ligado a uma sequência de codificação se está posicionado de forma a facilitar a tradução. Geralmente, "operacionalmente ligado" significa que as sequências de DNA sendo ligadas são adjacentes, e, no caso de um líder secretório, adjacentes e na fase de leitura. No entanto, amplificadores não têm que ser adjacentes. A ligação é realizada por ligação em sítios de restrição convenientes. Se tais sítios não existem, os adaptadores de oligonucleotídeos sintéticos ou ligantes são usados de acordo com as práticas convencionais.

"Citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo" e "ADCC" referem-se à reação mediada por célula na qual células citotóxicas não específicas que expressam receptores Fc (FcRs) (por exemplo, células *Natural Killer* (NK), neutrófilos, e macrófagos) reconhecem o anticorpo ligado na célula atingida e subseqüentemente causam lise da célula alvo. As células primárias para mediação de ADCC, células NK, expressam somente FcγRIII, enquanto que monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão FcR em células hematopoiéticas está resumida na Tabela 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para avaliar atividade de ADCC de uma molécula de interesse, um ensaio *in vitro* de ADCC, tal como descrito na patente US 5.500.362 ou US 5.821.337 pode ser apresentado.

Células efetoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e células *Natural Killer* (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, atividade de ADCC da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo, em um modelo animal tal como divulgado em Clynes *et al.* *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

"Células efetoras humanas" são leucócitos que expressam um ou mais FcRs e desempenham funções efetoras. Preferencialmente, as células expressam pelo menos FcγRIII e realizam função efetora de ADCC. Exemplos de leucócitos humanos que mediam ADCC incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC), células *Natural Killer* (NK), monócitos, células T citotóxicas e neutrófilos; com PBMCs e células NK sendo preferidas.

Os termos "receptor Fc" ou "FcR" são usados para descrever um receptor que se liga a região Fc de um anticorpo. O FcR preferido é um FcR humano de sequência nativa. Além disso, um FcR preferido é aquele que se liga a um anticorpo IgG (um receptor gama) e inclui subclasses dos receptores FcγRI, FcγRII, e FcγRIII, incluindo variantes alélicas e alternativamente formas unidas destes receptores. Receptores FcγRII incluem FcγRIIA (um "receptor de ativação") e FcγRIIB (um "receptor de inibição"), que têm sequências similares de aminoácidos que diferem primeiramente nos domínios citoplasmáticos destes. Receptor de ativação FcγRIIA contém um motivo de ativação de imuno-receptor baseado em tirosina (ITAM) em seu domínio citoplasmático. Receptor de ativação FcγRIIA contém um motivo de inibição de imuno-receptor baseado em tirosina (ITIM) em seu domínio citoplasmático. (ver Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcRs foram revisados em Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); e de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Outros FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, são englobados pelo termo "FcR" no presente pedido. O termo também inclui o receptor neonatal, FcRn,

que é responsável por transferir as IgGs maternas para os fetos (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) e Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)). FcRs no presente incluem polimorfismos, tal como dimorfismo genético no gene que codifica FcγRIIIa resultando tanto em uma fenilalanina (F) como uma valina (V) na posição de aminoácido 158, localizada na posição do receptor que se liga ao IgG1. O homozigoto valina FcγRIIIa (FcγRIIIa-158V) mostrou ter uma afinidade maior para IgG1 humano e mediar aumento de ADCC *in vitro*, relativo ao homozigoto fenilalanina FcγRIIIa (FcγRIIIa-158F) ou receptores heterozigoto (FcγRIIIa-158F/V).

“Citotoxicidade dependente de complemento” ou “CDC” refere-se à habilidade de uma molécula lisar um alvo na presença de complemento. A via de ativação de complemento é iniciada pela ligação do primeiro componente do sistema complemento (C1q) a uma molécula complexa (por exemplo, um anticorpo) com um antígeno cognato. Para avaliar ativação de complemento, um teste CDC, por exemplo, como descrito em Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), pode ser realizado.

II. MATERIAIS E MÉTODOS EXEMPLARES DA INVENÇÃO

Os métodos e testes divulgados no presente pedido são direcionados ao exame da expressão de um ou mais biomarcadores em uma amostra de célula ou tecido de mamífero, em que a determinação dessa expressão de um ou mais de tais biomarcadores é preditiva ou indicativa se a amostra de célula ou tecido será sensível a agentes tais como Apo2L/TRAIL e/ou anticorpos receptores de morte tais como anticorpos agonistas de anti-DR5 ou anticorpos agonistas de anti-DR4. Os métodos e testes incluem aqueles que examinam a expressão de membros da família de moléculas GalNac-T, incluindo GalNac-T14 e GalNac-T3.

Como discutido acima, existem algumas populações de tipo celulares humanos doentes (tais como certas populações de células

cancerígenas) que são resistentes à morte celular induzindo efeitos de Apo2L/TRAIL ou anticorpos receptores de morte. Acredita-se então que os métodos e testes divulgados podem fornecer meios convenientes, eficientes e de custo potencialmente efetivo para obter dados e informações úteis na avaliação apropriada ou terapias eficazes para tratar pacientes. Por exemplo, um paciente que foi diagnosticado com câncer ou uma condição imune relacionada poderia realizar uma biópsia para obter uma amostra de célula ou tecido, e a amostra poderia ser examinada com o objetivo de realizar vários testes *in vitro* para determinar se as células do paciente poderiam ser sensíveis a um agente terapêutico tal como Apo2L/TRAIL ou anticorpo de receptor de morte.

A invenção fornece métodos para prever a sensibilidade de uma amostra de célula ou tecido de mamífero (tal como uma célula cancerígena) para Apo2L/TRAIL e/ou anticorpo agonista de receptor de morte.

Opcionalmente, uma amostra de célula ou tecido de mamífero é obtida e examinada para expressão de GalNac-T14. Estes métodos podem ser conduzidos em uma variedade de formatos de testes, incluindo testes que detectam mRNA, expressão de proteína (tal como testes imunohistoquímicos) e testes bioquímicos que detectam UDP-N-acetil-D-galactosamine enzimática: polipeptídeo de atividade N-acetilgalactosaminiltransferase. A determinação da expressão de tais biomarcadores GalNac-T14 em ditos tecidos ou células serão preditivos de forma que tecidos ou células serão sensíveis aos efeitos biológicos do Apo2L/TRAIL e/ou anticorpo de receptor de morte. A Depositante descobriu de maneira surpreendente que a expressão de GalNac-T14 se correlaciona com a sensibilidade de tais células ou tecidos para Apo2L/TRAIL e anticorpos agonistas de receptores de morte.

Como discutido abaixo, a expressão de vários biomarcadores tal como GalNac-T14 em uma amostra pode ser analisada por uma variedade de

metodologias, muitas das quais são conhecidas na técnica e entendidas pelo técnico no assunto, incluindo mas não limitadas a, análise imunohistoquímica e/ou Western, testes quantitativos baseados em sangue (como por exemplo Soro ELISA) (para examinar, por exemplo, níveis de expressão de proteína),
5 testes de atividade enzimática bioquímica, hibridização *in situ*, análise Northern e/ou análise PCR de mRNAs, e análise Southern genômica (para examinar, por exemplo, deleção ou amplificação gênica), assim como qualquer um de uma variedade de testes que podem ser realizados por análise arranjo de gene e/ou tecido. Protocolos típicos para avaliação da situação dos genes e
10 produtos dos genes são encontrados, por exemplo, em Ausubel *et al.* eds., 1995, *Current Protocols In Molecular Biology*, Unidades 2 (Northern Blotting), 4 (Southern Blotting), 15 (Immunoblotting) e 18 (Análise PCR).

Os protocolos abaixo que relatam a detecção de GalNac-T14 em uma amostra são fornecidos para propósitos ilustrativos.

15 Métodos opcionais da invenção incluem protocolos que examinam ou testam a presença de GalNac-T14 em uma amostra de célula ou tecido de mamífero. Uma variedade de métodos para detectar GalNac-T14 pode ser empregado e inclui, por exemplo, análise imunohistoquímica, imunoprecipitação, análise Western blot, testes de ligação molecular, ELISA,
20 ELIFA, seleção celular ativada por fluorescência (FACS) e imunoprecipitação seguida por MS, análise de monossacarídeo. Por exemplo, um método opcional de detecção da expressão de GalNac-T14 em um tecido ou amostra compreende contatar a amostra com um anticorpo anti-GalNac-T14 e então detectar a ligação do anticorpo a GalNac-T14 na amostra.

25 Em realizações específicas da invenção, a expressão de GalNac-T14 em uma amostra é examinada usando-se imunohistoquímica e protocolos de coloração. Coloração imunohistoquímica de cortes de tecido mostraram ser um método confiável de avaliação ou detecção da presença de proteínas na

amostra. Técnicas imunohistoquímicas (“IHC”) utilizam um anticorpo para sondar e visualizar antígenos *in situ*, geralmente por métodos cromatogênicos ou fluorescentes.

Para preparação da amostra, uma amostra de célula ou tecido de um mamífero (tipicamente um paciente humano) pode ser usada. Exemplos de amostras incluem, mas não são limitados a, células de câncer tais como cólon, mama, próstata, ovário, pulmão, estômago, pâncreas, linfoma e células de câncer de leucemia. Opcionalmente, as amostras incluem células de câncer de pulmão de célula não pequena, células de câncer pancreático ou células de câncer de linfoma não-Hodgkin. A amostra pode ser obtida por uma variedade de procedimentos conhecidos na técnica incluindo, mas não limitado a excisão cirúrgica, aspiração ou biópsia. O tecido pode ser fresco ou congelado. Em uma realização, a amostra é fixada e embebida em parafina ou similar.

A amostra de tecido pode ser fixada (isto é, preservada) por metodologia convencional (Ver, por exemplo, “*Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology*”, 3ª edição (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, Nova York; *The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology* (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.). Um técnico no assunto irá apreciar que a escolha de um fixador seja determinada para os propósitos para que a amostra seja histologicamente corada ou analisada de outra forma. Um técnico no assunto irá também apreciar que a extensão da fixação dependa do tamanho da amostra de tecido e do fixador utilizado. A título de exemplo, formalina tamponada neutra, de Bouin ou paraformaldeído, podem ser usados para fixar uma amostra.

Geralmente, a amostra é, em primeiro lugar, fixada e é então desidratada por meio de uma sequência ascendente de álcoois, infiltrada e embebida com parafina ou outro meio de corte de forma que a amostra de tecido possa ser seccionada. Alternativamente, pode-se cortar o tecido e
5 fixar os cortes obtidos. A título de exemplo, a amostra de tecido pode ser embebida e processada em parafina por metodologia convencional (ver, por exemplo, "*Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology*", acima). Exemplos de parafina que podem ser usadas incluem, mas não estão limitados a, Paraplast, Broloid, e
10 Tissuemay. Uma vez que a amostra está embebida, a amostra pode ser seccionada por um micrótomo ou similar (ver, por exemplo, "*Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology*", acima). A título de exemplo para este procedimento, os cortes podem variar de aproximadamente três a aproximadamente cinco microns em
15 espessura. Uma vez seccionados, os cortes podem ser anexados a lâminas por diversos métodos padrões. Exemplos de placas adesivas incluem, mas não estão limitadas a, silano, gelatina, poli-L-lisina e similares. A título de exemplo, os cortes embebidos em parafina podem ser anexados a lâminas carregadas positivamente e/ou lâminas revestidas com
20 poli-L-lisina.

Se a parafina foi usada como material de embebedimento, os cortes de tecido são geralmente desparafinados e reidratados em água. Os cortes de tecido podem ser desparafinados por diversas metodologias padrão convencionais. Por exemplo, xilenos e sequências decrescentes de álcoois
25 podem ser usados (ver, por exemplo, "*Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology*", acima). Alternativamente, agentes não orgânicos desparafinantes disponíveis comercialmente tal como Hemo-De7 (CMS, Houston, Texas) podem ser usados.

Opionalmente, após a preparação da amostra, um corte pode ser analisado usando-se IHC. IHC pode ser realizado em combinação com técnicas adicionais tais como coloração morfológica e/ou hibridização fluorescente *in situ*. Dois métodos gerais de IHC estão disponíveis; testes
5 diretos e indiretos. De acordo com o primeiro teste, a ligação do anticorpo ao antígeno alvo (por exemplo, GalNac-T14) é determinada diretamente. Este teste direto usa um reagente marcado, tal como uma marcação fluorescente ou um anticorpo primário marcado com uma enzima, que pode ser visualizado sem interações de anticorpos adicionais. Em um teste
10 indireto típico, o anticorpo primário não conjugado se liga ao antígeno e então um anticorpo secundário marcado se liga ao anticorpo primário. Onde o anticorpo secundário é conjugado a um marcador enzimático, um substrato cromatogênico ou fluorogênico é adicionado para fornecer visualização do antígeno. A amplificação de sinal ocorre porque diversos
15 anticorpos secundários podem reagir com diferentes epítomos no anticorpo primário.

O anticorpo primário e/ou secundário usado para imunohistoquímica tipicamente será marcado com um componente detectável. Diversos marcadores estão disponíveis, as quais podem ser agrupadas nas
20 seguintes categorias:

(a) Radioisótopos, tais como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , e ^{131}I . O anticorpo pode ser marcado com radioisótopo usando-se técnicas descritas em *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 e 2, Coligen *et al.*, Ed. Wiley-Interscience, Nova York, Pubs. (1991) por exemplo, e a radioatividade pode ser
25 medida usando-se contagem cintilante.

(b) Partículas de ouro coloidais.

(c) Marcadores fluorescentes incluem, mas não estão limitadas a, quelatos de raros-terra (quelatos európio), Texas Red,

rodamina, fluorescina, dansil, Lisamina, umbelífero, ficocriterina, ficocianina ou fluoróforos disponíveis comercialmente tais como SPECTRUM ORANGE7 e SPECTRUM GREEN7 e/ou derivados de qualquer um dos acima. Os marcadores fluorescentes podem ser conjugadas ao anticorpo usando-se técnicas divulgadas em *Current Protocols in Immunology*, acima, por exemplo. A fluorescência pode ser quantificada usando-se um fluorímetro.

(d) Vários marcadores enzima-substrato estão disponíveis e a patente US 4.275.149 fornece uma revisão de alguns destes. A enzima geralmente catalisa uma alteração química do substrato cromatogênico que pode ser medida usando-se várias técnicas. Por exemplo, a enzima pode catalisar uma alteração de cor em um substrato que pode ser medido espectrofotometricamente. Alternativamente, a enzima pode alterar a fluorescência ou quimioluminescência do substrato. Técnicas para quantificar uma alteração na fluorescência estão descritas acima. O substrato quimioluminescente torna-se eletronicamente excitado por uma reação química e pode então emitir luz, a qual pode ser medida (usando-se um quimioluminômetro, por exemplo) ou doando energia a um receptor fluorescente. Exemplos de marcadores enzimáticos incluem luciferases (por exemplo, luciferase de vagalume e luciferase de bactérias; patente US 4.737.456), luciferina, 2,3-desidroftalazinedionas, malato desidrogenase, urease, peroxidase tal como peroxidase de rábano silvestre (*horseradish*) (HRPO), fosfatase alcalina. β -galactosidase, glucoamilase, lisozima, sacarídeos oxidases (por exemplo, glicose oxidase, galactose oxidase, e glicose-6-fosfate desidrogenase), oxidases heterocíclicas (tais como uricase e xantina oxidase), lactoperoxidase, microperoxidase e similares. Técnicas para conjugar enzimas a anticorpos estão descritas em O'Sullivan *et al.*, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in*

Enzyme Immunoassay, in *Methods in Enzym.* (ed. J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, Nova York, 73:147-166 (1981).

Exemplos de combinações enzima-substrato incluem, por exemplo:

5 (i) Peroxidase de rábano silvestre (HRPO) com peroxidase hidrogenada como um substrato, em que a peroxidase hidrogenada oxida um precursor de cor (por exemplo, ortofenileno diamina (OPD) ou 3,3',5,5'-tetrametil benzidina hidrocloreto (TMB));

(ii) fosfatase alcalina (AP) com *para*-Nitrofenil fosfato como
10 substrato cromatogênico; e

(iii) β -D-galactosidase (β -D-Gal) com um substrato cromatogênico (por exemplo, *p*-nitrofenil- β -D-galactosidase) ou substrato fluorogênico (por exemplo, 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidase).

Diversas outras combinações enzima-substrato estão disponíveis
15 para aqueles técnicos no assunto. Para revisão destas, ver, por exemplo, patentes US 4.275.149 e US 4.318.980. Algumas vezes, o marcador é indiretamente conjugado com o anticorpo. Um técnico no assunto pode ter conhecimento de diversas técnicas para alcançar isto. Por exemplo, o anticorpo pode ser conjugado com biotina e qualquer uma das quatro amplas
20 categorias de marcadores mencionados acima podem ser conjugados com avidina ou vice-versa. Biotina liga-se seletivamente à avidina e então, o marcador pode ser conjugado com o anticorpo desta maneira indireta. Alternativamente, para alcançar conjugação indireta do marcador com o anticorpo, o anticorpo é conjugado com um pequeno hapteno, e um dos
25 diferentes tipos de marcadores mencionados acima é conjugado com um anticorpo anti-hapteno. Então, conjugação indireta do marcador com o anticorpo pode ser alcançada.

Com exceção da preparação da amostra dos procedimentos

discutidos acima, além disso, tratamento do corte do tecido anterior a, durante ou seguindo IHC pode ser desejado, por exemplo, métodos de recuperação de epítopo, tal como aquecimento da amostra de tecido em tampão citrato pode ser realizado (ver, por exemplo, Leong *et al. Appl. Immunohistochem.* 4(3):201 (1996)).

Seguindo uma etapa de bloqueio opcional, o corte de tecido é exposto a anticorpo primário por um período de tempo suficiente e sob condições adequadas tal como o anticorpo primário liga-se ao antígeno de proteína alvo na amostra de tecido. Condições apropriadas para alcançar isto podem ser determinadas por experimento de rotina. A extensão de ligação de anticorpo para a amostra é determinada pelo uso de qualquer um dos marcadores detectáveis discutidos acima. Preferivelmente, o marcador é um marcador enzimático (por exemplo, HRPO) que cataliza uma alteração química do substrato cromatogênico tal como 3,3"-diaminobenzidina cromógeno. Preferivelmente o marcador enzimática é conjugado ao anticorpo que se liga especificamente ao anticorpo primário (por exemplo, o anticorpo primário é anticorpo policlonal de coelho e anticorpo secundário é anticorpo anti-coelho de cabra).

Opcionalmente, os anticorpos empregados na análise de IHC para detectar expressão de GalNac-T14 são anticorpos anti-GalNac-T14. Alternativamente, anticorpos para outros antígenos GalNac-T que têm interação com GalNac-T14 podem ser empregados. Opcionalmente, o anticorpo anti-GalNac-T14 é um anticorpo monoclonal.

Espécimes deste modo preparadas podem ser montadas e cobertas com vidro. Avaliação da lâmina é então determinada, por exemplo, usando-se um microscópio, e critério de intensidade de coloração, rotineiramente usado na técnica, pode ser empregado. Critério de intensidade de coloração pode ser avaliado como segue:

TABELA 1

Padrão de Coloração	Pontuação
Nenhuma coloração é observada nas células.	0
Coloração fraca/difícilmente perceptível é detectada em mais que 10% das células.	1+
Coloração fraca a moderada é observada em mais que 10% das células.	2+
Coloração moderada a forte é observada em mais que 10% das células.	3+

Tipicamente, uma pontuação padrão de coloração de aproximadamente 2+ ou superior em tal teste IHC, acredita-se ser preditiva ou indicativa de sensibilidade de uma célula de mamífero (tal como uma célula cancerígena de mamífero) a Apo2L/TRAIL ou um anticorpo agonista de receptor de morte.

Em métodos alternativos, a amostra pode ser contatada com um anticorpo específico para dito marcador sob condições suficientes para um complexo anticorpo-biomarcador formar e então detectar dito complexo. A presença do biomarcador pode ser realizada de diversas maneiras, tal como por Western blotting (com ou sem imunoprecipitação) e procedimentos de ELISA para testar uma ampla variedade de tecidos e amostras, incluindo plasma ou soro. Uma ampla variedade de técnicas de imunoensaio usando tal formato de teste está disponível, ver, por exemplo, patentes US 4.016.043, US 4.424.279 e US 4.018.653. Estes incluem tanto testes de sítio único e dois sítios como "sanduíche" de tipos não competitivos, assim como nos testes de ligação competitivos tradicionais. Estes testes também incluem ligação direta de um anticorpo marcado a um biomarcador alvo.

Testes sanduíche estão entre os testes mais funcionais e freqüentemente usados. Existem inúmeras variações da técnica de teste

sanduíche, e todas têm a intenção de ser engobladas pela presente invenção. Resumidamente, em um teste avançado típico, um anticorpo não marcado é imobilizado em um substrato sólido, e a amostra a ser testada trazida em contato com a molécula ligada. Após um período adequado de incubação, por um período de tempo suficiente para permitir formação de um complexo anticorpo-antígeno, um segundo anticorpo específico ao antígeno, marcado com uma molécula repórter capaz de produzir um sinal detectável é então adicionada e incubada, permitindo tempo suficiente para a formação de outro complexo de anticorpo anticorpo-antígeno-marcador. Qualquer material não relacionado é tirado lavado, e a presença do antígeno é determinada por observação de um sinal produzido pela molécula repórter. Os resultados podem ser tanto qualitativos, pela simples observação do sinal visível, como podem ser quantificados pela comparação com a amostra controle que contém quantidades conhecidas de biomarcador.

Variações nos testes avançados incluem um teste simultâneo, no qual ambos, amostra e anticorpo marcado são adicionados simultaneamente ao anticorpo ligado. Estas técnicas são bem conhecidas pelos técnicos no assunto, incluindo qualquer variação menor à medida que seria visível de imediato. Em um teste sanduíche avançado típico, um primeiro anticorpo tendo especificidade para o biomarcador é tanto ligado covalentemente como de forma passiva a uma superfície sólida. A superfície sólida é tipicamente vidro ou um polímero, a mais comumente usada polímeros sendo celulose, poliacrilamida, nylon, poliestireno, cloreto de polivinil ou polipropileno. O suporte sólido pode ser na forma de tubos, gotas, discos de microplacas, ou qualquer outra superfície adequada para conduzir um imunoensaio. Os processos de ligação são bem conhecidos na técnica e geralmente consiste de interligação de ligação covalente ou adsorção física, o complexo polímero-anticorpo é lavado em preparação para a amostra teste. Uma alíquota da

amostra a ser testada é então adicionada ao complexo de fase sólida e incubada por um período de tempo suficiente (por exemplo, 2-40 minutos ou durante a noite se mais conveniente) e sob condições adequadas (por exemplo, desde temperatura ambiente a 40°C assim como entre 25° C e 32° C inclusive) para permitir ligação de qualquer subunidade presente no anticorpo. Seguindo o período de incubação, a subunidade de anticorpo de fase sólida é lavada e seca e incubada com um segundo anticorpo específico para uma porção do biomarcador. O segundo anticorpo é ligado a uma molécula repórter que é usado para indicar a ligação do segundo anticorpo ao marcador molecular.

Um método alternativo envolve imobilização de biomarcadores alvo na amostra e então exposição ao alvo imobilizado para anticorpo específico o qual pode ou não pode ser marcado com uma molécula repórter. Dependendo da quantidade de alvo e a força do sinal da molécula repórter, um alvo ligado pode ser detectável por marcação direta com o anticorpo. Alternativamente, um segundo anticorpo marcado, específico para o primeiro anticorpo é exposto ao complexo anticorpo alvo-primário para formar um complexo anticorpo terciário anticorpo-secundário alvo-primário. O complexo é detectado pelo sinal emitido pela molécula repórter. Por “molécula repórter” como usado no presente relatório descritivo, entende-se uma molécula a qual, pela natureza química, fornece um sinal identificável analicamente o qual permite a detecção de anticorpo antígeno ligado. As moléculas repórteres mais comumente usadas neste tipo de teste são tanto enzimas, fluoróforos como moléculas contendo radionuclídeo (isto é, radioisótopos) e moléculas quimioluminescentes.

No caso de um imunoensaio de enzima, uma enzima é conjugada ao segundo anticorpo, geralmente por meio de glutaraldeído ou periodato. Como será reconhecido prontamente, no entanto, uma ampla variedade de

técnicas de conjugação diferente, as quais estão prontamente disponíveis para o técnico no assunto. Frequentemente enzimas usadas incluem peroxidase de rábano silvestre, glicose oxidase, galactosidase e fosfatase alcalina, entre outras. Os substratos a serem usados com as enzimas específicas são

5 geralmente escolhidos para a produção, sob hidrólise pela correspondente enzima, de uma alteração de cor detectável. Exemplos de enzimas adequadas incluem fosfatase alcalina e peroxidase. É possível também empregar substratos fluorogênicos, que rende um produto fluorescente ao invés de substratos cromogênicos apontados acima. Em todos os casos, o anticorpo

10 enzima marcada é adicionado ao primeiro complexo anticorpo marcador molecular, permitida a ligação, e então o excesso de reagente é lavado. Uma solução contendo o substrato apropriado é então adicionada ao complexo de anticorpo-antígeno anticorpo. O substrato irá reagir com a enzima ligada ao segundo anticorpo, dando um sinal visual qualitativo, que pode ser também

15 quantificado, usualmente, espectropotometricamente, dar uma indicação da quantidade de biomarcador que estava presente na amostra. Alternativamente, compostos fluorescentes, tais como fluoresceína e rodamina, podem ser quimicamente acoplados aos anticorpos sem alterar suas capacidades de ligação. Quando ativado por iluminação com luz de um

20 comprimento de onda específico, o anticorpo marcado com fluorocromo adsorve a energia da luz, incluindo um estado para excitabilidade na molécula, seguido por emissão da luz em uma característica de cor detectável visualmente com um microscópio de luz. Como no EIA, o anticorpo marcado fluorescente é permitido ligar-se ao primeiro complexo anticorpo-marcador

25 molecular. Após lavagem do reagente não ligado, o complexo terciário remanescente é então exposto à luz do comprimento de onda apropriado, a fluorescência observada indica a presença do marcador molecular de interesse. Imunofluorescência e técnicas EIA são ambas muito bem

conhecidas na técnica. No entanto, outra molécula repórter, tal como radioisótopo, molécula quimioiluminescente ou bioluminescente, podem ser empregadas.

É contemplada que as técnicas acima descritas também podem ser empregadas para detectar expressão de GalNac-T14.

Métodos da invenção, além disto, incluem protocolos que examinam a presença e/ou expressão de mRNA de GalNac-T14 em uma amostra de célula ou tecido. Métodos para a avaliação de mRNAs em células são bem conhecidos e incluem, por exemplo, testes de hibridização usando-se sondas de DNA complementares (tal como hibridização *in situ* usando-se ribosondas GalNac-T14 marcadas, Northern blot e técnicas relacionadas) e diversos testes de amplificação de ácido nucléico (tal como RT-PCR usando-se *primers* complementares para GalNac-T14, e outros métodos de detecção tipo amplificação, tais como, por exemplo, DNA ramificado, SISBA, TMA e similares).

Amostras de células ou tecidos de mamíferos podem ser convenientemente testadas por, por exemplo, mRNAs de GalNac-T14 usando-se análise Northern, dot blot ou PCR. Por exemplo, testes RT-PCR tal como testes PCR quantitativos são bem conhecidos na técnica. Em uma realização ilustrativa da invenção, um método para detectar um mRNA de GalNac-T14 em uma amostra biológica compreende produzir cDNA a partir da amostra por transcrição reversa usando-se pelo menos um *primer*, amplificando o cDNA então produzido usando-se um polinucleotídeo GalNac-T14 como *primer sense* e *antisense* para amplificar cDNAs de GalNac-T14 neste; e detectar a presença do cDNA de GalNac-T14 amplificado. Além disso, tais métodos podem incluir uma ou mais etapas que permitem alguém determinar os níveis de mRNA de GalNac-T14 em uma amostra biológica (por exemplo, simultaneamente examinando os níveis de uma sequência mRNA controle

comparativa de um gene “housekeeping” tal como um membro da família actina). Opcionalmente, a sequência do cDNA de GalNac-T14 amplificado pode ser determinada.

Realizações materiais deste aspecto da invenção incluem *primers*

5 GalNac-14 e pares de *primer*, que permitem a amplificação específica dos polinucleotídeos da invenção ou de qualquer parte específica disso, e sondas que hibridizam seletivamente ou especificamente moléculas de ácido nucléico da invenção ou qualquer parte disso. Sondas podem ser marcadas com um marcador detectável, tais como, por exemplo, um radioisótopo, composto
10 fluorescente, composto bioluminescente, um composto quimioluminescente, quelante de metal ou enzima. Tais sondas e *primers* podem ser usados para detectar a presença de polinucleotídeos GalNac-T14 em uma amostra e como um meio para detectar uma célula que expressa proteínas GalNac-T14. Como seria entendido pelo técnico no assunto, um grande número de diferentes
15 *primers* e sondas podem ser preparados baseados nas sequências fornecidas no presente e usados efetivamente para amplificar, clonar e/ou determinar a presença e/ou níveis de mRNAs de GalNac-T14.

Opcionalmente métodos da invenção incluem protocolos que examinam ou detectam mRNAs, tal como mRNAs de GalNac-T14, em uma
20 amostra de célula ou tecido por tecnologias de microarranjo. Usando-se microarranjos de ácido nucléico, amostras de teste e controle de mRNA de amostras de tecido de teste e controle são transcritas inversamente e marcadas para gerar sondas de cDNA. As sondas são então hibridizadas para um arranjo de ácidos nucléicos imobilizados em um suporte sólido. O arranjo é
25 configurado de forma que a sequência e posição de cada membro do arranjo seja conhecida. Por exemplo, uma seleção de genes que tem potencial para ser expresso certos estados da doença pode ser arranjada em um suporte sólido. Hibridização de uma sonda marcada com um membro do arranjo

específico indica que a amostra a partir da qual a sonda foi derivada expressa esse gene. A análise de expressão gênica diferente do tecido doente pode fornecer informações valiosas. A tecnologia de microarranjo utiliza técnicas de hibridização e tecnologia de computador para avaliar o perfil de expressão de mRNA de milhares de genes dentro de um único experimento. (ver, por exemplo, documento WO 01/75166 publicado em 11 de outubro de 2001; (ver, por exemplo, patente US 5.700.637, patente US 5.445.934 e patente US 5.807.522, Lockart, *Nature Biotechnology*, 14:1675-1680 (1996); Cheung, V.G. *et al.*, *Nature Genetics* 21(Suppl):15-19 (1999) para uma discussão de fabricação de arranjos). Microarranjos de DNA são arranjos miniatura que contêm fragmentos de gene que são tanto sintetizados diretamente sobre ou ponteados em vidro ou outros substratos. Milhares de genes são usualmente representados em um único arranjo. Um experimento de microarranjo típico envolve as seguintes etapas: 1. preparação de alvo marcado de forma fluorescente a partir de RNA isolado da amostra, 2. hibridização do alvo marcado do microarranjo, 3. lavagem, coloração e escaneamento do arranjo, 4. análise da imagem escaneada e 5. geração de perfis de expressão gênica. Atualmente dois tipos principais de microarranjos de DNA estão sendo utilizados. arranjos de oligonucleotídeos (usualmente 25 a 70 mers) e arranjos de expressão gênica contendo produtos PCR preparados a partir de cDNAs. Na formação de um arranjo, os oligonucleotídeos podem tanto ser pré-fabricados e ponteados na superfície ou sintetizados diretamente na superfície sólida (*in situ*).

O sistema Affymetrix GeneChip® é um sistema de microarranjo disponível comercialmente que compreende arranjos fabricados pela síntese direta de oligonucleotídeos em uma superfície de vidro. Arranjos Sonda/Gene: Oligonucleotídeos, usualmente 25 mers, são diretamente sintetizados em uma lâmina de vidro por uma combinação de fotolitografia baseada em

semicondutor e tecnologias de síntese química de fase sólida. Cada arranjo contém até 400.000 diferentes oligos e cada oligo está presente em milhões de cópias. Visto que sondas de oligonucleotídeo são sintetizadas em locais conhecidos no arranjo, os padrões de hibridização e intensidade de sinal

5 podem ser interpretados em termos de identidade gênica e níveis de expressão relativa pelo programa Integrado de Microarranjo Affymetrix. Cada gene é representado no arranjo por uma série de diferentes sondas de oligonucleotídeo. Cada par de sonda consiste de uma combinação perfeita de oligonucleotídeo e uma combinação mal sucedida de oligonucleotídeo. Uma

10 sonda de combinação perfeita tem uma sequência exatamente complementar para o gene específico e então mede a expressão do gene. A sonda de combinação mal sucedida difere daquela de combinação perfeita por uma única substituição de base na posição de base central, atrapalhando a ligação do gene alvo transcrito. Isto ajuda a determinar a hibridização antecedente e

15 não específica que contribui para o sinal medido para o oligo de combinação perfeita. O programa Integrado de Microarranjo diminui a intensidade de hibridização das sondas de combinação mal sucedida daquelas das sondas de combinação perfeita para determinar o valor de intensidade absoluta ou específica para cada conjunto de sonda. As sondas são escolhidas baseadas

20 em informação atual a partir do Genbank e outros repertórios de nucleotídeo. Acredita-se que as sequências reconheçam regiões exclusivas da terminação 3' do gene. Um forno de hibridização GeneChip (forno "grelha") é usado para realizar a hibridização de até 64 arranjos ao mesmo tempo. A estação de fluidos executa lavagem e coloração dos arranjos de sonda. Isto é

25 completamente automatizado e contém quatro módulos, com cada módulo contendo um arranjo de sonda. Cada módulo é controlado independentemente por meio do programa Integrado de Microarranjo usando protocolos de fluidos programados. O *scanner* é um *scanner* de fluorescência a laser com o mesmo

foco que mede a intensidade de fluorescência emitida pelo cRNA marcado ligado aos arranjos de sonda. A estação de trabalho de computador com o programa Integrado de Microarranjo controla a estação de fluidos e o *scanner*. O programa Integrado de Microarranjo pode controlar até oito estações de fluidos usando hibridização pré-programada, lavagem e protocolos de coloração para o arranjo de sonda. O programa também adquire e converte dados de intensidade de hibridização em uma presença/ausência de convocação para cada gene usando algoritmos apropriados. Finalmente, o programa detecta alterações na expressão gênica entre experimentos pela análise de comparação e formata a produtividade em arquivos .txt, que podem ser usados com outros programas de computador para análise de dados adicionais.

Teste de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) pode também ser usado para detectar expressão do biomarcador mRNA usando-se sondas marcadas. Tais testes são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Kallioniemi, 1992; patente US 6.358.682).

A expressão de um biomarcador selecionado pode também ser avaliada por exame de deleção de gene ou amplificação de gene. Deleção ou amplificação de gene pode ser medida por qualquer um de uma ampla variedade de protocolos conhecidos na técnica, por exemplo, por Southern blotting convencional, Northern blotting para quantificar a transcrição de mRNA (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)), dot blotting (análise de DNA), ou hibridização *in situ* (por exemplo, FISH), usando-se uma sonda marcada apropriadamente, métodos de citogenética ou hibridização genômica comparativa (CGH) usando-se uma sonda marcada apropriadamente. A título de exemplo, estes métodos podem ser empregados para detectar deleção de amplificação de genes GalNac-T14.

Adicionalmente, pode-se examinar a posição de metilação do

biomarcador, tal como gene GalNac-T14, em uma amostra de célula ou tecido. Desmetilação anormal e/ou hipermetilação de ilhas CpG nas regiões regulatórias 5' do gene freqüentemente ocorrem em células imortalizadas e transformadas, e podem resultar em alteração de expressão de vários genes.

5 Uma variedade de testes para exame de posição de metilação de um gene é bem conhecida na técnica. Por exemplo, pode-se utilizar, na abordagem de hibridização Southern, enzimas de restrição sensíveis a metilação que não podem clivar sequências que contêm sítios CpG metilados para avaliar a posição de metilação de ilhas CpG. Além disso, MSP (PCR específico para metilação) pode rapidamente traçar o perfil da posição de metilação de todos os sítios CpG presentes em uma ilha CpG de um dado gene. Este procedimento envolve modificação inicial de DNA por bissulfito de sódio (que irá converter todas citocinas não metiladas em uracil) seguido por amplificação usando-se *primers* específicos para DNA metilado *versus* não metilado.

10 Protocolos envolvendo interferência de metilação podem também ser encontrados, por exemplo, em Current Protocols In Molecular Biology, Unit 12, Frederick M. Ausubel *et al.* eds., 1995; De Marzo *et al.*, *Am. J. Pathol.* 155(6): 1985-1992 (1999); Brooks *et al.*, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1998, 7:531-536); e Lethe *et al.*, *Int. J. Cancer* 76(6): 903-908 (1998).

20 Expressão de GalNac-T14 em uma amostra de célula ou tecido pode também ser examinada a título de testes baseados na atividade ou funcionais. Por exemplo, pode-se conduzir testes conhecidos na técnica para determinar ou detectar a presença de dada atividade N-aetilgalactosaminiltransferase enzimática na amostra de célula ou tecido. (ver, por exemplo, Bennett *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:17006-17012 (1996); Wang *et al.*, *BBRC*, 300:738-744 (2003); Hang *et al.*, acima, disponível em maio de 2005 em www.sciencedirect.com.

Nos métodos da presente invenção, é contemplada que a

amostra de célula ou tecido pode também ser examinada para a expressão de Apo2L/TRAIL ou receptores na amostra que se liga ao Apo2L/ TRAIL ou anticorpo de receptor de morte. Conforme descrito acima e na técnica, acredita-se atualmente que Apo2L/TRAIL liga-se a pelo menos cinco diferentes receptores: DR4, DR5, DcR1, DcR2 e OPG. Usando-se métodos conhecidos na técnica, incluindo aqueles descritos no presente, a expressão de Apo2L/TRAIL, DR4, DR5, DcR1, DcR2 e/ou OPG pode ser detectada nos níveis de mRNA e nos níveis de proteína. A título de exemplo, as técnicas IHC descritas acima podem ser empregadas para detectar a presença de um dos membros de tais moléculas na amostra. É contemplado que em métodos em que um tecido ou amostra está sendo examinado não somente para a presença de marcador GalNac-T14, mas também para a presença, por exemplo, de DR4, DR5 ou DcR1, lâminas separadas podem ser preparadas a partir do mesmo tecido ou amostra, e cada lâmina testada com um reagente específico para cada biomarcador ou receptor específico. Alternativamente, uma única lâmina pode ser preparada a partir da amostra de célula ou tecido, e anticorpos direcionados para cada biomarcador ou receptor podem ser usados na conexão com um protocolo de coloração multicolor para permitir visualização e detecção dos respectivos biomarcadores ou receptores.

Após a determinação que a amostra de célula ou tecido expressa GalNac-T14 indicando que a amostra de célula ou tecido será sensível a Apo2L/TRAIL ou anticorpo de receptor de morte, é contemplado que uma quantidade eficaz do Apo2L/TRAIL ou anticorpo de receptor de morte pode ser administrado a um mamífero para tratar uma disfunção, tal como câncer ou disfunção imune relacionada que aflige o mamífero. O diagnóstico de várias condições patológicas em mamíferos descritas no presente pode ser feito por médicos técnicos no assunto. Técnicas de diagnóstico que estão disponíveis na técnica permitem, por exemplo, o diagnóstico ou detecção de câncer ou

doença imune relacionada em um mamífero. Por exemplo, cânceres podem ser identificados por meio de técnicas, incluindo mas não limitado a, palpação, análise de sangue, raio X, NMR e similares. Doenças imune relacionadas podem também ser facilmente identificadas.

5 O Apo2L/TRAIL ou anticorpo de receptor de morte pode ser administrado de acordo com métodos conhecidos, tal como administração intravenosa como um *bolus* ou por infusão contínua por um período de tempo, por rotas intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinhal, subcutânea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, ou inalação. Opcionalmente, a
10 administração pode ser realizada através de mini-bomba de infusão usando-se vários dispositivos disponíveis comercialmente.

Dosagens eficazes e programação para administração de Apo2L/TRAIL ou anticorpo receptor de morte pode ser determinada empiricamente, e tais determinações estão dentro do estado da técnica.
15 Dosagens únicas ou múltiplas podem ser empregadas. Acredita-se atualmente que uma dosagem eficaz ou quantidade de Apo2L/TRAIL usado sozinho possa variar de aproximadamente 1 mg/kg a cerca de 100 mg/kg do peso corporal ou mais por dia. Escalas de dosagens entre espécies podem ser preparadas de um modo conhecido na técnica, por exemplo, como divulgado em Mordenti *et al.*, *Pharmaceut. Res.*, 8:1351 (1991).
20

Quando administração *in vivo* de Apo2L/TRAIL é empregada, quantidades normais de dosagem podem variar de aproximadamente 10 ng/kg até 100 mg/kg de peso corporal do mamífero ou mais por dia, preferivelmente cerca de 1 µg/kg/dia a 10 mg/kg/dia, dependendo da rota de administração.
25 Orientações para dosagens específicas e métodos de entrega são fornecidos na literatura; ver, por exemplo, patente US 4.657.760; US 5.206.344; ou US 5.225.212. É antecipado que diferentes formulações serão eficazes para diferentes compostos do tratamento e diferentes disfunções, que a

administração que atinge um órgão ou tecido, por exemplo, pode necessitar distribuição de um modo diferente daquela para outro órgão ou tecido.

É contemplado que terapias adicionais ainda podem ser empregadas nos métodos. Uma ou mais outras terapias podem incluir, mas
5 não estão limitadas a, administração de terapia de radiação, citocina(s), agente(s) inibitório de crescimento, agente(s) quimioterápico(s), agente(s) citotóxico(s), inibidores tirosina quinase, inibidores ras farnesil transferase, inibidores de angiogênese, e inibidores quinase dependente de ciclina que são conhecidos na técnica e, além disso, definidos com particularidade acima. É
10 contemplado que tais outras terapias podem ser empregadas como um agente separado do Apo2L/TRAIL ou anticorpo de receptor de morte. Além disso, terapias baseadas em anticorpo terapêuticos que atingem antígenos de tumor tal como RituxanTM ou HerceptinTM como também anticorpos anti-angiogênicos tal como anti-VEGF.

15 Preparação e programação de dosagens para agentes quimioterápicos podem ser usadas de acordo com instruções do fabricante ou como determinado empiricamente por um técnico no assunto. A preparação e programação de dosagens para tal quimioterapia estão também descritas em *Chemotherapy Service* Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD
20 (1992). O agente quimioterápico pode preceder, ou seguir administração do Apo2L/TRAIL, anticorpo receptor de morte, e/ou pode ser dado simultaneamente com estes.

Pode ser também desejável administrar anticorpos contra outros antígenos, tal como anticorpos que se ligam a CD20, CD11a, CD18, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, ou fator endotelial vascular (VEGF) ou outros membros
25 da família TNFR (tais como OPG, TNFR1, TNFR2, GITR, Apo-3, TACI, BCMA, BR3) Alternativamente, ou além disso, dois ou mais anticorpos que se ligam ao mesmo, ou dois ou mais antígenos diferentes divulgados no presente

podem ser co-administrados ao paciente. Algumas vezes, pode também ser benéfico administrar uma ou mais citocinas ao paciente. Seguindo a administração, as células tratadas *in vitro* podem ser analisadas. Onde existiu tratamento *in vivo*, um mamífero tratado pode ser monitorado de várias maneiras bem conhecidas por técnicos no assunto. Por exemplo, células de tumor podem ser examinadas patologicamente para testar necrose ou o soro pode ser analisado para respostas do sistema imune.

Para uso nos pedidos descritos ou sugeridos acima, kits ou artigos de fabricação são também fornecidos pela invenção. Tais kits podem compreender um meio veículo sendo compartimentalizado para receber em confinamento fechado um ou mais meios recipientes tais como frascos, tubos e similares, cada meio recipiente compreendendo um dos elementos separados para ser usado no método. Por exemplo, um dos meios recipientes pode conter uma sonda que é ou pode ser detectável marcada. Tal sonda pode ser um anticorpo ou polinucleotídeo específico para proteína GalNac-T14 ou um gene GalNac-T14 ou mensagem, respectivamente. Onde o kit utiliza hibridização de ácido nucléico para detectar ácido nucléico alvo, o kit pode também ter recipientes contendo nucleotídeo(s) para amplificação da sequência de ácido nucléico alvo e/ou um recipiente contendo um meio repórter, tal como uma proteína de ligação de biotina, tal como avidina ou estreptavidina, ligada a uma molécula repórter, tal como um marcador enzimático, fluorescente ou radioisótopo.

O kit da invenção tipicamente irá compreender o recipiente descrito acima e um ou mais recipientes contendo materiais comerciais desejáveis do ponto de vista do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e bulas com instruções para uso. Um marcador pode estar presente no recipiente para indicar que a composição é usada para uma terapia específica ou aplicação não terapêutica, e pode também indicar

direções tanto para uso *in vivo* como *in vitro*, da forma como descrito acima.

Os kits da invenção têm uma variedade de realizações. Uma realização típica é um kit que compreende um recipiente, um rótulo em dito recipiente, e uma composição contida dentro de dito recipiente; em que a
5 composição inclui um anticorpo primário que se liga a uma sequência de polipeptídeo de GalNac-T14, o rótulo em dito recipiente indica que a composição pode ser usada para avaliar a presença de proteínas GalNac-T14 em pelo menos um tipo de célula de mamífero, e instruções para usar GalNac-T14 para avaliar a presença de proteínas em pelo menos um tipo de célula de
10 mamífero. O kit pode também compreender um conjunto de instruções e materiais para preparar uma amostra de tecido e aplicar o anticorpo e sonda no mesmo corte de uma amostra de tecido. O kit pode incluir tanto um anticorpo primário como secundário, em que o anticorpo secundário é conjugado a um marcador, por exemplo, um marcador enzimático.

15 Outra realização é um kit que compreende um recipiente, um rótulo em dito recipiente, e uma composição contida dentro de dito recipiente; em que a composição inclui um polinucleotídeo que hibridiza com um complemento do polinucleotídeo de GalNac-T14 sob condições de estringência, o rótulo em dito recipiente indica que a composição pode ser
20 usada para avaliar a presença de GalNac-T14 em pelo menos um tipo de célula de mamífero, e instruções para usar o polinucleotídeo GalNac-T14 para avaliar a presença de proteínas de RNA ou DNA de GalNac-T14 em pelo menos um tipo de célula de mamífero.

Outros componentes opcionais no kit incluem um ou mais
25 tampões (por exemplo, tampão de bloqueio, tampão de lavagem, tampão substrato, etc), outros reagentes tal como substrato (por exemplo, cromogênico) que é quimicamente alterado por um marcador enzimático, solução de restauração de epítopo, amostras controle (controles positivos e/ou

negativos), lâmina(s) controle, etc.

EXEMPLOS

Vários aspectos da invenção são também descritos e ilustrados a título de exemplos que seguem, sendo que nenhum destes têm a intenção de
5 limitar o escopo da invenção.

MÉTODOS E MATERIAIS

CULTURA CELULAR E LINHAGENS CELULARES

As seguintes linhagens celulares humanas: Linhagens de câncer de pulmão de célula não-pequena (NSCLC): H2122, A427, H647, SK-MES-1,
10 H838, H358, H2126, H460, H1703, H2405, H650, H1568, H1666, H322T, SW1573, H292, H1650, H522, EKVX, H661, H23, LXFL 529, H226, A549, H1781, H1299, HOP 62, H2009, HOP 92, H1793, H1975, H1651, calu-1, H1435, HOP 18, H520, H441, H2030, H1155, H1838, H596, HLFa; linhagens de câncer pancreático: Panc 05.04, BxPC3, HPAC, SU.86.86, HuP-T3, PSN1,
15 Panc 08.13, MiaPaCa-2, PA-TU-8988T, Panc 03.27, Capan-1, SW 1990, CFPAC-1, PA-TU-8902, Panc 02.03, Panc 04.03, PL45, Aspc-1, Hs766T, Panc 10.05, Panc1, Capan-2, HPAF-II and NHL: JEKO-1, SU-DHL-4, OCI-LY-19, SR, Farage, DOHH-2, Toledo, WSU-NHL, KARPAS-422, GRANTA-519, Pfeiffer, HT, SC-1, DB. As linhagens celulares foram obtidas do Depósito
20 ATCC (Manassas, Virgínia), DSMZ (Coleção Alemã de Microorganismos e Culturas Celulares), JCRB (Banco Japonês de Fontes de Células) ou ECACC (Coleção Européia de Culturas Celulares) e cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 2 mM de L-glutamina e 10 mM de HEPES.

TESTES DE CITOTOXICIDADE

25 O teste MTT (CellTiter 96® Teste de Proliferação Celular Não Radioativo da Promega), que é um teste colorimétrico baseado na habilidade de células viáveis em reduzir um sal tetrazólio amarelo solúvel (MTT) em

cristais azuis formazano), foi usado para determinar a quantidade de células viáveis após tratamento com Apo2L/TRAIL ou anticorpo DR5. O teste MTT foi realizado pela adição de uma solução corante otimizada pré-misturada para cultivar poços de uma placa de 96 poços contendo várias concentrações (0 a 5 1000 ng/ml) de Apo2L/TRAIL ou anticorpo DR5. Durante 4 horas de incubação, células vivas convertem o componente tetrazólio da solução corante em um produto formazano. A solução de solubilização/parada foi então adicionada aos poços de cultura para solubilizar o produto formazano, e a absorbância a 570 nm foi registrada usando-se um leitor de placa de 96 poços 10 (SpectraMax). A leitura de absorbância a 570 nm lida é diretamente proporcional ao número de células normalmente usado nos testes de proliferação. Embora a absorbância máxima para o produto formazona seja 570 nm e as soluções puras pareçam azuis, a cor no final do teste pode não ser azul e depende da quantidade de formazona presente relativa a outros 15 componentes (incluindo soro, fenol vermelho acidificado e MTT não reduzido) no meio de cultura.

Os números de células foram otimizados pela realização de uma titulação celular para produzir um teste sinal perto do final mais alto da variação linear do teste. Visto que tipos celulares diferentes possuem níveis 20 diferentes de atividade metabólica, isto foi feito para cada linhagem celular separadamente. Para a maioria das células tumorais, 5000 células por poço a 20.000 células por poço foram usadas.

O que segue é uma descrição passo a passo dos testes empregados:

25 1. As células usadas para o bioensaio eram de estoque de culturas.

2. Determinação do número de células e viabilidade azul de tripan, e suspensão das células para um número final de 5.000 a 20.000

células por poço.

3. Distribuídos 50 µl da suspensão celular em placas de 96 poços.

4. Incubação das placas a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ durante a noite.

5. Adição de 50 µl de meio de cultura contendo várias concentrações variando de 0 a 1000 ng/ml de Apo2L/TRAIL ou anticorpo DR5 para amostras das placas de 96 poços. Os controles foram 50 µl de meio de cultura (sem Apo2L/TRAIL ou anticorpo DR5) e 100 µl de meio de cultura (sem células).

10 Todo experimento foi realizado em um conjunto triplicado de poços e em três dias independentes. O total de volume dos poços foi 100 µl/poço.

6. Incubação das placas a 37°C por 72 horas em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

15 7. Adição de 15 µl de solução corante para cada poço.

8. Incubação das placas a 37°C por até 4 horas em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

9. Adição de 100 µl da solução de solubilização/parada para cada poço.

20 10. Incubação das placas durante a noite a 37°C na noite anterior.

11. Registro da absorbância a um comprimento de onda de 570 nm usando-se um leitor de placa de 96 poços. Uma referência de comprimento de onda de 750 nm foi usada para reduzir fundo causado por fragmentos celulares, impressão digital outra absorbância não específica.

25 12. A média dos valores da absorbância para o controle negativo foi usada como um valor vazio e subtraídos de todas as outras leituras. A média dos valores de absorbância para cada concentração de

Apo2L/TRAIL ou anticorpo DR5 foi dividida pela média dos valores de absorbância do controle positivo (células 100% viáveis – não tratadas) para calcular a quantidade de células viáveis (em %).

13. A porcentagem de células viáveis (eixo Y) versus a
5 concentração de Apo2L/TRAIL ou anticorpo DR5 (eixo X, escala log) foi plotada e o valor IC50 foi determinado pela localização do valor do eixo X (ng/ml) correspondendo a 50 % de células viáveis.

PROTOCOLO DE MARCAÇÃO AFFYMETRIX

Uma leitura OD260/280 foi feita para todas as amostras e as
10 amostras foram corridas no BioAnalyser. 5 µg de RNA total de alta qualidade foi usado.

A. Síntese Da Primeira Fita de cDNA:

1. Hibridização *primer*

DEPC-H₂O x µl Misturar por turbilhonamento. Girar rápido.

15 RNA (5 ug) y µl Incubar a 70°C por 10 minutos.

Aumento (1:4 dil de estoque para 5 ug) 1 µl Girar rápido e
colocar no gelo

T7-(dT)24 *primer* 1 µl

volume 12 µl

20 2. Ajuste de temperatura

5X- tampão de reação da 1ª fita de cDNA 4 µl

Adicionar 7 µl (da mistura à esquerda) para cada amostra.

0,1 M DTT 2 µl Misturar por *vortexing*. Girar rápido.

10 mM de mistura dNTP 1 µl Incubar a 42°C por 2 minutos.

25 volume 7 µl

3. Síntese Da Primeira Fita

Adicionar 1 µl de SSII RT para cada amostra.

SSII RT 1 µl Misturar por pipetagem para cima e para

baixo -OR- turbilhonar levemente.

Girar rápido.

Volume total 20 µl Incubar a 42°C por 1 hora.

B. Síntese Da Segunda Fita de cDNA

- 5 1. Colocar as reações da Primeira Fita no gelo. Centrifugar brevemente para trazer para baixo a condensação nas laterais do tubo.
2. Fazer a seguinte mistura da Segunda fita máster.

H₂O tratada com DEPC 91 µl

5X- Tampão de reação da 2ª fita 30 µl

10 mM de mistura dNTP 3 µl

10 U/µl de DNA Ligase 1 µl

10 U/µl de DNA Polimerase 4 µl

2 U/µl de RNA H 1 µl

Volume total 130 µl
- 15 3. Adicionar 130 µl da mistura master da Segunda fita a 20 µl da primeira fita de cDNA. (Volume final = 150 µl)
4. Misturar por pipetagem para cima e para baixo -OR- por turbilhonamento leve. Girar rápido.
5. Incubar a 16°C por 2 horas em um banho-maria resfriado.
- 20 6. Adicionar 2 µl [10 U] T4 de DNA Polimerase. Misturar por pipetagem para cima e para baixo -OR- turbilhonar levemente. Girar rápido.
7. Incubar por 5 minutos a 16°C.
8. Adicionar 10 µl de 0,5 M EDTA. Turbilhonar levemente. Girar rápido.
9. Prosseguir para os procedimentos de limpeza para cDNA -OR- estocar a
- 25 - 20°C para uso posterior.

Limpar a Fita Dupla de cDNA (Módulo de Limpeza de Amostra GeneChip)

1. Adicionar 600 µl de Tampão de Ligação de cDNA para os 162 µl finais de preparação de síntese de cDNA de fita dupla.

Misturar por turbilhonamento por 3 segundos.

2. Checar se a cor da mistura é amarela (similar ao Tampão de Ligação de cDNA w/o a síntese de cDNA)

Se a cor da mistura for laranja ou violeta, adicionar 10 µl de 3 M de acetato de sódio, pH 5,0 e misturar.

A cor da mistura irá tornar-se amarela.

3. Aplicar 500 µl da amostra à Coluna Giratória de Limpeza de cDNA incubando em uma Coleção de Tubo de 2ml e centrifugar.

por 1 minuto a $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Descartar o fluxo como lixo perigoso.

4. Recarregar a coluna giratória com a mistura remanescente (262 µl) e centrifugar como acima.

Descartar o fluxo como lixo perigoso e descartar a Coleção de Tubo.

5. Transferir a coluna giratória em uma nova Coleção de Tubo de 2 ml (abastecida). Pipetar 750 µl de Tampão de Lavagem de cDNA

na coluna giratória Centrifugar por 1 minuto a $\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm). Descartar o fluxo.

6. Abrir a tampa da coluna giratória e centrifugar por 5 minutos em velocidade máxima ($\leq 25,000 \times g$). Colocar

as colunas na centrífuga usando toda segunda cesta. Posicionar as tampas sobre a junção da cesta de forma que

elas fiquem orientadas na direção contrária à rotação, isto é, se a rotação for ao sentido horário, orientar as tampas.

em uma direção no sentido horário do contador. Isto evita danos às tampas.

Descartar o fluxo e Coleção de Tubo.

7. Transferir a coluna giratória em uma Coleção de Tubo de 1,5 ml. Pipetar 10 µl de Tampão de Eluição de cDNA diretamente na membrana

de coluna giratória. Assegurar que o tampão de Eluição de cDNA seja distribuído diretamente na membrana.

Incubar por 1 minuto a RT e centrifugar 1 minuto em velocidade máxima ($\leq 25,000\times g$) para eluir.

5 Preparar e ativar a reação IVT

Enzo: Kit de Marcação de Transcrição de RNA Bioensaio de Alto Rendimento (Part No. 900182)

1. Usar 10 μ l da fita dupla de cDNA limpa

2. Fazer a seguinte mistura IVT máster:

10 H₂O Destilada ou Deionizada 12 μ l

10X tampão de reação HY 4 μ l

10x Ribonucleotídeos marcados com Biotina 4 μ l

10X DTT 4 μ l

10X Mistura Inibidora de RNase 4 μ l

15 20X T7 RNA Polimerase 2 μ l

Volume total: 30 μ l

3. Adicionar 30 μ l da mistura master IVT a 10 μ l da fita dupla de cDNA. (Volume Total = 40 μ l)

4. Misturar por pipetagem para cima e para baixo -OR- por turbilhonamento leve. Girar rápido.

5. Imediatamente colocar o tubo em um banho-maria a 37°C. Incubar por 5 horas.

6. Armazenar a -20°C se não purificar o RNA imediatamente.

Limpar o cDNA Marcado com Biotina (Módulo de Limpeza de Amostra

25 GeneChip)

1. Adicionar 60 μ l de H₂O à reação IVT e misturar por turbilhonamento por 3 segundos.

2. Adicionar 350 μ l de Tampão IVT de Ligação de cRNA à amostra,

misturar por turbilhonamento por 3 segundos.

3. Adicionar 250 μ l de etanol (96-100%) ao lisado, e misturar bem por pipetagem. Não centrifugar.

4. Aplicar a amostra (700 μ l) à Coluna Giratória de Limpeza de cDNA IVT

5 incubando em uma coleção de tubo de 2ml.

Centrifugar por 15 segundos a $\geq 8 \times g$ (≥ 10.000 rpm).

5. Passar o eluato através da coluna mais uma vez.

Centrifugar por 15 segundos a $\geq 8 \times g$ (≥ 10.000 rpm).

Descartar o fluxo como lixo perigoso e descartar a coleção de

10 tubo.

6. Transferir a coluna giratória em uma nova Coleção de Tubo de 2 ml (abastecida).

7. Adicionar 500 μ l de tampão IVT de Lavagem de cRNA por 15 segundos a $\geq 8 \times g$ (≥ 10.000 rpm) para lavagem.

15 Descartar o fluxo.

8. Pipetar 500 μ l 80% (v/v) etanol na coluna giratória, e centrifugar por 15 segundos a

$\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm). Descartar o fluxo.

9. Abrir a tampa da coluna giratória e centrifugar por 5 minutos em
20 velocidade máxima ($\leq 25.000 \times g$).

Descartar o fluxo e Coleção de Tubo.

10. Transferir a coluna giratória em uma nova coleção de tubo de 2 ml.

11. Pipetar 11 μ l de água livre de RNase diretamente na membrana da coluna giratória. Deixar descansar por 1 minuto

25 Centrifugar por 1 minuto a velocidade máxima ($\geq 25.000 \times g$) para eluir.

12. Pipetar 10 μ l de água livre de RNase diretamente na membrana da coluna giratória. Deixar descansar por 1 minuto

Centrifugar por 1 minuto a velocidade máxima ($\geq 25.000 \times g$) para

eluir.

Quantificação do cRNA (Produto IVT)

Usar análise espectrofotométrica para determinar o rendimento de RNA.

Aplicar a convenção de que 1 OD a 260 nm equivale a

5 40 µg/ml de RNA.

 Checar a OD a 260 nm e 280 nm para determinar a concentração e pureza da amostra.

 Manter a razão A260/A280 próxima a 2,0 para purificar o RNA (razão entre 1,9 e 2,1 são aceitáveis).

10 Para quantificação do cRNA quando se usando o total de RNA como material de partida, um rendimento de cRNA ajustado pode ser calculado para refletir influência indesejada do RNA total não marcado. Usando-se uma estimativa de 100% de influência indesejada, usar a fórmula abaixo para determinar o rendimento de cRNA ajustado:

15 rendimento de cRNA ajustado = $RNA_m - (total\ RNA_i)(y)$

RNA_m = quantidade de cRNA medida após IVT (µg)

 total RNA_i = quantidade de RNA total de partida (µg)

 y = fração de cDNA de reação usado em IVT

 Fragmentação do cRNA para Preparação Alvo

20 Para fragmentação, usar a concentração de cRNA ajustada.

1. Adicionar 2 µl de 5x Tampão de Fragmentação para cada 8 µl de RNA mais H₂O.

 20 µg de cRNA 1 para 32 µl

 5X Tampão de Fragmentação 8 µl

25 Água livre de RNase para 40 µl

 Volume total: 40 µl

2. Incubar a 94°C por 30 minutos. Imediatamente colocar no gelo seguindo a incubação.

Preparação da Hibridização Alvo

1. Aquecer a 20X Controles de Hibridização Eucarióticos e o Oligo B2 por 5 minutos a 65°C.

Kit Controle de Hibridização Eucariótico GeneChip Affymetrix, Part

5 #900362 (por 150 rxns)

2. Turbilhonar levemente, girar baixo

3. Mistura Master (Assumindo que a concentração de cRNA fragmentado seja 0,5 µg/µl):

	Arranjo Padrão (µl)	Conc. Final
10	15 µg de cRNA fragmentado	30 0,05 µg/µl
	Oligo B2 (3 nM)	5 50 pM
	20x Controle de Aumento (Bio B, C, D, Cre)	15 1,5, 5, 25, 100 pM
	DNA de espermatozoides de arenque	3 0,1 mg/ml
15	BSA acetilado	3 0,5 mg/ml
	Hu cot-1 DNA (1 mg/ml)	30 0,1 mg/ml
	2X Tampão MES Hyb	150 1X
	H ₂ O	64
	Volume Final	300

20 4. Alíquota de 270 µl de mistura master nos tubos e adicionar 30 µl de cRNA fragmentado para cada um. Esta é a mistura de Hibridização

5. Equilibrar as sondas de arranjo para temperatura ambiente imediatamente antes do uso.

6. Preencher a sonda de arranjo 1x Tampão MES Hyb e incubar na grelha do forno por 10 minutos a 45°C, 60 rpm.

7. Aquecer a Mistura de Hibridização em banho-maria a 99°C por 5 minutos.

8. Transferir a Mistura de Hibridização a um banho-maria a 45°C por 5

minutos.

9. Centrifugar a Mistura de Hibridização por 5 minutos em velocidade máxima.

10. Remover o 1x Tampão MES Hyb Buffer da sonda de arranjo.

5 11. Preencher a sonda de arranjo com a cobertura de 200 µl da Mistura de Hibridização.

12. Selar os septos com Tough-Spots.

13. Hibridizar a sonda de arranjo a 45°C, 60 RPM por 19 horas.

14. Lavar, corar e rastrear a sonda de arranjo de acordo com os protocolos

10 Affymetrix.

MATERIAIS AFFYMATRIX

Item Fornecedor Catálogo #

T7-(dT)24 *primer* Biosearch Technologies adaptado

Spikes Controle interno -

15 Sobrescrito II/5X Tampão Primeira Fita/0,1 M DTT Invitrogen 18064-014

5X Tampão Segunda Fita Invitrogen 10812-014

10 mM de dNTP Invitrogen 18427-088

10 U/ul DNA Ligase de *E. coli* Invitrogen 18052-019

20 10 U/ul DNA Polimerase I de *E. coli* Invitrogen 18010-025

2 U/ul de RNase H Invitrogen 18021-071

10 U/ul de T4 DNA Polimerase Invitrogen 18005-025

0,5 M de EDTA Sigma E-7889

Kit de marcação de transcrição de RNA de alto rendimento ENZ

25 Affymetrix ou ENZO 900182 (ENZO)

Módulo de Limpeza de Amostra GeneChip Affymetrix 900371

Albumina de Soro Bovino Acetilado Invitrogen 15561-020

IgG de Cabra – Reagente para Graduação Sigma I-5256

	Anticorpo anti-estreptavidina (cabra), biotinilado	Vector Labs BA-0500	
	R-Ficoeritrina estreptavidina	Sondas Moleculares	S-866
	20X SSPE	BioWhittaker 51214	
	Kit de Controle Eucariótico	Affymetrix	900362
5	Água, Graduação de Biologia Molecular	Ambion	9934
	Cot-1 DNA Humano	Roche1-581-074	
	5 M de NaCl livre de RNase, livre de DNase	Ambion	9760
	Anti-espumante 0-30	SigmaA-8082	
	10% de Tween-20	Pierce Chemical	28320
10	Monodrato de Ácido Livre MES	SigmaM5287	
	Sal de sódio MES	SigmaM3885	
	Sal Dissódico EDTA, solução 0,5 M	SigmaE7889	
	<i>Tough Spots, Label Dots</i>	USA Scientific	9902
	Forno 640 de Hibridização GeneChip	Affymetrix	800139
15	Scanner GeneChip 3000 w/Workstation	Affymetrix	00-0074
	Estação de Fluidos	Affymetrix	00-0081
	Leitor de Código de Barra w/Externo Autoloader	Affymetrix	00-0129

PCR QUANTITATIVO

SÍNTESE DE cDNA

Componente	Volume (uL)
10X Tampão RT	10
25X mistura dNTP	4
10x Primers Aleatórios	10
MultiScribe RT (50U/uL)	5
Água livre de RNase	21
RNA (100 ng)	50
Volume Final	100

20

Condições de Incubação:

25° por 10 minutos

37° por 2 horas

REAÇÃO TAQMAN USANDO DETECTOR DE SEQUENCIAMENTO ABI PRISMA 7700

Componente	Volume (uL)
TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)	25
Sonda TaqMan (20X) (Testes-on-Demand™)	2,5
cDNA (100ng)	2
H ₂ O	20,5
Volume Final	50

Condições de Ciclo Termal:

95° por 10 minutos

5 40 ciclos: 95° por 15 segundos

60° por 1 minuto

Sondas TaqMan Testes-on-Demand™ (sondas TaqMan® MGB, FAM™ marcado com corante)

10 * Amplificação do controle endógeno, GAPDH (concentração da sonda 100nM, concentrações de *primer* de frente e 200nM), foi realizada para padronizar a quantidade de amostra de RNA (cDNA) adicionada a cada reação.

15 A quantificação relativa foi realizada usando-se o método de curva padrão. Para quantificação normalizada para um controle endógeno, curvas padrão foram preparadas tanto para o alvo como referência endógena. Para cada amostra experimental, a quantidade de alvo e referência endógena foi determinada a partir de uma curva padrão apropriada. Então, a quantidade alvo foi dividida pela quantidade referência endógena para obter um valor alvo normalizado. Uma das amostras experimentais serviu como calibrador, ou
20 amostra 1x. Cada um dos valores alvos normalizados foi então dividido pelo valor alvo normalizado calibrador para gerar os níveis de expressão relativa.

RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Os experimentos foram conduzidos usando-se métodos e materiais descritos acima. Os resultados destes experimentos estão ilustrados nas Figuras 5-9, como discutido abaixo.

5 Figura 5 fornece uma tabela sumária IC50 dos dados obtidos na análise de linhagens celulares de câncer de célula de pulmão não-pequena ("NSCLC") para sensibilidade ou resistência à atividade apoptótica de Apo2L (+ 0,5% de soro fetal bovino "FBS" ou 10% de FBS) ou anticorpo monoclonal DR5 "mab", "XL" interligado ou não interligado, (+ 0,5% de soro fetal bovino "FBS"
10 ou 10% de FBS) como medido nos testes de citotoxicidade MTT.

 Figura 6 fornece uma tabela sumária IC50 dos dados obtidos na análise de linhagens celulares de câncer pancreático para sensibilidade ou resistência à atividade apoptótica de Apo2L (+ 0,5% de soro fetal bovino "FBS" ou 10% de FBS) ou anticorpo monoclonal DR5 "mab", "XL" interligado ou não
15 interligado, (+ 0,5% de soro fetal bovino "FBS" ou 10% de FBS) como medido nos testes de citotoxicidade MTT.

 Figura 7 fornece uma tabela sumária IC50 dos dados obtidos na análise de linhagens celulares de câncer de linfoma não-Hodgkin ("NHL") para sensibilidade ou resistência à atividade apoptótica de Apo2L (+ 10% de soro fetal bovino "FBS") ou anticorpo monoclonal DR5 "mab", "XL" interligado ou
20 não interligado, (+ 0,5% de soro fetal bovino "FBS" ou 10% de FBS) como medido nos testes de citotoxicidade MTT.

 Figura 8 fornece uma comparação de sensibilidade ("sen") ou resistência ("RES") de NSCLC selecionado, pancreático e linhagens celulares
25 de câncer NHL para anticorpo DR5 e a correlação para expressão de GalNac-T14, como medido pela expressão de mRNA de GalNac-T14.

 Figura 9 fornece um gráfico de diagrama de barra de vários NSCLC, pancreático, e linhagens celulares NHL classificadas (em ordem

decrecente) pelos níveis de padrões de expressão de mRNA de GalNac-T14.

O programa de morte celular apoptótica desempenha papéis importantes no desenvolvimento e homeostase de organismos multicelulares (Danial *et al.*, *Cell*, 116:205 (2004)). Os estímulos intracelulares podem acionar apoptose por meio da via intrínseca celular que depende de membros da superfamília do gene Bcl-2 para ativar o mecanismo caspase apoptótico (Cory *et al.*, *Nat. Rev. Cancer*, 2:647 (2002)). Certas citocinas que pertencem à superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) podem ativar apoptose por meio da via extrínseca celular, pela interação com alguns receptores que contêm um “domínio de morte” de indução de apoptose (DD) (Ashkenazi *et al.*, *Science*, 281:1305 (1998)). O ligante Fas (FasL) estimula apoptose por meio de Fas (Apo1/CD95), enquanto o ligante de indução de apoptose relacionado ao ligante Apo-2 L/TNF (Apo2L/TRAIL) aciona apoptose por meio do DR4 (TRAIL-R1) e/ou DR5 (TRAIL-R2) (LeBlanc *et al.*, *Cell Death Differ.*, 10:66 (2003)). Pela ligação de seus ligantes cognatos, estes receptores se ligam à molécula adaptadora FADD (domínio de morte associado a Fas), que recruta a caspase 8 iniciadora de apoptose para formar o complexo de sinalização de indução de morte (DISC) (ver, por exemplo, Kischkel *et al.*, *EMBO J.*, 14:5579 (1995); Kischkel *et al.*, *Immunity*, 12:611 (2000)). Associação a DISC estimula caspase-8, que uma após a outra, cliva e ativa proteases efetoras tal como caspase-3, 6, e 7 para executar o programa de morte apoptótica. Em muitos tipos celulares, a intercomunicação para a via intrínseca celular pode também amplificar o sinal de morte extrínseco celular (Scaffidi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:1541 (1999)). Apo2L/TRAIL induz apoptose em uma variedade de tipos celulares de tumor com nenhum ou menor efeito nos tecidos normais, sugerindo que pode ser útil para terapia de câncer (ver, por exemplo, Ashkenazi, *Nat. Rev. Cancer*, 2:420 (2002); Kelley *et al.*, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 4:333 (2004)). Alterações em vários componentes das vias de

apoptose podem reduzir a sensibilidade a Apo2L/TRAIL em linhagens celulares cancerígenas específicas (Igney *et al.*, *Nat. Rev. Cancer*, 2:277 (2002)).

Vários experimentos foram realizados de acordo com os métodos e protocolos estabelecidos abaixo, e os dados estão fornecidos nas Figuras 10-15.

Para examinar a sensibilidade à ativação do receptor, a sobrevivência celular foi testada como uma função da concentração de Apo2L/TRAIL em um painel de linhagens celulares humanas, incluindo 23 adenocarcinomas pancreáticos, 18 melanomas malignos e 36 adenocarcinomas coloretais (Fig. 10A e dados não mostrados). Esta análise classificou 29/77 (38%) das linhagens celulares como altamente ou moderadamente sensível ao Apo2L/TRAIL. A concentração de Apo2L/TRAIL exigida para alcançar 50% de morte celular nestas 29 linhagens celulares variou de 3 a 800 ng/ml, com uma média de 250 ng/ml.

O painel de linhagem celular foi também examinado pelo perfil da expressão gênica, usando-se um microarranjo de conjuntos de sonda de 54.613 genes. Apesar de algumas exceções, câncer pancreático e linhagens celulares de melanoma que mostraram sensibilidade forte ou intermediária para Apo2L/TRAIL expressaram níveis de mRNA significativamente mais altos da enzima ppGalNAcT-14 de O-glicosilação do que linhagens celulares resistentes correspondentes ($p=0.5 \times 10^{-4}$ pelo teste exato de Fisher, corte determinado repetidamente em 750 para carcinoma pancreático e 300 para melanoma) (Fig. 10B). A maioria das linhagens celulares de câncer col retal sensíveis ao Apo2L/TRAIL mostraram alta expressão de mRNA da enzima ppGalNAcT-3 relacionada a O-glicosilação, embora diversas linhagens celulares resistentes também expressaram este gene, resultando em uma diferença fraca, ainda significativa ($p=0,026$, corte determinado em 2000) (Fig. 10C, inferior). Exceções no painel completo foram: (a) 5/29 (17%) das

linhagens celulares que eram sensíveis, ainda expressaram ppGalNAcT-14 ou ppGalNAcT-3 abaixo dos níveis de corte; (b) 16/48 (33%) das linhagens celulares resistentes que apesar de tudo não tiveram níveis de ppGalNAcT-14 ou ppGalNAcT-3 abaixo do corte. Pelo exame da expressão de mRNA de outras enzimas de O-glicosilação nas linhagens celulares coloretais, níveis mais altos de Fut-6 foram detectados em 10/12 (83%) de linhagens celulares sensíveis quando comparado a 6/24 (25%) de resistentes ($p=0,013$; corte determinado a 200) (Fig. 10C, superior). A expressão combinada de ppGalNAcT-14 em câncer pancreático e melanoma com Fut-6 em linhagens celulares coloretais correlacionaram muito fortemente com a sensibilidade ao Apo2L/TRAIL ($p=1.83 \times 10^{-7}$, $N=77$). Este conjunto de genes corretamente previu sensibilidade ou resistência para 23/32 (72%) de linhagens celulares marcadoras positivas e 39/45 (87%) marcadoras negativas, respectivamente.

A sensibilidade ao Apo2L/TRAIL foi também examinada *in vivo* usando-se xenoinxertos de tumor. Um tratamento de 5 dias com Apo2L/TRAIL de camundongos que abrigam tumores derivados de linhagens celulares de câncer coloretal Fut-6-positivas Colo205 e DLD-1 causaram regressão de tumor seguida por uma progressão de tumor muito atrasada (Fig. 10D). Em contraste, tumores derivados de linhagens celulares de câncer coloretal Fut-6-negativas Colo320 e RKO não responderam a este tratamento.

A pré-incubação da linhagem celular ppGalNAcT-3/Fut-6-positiva Colo205 com o total benzil-GalNAc inibidor transferase O-glicosil (Delannoy *et al.*, Glycoconj., 13:717 (1996)) reduziu acentuadamente a sensibilidade ao Apo2L/TRAIL (Fig. 11A), sugerindo uma ligação funcional entre O-glicosilação e sinalização Apo2L/TRAIL. Para também examinar isto, oligonucleotídeos pequenos (si)RNA específicos de interferência foram usados de forma a atingir ppGalNAcT-14, ppGalNAcT-3, ou mRNA Fut-6. Para excluir efeitos fora do alvo, siRNAs múltiplos, não sobrepostos foram sintetizados para cada gene e

verificaram sua habilidade para reduzir expressão alvo por RT-PCR quantitativo (fig. 14A). Nós confirmamos especificidade de siRNA também com um plasmídeo ppGalNacT-14 contendo 6 trocas de nucleotídeos 'silenciosos' dentro da região siRNA atingida (Editorial, *Nat. Cell. Biol.*, 5:489 (2003))(fig. 14B). A transfecção de carcinoma pancreático ppGalNacT-14-positivo PSN-1 e linhagens celulares de melanoma Hs294T com siRNA ppGalNacT-14 reduziu substancialmente a sensibilidade ao Apo2L/TRAIL, enquanto siRNA caspase-8, como esperado, forneceu essencialmente proteção completa (Fig. 11B). De maneira similar, a transfecção de células de câncer colorectal DLD-1 ou C170 com GalNacT-3 ou siRNA Fut-6 diminuiu significativamente a sensibilidade ao Apo2L/TRAIL (Fig. 11C e fig. 14C). No total, siRNA GalNacT-14 reduziu sensibilidade ao Apo2L/TRAIL em 4/5 das câncer pancreático e 2/2 das linhagens celulares de melanoma, enquanto siRNA ppGalNacT-3 ou Fut-6 cada um reduziu a sensibilidade em 2/3 das linhagens celulares de câncer colorectal. Pelo contrário, a transfecção de células PSN-1 ou Hs294T com siRNA GalNacT-14 não alterou a sensibilidade ao etoposídeo inibidor topoisomerase II (fig. 14D). De maneira similar, a transfecção de células PSN-1 ou C170 com GalNacT-14 ou GalNacT-3 não afetou a sensibilidade à estaurosporina inibidor de proteína quinase de espectro mais amplo (fig. 14E). Devido ao fato de tanto ao etoposídeo como estaurosporina estimularem apoptose por meio da via intrínseca celular (Wei *et al.*, *Science*, 292:727 (2001)), estes estudos sugeriram que enzimas de O-glicosilação podem modular sinalização de apoptose por meio da via extrínseca celular.

A transfecção de células HEK293 com ppGalNacT-14 revelou morte celular quando co-transfectadas com DR4 ou DR5, mas não as relacionados a Fas e TNFR1 ou a via intrínseca celular agonista de Bax (Fig. 11D). Além disto, a transfecção ppGalNacT-14 aumentou a sensibilidade Apo2L/TRAIL das linhagens celulares H1568 de melanoma (Fig. 11E) e PA-

TU-8902 e PL-45 de carcinoma pancreático (Fig. 14F), mas não alteraram a sensibilidade ao etoposídeo (dados não mostrados). No total, a superexpressão de GalNAcT-14 sensibilizou 4/7 das linhagens celulares ao Apo2L/TRAIL.

O efeito de siRNA *knockdown* de ppGalNAcT-14 ou Fut-6 foi examinado no processo caspase induzida por Apo2L/TRAIL. Em células PSN-1 e DLD-1 transfectadas com siRNA controle, Apo2L/TRAIL induziu essencialmente processo completo de caspase-8, levando à clivagem de Bid, caspase-9 e caspase-3 (Fig. 12A). Transfecção com siRNA caspase-8 preveniu estes eventos. *Knockdown* de ppGalNAcT-14 em células PSN-1 ou Fut-6 em células DLD-1 também atenuou acentuadamente o processo de caspase-8 induzido por Apo2L/TRAIL, Bid, caspase-9 e caspase-3 (Fig. 12A), e estimulação da atividade de caspase-3/7 (Fig. 12B). RKO resistente ao Apo2L/TRAIL e linhagens celulares de câncer colorectal SW1417, que expressam baixos níveis de ppGalNAcT-3 e Fut-6, mostraram bloqueio similar ao nível do processo de caspase-8 (fig. 15A). Dessa forma, enzimas de O-glicosilação podem modular a via Apo2L/TRAIL a montante de eventos que levam à ativação de caspase-8.

A ativação de caspase-8 requer montagem DISC (Ashkenazi *et al.*, *Science*, 281:1305 (1998)). Análises do Apo2L/TRAIL DISC (Kischkel *et al.*, *Immunity*, 12:611 (2000)) em células PSN-1 e DLD-1 indicaram que *knockdown* de ppGalNAcT-14 ou Fut-6 reduziu o recrutamento de FADD e caspase-8 para o DISC, o processo de atividade enzimática de caspase-8 ligada DISC, e a estimulação de caspase-8 ligada DISC (Sharp *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280:19401 (2005)) (Fig. 12C, 12D, e fig. 15B). Nem siRNA ppGalNAcT-14 ou Fut-6 alteraram substancialmente a quantidade de DR4 e DR5 no DISC, ou a ligação dependente de dose de Apo2L/TRAIL para células PSN-1 ou DLD-1, que expressam tanto DR4 como DR5 (Fig. 12C, fig. 15B, e dados não mostrados).

Dessa forma, ppGalNAcT-14 e Fut-6 não parecem modular apoptose pela influência dos níveis de receptores de superfície celular ou ligação Apo2L/TRAIL. Consistente com isto, a sensibilidade ao Apo2L/TRAIL no painel de linhagem celular 77 não mostrou correlação significativa com a expressão de superfície celular dos cognatos que sinalizam receptores DR4 e DR5 ou receptores isca DcR1 e DcR2 (dados não mostrados). Além disto, muitos siRNAs contra ppGalNAcT-14, ppGalNAcT-3 ou Fut-6 não alteraram os níveis de DR4 e DR5 em células PSN-1, C170 ou DLD-1 (fig. 15C). Dois siRNAs causaram um decréscimo detectável em DR4 e DR5 em certas linhagens celulares (fig. 15C). No entanto, outros siRNAs contra as mesmas enzimas inibiram apoptose induzida por Apo2L/TRAIL sem afetar os níveis dos receptores.

O domínio extracelular (ECD) de DR5 humano foi expresso em células ovarianas de hamster chinês, a proteína secretada purificada, submetida à hidrólise ácida, e os monossacarídeos associados foram analisados (Fig. 13A). Consistente com a ausência de sítios de N-glicosilação preditivos no DR5 ECD, nós não detectamos glicanos N-ligados. Embora, duas amostras de 2 experimentos independentes mostraram 3 moles de GalNAc e 3 moles de Gal por mol de DR5 ECD (Fig. 13A), sugerindo modificação O-ligada de três sítios em DR5 com o centro glicano GalNAc-Gal.

A proteína de O-glicosilação modifica serinas ou treoninas. Usando-se uma ferramenta de bioinformática para previsão dos sítios potenciais de O-glicosilação (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>) (Julenius *et al.*, *Glycobiology*, 15:153 (2005)), nós identificamos duas tais regiões na sequência ECD comum das variantes de junção longa (DR5-L) e curta (DR5-S) de DR5 humano, e um terceiro sítio dentro da região de junção alternativa (Fig. 13B). O primeiro segmento de aminoácido (74-77) tem 3 serinas; o segundo (130-144) tem 5 treoninas, enquanto o terceiro tem 4

treoninas e 3 serinas. DR5 murino tem seqüência similares aos 2 primeiros segmentos, com 2 serinas e 4 treoninas, respectivamente, enquanto DR4 humano também tem 2 seqüência similares que contém 1 serina e 5 treoninas. Para testar se estes sítios podem ser importantes para modificação pós-
5 tradução de DR5, um conjunto de mutantes DR5L e DR5S foram feitos, substituídos por alanina tanto nas 5 treoninas do segmento 130-144 (DR5L-5T, DR5S-5T) como estas mesmas 5 treoninas, como também as 3 serinas do segmento 74-77 (DR5L-5T3S, DR5S-5T3S). Lisados de imunoblot do anticorpo DR5 a partir de células HEK293 transfectadas com DR5L ou DR5S revelaram
10 a presença do DR5L esperado ou bandas DR5S (Fig. 13C). O anticorpo também detectou bandas de peso molecular mais alto (MW), que se tornam mais abundantes sob co-transfecção de DR5L ou DR5S com ppGalNAcT-14 quando comparado ao controle (Fig. 13C, asteriscos). A abundância destas bandas mais altas MW e seu aumento por ppGalNAcT-14 foi diminuída
15 significativamente com DR5L-5T ou DR5S-5T e quase eliminou DR5L-5T3S ou DR5S-5T3S, quando comparado às construções tipo selvagem. Estes resultados sugerem que bandas MW mais altas representam formas O-glicosiladas de DR5: ppGalNAcT-14 promove sua formação, e a eliminação progressiva dos sítios de O-glicosilação previstos pela substituição de alanina
20 gradualmente reverte este efeito. A transfecção de células HEK293 com DR5 murino ou DR4 humano, DR5L, ou DR5S revelou morte celular (Fig. 13D); cada DR5 mutante mostrou menos atividade do que sua construção tipo selvagem correspondente, com DR5S-5T3S (que é desprovido de todos os 3 sítios) que possui a atividade mais fraca. A co-transfecção com ppGalNAcT-14
25 aumentou acentuadamente a morte celular por todas as construções DR4 e DR5 exceto DR5S-5T3S, que mostrou atividade significativamente menor.

A maioria dos tecidos normais e amostras de tumor de câncer de pele, pulmão, pâncreas, mama, ovário, endométrio e bexiga, ou de linfoma

não-Hodgkin mostrou expressão de ppGalNAcT-14 mRNA abaixo dos valores de corte (determinado em 500 para a maioria dos cânceres e 200 para cânceres de pele, Fig. 13E). No entanto, um subconjunto significativo de amostras de tumor, variando de 10% em câncer de mama lobular a 30% em
5 câncer de pulmão e linfoma de célula B grande difuso, mostrou superexpressão de ppGalNAcT-14. Algumas amostras de câncer tiveram níveis de expressão de mRNA maior que 1000 vezes acima dos tecidos normais correspondentes. A expressão dinâmica de ppGalNAcT-14 em câncer sugere que este gene, e possivelmente outras enzimas relacionadas, podem fornecer
10 biomarcadores úteis para identificar tumores com grande sensibilidade ao Apo2L/TRAIL.

Glicanos O-ligados mostram diversidade estrutural extensa, e eles modulam vários aspectos da biologia de proteína de membrana plasmática, incluindo conformação, agregação, trânsito, meia-vida, como
15 também atividade de adesão e sinalização (Hang *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 13:5021 (2005); Hanisch, *Biol. Chem.*, 382:143 (2001)). Células cancerígenas freqüentemente exibem alterações nos perfis O-glicano, criando exclusivos antígenos de carboidrato associados a tumor (Brockhausen, *Biochim. Biophys. Acta*, 1473:67 (1999); Dube *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 4:477
20 (2005); Fuster *et al.*, *Nat. Rev. Cancer*, 5:526 (2005)). O-glicosilação também desempenha um papel importante na estabilização de células tumorais para sítios específicos de metástase (Fuster *et al.*, *Cancer Res.*, 63:2775 (2003); Ohyama *et al.*, *EMBO J.*, 18:1516 (1999); Takada *et al.*, *Cancer Res.*, 53:354 (1993)). Um subconjunto significativo de amostras de tumor primário de uma
25 variedade de cânceres humanos mostra expressão elevada da enzima ppGalNAcT-14 de O-glicosilação, incluindo amostra de células de cólon e coloretal, amostras de células de melanoma e amostras de células de condrosarcoma.

MÉTODOS

MATERIAIS

Os reagentes da cultura celular foram adquiridos da Gibco (Invitrogen/Gibco, Carlsbad, CA), Apo2L/TRAIL solúvel não marcado foi
5 preparado como descrito anteriormente (Lawrence *et al.*, *Nat. Med.*, 7:383 (2001)), o inibidor de glicosilação O-ligado Benzil-a-GalNAc foi adquirido da Calbiochem e todas as outras substâncias químicas (incluindo etoposídeo e estaurosporina) eram da Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

CULTURA CELULAR E LINHAGENS CELULARES

10 Todas as linhagens celulares de carcinoma humano (para nomes e números catalogados ver dados adicionais) foram obtidas da ATCC ou DSMZ (Braunschweig, Germany) e cultivadas a 37°C e 5% CO₂ em RPMI1640 suplementado com 10% de soro de bovino fetal inativado pelo calor, 2 mM L-de glutamina e 10 mM de HEPES sem antibióticos similares à
15 penicilina/estreptomicina. Células de rim embrionárias humanas 293 (número catalogado CRL-1573) foram também obtidas da ATCC e cultivadas em 100% de meio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado com 10% de FBS. A linhagem celular CHO mutante de O-glicosilação, IdID CHO, foi licenciada pelo Dr. Monty Kreiger, MIT (Boston MA).

TESTES DE VIABILIDADE CELULAR E TESTES DE APOPTOSE

20 Para determinar IC₅₀ para Apo2L/TRAIL, as células foram plaqueadas em triplicata em placas de 96 poços, permitidas aderir por 24 horas e então tratadas com Apo2L/TRAIL recombinante em concentrações crescentes, até 1000 ng/ml. Após uma incubação de 72h, elas foram então
25 submetidas a um teste de viabilidade – teste MTT (Pierce) ou Teste de Viabilidade Celular Luminescente CellTiter-Glo (Promega) – de acordo com as instruções do fabricante. Cada experimento de viabilidade celular foi repetido pelo menos três vezes em soro baixo (0,5%) e alto (10% de FBS) e linhagens

celulares sensíveis intermediárias são definidas pela variabilidade entre os IC50s de experimentos independentes ou entre soro alto e baixo. Nós definimos uma linhagem celular como sensível baseado na indução de apoptose de pelo menos 50% das células em uma concentração de Apo2L/TRAIL de 1 ug/ml e como intermediariamente sensível baseado na variabilidade da quantidade de apoptoses induzida em experimentos independentes ou na presença de soro baixo (0,5%) *versus* alto (10%). A apoptose foi quantificada pela análise citométrica de fluxo da porcentagem média de células colhidas (aderente + flutuante no meio) corada com Anexina V (BD Pharmingen).

HIBRIDIZAÇÃO DE MICROARRANJO E ANÁLISE DE DADOS

RNA celular total foi preparado a partir de células não tratadas (3×10^6) usando-se o Kit RNeasy (Quiagen). cRNA marcado foi preparado e hibridizado para microarranjos de oligonucleotídeos (U133P GeneChip; Affymetrix Incorporated, Santa Clara, CA) como previamente descrito (Hoffman *et al.*, *Nat. Rev. Genetics*, 5:229 (2004); Yauch *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 11:8686 (2005)). Arquivos de imagens escaneadas foram analisadas com GENECHIP 3.1 (Affymetrix), Spotfire, GenePattern e Cluster/TreeView. Para identificar os genes mais diferentemente expressados entre linhagens de células sensíveis e resistentes, valores de expressão gênica foram submetidos a um filtro de variação que excluiu genes com variação mínima através das amostras sendo analisadas pelo teste para uma troca e variação absoluta sobre as amostras, comparando a razão de máx e min (máx/min) e diferença entre máx e min (máx-min) com valores pré-definidos e excluindo genes que não obedecem ambas as condições.

CONSTRUÇÃO DE EXPRESSÃO E TRANSDUÇÃO RETROVIRAL

Um fragmento de DNA que codifica ppGalNAcT-14 foi clonado a partir de cDNA agrupado de linhagens celulares sensíveis Apo2L/TRAIL e

inseridas no plasmídeo de expressão pcDNA3.1 (Invitrogen) com um N-terminal *Flag tag*. Esta construção foi então submetida ao sítio dirigido de mutagênese (kit Quikchange Mutagenesis, Stratagene) para gerar mutantes silenciosos siRNA que tinham 4-6 alterações de pares de base balanceadas na seqüência homóloga para o siRNA, sem trocar a seqüência de proteína. As mutações atravessam uma região de 10bp no centro do 19bp da seqüência de ligação de siRNA. As seqüência de DNA para DR5Longo e DR5Curto, DR4, receptor TRAIL murino, DR4, Fas (variante 1), TNFR1 e Bax (variante beta) foram clonadas a partir de *pools* de cDNA e inseridas no vetor de expressão pRK (Genentech). Mutantes O-glicosilação de DR5L e DR5S foram gerados pela mutação sítio-específica de quatro treoninas a resíduos alanina, Mut4xTA (T130, T131, T132, T135) ou cinco treoninas a resíduos alanina Mut5xTA (T130, T131, T132, T135, T143). A transfecção transitória em células HEK293 com construção de expressão de moléculas pró-apoptóticas foram feitas em placas de 6 poços a uma concentração de 0,5 ug/poço da molécula pró-apoptótica e 2,0 ug de ppGalNAcT-14 ou um vetor controle. As células foram transfectadas usando-se Lipofectamina 2000 de acordo com o protocolo do fabricante. Seguindo uma incubação de 48h, as células foram submetidas à análise de apoptose.

Para gerar retrovirais construções ppGalNAcT-14 e mutantes foram clonados no vetor retroviral pQCXIP (Clontech). Sobrenadantes retrovirais de alta titulação foram gerados usando-se linhagem celular auxiliar Φ NX-Ampho. Células empacotadas foram transfectadas usando-se Fosfato de Cálcio (Invitrogen). Os sobrenadantes foram isolados 48h após transfecção e adicionados às células alvo junto com 10 microg/ml de polibreno, seguido por uma etapa de centrifugação de 1h a 2700 rpm para aumentar infecção. Seguindo transdução, as células foram submetidas à seleção com 2 microg/ml de puromicina.

PROJETO siRNA E PROTOCOLOS DE TRANSFEÇÃO

Os siRNAs contra ppGalNAcT-14, ppGalNAcT-3, Caspase-8 e DR5 foram projetados pela Dharmacon (Lafayette, CO) usando seus critérios de seleção de propriedade. As seqüência selecionadas foram:

5 siGalNAcT-14 (1): 5' GACCATCCGCAGTGTATTA-dTdT 3' (=14-4) (SEQ ID NO:15)

 siGalNAcT-14 (2): 5' ATACAGATATGTTCCGGTGA-dTdT 3' (=14-6) (SEQ ID NO:16)

 siGalNAcT-3 (1): 5' CCATAGATCTGAACACGTT-dTdT 3' (=3-2) (SEQ ID NO:17)

 siGalNAcT-3 (2): 5' GCAAGGATATTATACAGCA-dTdT 3' (=3-7) (SEQ ID NO:18)

 siFut-6 (1) 5' GUACCAGACACGCGGCAUA-dTdT 3' (=6-1) (SEQ ID NO:19)

15 siFut-6 (2) 5' ACCGAGAGGUCAUGUACAA-dTdT 3' (=6-2) (SEQ ID NO:20)

 siCaspase-8: 5' GGACAAAGTTTACCAAATG-dTdT 3' (SEQ ID NO:21)

 siRNAs foram adquiridos como oligonucleotídeos RNA de fita dupla e transfectados nas respectivas linhagens celulares a uma concentração de 25 nM para cada siRNA. siRNA dúplex contra uma seqüência não alvo (Dharmacon) foi usado como controle. Células foram transfectadas usando-se Lipofectamine2000 (Invitrogen) por transfecção reversa onde as células foram adicionadas na suspensão aos complexos siRNA lipídeo pré-plaqueados.

25 Concentrações para Lipofectamine2000 eram de acordo com as instruções do fabricante. Após 48h de incubação, as células foram colhidas para análise de mRNA ou incubadas com Apo2L/TRAIL humano recombinante, etoposídeo ou estaurosporina para um adicional 24-72h para testes de viabilidade para 4, 8

ou 24h para análise Western blot.

INIBIÇÃO DE O-GLICOSILAÇÃO COM BENZIL-A-GALNAC

Células Colo205 foram cultivadas na presença de Benzil-a-GalNAc (2 mM ou 4 mM) por 72 horas. Neste ponto elas foram replaqueadas em placas de 96 poços, permitidas aderirem por 24 horas, enquanto ainda na presença do inibidor. Elas foram então estimuladas com concentrações crescentes de Apo2L/TRAIL como indicado e submetidas a um teste de viabilidade.

PCR QUANTITATIVO

Níveis de expressão de transcrição de GalNacT-14 e GalNacT-3 foram avaliados por RT-PCR quantitativo usando-se técnicas padrão Taqman. Níveis de transcrição foram normalizados para o gene *housekeeping*, GAPDH e os resultados estão expressos como valores de expressão normalizados ($=2^{-D_{Ct}}$). Conjuntos *primer/sonda* para GalNacT-14 (cat#: Hs00226180_m1_GT14), GalNacT-3 (cat#:Hs00237084_m1_GT3) e GAPDH (cat#: 402869) foram adquiridos da Applied Biosystems (Foster City, CA).

IMUNOPRECIPITAÇÃO, ANÁLISE WESTERN BLOT E ANTICORPOS

IP: Anticorpos monoclonais anti-Apo2L (2E11; ATCC Acesso No. HB-12256), anti-DR4 (3G1 e 4G7, ATCC Acesso No. PTA-99) e anti-DR5 (3H3, ATCC Acesso No. 12534, e 5C7) foram gerados na Genentech, Inc. utilizando proteínas de fusão receptor Fc como antígenos. Anticorpos monoclonais anti-DR4 (4G7) e anti-DR5 (5C7), usados para imunoprecipitar o Apo2L/TRAIL DISC, foram conjugados à agarose usando-se o kit de orientação ImmunoPure Proteína G IgG Plus (número catalogado 44990) da Pierce. Os anticorpos monoclonais anti-DR4 (3G1) e anti-DR5 (3H3), usados para imunodetecção de DR4/5 em imunoprecipitações DISC, foram biotinilados usando-se kit de biotinylation EZ-link Sulfo-NHS-LC (número catalogado 21217) da Pierce. FLAG-unido Apo2L/TRAIL foi preparado e interligado com anticorpo anti-FLAG

M2 (Sigma) como descrito (Kischkel, *Immunity*, 12:611 (2000)). Estes experimentos foram feitos como previamente descrito para análise Apo2L/TRAIL-FLAG + anti-FLAG DISC (Kischkel, acima). Os experimentos de imunoprecipitação DR4/5 DISC também foram realizados como descrito, exceto que os anticorpos monoclonais anti-DR4 (4G7) e anti-DR5 (5C7) foram diretamente conjugados à agarose para a imunoprecipitação (Sharp *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280:19401 (2005)).

WB: 5×10^5 células foram semeadas por poço em placas de 6 poços. Para experimentos de RNAi *knock-down*, as células foram tratadas com siRNAs diferentes por 48h seguida pelo Apo2L/TRAIL por 4, 8 ou 24h. Após os períodos de tempo indicados, as células foram lavadas em gelo seco PBS e lisadas em 1% de Triton X-100 contendo tampão de lise hipotônico (20 mM HEPES pH 7,5, 10 mM de KCL, 1,5 mM de $MgCl_2$, 1 mM de EDTA e 1 mM de DTT). Para cada amostra, 40 μ g de proteína foi separada sob condições de redução em gradiente 10% ou 10-20% de géis SDS-poliacrilamida. Após transferência para membranas de nitrocelulose (Schleicher e Schuell) as membranas foram incubadas por 1h em 10% de leite em pó desnatado seguido por 1h de incubação com os seguintes anticorpos primários: anticorpo anti-caspase-3 de cabra (1:1000, R&D) anticorpo anti-caspase-8 de coelho (1:1000, Pharmingen), anticorpo 5B4 anti-caspase-9 de camundongo 5B4 (1:1000, MBL), anticorpo anti-Bid de coelho (1:1000, Pharmingen), anticorpo anti-DR5 de coelho (1:500, Cayman) ou anticorpo anti-actina de cabra (1:200, Santa Cruz Biotechnology). As membranas foram lavadas cinco vezes com TBS/0,05% Tween e então incubadas com o anticorpo secundário purificado de afinidade conjugado com a respectiva peroxidase (1:5000, Biorad) por 30 min. As membranas foram lavadas novamente cinco vezes e reveladas usando-se quimioluminescência aumentada (ECL, Amersham) e expostas a filmes Kodak Biomax .

CITOMETRIA DE FLUXO/ANÁLISE FACS

A expressão de superfície dos receptores DR4 e DR5 da família TNF foi determinada por seleção celular ativada por fluorescência (FACS) usando-se um citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA). Células C170 e PSN-1, transfetadas com siRNAs indicados por 48h, foram coradas com 10 µg/ml de anticorpo primário, 4G7 (anti-DR4) ou 3H3 (anti-DR5) ou um anticorpo controle IgG de camundongo por 1 h a 4°C. As células foram então lavadas com PBS e então incubadas com um anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fluorescina (FITC) (Jackson Laboratories) por 30 min a 4°C. As células foram então analisadas por citometria de fluxo usando-se um citômetro de fluxo FACS Calibur.

TESTES DE CASPASE

Atividades de caspase-3/-7 foram testadas a 37°C em 40 µl de tampão caspase (50 mM de HEPES pH 7,4, 100 mM de NaCl, 10 % de sacarose, 1 mM de EDTA, 0,1% de CHAPS e 10 mM de DTT) contendo 100 µM do peptídeo fluorogênico Ac-DEVD-AFC. A atividade foi medida continuamente sobre o tempo indicado pela liberação de AFC a partir de DEVD-AFC usando-se um Dispositivo Molecular fluorômetro no modo cinético e com o par de filtro 405-510. Para a avaliação da atividade de caspase 20 µg de proteína celular total (Triton X-100 extracts) foi usado em 40 µl de tampão caspase (contendo 100 µM de DEVD-AFC).

ANÁLISE DE CARBOIDRATO DE DR5 DERIVADO DE CHO

A composição de monossacarídeo de DR5 derivado de células de CHO foi obtida após hidrólise com 4 N TFA. A análise dos monossacarídeos liberados foi realizada em um sistema HPLC Dionex BioLC usando-se cromatografia de troca aniônica de alta eficiência acoplada a um detector amperométrico pulsado.

ESTUDOS DE ANIMAIS E XENOENXERTOS S.C.

Fêmeas atímicas de camundongos nus (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) foram aclimatadas ao biotério da Genentech por um mínimo de 1 semana antes de colocado no estudo experimental. Todos os
5 procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Uso e Cuidado Animal da Genentech (IACAUC). Os camundongos foram inoculados s.c com 5×10^6 células/camundongo de Colo205, DLD-1 e RKO ou 20×10^6 células/camundongo de células de carcinoma de cólon humano Colo320HSR (Coleção Americana de Tipo de Cultura). As medidas do tumor
10 foram coletadas por um calibre digital e os volumes do tumor calculados usando-se a fórmula $p/6$ ($A = \text{comprimento}$)($B = \text{largura}$)². Uma vez que os tumores atingiram um volume de $\sim 150 - 200 \text{ mm}^3$, os camundongos foram agrupados aleatoriamente e administrados de forma intraperitoneal (i.p) com veículo ou Apo2L/TRAIL (60 mg/kg/dia) nos dias 0 – 4.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Genentech, Inc.

<120> ENSAIOS E MÉTODOS UTILIZANDO BIOMARCADORES

<130> P2245R1 PCT

<140> PCT/US2006/031785

<141> 15-08-2006

<150> US 60/708,677

<151> 16-08-2005

<150> US 60/808,076

<151> 24-05-2006

<160> 29

<210> 1

<211> 281

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met	Ala	Met	Met	Glu	Val	Gln	Gly	Gly	Pro	Ser	Leu	Gly	Gln	Thr
1				5					10					15
Cys	Val	Leu	Ile	Val	Ile	Phe	Thr	Val	Leu	Leu	Gln	Ser	Leu	Cys
				20					25					30
Val	Ala	Val	Thr	Tyr	Val	Tyr	Phe	Thr	Asn	Glu	Leu	Lys	Gln	Met
				35					40					45
Gln	Asp	Lys	Tyr	Ser	Lys	Ser	Gly	Ile	Ala	Cys	Phe	Leu	Lys	Glu
				50					55					60
Asp	Asp	Ser	Tyr	Trp	Asp	Pro	Asn	Asp	Glu	Glu	Ser	Met	Asn	Ser
				65					70					75
Pro	Cys	Trp	Gln	Val	Lys	Trp	Gln	Leu	Arg	Gln	Leu	Val	Arg	Lys
				80					85					90
Met	Ile	Leu	Arg	Thr	Ser	Glu	Glu	Thr	Ile	Ser	Thr	Val	Gln	Glu
				95					100					105
Lys	Gln	Gln	Asn	Ile	Ser	Pro	Leu	Val	Arg	Glu	Arg	Gly	Pro	Gln
				110					115					120
Arg	Val	Ala	Ala	His	Ile	Thr	Gly	Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Asn	Thr
				125					130					135
Leu	Ser	Ser	Pro	Asn	Ser	Lys	Asn	Glu	Lys	Ala	Leu	Gly	Arg	Lys
				140					145					150
Ile	Asn	Ser	Trp	Glu	Ser	Ser	Arg	Ser	Gly	His	Ser	Phe	Leu	Ser
				155					160					165

Asn	Leu	His	Leu	Arg	Asn	Gly	Glu	Leu	Val	Ile	His	Glu	Lys	Gly
				170					175					180
Phe	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Gln	Thr	Tyr	Phe	Arg	Phe	Gln	Glu	Glu
				185					190					195
Ile	Lys	Glu	Asn	Thr	Lys	Asn	Asp	Lys	Gln	Met	Val	Gln	Tyr	Ile
				200					205					210
Tyr	Lys	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	Pro	Ile	Leu	Leu	Met	Lys	Ser
				215					220					225
Ala	Arg	Asn	Ser	Cys	Trp	Ser	Lys	Asp	Ala	Glu	Tyr	Gly	Leu	Tyr
				230					235					240
Ser	Ile	Tyr	Gln	Gly	Gly	Ile	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Asp	Arg
				245					250					255
Ile	Phe	Val	Ser	Val	Thr	Asn	Glu	His	Leu	Ile	Asp	Met	Asp	His
				260					265					270
Glu	Ala	Ser	Phe	Phe	Gly	Ala	Phe	Leu	Val	Gly				
				275					280					

<210> 2
 <211> 1042
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> Incerto
 <222> 447
 <223> Base Desconhecida

<400> 2
 tttcctcact gactataaaa gaatagagaa ggaagggctt cagtgaccgg 50
 ctgcctggct gacttacagc agtcagactc tgacaggatc atggctatga 100
 tggaggtcca ggggggaccc agcctgggac agacctgcgt gctgatcgtg 150
 atcttcacag tgctcctgca gtctctctgt gtggctgtaa cttacgtgta 200
 ctttaccaac gagctgaagc agatgcagga caagtactcc aaaagtggca 250
 ttgcttgttt cttaaaagaa gatgacagtt attgggaccc caatgacgaa 300
 gagagtatga acagcccctg ctggcaagtc aagtggcaac tccgtcagct 350
 cgttagaaag atgattttga gaacctctga ggaaaccatt tctacagttc 400
 aagaaaagca acaaaatatt tctcccctag tgagagaaaag aggtccncag 450
 agagtagcag ctacataac tgggaccaga ggaagaagca acacattgtc 500
 ttctccaaac tccaagaatg aaaaggctct gggccgcaaa ataaactcct 550
 gggaatcatc aaggagtggg cattcattcc tgagcaactt gcacttgagg 600

aatggtgaac tgggtcatcca tgaaaaaggg ttttactaca tctattccca 650
 aacatacttt cgatttcagg aggaaataaa agaaaacaca aagaacgaca 700
 aacaaatggt ccaatatatt tacaaataca caagttatcc tgaccctata 750
 ttgttgatga aaagtgctag aaatagttgt tgggtctaaag atgcagaata 800
 tggactctat tccatctatc aagggggaat atttgagctt aaggaaaatg 850
 acagaatttt tgtttctgta acaaagagc acttgataga catggaccat 900
 gaagccagtt ttttcggggc ctttttagtt ggctaactga cctggaaaga 950
 aaaagcaata acctcaaagt gactattcag ttttcaggat gatacactat 1000
 gaagatgttt caaaaaatct gaccaaaca aacaaacaga aa 1042

<210> 3
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3
 Met Ala Pro Pro Pro Ala Arg Val His Leu Gly Ala Phe Leu Ala
 1 5 10 15
 Val Thr Pro Asn Pro Gly Ser Ala Ala Ser Gly Thr Glu Ala Ala
 20 25 30
 Ala Ala Thr Pro Ser Lys Val Trp Gly Ser Ser Ala Gly Arg Ile
 35 40 45
 Glu Pro Arg Gly Gly Gly Arg Gly Ala Leu Pro Thr Ser Met Gly
 50 55 60
 Gln His Gly Pro Ser Ala Arg Ala Arg Ala Gly Arg Ala Pro Gly
 65 70 75
 Pro Arg Pro Ala Arg Glu Ala Ser Pro Arg Leu Arg Val His Lys
 80 85 90
 Thr Phe Lys Phe Val Val Val Gly Val Leu Leu Gln Val Val Pro
 95 100 105
 Ser Ser Ala Ala Thr Ile Lys Leu His Asp Gln Ser Ile Gly Thr
 110 115 120
 Gln Gln Trp Glu His Ser Pro Leu Gly Glu Leu Cys Pro Pro Gly
 125 130 135
 Ser His Arg Ser Glu Arg Pro Gly Ala Cys Asn Arg Cys Thr Glu
 140 145 150
 Gly Val Gly Tyr Thr Asn Ala Ser Asn Asn Leu Phe Ala Cys Leu
 155 160 165
 Pro Cys Thr Ala Cys Lys Ser Asp Glu Glu Glu Arg Ser Pro Cys
 170 175 180

[illegible]

<210> 4
 <211> 1407
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4
 atggcgccac caccagctag agtacatcta ggtgcgttcc tggcagtgac 50
 tccgaatccc gggagcgag cgagtgggac agaggcagcc gcggccacac 100
 ccagcaaagt gtggggctct tccgcgggga ggattgaacc acgaggcggg 150
 ggccgaggag cgctccctac ctccatggga cagcacggac ccagtgcccg 200
 ggcccgggca gggcgcgccc caggacccag gccggcgcgg gaagccagcc 250
 ctcggtccg ggtccacaag accttcaagt ttgtcgtcgt cggggtcctg 300
 ctgcaggctg tacctagctc agctgcaacc atgatcaatc aattggcaca 350
 aattggcaca cagcaatggg aacatagccc tttgggagag ttgtgtccac 400
 caggatctca tagatcagaa cgtcctggag cctgtaaccg gtgcacagag 450
 ggtgtgggtt acaccaatgc ttccaacaat ttgtttgctt gcctcccatg 500
 tacagcttgt aaatcagatg aagaagagag aagtccttgc accacgacca 550
 ggaacacagc atgtcagtg aaaccaggaa ctttcggaa tgacaattct 600
 gctgagatgt gccggaagtg cagcacaggg tgccccagag ggatgggtcaa 650
 ggtcaaggat tgtacgccct ggagtgacat cgagtgtgtc caaaagaat 700
 caggcaatgg acataatata tgggtgattt tggttgtgac tttggttgtt 750
 ccgttgctgt tgggtggctgt gctgattgtc tgttgttgca tcggctcagg 800
 ttgtggaggg gacccaagt gcatggacag ggtgtgtttc tggcgcttgg 850
 gtctcctacg agggcctggg gctgaggaca atgctcaca cgagattctg 900
 agcaacgcag actcgctgtc cactttcgtc tctgagcagc aaatggaaag 950
 ccaggagccg gcagatttga cagggtgtcac tgtacagtcc ccaggggagg 1000
 cacagtgtct gctgggaccg gcagaagctg aagggtctca gaggaggagg 1050
 ctgctgggtc cagcaaatgg tgctgacccc actgagactc tgatgctgtt 1100
 ctttgacaag tttgcaaaca tcgtgccctt tgactcctgg gaccagctca 1150
 tgaggcagct ggacctcacg aaaaatgaga tcgatgtggt cagagctggg 1200
 acagcaggcc caggggatgc cttgtatgca atgctgatga aatgggtcaa 1250

caaaactgga cggaacgcct cgatccacac cctgctggat gccttggaga 1300
 ggatggaaga gagacatgca aaagagaaga ttcaggacct cttggtggac 1350
 tctggaaagt tcattctactt agaagatggc acaggctctg ccgtgtcctt 1400
 ggagtga 1407

<210> 5
 <211> 411
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5
 Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg
 1 5 10 15
 Lys Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro
 20 25 30
 Gly Leu Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val
 35 40 45
 Leu Leu Leu Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp
 50 55 60
 Leu Ala Pro Gln Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser
 65 70 75
 Pro Ser Glu Gly Leu Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp
 80 85 90
 Gly Arg Asp Cys Ile Ser Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr
 95 100 105
 His Trp Asn Asp Leu Leu Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp
 110 115 120
 Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr
 125 130 135
 Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro
 140 145 150
 Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met Val
 155 160 165
 Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile Glu Cys Val His
 170 175 180
 Lys Glu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala Ala Val Val
 185 190 195
 Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp Lys Lys
 200 205 210
 Val Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly Asp
 215 220 225

Pro Glu Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp
 230 235 240
 Asn Val Leu Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val
 245 250 255
 Pro Glu Gln Glu Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly
 260 265 270
 Val Asn Met Leu Ser Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro
 275 280 285
 Ala Glu Ala Glu Arg Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala
 290 295 300
 Asn Glu Gly Asp Pro Thr Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp
 305 310 315
 Phe Ala Asp Leu Val Pro Phe Asp Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg
 320 325 330
 Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu Ile Lys Val Ala Lys Ala Glu
 335 340 345
 Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Tyr Thr Met Leu Ile Lys Trp
 350 355 360
 Val Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala Ser Val His Thr Leu Leu Asp
 365 370 375
 Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu Ala Lys Gln Lys Ile Glu
 380 385 390
 Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met Tyr Leu Glu Gly Asn
 395 400 405
 Ala Asp Ser Ala Leu Ser
 410

<210> 6
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6
 Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg
 1 5 10 15
 Lys Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro
 20 25 30
 Gly Pro Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val
 35 40 45
 Leu Leu Leu Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp
 50 55 60
 Leu Ala Pro Gln Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser
 65 70 75

Pro Ser Glu Gly	Leu Cys Pro Pro Gly	His His Ile Ser Glu Asp	80	85	90
Gly Arg Asp Cys	Ile Ser Cys Lys Tyr	Gly Gln Asp Tyr Ser Thr	95	100	105
His Trp Asn Asp	Leu Leu Phe Cys Leu	Arg Cys Thr Arg Cys Asp	110	115	120
Ser Gly Glu Val	Glu Leu Ser Pro Cys	Thr Thr Thr Arg Asn Thr	125	130	135
Val Cys Gln Cys	Glu Glu Gly Thr Phe	Arg Glu Glu Asp Ser Pro	140	145	150
Glu Met Cys Arg	Lys Cys Arg Thr Gly	Cys Pro Arg Gly Met Val	155	160	165
Lys Val Gly Asp	Cys Thr Pro Trp Ser	Asp Ile Glu Cys Val His	170	175	180
Lys Glu Ser Gly	Thr Lys His Ser Gly	Glu Ala Pro Ala Val Glu	185	190	195
Glu Thr Val Thr	Ser Ser Pro Gly Thr	Pro Ala Ser Pro Cys Ser	200	205	210
Leu Ser Gly Ile	Ile Ile Gly Val Thr	Val Ala Ala Val Val Leu	215	220	225
Ile Val Ala Val	Phe Val Cys Lys Ser	Leu Leu Trp Lys Lys Val	230	235	240
Leu Pro Tyr Leu	Lys Gly Ile Cys Ser	Gly Gly Gly Gly Asp Pro	245	250	255
Glu Arg Val Asp	Arg Ser Ser Gln Arg	Pro Gly Ala Glu Asp Asn	260	265	270
Val Leu Asn Glu	Ile Val Ser Ile Leu	Gln Pro Thr Gln Val Pro	275	280	285
Glu Gln Glu Met	Glu Val Gln Glu Pro	Ala Glu Pro Thr Gly Val	290	295	300
Asn Met Leu Ser	Pro Gly Glu Ser Glu	His Leu Leu Glu Pro Ala	305	310	315
Glu Ala Glu Arg	Ser Gln Arg Arg Arg	Leu Leu Val Pro Ala Asn	320	325	330
Glu Gly Asp Pro	Thr Glu Thr Leu Arg	Gln Cys Phe Asp Asp Phe	335	340	345
Ala Asp Leu Val	Pro Phe Asp Ser Trp	Glu Pro Leu Met Arg Lys	350	355	360
Leu Gly Leu Met	Asp Asn Glu Ile Lys	Val Ala Lys Ala Glu Ala	365	370	375

Ala	Gly	His	Arg	Asp	Thr	Leu	Tyr	Thr	Met	Leu	Ile	Lys	Trp	Val	
				380					385					390	
Asn	Lys	Thr	Gly	Arg	Asp	Ala	Ser	Val	His	Thr	Leu	Leu	Asp	Ala	
				395					400					405	
Leu	Glu	Thr	Leu	Gly	Glu	Arg	Leu	Ala	Lys	Gln	Lys	Ile	Glu	Asp	
				410					415					420	
His	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Lys	Phe	Met	Tyr	Leu	Glu	Gly	Asn	Ala	
				425					430					435	
Asp	Ser	Ala	Met	Ser											
				440											

<210> 7
 <211> 1180
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

<400> 7
 gctgtgggaa cctctccacg cgcacgaact cagccaacga tttctgatag 50
 atttttggga gtttgaccag agatgcaagg ggtgaaggag cgcttcctac 100
 cgttagggaa ctctggggac agagcgcccc ggccgcctga tggccgaggc 150
 aggggtgacgac ccaggaccca ggacggcgctc ggaaccata ccatggcccg 200
 gatccccaag accctaaagt tcgtcgtcgt catcgtcgcg gtccctgctgc 250
 cagtcctagc ttactctgcc accactgccc ggcaggagga agttccccag 300
 cagacagtgg cccacagca acagaggcac agcttcaagg gggaggagtg 350
 tccagcagga tctcatagat cagaacatac tggagcctgt aaccctgca 400
 cagaggggtgt ggattacacc aacgcttcca acaatgaacc ttcttgcttc 450
 ccatgtacag ttgttaaatac agatcaaaaa cataaaagt cctgcaccat 500
 gaccagagac acagtgtgtc agtgtaaaga aggcaccttc cggaatgaaa 550
 actccccaga gatgtgccgg aagtgtagca ggtgccctag tggggaagtc 600
 caagtacagta attgtacgtc ctgggatgat atccagtgtg ttgaagaatt 650
 tgggtgccaat gccactgtgg aaaccccagc tgctgaagag acaatgaaca 700
 ccagcccggg gactcctgcc ccagctgctg aagagacaat gaacaccagc 750
 ccagggactc ctgccccagc tgctgaagag acaatgacca ccagcccggg 800
 gactcctgcc ccagctgctg aagagacaat gaccaccagc ccggggactc 850
 ctgccccagc tgctgaagag acaatgacca ccagcccggg gactcctgcc 900
 tcttctcatt acctctcatg caccatcgta gggatcatag ttctaattgt 950
 gcttctgatt gtgtttgttt gaaagacttc actgtggaag aaattccttc 1000

cttacctgaa aggttcaggt aggcgctggc tgagggcggg gggcgctgga 1050
 cactctctgc cctgcctccc tctgctgtgt tcccacagac agaaacgcct 1100
 gccctgccc caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1150
 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1180

<210> 8
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8
 Met Ala Arg Ile Pro Lys Thr Leu Lys Phe Val Val Val Ile Val
 1 5 10 15
 Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Ala Tyr Ser Ala Thr Thr Ala Arg
 20 25 30
 Gln Glu Glu Val Pro Gln Gln Thr Val Ala Pro Gln Gln Gln Arg
 35 40 45
 His Ser Phe Lys Gly Glu Glu Cys Pro Ala Gly Ser His Arg Ser
 50 55 60
 Glu His Thr Gly Ala Cys Asn Pro Cys Thr Glu Gly Val Asp Tyr
 65 70 75
 Thr Asn Ala Ser Asn Asn Glu Pro Ser Cys Phe Pro Cys Thr Val
 80 85 90
 Cys Lys Ser Asp Gln Lys His Lys Ser Ser Cys Thr Met Thr Arg
 95 100 105
 Asp Thr Val Cys Gln Cys Lys Glu Gly Thr Phe Arg Asn Glu Asn
 110 115 120
 Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Ser Arg Cys Pro Ser Gly Glu
 125 130 135
 Val Gln Val Ser Asn Cys Thr Ser Trp Asp Asp Ile Gln Cys Val
 140 145 150
 Glu Glu Phe Gly Ala Asn Ala Thr Val Glu Thr Pro Ala Ala Glu
 155 160 165
 Glu Thr Met Asn Thr Ser Pro Gly Thr Pro Ala Pro Ala Ala Glu
 170 175 180
 Glu Thr Met Asn Thr Ser Pro Gly Thr Pro Ala Pro Ala Ala Glu
 185 190 195
 Glu Thr Met Thr Thr Ser Pro Gly Thr Pro Ala Pro Ala Ala Glu
 200 205 210
 Glu Thr Met Thr Thr Ser Pro Gly Thr Pro Ala Pro Ala Ala Glu
 215 220 225

Glu	Thr	Met	Thr	Thr	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Ser	Ser	His	Tyr
				230					235					240
Leu	Ser	Cys	Thr	Ile	Val	Gly	Ile	Ile	Val	Leu	Ile	Val	Leu	Leu
				245					250					255
Ile	Val	Phe	Val											

<210> 9
 <211> 2082
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 ccaactgcac ctcggttcta tcgattgaat tccccgggga tcctctagag 50
 atccctcgac ctcgaccac gcgtccggaa cctttgcacg cgacaaaact 100
 acggggacga tttctgattg atttttggcg ctttcgatcc accctcctcc 150
 cttctcatgg gactttgggg acaaagcgtc ccgaccgcct cgagcgctcg 200
 agcagggcgc tatccaggag ccaggacagc gtcgggaacc agaccatggc 250
 tcctggaccc caagatcctt aagttcgtcg tcttcatcgt cgcggttctg 300
 ctgccggtcc gggttgactc tgccaccatc ccccggcagg acgaagttcc 350
 ccagcagaca gtggccccac agcaacagag gcgcagcctc aaggaggagg 400
 agtgtccagc aggatctcat agatcagaat atactggagc ctgtaaccgc 450
 tgcacagagg gtgtggatta caccattgct tccaacaatt tgccttcttg 500
 cctgctatgt acagtttgta aatcagggtca aacaaataaa agttcctgta 550
 ccacgaccag agacaccgtg tgtcagtgtg aaaaaggaag cttccaggat 600
 aaaaactccc ctgagatgtg ccggacgtgt agaacagggt gtcccagagg 650
 gatggtcaag gtcagtaatt gtacgccccg gagtgacatc aagtgcaaaa 700
 atgaatcagc tgccagttcc actgggaaaa ccccgacagc ggaggagaca 750
 gtgaccacca tcctggggat gcttgccctc ccctatcact accttatcat 800
 catagtgggt ttagtcatca ttttagctgt gggtgtgggt ggcttttcat 850
 gtcggaagaa attcatttct tacctcaaag gcatctgctc aggtggtgga 900
 ggagggtccc aacgtgtgca cagagtcctt ttccggcggc gttcatgtcc 950
 ttcacgagtt cctggggcgg aggacaatgc ccgcaacgag accctgagta 1000
 acagatactt gcagcccacc caggctctctg agcaggaaat ccaaggtcag 1050
 gagctggcag agctaacagg tgtgactgta gagtygccag aggagccaca 1100

gcgtctgctg gaacaggcag aagctgaagg gtgtcagagg aggaggctgc 1150
 tggttccagt gaatgacgct gactccgctg acatcagcac cttgctggat 1200
 gcctcggcaa cactggaaga aggacatgca aaggaaacaa ttcaggacca 1250
 actggtgggc tccgaaaagc tcttttatga agaagatgag gcaggctctg 1300
 ctacgtcctg cctgtgaaag aatctcttca ggaaaccaga gcttcctca 1350
 ttacaccttt ctcctacaaa gggaagcagc ctggaagaaa cagtccagta 1400
 cttgacccat gcccacaaa actctactat ccaatatggg gcagcttacc 1450
 aatggtccta gaactttggt aacgcacttg gagtaatttt tatgaaatac 1500
 tgcgtgtgat aagcaaacgg gagaaattta tatcagattc ttggctgcat 1550
 agttatacga ttgtgtatta agggtcgttt taggccacat gcggtggctc 1600
 atgcctgtaa tcccagcact ttgataggct gaggcagggtg gattgcttga 1650
 gctcgggagt ttgagaccag cctcatcaac acagtgaaac tccatctcaa 1700
 tttaaaaaga aaaaaagtgg ttttaggatg tcattctttg cagttcttca 1750
 tcatgagaca agtctttttt tctgcttctt atattgcaag ctccatctct 1800
 actggtgtgt gcatttaatg acatctaact acagatgccg cacagccaca 1850
 atgctttgcc ttatagtttt ttaactttag aacgggatta tcttggttatt 1900
 acctgtatth tcagttttcg atatttttga cttaatgatg agattatcaa 1950
 gacgtacccc tatgctaagt catgagcata tggacttacg agggttcgac 2000
 ttagagtttt gagctttaag ataggattat tgggggctta cccccacctt 2050
 aattagaaga aacattttat attgctttac ta 2082

<210> 10

<211> 386

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> Incerto

<222> 310

<223> Aminoácido Desconhecido

<400> 10

Met	Gly	Leu	Trp	Gly	Gln	Ser	Val	Pro	Thr	Ala	Ser	Ser	Ala	Arg
1				5					10					15

Ala	Gly	Arg	Tyr	Pro	Gly	Ala	Arg	Thr	Ala	Ser	Gly	Thr	Arg	Pro
				20					25					30

Trp	Leu	Leu	Asp	Pro	Lys	Ile	Leu	Lys	Phe	Val	Val	Phe	Ile	Val
				35					40					45

Ala Val Leu Leu Pro Val Arg Val Asp Ser Ala Thr Ile Pro Arg	50	55	60
Gln Asp Glu Val Pro Gln Gln Thr Val Ala Pro Gln Gln Gln Arg	65	70	75
Arg Ser Leu Lys Glu Glu Glu Cys Pro Ala Gly Ser His Arg Ser	80	85	90
Glu Tyr Thr Gly Ala Cys Asn Pro Cys Thr Glu Gly Val Asp Tyr	95	100	105
Thr Ile Ala Ser Asn Asn Leu Pro Ser Cys Leu Leu Cys Thr Val	110	115	120
Cys Lys Ser Gly Gln Thr Asn Lys Ser Ser Cys Thr Thr Thr Arg	125	130	135
Asp Thr Val Cys Gln Cys Glu Lys Gly Ser Phe Gln Asp Lys Asn	140	145	150
Ser Pro Glu Met Cys Arg Thr Cys Arg Thr Gly Cys Pro Arg Gly	155	160	165
Met Val Lys Val Ser Asn Cys Thr Pro Arg Ser Asp Ile Lys Cys	170	175	180
Lys Asn Glu Ser Ala Ala Ser Ser Thr Gly Lys Thr Pro Ala Ala	185	190	195
Glu Glu Thr Val Thr Thr Ile Leu Gly Met Leu Ala Ser Pro Tyr	200	205	210
His Tyr Leu Ile Ile Ile Val Val Leu Val Ile Ile Leu Ala Val	215	220	225
Val Val Val Gly Phe Ser Cys Arg Lys Lys Phe Ile Ser Tyr Leu	230	235	240
Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro Glu Arg Val His	245	250	255
Arg Val Leu Phe Arg Arg Arg Ser Cys Pro Ser Arg Val Pro Gly	260	265	270
Ala Glu Asp Asn Ala Arg Asn Glu Thr Leu Ser Asn Arg Tyr Leu	275	280	285
Gln Pro Thr Gln Val Ser Glu Gln Glu Ile Gln Gly Gln Glu Leu	290	295	300
Ala Glu Leu Thr Gly Val Thr Val Glu Xaa Pro Glu Glu Pro Gln	305	310	315
Arg Leu Leu Glu Gln Ala Glu Ala Glu Gly Cys Gln Arg Arg Arg	320	325	330
Leu Leu Val Pro Val Asn Asp Ala Asp Ser Ala Asp Ile Ser Thr	335	340	345

Leu Leu Asp Ala Ser Ala Thr Leu Glu Glu Gly His Ala Lys Glu
350 355 360

Thr Ile Gln Asp Gln Leu Val Gly Ser Glu Lys Leu Phe Tyr Glu
365 370 375

Glu Asp Glu Ala Gly Ser Ala Thr Ser Cys Leu
380 385

<210> 11

<211> 2742

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

```

cccaacccac gatggtcttg gagctgcgcc cagggcttgg cgctggcggc 50
cccgcaacag caccgagcgt ttcggtcggc gtcggggccc ccctccccgc 100
tcactccctc cgccctcgtg ctctctcccg ggtgcttggc acagcctcgg 150
attctccct gtggcgggcgt ggggaacatc tcggcagcca ccgcgcttct 200
cccgtggag cgggcggtcca gcttggtgc cctcggtcct cttgcaggat 250
cctgccgccc ctccaaccgg atcctgggtc tagagctccc cagagcgagg 300
cgctcgccag gactcctgcc atgcggcgcc tgactcgtcg gctggttctg 350
ccagtcttcg gggtgctctg gatcacggtg ctgctgttct tctgggtaac 400
gacctgtggg accagtttga tgagcggcgg tatctgaatg ccaaaaagtg 450
gcgcgttggg gacgacctct ataagctgta tgcacactgc tgggtgtattg 500
cacggacctt ccacccaacta gcacatcat caccttccac aacgaggccc 550
gctccacgct gacttcagca atgacatcga tgactgtaaa cagctcatca 600
agttgcccaa ggtgaaatgc ttgcgcaata atgaacggca aactgtgag 650
gtgaacaggg actgggtcca gcctctgttg cacaggggtca aagaggacta 700
cacgcgggtg gtgtgccttg ttggagcctc cacttccagt gggagcagct 750
ctccccagag cagaaggctc ggcgccctga cccacaggag cccatcagga 800
cggcatcccg agtgcaccgc tcccggcccg cccgccttg cgggcggcgg 850
tagcgccttc tctcagagcc ccgctcactc ccacctcggc tcgctccgag 900
tcggcctgtc tctcgtgtgt cgagtcagtt tccctatcgg cggcagcggg 950
caaggcggcg gcggcgggcg cggcagccgc gtccctgcca cgtttcgggt 1000
cgccctgcac cccccacca ggctcgcttc tcttcgaagc gggaagggcg 1050
cccgccaacc ctgaccgccg ggggggtgcc ccgggacgta gcgccgcgga 1100

```

gaggaagcgg caaaggggac ccaagaggaa gttggaggtg ccgacgggac 1150
 ctgaagtgca gaccacctaa ccttcggacg ctgactggga ctgctttcaa 1200
 ccagcgggag agtgagcgga tctccagcaa tcgggccatc ccggacactc 1250
 gccatctgag agctcaggac catccgcagt gtattaaacc gcaccctac 1300
 gcatctgac cgggaaatca tattagtga taggtctggt ccggtcccgg 1350
 attcggggcg ctgacatcgc ccagggcacc actctgactt tcctcgacag 1400
 cgatcgatat cattaacctg gacaccttca cctacatcga gtctgcctcg 1450
 gagctcagag gggggtttga ctccatcat agctggaggg ctcttcgtga 1500
 tcgacaaagc ttggtttgat tacctgggga aatatgatat ggacatggac 1550
 atctgggggtg gggagaactt tgaaatctcc ttccgagtgt ggatgtgcgg 1600
 gggcagccta gagatcgtcc ctatataaag aacaccaagc ggacagctga 1650
 agtgtggatg gatgaataca agcaatacta ttacgctgcc cggccattcg 1700
 caagtggtag ctggagaata tctaccctga actcagcatc cccaaggagt 1750
 cctccatcca gaagggaat atccgacaga gaaggtcaaa ggcgaagatg 1800
 caaagtcca ggtatgggac ttacataca ccagcagat cctccaggag 1850
 gagctgtgcc tcaatggacc aaaactggtt ccacatcga gcacatagca 1900
 tcccacctct gcctcgatac agatatgttc ggtgatggca cagctcttga 1950
 ggaccctgc cagaagcagc aagggccatg ggggtgtgct tcctggacc 2000
 agaacagact ggaaactggg ccaactgtct caggaggagc agaggaaaac 2050
 atcacaagcc aatggggctc aaagacaaat ccacatgtt ctcaaggccg 2100
 ttgttccttt tcctacaaag gaagcagtct ctggaggcca gaaacaaaag 2150
 cttcttttt cactaggcca ggactacatt gactgcagcc gagtggggca 2200
 cgtcttcgg aagaagcacc cctacgtttt ccctgatgga aatgccaaca 2250
 cgcttgaga ggcccttcgg gaatgttgag agcagattgg acctgaggaa 2300
 gaatctgcgc tgccagagct tcacagaagt gcctggaatc tcaaaggcag 2350
 aacaaccaag aaaccccaaa cctaaagttg agccctgtg ccgtcagtca 2400
 tcacctgtt ccctggcgcc ccagtggttc ttgtcctttg caagaatgga 2450
 gatgaccgac agcgagaacg gcaaggaaat cgtcgtcaac ccatgtgagt 2500
 cctcactcat gagccagcac tgggacatgg tgagcaagca gcctgcaacc 2550
 acctcagaca tcctggactg ggaggtccag gcagagcccc ccaggacagg 2600

agtaagttcc agtcctggcc agtcattccc tgattggtat ctggagacag 2650

aaacctaatag ggaagtgttt atagagatga agaatggagg ttgtttccaa 2700

aagaaataaaa gagaaactta gaagttgaaa aaaaaaaaaa aa 2742

<210> 12

<211> 552

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Met	Arg	Arg	Leu	Thr	Arg	Arg	Leu	Val	Leu	Pro	Val	Phe	Gly	Val
1				5					10					15

Leu	Trp	Ile	Thr	Val	Leu	Leu	Phe	Phe	Trp	Val	Thr	Asp	Leu	Trp
				20					25					30

Asp	Gln	Phe	Asp	Glu	Arg	Arg	Tyr	Leu	Asn	Ala	Lys	Lys	Trp	Arg
				35					40					45

Val	Gly	Asp	Asp	Pro	Tyr	Lys	Leu	Tyr	Cys	Thr	Leu	Leu	Val	Tyr
				50					55					60

Cys	Thr	Asp	Leu	Pro	Pro	Thr	Ser	Ile	Ile	Ile	Thr	Phe	His	Asn
				65					70					75

Glu	Ala	Arg	Ser	Thr	Leu	Asp	Phe	Ser	Asn	Asp	Pro	Asp	Asp	Cys
				80					85					90

Lys	Gln	Leu	Ile	Lys	Leu	Pro	Lys	Val	Lys	Cys	Leu	Arg	Asn	Asn
				95					100					105

Glu	Arg	Gln	His	Cys	Glu	Val	Asn	Arg	Asp	Trp	Leu	Gln	Pro	Leu
				110					115					120

Leu	His	Arg	Val	Lys	Glu	Asp	Tyr	Thr	Arg	Val	Val	Cys	Pro	Val
				125					130					135

Trp	Ser	Leu	His	Phe	Gln	Trp	Glu	Gln	Leu	Ser	Pro	Glu	Gln	Lys
				140					145					150

Ala	Arg	Arg	Leu	Asp	Pro	Thr	Glu	Pro	Ile	Arg	Thr	Lys	Arg	Lys
				155					160					165

Leu	Glu	Val	Pro	Thr	Gly	Pro	Glu	Val	Gln	Thr	Pro	Lys	Pro	Ser
				170					175					180

Asp	Ala	Asp	Trp	Asp	Ala	Phe	Asn	Gln	Arg	Glu	Ser	Glu	Arg	Ile
				185					190					195

Ser	Ser	Asn	Arg	Ala	Ile	Pro	Asp	Thr	Arg	His	Leu	Arg	Leu	Arg
				200					205					210

Thr	Ile	Arg	Ser	Val	Leu	Asn	Arg	Thr	Pro	Thr	His	Leu	Ile	Arg
				215					220					225

Glu Ile Ile Leu Val Asp Gly Leu Val Arg Ser Arg Ile Arg Gly	230	235	240
Ala Asp Ile Ala Gln Gly Thr Thr Leu Thr Phe Leu Asp Ser Ile	245	250	255
Asp Ile Ile Asn Leu Asp Thr Phe Thr Tyr Ile Glu Ser Ala Ser	260	265	270
Glu Leu Arg Gly Gly Phe Asp Pro Ile Ile Ala Gly Gly Leu Phe	275	280	285
Val Ile Asp Lys Ala Trp Phe Asp Tyr Leu Gly Lys Tyr Asp Met	290	295	300
Asp Met Asp Ile Trp Gly Gly Glu Asn Phe Glu Ile Ser Phe Arg	305	310	315
Val Trp Met Cys Gly Gly Ser Leu Glu Ile Val Pro Tyr Ile Lys	320	325	330
Asn Thr Lys Arg Thr Ala Glu Val Trp Met Asp Glu Tyr Lys Gln	335	340	345
Tyr Tyr Tyr Ala Ala Arg Pro Phe Ala Lys Trp Tyr Leu Glu Asn	350	355	360
Ile Tyr Pro Glu Leu Ser Ile Pro Lys Glu Ser Ser Ile Gln Lys	365	370	375
Gly Asn Ile Arg Gln Arg Lys Val Lys Gly Glu Asp Ala Lys Ser	380	385	390
Gln Val Trp Ala Phe Thr Tyr Thr Gln Gln Ile Leu Gln Glu Glu	395	400	405
Leu Cys Leu Gln Trp Thr Lys Thr Gly Ser His Ile Glu His Ile	410	415	420
Ala Ser His Leu Cys Leu Asp Thr Asp Met Phe Gly Asp Gly Thr	425	430	435
Ser Ser Cys Ser Arg Val Gly His Val Phe Arg Lys Lys His Pro	440	445	450
Tyr Val Phe Pro Asp Gly Asn Ala Asn Thr Leu Glu Arg Pro Phe	455	460	465
Gly Asn Val Glu Ser Arg Leu Asp Leu Arg Lys Asn Leu Arg Cys	470	475	480
Gln Ser Phe Gln Lys Cys Leu Glu Ser Gln Arg Gln Asn Asn Gln	485	490	495
Glu Thr Pro Asn Leu Lys Leu Ser Pro Cys Ala Ser Val Ile Thr	500	505	510

Leu	Phe	Pro	Gly	Ala	Pro	Val	Val	Leu	Val	Leu	Cys	Lys	Asn	Gly
				515					520					525
Asp	Asp	Arg	Gln	Glu	Asn	Gly	Lys	Glu	Ile	Val	Val	Asn	Pro	Cys
				530					535					540
Glu	Ser	Ser	Leu	Met	Ser	Gln	His	Trp	Asp	Met	Val			
				545					550					

<210> 13

<211> 2937

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

```

atggctcacc taaagcgact agtaaaatta cacattaata gacattacca 50
taaaaagttc tggaagcttg gtgcagtaat aggatggaaa ggaacatgaa 100
aaacaaaaac aagatggttg atttaatgct agaagctgta aacaatatta 150
aggatgccat tattatacag cagcagaatt gaagcctgtc cttgaccgtc 200
cacctcagga ttcaaatgca cctgggtgctt ctggtaaagc aatgctttcg 250
caagtgacag gatttctttg caccgagatc ttggaccaga cactcgacct 300
cctgaatgta ttgaacaaaa ttgcttagaa ctgtccacag tgtgctctat 350
tcttcacctg caatactgct gaaggaaatc attttggtgg atgatgctag 400
caaagagaaa gaaaaggtct gatcactgct cggttgctag gagcaacagt 450
cgcaacagct gaaacgctca cattttttaga gtcgtaagtc cagatattgc 500
atccatagat ctgaacacgt ttgaattcaa caaaccttct ccttatggaa 550
gtaaccataa aaagatgaaa cctacccaat taaaacaccc acttttgtag 600
gaggactttt ttccatatca aaagaatatt ttgagtatat tgtggtgggc 650
agttggagat tatgccttgc tctgttggtg gacatgtttt tcgcagcaaa 700
agccctcata gctttccaaa ttttatagga gaaatacaga tgcagcaaaa 750
attgttaaac aaaaagcatt tggatgatct tcaaaaagat ttgaaataaa 800
gaagaagaaa taactgttat ttgtcaagtg acaagctttt aatgtcagat 850
tttttcttta taatagtttt ggttttaatg caaagagaag taagtgttca 900
atattccaaa gaggaatcag ccaaaaatgc aaataggagc acctgtcagg 950
caaaacattg atgctggtga gagaccttgt ttgcaaggaa ttcaagacaa 1000
ccaatttaag tgttgaagag caaaaggaaa aggaacgtgg ggaagctaaa 1050
cactgcttta tttaagcgct gccctcccct gccaccacc agtgtcataa 1100

```

tagtttttca taatgaagcg tgggtccacgt gtagatgagt acttacatga 1150
 taaactagat gaatatgtaa aacaattttc tatagtaaaa atagtcagat 1200
 gctcactgtg agtgtttcta tggttggcta gaacctctgt tggccagaat 1250
 agctgagaac tacacggctc cgtggaaatt ttgactggag tctttcattt 1300
 ggctgggagt cgcttcctga tcatgagaag caaagaagggt ggaagctatg 1350
 atgaagaaat ggaaatctgg ggaggtgaaa atatagaaat gtctttcaga 1400
 gtatggcaaa ggcactcagg tgattgctag aaaccaagtt cgccttcag 1450
 aagtctggat ggatgaatac aaggaaataa caccgtcttc ggtgtaaaaa 1500
 ttttacatgg tatctgaaca acatttatcc agaggtgtat gtgccagacc 1550
 ttaatcctgt tatactctgga tacattaaaa gcgttgggtca gcctctatgt 1600
 ctggatgttg gagaaaacaa tcaaggaggg aaattcggca caacatccag 1650
 aaggaattat gtcttcatgc tgctcaagggt ctcgttcagc tgaaggcatg 1700
 tacctacaat tcttaaaaaat gtgcctttca gcaaatggag agcatccaag 1750
 tttagtgtca tgcaacccat cagatccact ccaaaaatgc tgtgactagg 1800
 catacactgt agtttttgaa aattatgcaa aagcagctaa atgtaactta 1850
 ttccaagtgc attttttctta taccaaagac tatttcaaaa tgtccagatg 1900
 taggggaaga gatgtttaca gtatgatgaa aataattttc caagtaaagt 1950
 atttccccta gttttttggg gggataggaa gaaagatttg ttactgtatt 2000
 tttttaacta cataaaaaata gatcaataag gtgaactttt ttttgcgttt 2050
 ggtttacttg tctgtcaaat gtttccttaa acatgaaact gaataaggag 2100
 aagagtatth aagtcttcct taaatgactt ttcttaagta atgatactgt 2150
 gtgttttccc aaagcacttt taaaaaaatt ttataaatt gaatgtttgt 2200
 gataataaat ttcaaagca gaataactga ctcatttaaa gctaaatttt 2250
 gttactgatt caattataaa acacaataaa aaatcctcaa cactaaaaaa 2300
 aaaaaaacia accattaatt atgtatacat gtcattggact tgggggaaac 2350
 cagtactttg aatactctgc tcaacatagg tcacaagaca gttgtcactg 2400
 gagagcagat atgggagatc cagaaggatc aacttctata caatccagat 2450
 acttagccaa aatgattaag tggttcctta aattaagttg aaaaaggaaa 2500
 tattctttct cataaaaaatt tatatcttta ttagcacta tctacagaaa 2550

ttctgcaagt ttctgtttca aagcacaata actagtatga agtttgtgtg 2600
 ttttgtacac ttagggatat atatatatag ctacattcac acactcacia 2650
 tttaaaaatg tcagcattgg cctctgtgta caaaccaaga gcttttacag 2700
 atccagaatt tattagttta aaatgcattt aacacttaaa tttcttggca 2750
 aattttaaaa catttttttag tctgtaatac actccacttg aagcacttac 2800
 tatctgttga aaaggtgtcc ttttcctttc ttctagtatt ttttttctta 2850
 ccaaaattca ctaatctttg taatggattt ttgactttgt aatggattct 2900
 tttcatcaaa aagccttatt tttttatcta tgtggaa 2937

<210> 14

<211> 633

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

Met	Ala	His	Leu	Lys	Arg	Leu	Val	Lys	Leu	His	Ile	Lys	Arg	His
1				5					10					15
Tyr	His	Lys	Lys	Phe	Trp	Lys	Leu	Gly	Ala	Val	Ile	Arg	Met	Glu
				20					25					30
Arg	Asn	Met	Lys	Asn	Lys	Asn	Lys	Met	Leu	Asp	Leu	Met	Leu	Glu
				35					40					45
Ala	Val	Asn	Asn	Ile	Lys	Asp	Ala	Met	Tyr	Tyr	Thr	Ala	Ala	Glu
				50					55					60
Leu	Lys	Pro	Val	Leu	Asp	Arg	Pro	Pro	Gln	Asp	Ser	Asn	Ala	Pro
				65					70					75
Gly	Ala	Ser	Gly	Lys	Ala	Asn	Ala	Phe	Ala	Ser	Asp	Arg	Ile	Ser
				80					85					90
Leu	His	Arg	Asp	Leu	Gly	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Pro	Glu	Cys	Ile
				95					100					105
Glu	Gln	Lys	Leu	Leu	Arg	Thr	Val	His	Ser	Val	Leu	Tyr	Ser	Ser
				110					115					120
Pro	Ala	Ile	Leu	Leu	Lys	Glu	Ile	Ile	Leu	Val	Asp	Asp	Ala	Ser
				125					130					135
Gln	Arg	Glu	Arg	Lys	Gly	Leu	Ile	Thr	Ala	Arg	Leu	Leu	Gly	Ala
				140					145					150
Thr	Val	Ala	Thr	Ala	Glu	Thr	Leu	Thr	Phe	Leu	Asp	Val	Val	Ser
				155					160					165
Pro	Asp	Ile	Ala	Ser	Ile	Asp	Leu	Asn	Thr	Phe	Glu	Phe	Asn	Lys
				170					175					180
Pro	Ser	Pro	Tyr	Gly	Ser	Asn	His	Asn	Lys	Asp	Glu	Thr	Tyr	Pro
				185					190					195

Ile	Lys	Thr	Pro	Thr	Phe	Ala	Gly	Gly	Leu	Phe	Ser	Ile	Ser	Lys	200	205	210
Glu	Tyr	Phe	Glu	Tyr	Ile	Cys	Gly	Gly	Gln	Leu	Glu	Ile	Met	Pro	215	220	225
Cys	Ser	Val	Val	Gly	Asn	Val	Phe	Arg	Ser	Lys	Ser	Pro	Asn	Ser	230	235	240
Phe	Pro	Lys	Phe	Tyr	Arg	Arg	Asn	Thr	Asp	Ala	Ala	Lys	Ile	Val	245	250	255
Lys	Gln	Lys	Ala	Phe	Gly	Asp	Leu	Ser	Lys	Arg	Phe	Glu	Ile	Lys	260	265	270
Phe	Phe	Phe	Ile	Ile	Val	Leu	Val	Leu	Met	Gln	Arg	Glu	Val	Ser	275	280	285
Val	Gln	Tyr	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser	Pro	Lys	Met	Gln	Ile	Gly	Ala	290	295	300
Pro	Val	Arg	Gln	Asn	Ile	Asp	Ala	Gly	Glu	Arg	Pro	Cys	Leu	Gln	305	310	315
Gly	Phe	Lys	Thr	Thr	Asn	Leu	Ser	Val	Glu	Glu	Gln	Lys	Glu	Lys	320	325	330
Glu	Arg	Gly	Glu	Ala	Lys	His	Cys	Phe	Phe	Lys	Arg	Cys	Pro	Pro	335	340	345
Leu	Pro	Thr	Thr	Ser	Val	Ile	Ile	Val	Phe	His	Asn	Glu	Ala	Trp	350	355	360
Ser	Thr	Val	Asp	Glu	Tyr	Leu	His	Asp	Lys	Leu	Asp	Glu	Tyr	Val	365	370	375
Lys	Gln	Phe	Ser	Ile	Val	Lys	Ile	Val	Arg	Ala	His	Cys	Glu	Cys	380	385	390
Phe	Tyr	Gly	Trp	Leu	Glu	Pro	Leu	Leu	Ala	Arg	Ile	Ala	Glu	Asn	395	400	405
Tyr	Thr	Ala	Arg	Gly	Asn	Phe	Asp	Trp	Ser	Leu	Ser	Phe	Gly	Trp	410	415	420
Glu	Ser	Leu	Pro	Asp	His	Glu	Lys	Gln	Arg	Arg	Gly	Ser	Tyr	Asp	425	430	435
Glu	Glu	Met	Glu	Ile	Trp	Gly	Gly	Glu	Asn	Ile	Glu	Met	Ser	Pro	440	445	450
Arg	Val	Trp	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Ile	Ala	Arg	Asn	Gln	Val	Arg	455	460	465
Leu	Ala	Glu	Val	Trp	Met	Asp	Glu	Tyr	Lys	Glu	Ile	His	Arg	Leu	470	475	480
Arg	Cys	Lys	Asn	Phe	Thr	Trp	Tyr	Leu	Asn	Asn	Ile	Tyr	Pro	Glu	485	490	495

Val	Tyr	Val	Pro	Asp	Leu	Asn	Pro	Val	Ile	Ser	Gly	Tyr	Ile	Lys
				500					505					510
Ser	Val	Gly	Gln	Pro	Leu	Cys	Leu	Asp	Val	Gly	Glu	Asn	Asn	Gln
				515					520					525
Gly	Gly	Glu	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Gln	Lys	Glu	Leu	Cys	Leu	His
				530					535					540
Ala	Ala	Gln	Gly	Leu	Val	Gln	Leu	Lys	Ala	Cys	Thr	Tyr	Lys	Phe
				545					550					555
Leu	Lys	Met	Cys	Leu	Ser	Ala	Asn	Gly	Glu	His	Pro	Ser	Leu	Val
				560					565					570
Ser	Cys	Asn	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Gln	Lys	Trp	Lys	Pro	Leu	Ile
				575					580					585
Met	Tyr	Thr	Cys	His	Gly	Leu	Gly	Gly	Asn	Gln	Tyr	Phe	Glu	Tyr
				590					595					600
Ser	Ala	Gln	His	Gly	His	Lys	Thr	Val	Val	Thr	Gly	Glu	Gln	Ile
				605					610					615
Trp	Glu	Ile	Gln	Lys	Asp	Gln	Leu	Leu	Tyr	Asn	Pro	Ile	Leu	Ser
				620					625					630

Gln Asn Asp

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<220>

<221> misc_RNA

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 15

gaccatccgc agtgtatta 19

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<220>

<221> misc_RNA

<223> Sequência é Sintetizada

```

<400> 16
  atacagatat  gttcgggtga 19

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência é Sintetizada

<220>
<221> misc_RNA

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 17
  ccatagatct  gaacacggtt 19

<210> 18
<211> 19
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência é Sintetizada

<220>
<221> misc_RNA

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 18
  gcaaggatat  tatacagca 19

<210> 19
<211> 19
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência é Sintetizada

<220>
<221> misc_RNA
<222> 2
<223> Sequência é Sintetizada

<220>
<221> misc_RNA
<222> 18
<223> Sequência é Sintetizada

<400> 19
  guaccagaca  cgcggcga 19

<210> 20
<211> 19
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

```

<220>
 <223> Sequência é Sintetizada

<220>
 <221> misc_RNA
 <222> 10
 <223> Sequência é Sintetizada

<220>
 <221> misc_RNA
 <222> 13
 <223> Sequência é Sintetizada

<220>
 <221> misc_RNA
 <222> 15
 <223> Sequência é Sintetizada

<400> 20
 accgagaggu cauguacaa 19

<210> 21
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência é Sintetizada

<220>
 <221> misc_RNA
 <223> Sequência é Sintetizada

<400> 21
 ggacaaagtt taccaaatg 19

<210> 22
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 22
 Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Pro Cys Thr Thr Thr Arg Asn
 1 5 10 15
 Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe Arg Glu Ser Gly Thr
 20 25 30
 Lys His Ser Gly Glu Ala Pro Ala Val Glu Glu Thr Val Thr Ser
 35 40 45
 Ser Pro Gly Thr Pro Ala Ser Pro Cys Ser Leu Ser Gly Ile
 50 55

<210> 23
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 23

Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Pro Cys Thr Thr Thr Arg Asn
1 5 10 15

Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe Arg Glu Ser Gly Ile
20 25 30

<210> 24

<211> 28

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 24

Trp Glu His Ser Pro Leu Gly Glu Pro Cys Thr Thr Thr Arg Asn
1 5 10 15

Thr Ala Cys Gln Cys Lys Pro Gly Thr Phe Arg Glu Ser
20 25

<210> 25

<211> 28

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 25

Pro Glu Glu Ser Pro Ser Arg Gly Arg Cys Asn Ile Thr Thr Asn
1 5 10 15

Thr Val Cys Arg Cys Lys Pro Gly Thr Phe Glu Thr Ala
20 25

<210> 26

<211> 28

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 26

Pro Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn
1 5 10 15

Thr Lys Cys Arg Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Gly Ser
20 25

<210> 27

<211> 28

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 27

Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn
1 5 10 15

Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Asp Ser
20 25

<210> 28

<211> 40

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 28

acgctgctca ggaccattcg ctgcgtgtta aaccgcaccc 40

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 29

ctggtagcgg tcacataat 19

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO PARA PREVER A SENSIBILIDADE DE UMA AMOSTRA DE CÉLULA OU TECIDO, de mamífero, para Apo2L/TRAIL, caracterizado pelo fato de que compreende etapas de:

5 obtenção de uma amostra de célula ou tecido de mamífero;
 exame da amostra de célula ou tecido para detectar expressão de GalNac-T14, em que a expressão de dito GalNac-T14 é preditiva de que dita amostra de célula ou tecido é sensível à atividade de indução de apoptose de Apo2L/TRAIL.

10 2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que dita expressão de GalNac-T14 é examinada pela detecção da expressão de mRNA de GalNac-T14.

 3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que dita expressão de GalNac-T14 é examinada por
15 imunohistoquímica.

 4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a etapa de exame da expressão dos receptores DR4, DR5, DcR1 ou DcR2 em dita amostra de célula ou tecido.

 5. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
20 pelo fato de que a amostra de célula ou tecido compreende células ou tecidos cancerígenos.

 6. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que ditas células cancerígenas são pancreáticas, de linfoma, câncer de pulmão de célula não pequena, câncer de cólon, câncer colorretal,
25 melanoma, ou células ou tecidos de condrosarcoma.

 7. MÉTODO PARA INDUZIR APOPTOSE EM UMA AMOSTRA DE CÉLULA OU TECIDO, de mamífero caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

obtenção de uma amostra de célula ou tecido de mamífero;
exame da amostra de célula ou tecido para detectar a expressão
de GalNac-T14, e

subseqüente à detecção da expressão de dito GalNac-T14,
5 exposição de dita amostra de célula ou tecido a uma quantidade eficaz do
Apo2L/TRAIL.

8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado
pelo fato de que dita expressão de GalNac-T14 é examinada pelo teste para
expressão de mRNA de GalNac-T14.

10 9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado
pelo fato de que dita expressão de GalNac-T14 é examinada por
imunohistoquímica.

10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado
pelo fato de que compreende adicionalmente a etapa de exame da expressão
15 dos receptores DR4, DR5, DcR1 ou DcR2 em dita amostra de célula ou tecido.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado
pelo fato de que dita amostra de célula ou tecido compreende células ou
tecidos cancerígenos.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado
20 pelo fato de que ditas células cancerígenas são pancreáticas, de linfoma,
câncer de pulmão de célula não pequena, câncer de cólon, câncer colorectal,
melanoma, ou células ou tecidos de condrosarcoma.

13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado
pelo fato de que ditas células são expostas a uma quantidade eficaz de
25 polipeptídeo Apo2L/TRAIL que compreende os aminoácidos 114-281.

14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado
pelo fato de que dito polipeptídeo Apo2L/TRAIL está ligado a uma molécula de
polietilenoglicol.

15. MÉTODO DE TRATAMENTO DE UMA DISFUNÇÃO, em um mamífero tal como câncer ou uma disfunção imune relacionada, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

obtenção de uma amostra de célula ou tecido de dito mamífero;

5 exame da amostra de célula ou tecido para detectar a expressão de GalNac-T14, e

subseqüente à detecção da expressão de dito GalNac-T14, administração a dito mamífero uma quantidade eficaz de Apo2L/TRAIL.

16. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado
10 pelo fato de que dita expressão de GalNac-T14 é examinada pela detecção da expressão de mRNA de GalNac-T14.

17. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que dita expressão de GalNac-T14 é examinada por imunohistoquímica.

15 18. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a etapa de exame da expressão dos receptores DR4, DR5, DcR1 ou DcR2 em dito tecido ou célula.

19. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado
20 pelo fato de que a amostra de célula ou tecido compreende células ou tecidos cancerígenos.

20. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que ditas células ou tecidos cancerígenos são pancreáticos, de linfoma, câncer de pulmão de célula não pequena, câncer de cólon, câncer coloretal, melanoma, ou células ou tecidos de condrosarcoma.

25 21. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que uma quantidade eficaz de polipeptídeo Apo2L/TRAIL que compreende os aminoácidos 114-281 é administrada a dito mamífero.

22. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado

pelo fato de que agente(s) quimioterápico(s) ou radioterapia é também administrada a dito mamífero.

23. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que uma citocina, agente citotóxico ou agente inibidor do
5 crescimento é também administrado a dito mamífero.

24. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que dito polipeptídeo Apo2L/TRAIL está ligado a uma molécula de polietilenoglicol.

25. USO DE APO2L/TRAIL, caracterizado pelo fato de ser na
10 preparação de um medicamento para tratamento de uma disfunção em mamífero, tal como disfunção imune relacionada ou câncer, em que a disfunção expressa GalNac-T14.

26. USO, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que dita expressão de GalNac-T14 é examinada pela detecção da
15 expressão de mRNA de GalNac-T14.

27. USO, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que dita expressão de GalNac-T14 é examinada por imunohistoquímica.

28. USO, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo
20 fato de que compreende adicionalmente a etapa de exame da expressão dos receptores DR4, DR5, DcR1 ou DcR2 em dito tecido ou célula.

29. USO, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o câncer é câncer de pâncreas, de linfoma, câncer de pulmão de célula não pequena, câncer de cólon, câncer colorretal, melanoma, ou células
25 ou tecidos de condrosarcoma.

30. USO, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que dito polipeptídeo Apo2L/TRAIL está ligado a uma molécula de polietilenoglicol.

1 TTTCTCTCACTGACTATAAAAGAAATAGAGAAAGGAGGCTTTCAGTGACCGGCTGCTGGCTGACTTACAGCAGTCAGACTCTGACAGGATC
 1 ATGGCTATGATGGAGGTCCAGGGGGACCCAGCCTGGGACAGACCTGCGTGTGATCGTGATCTTACAGTGTCTCTGACAGTCTCTCTGT
 1 MetAlaMetMetGluValGlnGlyGlyProSerLeuGlyGlnThrCysValLeuIleValIlePheThrValLeuLeuGlnSerLeuCys
 181 GTGGCTGTAACTTACGTGTACTTTACCAACGAGCTGAAGCAGATGCAGGACAAAGTACTCCAAAAGTGGCATTGCTTGTCTTTAAAGAA
 31 ValAlaValThrTyrValTyrPheThrAsnGluLeuLysGlnMetGlnAspLysTyrSerLysSerGlyIleAlaCysPheLeuLysGlu
 271 GATGACAGTTATTGGGACCCCAATGACGAAGAGAGATGAACAGCCCCCTGCTGGCAAGTCAAGTGGCAACTCCGTCAGCTCGTTAGAAAG
 61 AspAspSerTyrTrpAspProAsnAspGluSerMetAsnSerProCysTrpGlnValLysTrpGlnLeuArgGlnLeuValArgLys
 361 ATGATTTTGAGAACTCTGAGGAAACCATTTCTACAGTTCAAGAAAAGCAACAAAATATTTCTCCCCCTAGTGAGAGAGAAAAGAGGTCCNCAG
 91 MetIleLeuArgThrSerGluGluThrIleSerThrValGlnGluLysGlnGlnAsnIleSerProLeuValArgGluArgGlyProGln
 451 AGAGTAGCAGCTCACATAACTGGGACCAGAGGAAGAAACACATTTGCTCTCCAAACTCCAAGAATGAAAAGGCTCTGGGGCCGCAAA
 121 ArgValAlaAlaHisIleThrGlyThrArgGlyArgSerAsnThrLeuSerSerProAsnSerLysAsnGluLysAlaLeuGlyArgLys
 541 ATAAACTCCTGGGAATCATCAAGGAGTGGGCAATTCCTGAGCAACTTGCACTTGAGGAATGGTGAACCTGGTCATCCATGAAAAAGGG
 151 IleAsnSerTrpGluSerSerArgSerGlyHisSerPheLeuSerAsnLeuHisLeuArgAsnGlyGluLeuValIleHisGluLysGly
 631 TTTTACTACATCTATTCCCAACATACTTTCGATTTCAGGAGGAAATAAAAAGAAAACACAAAGAACGACAAACAAATGGTCCCAATATATT
 181 PheTyrTyrIleTyrSerGlnThrTyrPheArgPheGlnGluIleLysGluAsnThrLysAsnAspLysGlnMetValGlnTyrIle
 721 TACAAAATACACAAGTTATCCTGACCCCTATATTGTTGATGAAAAGTGCTAGAAATAGTTGTTGGTCTAAAGATGCAGAAATATGGACTCTAT
 211 TyrLysTyrThrSerTyrProAspProIleLeuLeuMetLysSerAlaArgAsnSerCysTrpSerLysAspAlaGluTyrGlyLeuTyr
 811 TCCATCTATCAAGGGGAATATTGAGCTTAAGGAAAATGACAGAATTTTGTCTCTGTAAACAAATGAGCACTTGATAGACATGGACCAT
 241 SerIleTyrGlnGlyGlyIlePheGluLeuLysGluAsnAspArgIlePheValSerValThrAsnGluHisLeuIleAspMetAspHis
 901 GAAGCCAGTTTTTTCGGGGCCTTTTAGTTGGCTAACTGACCTGGAAGAAAAGCAATAACCTCAAAGTGACTATTTCAGTTTTCAGGAT
 271 GluAlaSerPhePheGlyAlaPheLeuValGlyStp
 991 GATACACTATGAAGATGTTTTCAAAAAATCTGACCACCAAAACAAACACAGAAA

Fig. 1

```

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

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

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

151 GGCCGAGGAG CGCTCCCTAC CTCCATGGGA CAGCACGGAC CCAGTGCCCCG
CCGGCTCCTC GCGAGGGATG GAGGTACCCT GTCGTGCCTG GGTACAGGGC
GlyArgGlyA laLeuProTh rSerMetGly GlnHisGlyP roSerAlaArg

201 GGCCCGGGCA GGGCGCGCCC CAGGACCCAG GCCGGCGCGG GAAGCCAGCC
CCGGGCCCCG CCGCGCGGGG GTCCTGGGTC CGGCCGCGCC CTTCCGTCGG
68 AlaArgAla GlyArgAlaP roGlyProAr gProAlaArg GluAlaSerP

251 CTCGGCTCCG GGTCCACAAG ACCTTCAAGT TTGTCGTCGT CGGGGTCTCTG
GAGCCGAGGC CCAGGTGTTC TGGAAGTTCA AACAGCAGCA GCCCAGGAC
roArgLeuAr gValHisLys ThrPheLysP heValValVa lGlyValLeu

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

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

401 CAGGATCTCA TAGATCAGAA CGTCTGGAG CCTGTAACCG GTGCACAGAG
GTCTTAGAGT ATCTAGTCTT GCAGGACCTC GGACATTGGC CACGTGTCTC
135 GlySerHi sArgSerGlu ArgProGlyA laCysAsnAr gCysThrGlu

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

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

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

601 GCTGAGATGT GCCGGAAGTG CAGCACAGGG TGCCCCAGAG GGATGGTCAA
CGACTCTACA CGGCCTTCAC GTCGTGTCCC ACGGGGTCTC CCTACAGTT
201 AlaGluMetC ysArgLysCy sSerThrGly CysProArgG lyMetValLy

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

```

Fig. 2

```

701 CAGGCAATGG ACATAATATA TGGGTGATTT TGGTTGTGAC TTTGGTTGTT
    GTCCGTTACC TGTATTATAT ACCCACTAAA ACCAACACTG AAACCAACAA
235   GlyAsnG1 yHisAsnIle TrpValIleL euValValTh rLeuValVal

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

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

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

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

951 CCAGGAGCCG GCAGATTGTA CAGGTGTCAC TGTACAGTCC CCAGGGGAGG
    GGTCTCTCGG CGTCTAAACT GTCCACATGT ACATGTCAGG GGTCCCCTCC
    rGlnGluPro AlaAspLeuT hrGlyValTh rValGlnSer ProGlyGluAla

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

1051 CTGCTGGTTC CAGCAAATGG TGCTGACCCC ACTGAGACTC TGATGCTGTT
    GACGACCAAG GTCGTTTACC ACGACTGGGG TGACTCTGAG ACTACGACAA
    LeuLeuValP roAlaAsnG1 yAlaAspPro ThrGluThrL euMetLeuPhe

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

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

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

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

1301 GGATGGAAGA GAGACATGCA AAAGAGAGA TTCAGGACCT CTTGGTGGAC
    CCTACCTTCT CTCTGTACGT TTTCTCTTCT AAGTCCTGGA GAACCACCTG
435   MetGluG1 uArgHisAla LysGluLysI leGlnAspLe uLeuValAsp

1351 TCTGGAAAGT TCATCTACTT AGAAGATGGC ACAGGCTCTG CCGTGTCTCT
    AGACCTTTCA AGTAGATGAA TCTTCTACCG TGTCCGAGAC GGCACAGGAA
    SerGlyLysP heIleTyrLe uGluAspGly ThrGlySerA laValSerLeu

1401 GGAGTGA
    CCTCACT
468   GluOP*

```

Fig. 2B

1 MEQRGQNA PAASGARKRHGPGPREARGAR PGLRVPKTLVLVVA VLLLVSAESALITQQD
61 LAPQQR AAPQQRSSPSEGLCPPGHHISEDGRDCISCKYGDYSTHWNDLLFCLRCTRCD
121 SGEVELSPCTTTTRNTVCQCEEGTFREEDSPEMCRKCR TGCPRGMVKVGDCTPWS DIECVH
181 KE SGIIIGVTVAAVVLIVAVFVCKSLLWKKVLPY LKGICSGGGGDPERVDRSSQRPGAED
241 NVLNEIVSILQPTQVPEQEME VQEPAEPTGVNMLSPGESEHLL EPAAERSQRRRLVPA
301 NEGDP TETLRQCFDDFADLV PFDSWEPLMRKLG LMDNEIKVAKAEAA GHRDTLYTMLIKW
361 VNKTGRDASVHTLLDALET GERLAKQKIEDHLLSSGKFMYLEGNADSALS

Fig. 3A

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

Fig. 3B

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

Fig. 3C

```

1  GCTGTGGGAA  CCTCTCCACG  CGCACGAAC  CAGCCAAAC  GATTTTGGA  GTTGTACCA  AGATGCAAG  GGTGAAGGA  CGCTTCCTAC
   CGACACCCCT  GGAGAGCTGC  GCGTGTGCT  GAGTGTGCT  TAAAGACTA  TAAAGACTA  TAAAGACTA  TAAAGACTA  TAAAGACTA
101 CGTTAGGGAA  CTCTGGGGAC  AGAGGGGGG  GGGGGGGGG  GGGGGGGGG  GGGGGGGGG  GGGGGGGGG  GGGGGGGGG  GGGGGGGGG
   GCAATCCCTT  GAGACCCCTG  TCTCGGGGG  CCGGGGGGG  CCGGGGGGG  CCGGGGGGG  CCGGGGGGG  CCGGGGGGG  CCGGGGGGG
   1          MetalArg
201 GATCCCCAAG  ACCCTAAAGT  TCGTGTGCT  CATCGTGGG  GTCCTGCTG  GTCCTGCTG  GTCCTGCTG  GTCCTGCTG  GTCCTGCTG
   CTAGGGGTT  TGGGATTTCA  AGCAGCAGC  GTAGCAGCG  CAGGACGAG  GTCAGGATC  GTCAGGATC  GTCAGGATC  GTCAGGATC
   4  IleProLys ThrLeuLysP heValValVa lIleValAla ValLeuLeup roValLeuAl aTySerAla ThrThrAlaA rGlnGlnGlu uValProGln
301 CAGACAGTGG  CCCACAGCA  ACAGAGGCAC  AGCTTCAAG  GGGAGGAGT  TCCAGCAGG  TCCAGCAGG  TCCAGCAGG  TCCAGCAGG
   GTCTGTCACC  GGGGTGCTGT  TGTCTGCTGT  TGTCTGCTGT  TGTCTGCTGT  TGTCTGCTGT  TGTCTGCTGT  TGTCTGCTGT  TGTCTGCTGT
37  GlnThrVala laProGlnG lnglnArgHis SerPheLysG lyGlnGlnGlu yProAlagly SerHisArg sArgGlnHisTh rGlyAlaCys AsnProCysThr
401 CAGAGGGTGT  GGATTACACC  AACGCTTCCA  ACAATGAACC  TTCTTGCTTC  CCATGTACAG  TTTGTAAATC  AGATCAAAAA  CATAAAAGTT  CCTGCACCAT
   GTCTCCCA  CCTAATGTGG  TTGCGAAGGT  TGTCTGCTGT  TGTCTGCTGT  TGTCTGCTGT  TGTCTGCTGT  TGTCTGCTGT  TGTCTGCTGT
71  GluglyVa laspTyThr AsnAlaSerA sNsnGluPr oSerCysPhe ProCysThrv alCysLysse rAspGlnLys HisLysSers erCysThrMet
501 GACCAGAGAC  ACAGTGTGTC  AGTGTAAAGA  AGGCACCTTC  CGGAATGAAA  ACTCCCCAG  GATGTGCGG  AAGTGTAGCA  GGTGCCCCAG  TGGGGAAGTC
   CTGGTCTCTG  TGTACACAC  TCACATTTCT  TCCGTGGGAG  GCCTTACTTT  TGAGGGGTCT  CTACACGGCC  TTCACATCGT  CCACGGGATC  ACCCTTTCAG
104 ThrArgAsp ThrValCysG lncysLysG lUglyThrPhe ArgAsnGluA sNserProG lUmetyCysArg LysCysSera rGysProse rGlyGluVal
601 CAAGTCAGTA  ATTGTACGTC  CTGGGATGAT  ATCCAGTGTG  TTGAAGAATT  TGGTGCCAAT  GCCACTGTGG  AAACCCCGAG  TGCTGAAGAG  ACAATGAACA
   GTTCAGTCA  TAACATGCA  GACCTACTTA  TAGGTACAC  AACCTTCTTA  ACCACGGTTA  CCGTGACACC  TTTGGGGTGC  AGCACTTCTC  TGTACTTGT
137 GlnValSera snCysThrise rTrpAspasp ileGlnCysV alGluGluPh eGlyAlaAsn AlaThrValG luThrProAl aAlaGluGlu ThrMetAsnThr
701 CCAGCCCGGG  GACTCCTGCC  CCAGCTGCTG  AAGAGACAAT  GAACACCCAG  CCAGGGACTC  CTGCCCCAG  TGCTGAAGAG  ACAATGAACA  CCAGCCCCGG
   GGTCGGGGCC  CTGAGGACGG  GGTGAGACGG  TTCTCTGTTA  CTTGTGGTGC  GGTCCCTGAG  GACGGGGTGC  AGCACTTCTC  TGTACTGCT  GGTGCGGGCC
171 SerProgl yThrProAla ProAlaAlag luGluThrHe tAsnThrser ProGlyThrp roAlaProAl aAlaGluGlu ThrMetThrt hrSerProGly

```

Fig. 3D-1

```

801 GACTCTCTGCC CCAGCTGCTG AAGAGACAAT GACCACCAGC CCGGGGACTC CTGCCCCAGC TGCTGAAGAG ACAATGACCA CCAGCCCCGG GACTCTCTGCC
CTAGGACGG GGTGAGGAC TTCTCTGTGA CTGGTGGTGG GGCCTCTGAG GACGGGTGG ACGACTCTCT TGTTACTGGT GGTGCGGCC CTGAGGACGG
204 ThrProAla ProAlaAlaG luGluThrMe tThrThrSer ProGlyThrP roAlaProAl aAlaGluGlu ThrMetThrT hrSerProGl yThrProAla

901 TCTTCTCATT ACCTCTCATG CACCATCGTA GGGATCATAG GGGATCATGT TTCTAATTGT GCTTCTGATT GTGTTTGTCTT GAAAGACTTC ACTGTGGAAG AAATTCTCTC
AGAAGAGTAA TGGAGAGTAC GTGGTAGCAT CCCTAGTATC CCCTAGTATC AAGATTACCA CGAAGACTAA CACAACAAA CTTTCTGAAG TGACACCTTC TTTAAGGAAG
237 SerSerHisT yrLeuSerCy sThrIleVal GlyIleIleV lleuIleVal ValPheVal

1001 CTTACCTGAA AGGTTCAGGT AGCGCTGGC TGAGGGGGGG GGGGGCTGGA CACTCTCTGC CCTGCTCTCC TCTGCTGTGT TCCACACAGC AGAAACGCCCT
GAATGGACTT TCCAGTCCA TCCGGGACCG ACTCCGGCCC CCGCGGACCT GTGAGAGACG GGACGGAGGG AGACGACACA AGGGTGTCTG TCTTTGCGGA

1101 GCCCCTGCC CAAAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA AAAA
CGGGACGGG GTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT

1 GCTGTGGGAA CCTCTCCAG CGCACGAAC TCCGCTTGA GTCTGCTGCT GAGAGAGTGC GCGTCTTGA GTCTGCTGCT TAAAAACCT CAAACTGGT TCTACCTCC CCACCTCTC GCGAAGGATG
CGACACCCCT GGAGAGGTGC GCGTCTTGA GTCTGCTGCT TAAAAACCT CAAACTGGT TCTACCTCC CCACCTCTC GCGAAGGATG
MetGlnG l yVallySglu ArgPheLeuPro

101 CGTTAGGGAA CTCTGGGAC AGAGCGCCC GCGCGCTGA TGGCGGAGG AGGTGCGAC CCAGGACCA GAGCGGCTC GGAAACATA CCATGGCCCG
GCAATCCCTT GAGACCCCTG TCTCGCGGG GCGCGGACT ACCGCTCCG TCCACGCTG GGTCTGGGT CCTGCCAG CCCTTGGTAT GGTACCGGGC
-30 LeuGlyAs nSerGlyAsp ArgAlaProA rgProProAs pGlyArgGly ArgValArgP roArgThrG l nAspGlyVal GlyAsnHisT hrMetAlaArg

201 GATCCCCAAG ACCCTAAAGT TCGTCTCGT CATCGTCCG GTCTCTCTG CAGTCTAGC TTACTCTGCC ACCACTGCC GGCAGGAGGA AGTTCCCCAG
CTAGGGGTTT TGGGATTTC AGCAGCAGCA GTAGCAGCG CAGGACGAC GTGAGATCG AATGAGACGG TGGTGACGG CCGTCTCTCT TCAAGGGGTC
4 IleProLys ThrLeuLysP heValValva lleValAla ValLeuLeuP roValLeuAl aTyrSerAla ThrThrAlaA rgGlnGluG l uValProGln

301 CAGACAGTGG CCCCACAGCA ACAGAGGCAC AGCTTCAAG GGGAGGAGTG TCCAGCAGGA TCTCATAGAT CAGAAACATA TGGAGCCCTGT AACCCGTGCA
GTCTCTCACC GGGGTGTCT GTCTCTCCGT TGTCTCCGT TCGAAGTTCC CCCTCTCAC AGGTCTCTCT AGAGTATCTA GTCTGTATG ACCTCGACA TTGGGACCGT
37 GlnThrValA laProGlnG l nGlnArgHis SerPheLysG lyGluGluCy sProAlaGly SerHisArgS erGluHisTh rGlyAlaCys AsnProCysThr

```

Fig. 3D-2

401 CAGAGGGTGT GGAATACACC AACGCTTCCA ACAATGAACC TTCTTGCTTC CCATGTACAG TTTGTAATC AGATCAAAA CATAAAAGTT CCTGCACCAT
 GTCTCCACA CCAATGTGG TTGCGAAGGT TGTACTTGG AAGAACGAAG GGTACATGTC AAACATTTAG TCTACTTTT GTATTTTCAA GGACGTGTA
 71 GluGlyVa lasPyrThr AsnAlaSerA snAsnGluPr oSerCysPhe ProCysThrV alCysLysSe rAspGlnLys HisLysSeis erCysThrMet
 501 GACCAGAGAC ACAGTGTGTC AGTGTAAGA AGGCACCTTC CGGAATGAAA ACTCCCCAGA GATGTCCGG AAGGTAGCA GTGCCCCTAG TGGGGAAGTC
 CTGGTCTCTG TGTACACAG TCACTTTCT TCCGTGGAAG GCCTTACTTT TGAGGGGTCT CTACACGGCC TTCACATCGT CCACGGGATC ACCCCTTCAG
 104 ThrArgAsp ThrValCysG lncCysLysG lncGlyThrPhe ArgAsnGluA snSerProG lncMetCysArg LysCysSerA rgCysProse rglyGluVal
 601 CAAGTCAGTA ATTGTACGTC CTGGGATGAT ATCCAGTGTG TTGAAGAATT TGGTGCCAAT GCCACTGTGG AAACCCACG TGCTGAAGAG ACAATGAACA
 GTTCAGTCAT TAACATGCAG GACCTACTA TAGGTACAC TACTTCTTAA ACCACGGTTA CGGTGACACC TTTGGGGTCG ACGACTTCTC TGTACTTGT
 137 GlnValSerA snCysThre rTrpAspAsp IleGlnCysV alGluGluPh eGlyAlaAsn AlaThrValG luThrProAl aIaGluGlu ThrMetAsnThr
 701 CCAGCCCCGG GACTCCTGCC CCAGCTGCTG AAGAGACAAT GAACACCAGC CCAGGGACTC CTGCCCCAGC TGCTGAAGAG ACAATGACCA CCAGCCCCGG
 GGTGCGGGCC CTGAGGACGG GGTGACGAC TTCTCTGTTA CTTGTGTCG GGTCCCTGAG GACGGGGTCG ACGACTTCTC TGTACTTGT GGTGCGGGCC
 171 SerProG lYThrProAla ProAlaAlaG luGluThrMe tAsnThrSer ProGlyThrP roAlaProAl aIaGluGlu ThrMetThrT hrSerProGly
 801 GACTCCTGCC CCAGCTGCTG AAGAGACAAT GACCACCAGC CCGGGACTC CTGCCCCAGC TGCTGAAGAG ACAATGACCA CCAGCCCCGG GACTCCTGCC
 CTGAGGACGG GGTGACGAC TTCTCTGTTA CTGGTGTGTC GGTCCCTGAG GACGGGGTCG ACGACTTCTC TGTACTTGT GGTGCGGGCC CTGAGGACGG
 204 ThrProAla ProAlaAlaG luGluThrMe tThrThrSer ProGlyThrP roAlaProAl aIaGluGlu ThrMetThrT hrSerProG lYThrProAla
 901 TCTTCTCATT ACCTCTCATG CACCATCGTA GGGATCATAG TTCTAATTCT GCTTCTGATT GTGTTTGT TT GAAAGACTTC ACTGTGGAAG AAATTCCTTC
 AGAAGAGTAA TGGAGAGTAC GTGGTAGCAT CCTACTATC AAGATTACA CGAAGACTAA CACAACAAA CTTTCTGAAG TGACACCTTC TTTAAGGAAG
 237 SerSerHist yrLeuSerCy sThrIleVal GlyIleIleV alLeuIleVal lLeuIleVal ValPheVal
 1001 CTTACTGAA AGGTTACAGT AGCGGTGGC TGAGGGCGGG GGGCGCTGGA CACTCTCTGC CTGCTCTCC TCTGCTGTGT TCCACAGAC AGAAACGCC
 GAATGGACTT TCCAAGTCCA TCCGCGACCG ACTCCGGCCC CCGCGACCT GTGAGAGAG GACGGAGG AGACGACACA AGGGTGTCTG TCTTTCGGA
 1101 GCCCCTGCCC CAAAAAAA CAAAAAAA CAAAAAAA CAAAAAAA CAAAAAAA CAAAAAAA CAAAAAAA CAAAAAAA CAAAAAAA
 CCGGGACGGG GTTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT

Fig. 3D-3

```

1  CCAACTGCAC CTCGGTTCTA TCGATTGAAT TCCCCGGGGA TCCTCTAGAG ATCCCTCGAC
61  CTCGACCCAC GCGTCCGGAA CCTTTGCACG CGCACAAACT ACGGGACGA TTTCTGATTG
121  ATTTTGGCG CTTTCGATCC ACCCTCCTCC CTTCTCATGG GACTTTGGG ACAAAGCGTC
1      M G L W G Q S V
181  CCGACCGCCT CGAGCGCTCG AGCAGGGCGC TATCCAGGAG CCAGGACAGC GTCGGGAACC
9      P T A S S A R A G R Y P G A R T A S G T
241  AGACCATGGC TCCTGGACCC CAAGATCCTT AAGTTCGTCG TCTTCATCGT CGCGGTTCTG
29      R P W L L D P K I L K F V V F I V A V L
301  CTGCCGGTCC GGGTTGACTC TGCCACCATC CCCCGGCAGG ACGAAGTTCC CCAGCAGACA
49      L P V R V D S A T I P R Q D E V P Q Q T
361  GTGGCCCCAC AGCAACAGAG GCGCAGCCTC AAGGAGGAGG AGTGTCAGC AGGATCTCAT
69      V A P Q Q R R S L K E E C P A G S H
421  AGATCAGAAT ATACTGGAGC CTGTAACCCG TGCACAGAGG GTGTGGATTA CACCATTGCT
89      R S E Y T G A C N P C T E G V D Y T I A
481  TCCAACAATT TGCCCTTCTTG CCTGCTATGT ACAGTTTGTA AATCAGGTCA AACAAATAAA
109     S N N L P S C L L C T V C K S G Q T N K
541  AGTTCCTGTA CCACGACCAG AGACACCGTG TGTACGTGTG AAAAAGGAAG CTTCAGGAT
129     S S C T T R D T V C Q C E K G S F Q D
601  AAAAAGTCCC CTGAGATGTG CCGGACGTGT AGAACAGGGT GTCCCAGAGG GATGGTCAAG
149     K N S P E M C R T C R T G C P R G M V K
661  GTCAGTAATT GTACGCCCCG GAGTGACATC AAGTGCAAAA ATGAATCAGC TGCCAGTTCC
169     V S N C T P R S D I K C K N E S A A S S
721  ACTGGGAAAA CCCAGCAGC GGAGGAGACA GTGACCACCA TCCTGGGGAT GCTTGCCCTCT
189     T G K T P A A E E T V T T I L G M L A S
781  CCCATCACT ACCTTATCAT CATAGTGGTT TTAGTCATCA TTTAGCTGT GGTGTGGTT
209     P Y H Y L I I I V V L V I I L A V V V V
841  GGCTTTTCAT GTCGGAAGAA ATTCAATTCT TACCTCAAAG GCATCTGCTC AGGTGGTGGA
229     G F S C R K K F I S Y L K G I C S G G G

```

Fig. 3E-1

901 GGAGGTCCCG AACGTGTGCA CAGAGTCCTT TTCCGGCGGC GTTCATGTCC TTCACGAGTT
 249 G G P E R V H R V L F R R R S C P S R V
 961 CCTGGGGCGG AGGACAATGC CCGCAACGAG ACCCTGAGTA ACAGATACTT GCAGCCCACC
 269 P G A E D N A R N E T L S N R Y L Q P T
 1021 CAGGTCTCTG AGCAGGAAAT CCAAGGTCAG GAGCTGGCAG AGCTAACAGG TGTGACTGTA
 289 Q V S E Q E I Q G Q E L A E L T G V T V
 1081 GAGTYGCCAG AGGAGCCACA GCGTCTGCTG GAACAGGCAG AAGCTGAAGG GTGTCAGAGG
 309 E Xaa P E E P Q R L L E Q A E A E G C Q R
 1141 AGGAGGCTGC TGGTTCAGT GAATGACGCT GACTCCGCTG ACATCAGCAC CTTGCTGGAT
 329 R R L L V P V N D A D S A D I S T L L D
 1201 GCCTCGGCAA CACTGGAAGA AGGACATGCA AAGAAACAA TTCAGGACCA ACTGGTGGGC
 349 A S A T L E E G H A K E T I Q D Q L V G
 1261 TCCGAAAAGC TCTTTTATGA AGAAGATGAG GCAGGCTCTG CTACGTCCTG CCTGTGAAAG
 369 S E K L F Y E E D E A G S A T S C L
 1321 AATCTCTTCA GGAACCAGA GCTTCCCTCA TTTACCTTTT CTCCTACAAA GGAAGCAGC
 1381 CTGGAAGAAA CAGTCCAGTA CTTGACCCAT GCCCAACAA ACTCTACTAT CCAATATGGG
 1441 GCAGCTTACC AATGGTCCTA GAACTTTGTT AACGCACCTG GAGTAATTTT TATGAAATAC
 1501 TCGTGTGAT AAGCAAAACG GAGAAATTA TATCAGATTC TTGGCTGCAT AGTTATACGA
 1561 TTGTGTATTA AGGTCGTTT TAGGCCACAT GCGGTGGCTC ATGCCTGTAA TCCCAGCACT
 1621 TTGATAGGCT GAGGCAGGTG GATTGCTTGA GCTCGGGAGT TTGAGACCAG CCTCATCAAC
 1681 ACAGTGAAAC TCCATCTCAA TTTAAAAAGA AAAAAAGTGG TTTTAGGATG TCATTCTTTG
 1741 CAGTCTTCA TCATGAGACA AGTCTTTTTT TCTGCTTCTT ATATTGCAAG CTCCATCTCT
 1801 ACTGGTGTGT GCATTTAATG ACATCTAACT ACAGATGCCG CACAGCCACA ATGCTTTGCC
 1861 TTATAGTTTT TTAACCTTAG AACGGGATTA TCTTGTATT ACCTGTATT TCAGTTTCGG
 1921 ATATTTTTGA CTTAATGATG AGATTATCAA GACGTACCCC TATGCTAAGT CATGAGCATA
 1981 TGGACTTACG AGGTTTCGAC TTAGAGTTTT GAGCTTTAAG ATAGGATTAT TGGGGGCTTA
 2041 CCCCCACCTT AATTAGAAGA AACATTTTAT ATTGCTTTAC TA

Fig. 3E-2

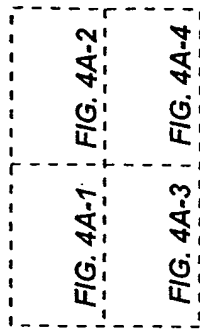


Fig. 4A

Fig. 4A-1

-640 CCCAACCCACGATGGTCTGGGAGCTGCGCCACAGGCTTGGCGCTGGCGGCCCGCAACAGACCGAGCGTTTCGGTCGGC
 -450 GTCGGGCCCCGCTCCCGCTCACTCCCTCCGCTCGTGTCTCCCGGGGTGCTTGGCACAGCCTCGGATTCCTCCCT
 -300 GTGGCGGCGTGGGAACATCTCGGCAGCCACCGCGCTTCTCCGCTGGAGCGGGCGTCCAGCTTGGCTGCCCTCGGTCCT
 -150 CTTGCAGGATCCTGCCGCCCTCCAAACCGGATCCTGGGTCTAGAGCTCCCCAGAGCGGCTCGCCAGGACTCCTGCC

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

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

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

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

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

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

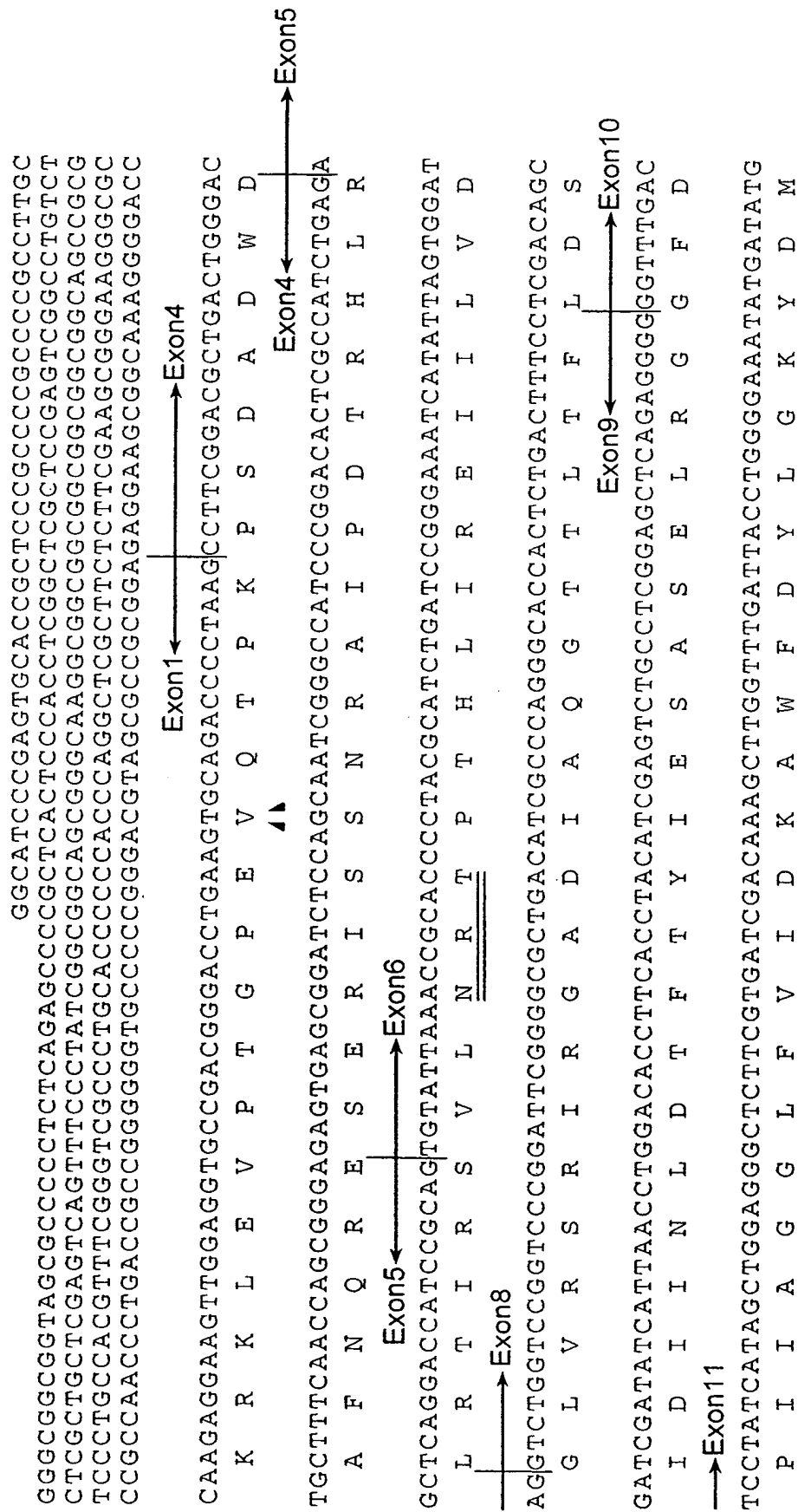


Fig. 4A-2

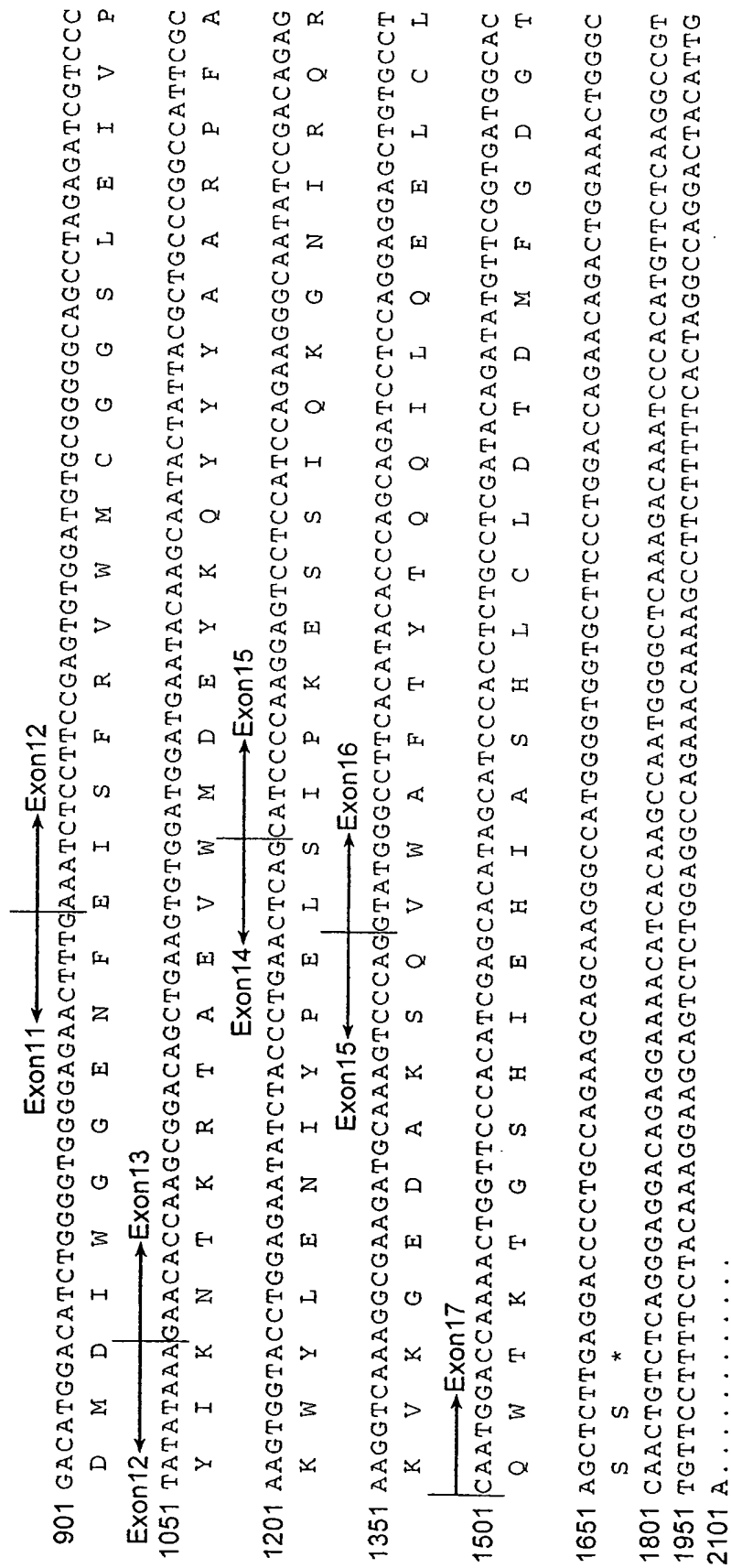


Fig. 4A- 3

```

CTGCAGCCGAGTGGGGCACGTCTTCGGGAAGACCCCTACGTTTTCCTGATGGAAATGCCAACACG
C S R V G H V F R K K H P Y V F P D G N A N T
      Exon13 ← Exon14
CCTGGAGAGGCCCTTCGGGAATGTTGAGAGCAGATTGGACCTGAGGAAGAAATCTGCGCTGCCAGAGCTTC
L E R P F G N V E S R L D L R K N L R C Q S F

ACAGAAAGTGCCCTGGAAATCTCAAGGCAGAAACAACCAAGAAACCCCAACCTAAAGTTGAGCCCTGTGCC
Q K C L E S Q R Q N N Q E T P N L K L S P C A
      Exon16 ←
GTCAGTCATCACCTTGTTCCCTGGCGCCCCCAGTGGTTCTTGTCCTTTGCAAGAAATGGAGATGACCGACAG
S V I T L F P G A P V V L V L C K N G D D R Q

CGAGAACGGCAAGGAAATCGTCGTCAACCCATGTGAGTCCTCACTCATGAGCCAGCACTGGGACATGGTG
E N G K E I V V N P C E S S L M S Q H W D M V

AGCAAGCAGCCTGCAACCACCTCAGACATCCTGGACTGGGAGGTCAGGCAGCCCCCAGGACAGGAG

TAAGTCCAGTCCGGCCAGTCATTCCCTGATTGGTATCTGGAGACAGAAACCTAATGGGAAAGTGTATTAT
AGAGATGAAGAAATGGAGGTGTTTCCAAAAGAAATAAAGAGAACTTAGAAGTTGAAAAAATAAAAAA

```

Sequência de nucleotídeo do de cDNA de ppGalNAc-T14 e a sequência de aminoácidos prevista do ppGalNAc-T14. As junções exon-intron estão indicadas. O Um domínio putativo transmembrânico está no quadro. O Um sítio putativo de N-glicosilação foi indicado por sublinhado com linha dupla. A posição inicial da forma truncada trincada foi indicada por triângulo.

Fig. 4A-4

Fig. 4B

Fig. 4B-1

GalINac-T3

-49

1 M A H L K R L V K L H I K R H Y H K...K...F W K L G A V I
 1 ATGGCTCACCTAAAGCGACTAGTAAATACACATTAAAGACATTACCATAAAAGTTCTTGGAAGCTTGGTGCGAGTAAT
 51 R M E R N M K N K N K M L D L M L E A V N N I K D A M
 151 AGGATGGAAGGAACATGAAACAAACAAAGATGTTGGATTAAATGCTAGAAGCTGTAAACAATATTAGGATGCCAT
 101 Y Y T A A E L K P V L D R P P Q D S N A P G A S G K A
 301 TATTATACAGCAGCAGAATTGAAGCCTGTCCCTTGACCGTCCACCTCAGGATTCAAATGCACCTGGTGCTTCTGGTAAAGC
 151 N A F A S D R I S L H R D L G P D T R P P E C I E Q K
 451 AATGCTTTCGCAAGTGACAGGATTCTTTCGACCGAGATCTTGGACCAACACTCGACCTCCTGAAATGTATTGAACAAAA
 201 L L R T V H S V L Y S S P A I L L K E I I L V D D A S
 601 TTGCTTAGAACTGTCCACAGTGTGCTCTATTCTTCACCTGCAATACTGCTGAAGGAAATCATTTTGGTGATGCTAG
 251 Q R E R K G L I T A R L L G A T V A T A E T L T F L D
 751 CAAAGAGAAAGAAAGTCTGATCACTGCTCGGTGCTAGGAGCAACAGTCGCAACGCTGAAACGCTCACATTTTTAGA
 301 V V S P D I A S I D L N T F E F N K P S P Y G S N H N
 901 GTCGTAAGTCCAGATATTGCATCCATAGATCTGAACACGTTTGAATTCAACAAACCTTCTCCTTATGGAAGTAACCATAA
 351 K D E T Y P I K T P T F A G G L F S I S K E Y F E Y I
 1051 AAAGATGAAACCTACCCAATTAAACACCCCACTTTTGCAGGAGGACCTTTTTCATATCAAAAGAAATATTTTGAGTATAT
 401 C G G Q L E I M P C S V V G N V F R S K S P N S F P K
 1201 TGTGGTGGGCAGTTGGAGATTATGCCCTTGCTCTGTTGTTGGACATGTTTTTCGCAGCAAAAGCCCTCATAGCTTTCCAAA
 451 F Y R R N T D A A K I V K Q K A F G D L S K R F E I K
 1351 TTTTATAGGAGAAATACAGATGCAGCAAAAAATGTTAAACAAAAAGCATTTGGTGATCTTTTCAAAAAGATTTGAAATAAA

.....GAAGAAGAAATAACTGTTATTGTCAAGTGACAAGCTTTTAATGTCAGA
F F F I I V L V L M Q.....R E V S V Q Y S K E E S
 TTTTTCCTTATAATAGTTTGGTTTTAAATGCAAGAGAGTAAGTGTTCAATATTCCAAAGAGGAATCA
 P K M Q I G A P V R Q N I D A G E R P C L Q G
 GCCAAAATGCAAAATAGGAGCACCTGTCTCAGGCAAAACATTTGATGCTGGTGAGAGACCTTGTGTTGCAAGGA
 F K T T N* L S V E E Q K E K E R G E A K H C F
 ATCAAGACAAACCAATTTAAGTGTGTAAGAGCAAAAGGAAAGGACGTGGGGAAGCTAAACACTGCTTT
 F K R C P L P T T S V I I V F H N E A W S T
 ATTAAGCGCTGCCCTCCCTGCCACCACCGTGTCTATAATAGTTTTCATAATGAAGCGTGGTCCACG
 V D E Y L H D K L D E Y V K Q F S I V K I V R
 TGTAGATGAGTACTTACATGATAAACTAGATGAATATGTAACAATTTTCTATAGTAAAAATAGTCAGA
 A H C E C F Y G W L E P L L A R I A E N* Y T A
 TGCTCACTGTGAGTGTCTTCTATGGTTGGCTAGAACCTCTGTGTTGCCAGAAATAGCTGAGAAGCTACACGGCT
 R G N F D W S L S F G W E S L P D H E K Q R R
 CCGTGGAAATTTTGACTGGAGTCTTTCATTTGGCTGGGAGTCCGCTTCCTGATCATGAGAAGCAAGAAAGG
 G S Y D E E M E I W G G E N I E M S P R V W Q
 TGGAAAGCTATGATGAAGAAATGGAAATCTGGGGAGGTGAAAAATATAGAAAATGTCTTTCAGAGTATGGCAA
 G T Q V I A R N Q V R L A E V W M D E Y K E I
 AGGCACTCAGGTGATGCTAGAAACCAAGTTCGCCCTTGCAAGAGTCTGGATGGATGAATACAAGGAAATA
 H R L R C K N* F T W Y L N N I Y P E V Y V P D
 ACACCGTCTTCGGGTGTA AAAATTTTACATGGGTATCTGAACAACATTTATCCAGAGGTGTATGTGCCAGAC

Fig. 4B-2

501 L N P V I S G Y I K S V G Q P L C L D V G E N N Q G G
 1501 CTAAATCCCTGTTATATCTGGATACATTAAAGCGTTGGTCAGCCCTCTATGTCTGGATGTTGGAGAAAACAATCAAGGAGG
 551 E I R H N I Q K E L C L H A A Q G L V Q L K A C T Y K
 1651 GAAATTCGGCACACATCCAGAAGGAATTATGTCTTCAATGCTCAAGGTCTCGTTCAGCTGAAGGCATGTACCTACAA
 601 F L K M C L S A N G E H P S L V S C N* P S D P L Q K W
 1801 TTCTTAAAAATGTGCCCTTTCAGCAAAATGGAGAGCATCCCAAGTTTAGTGTCAATGCCCATCAGATCCCACTCCAAAAAATG
 1951 CTGTGACTAGGCATACACTGTAGTTTGTGAAAAATTATGCAAAAGCAGCTAAATGTAACTTATCCCAAGTGCAATTTTCTT
 2101 ATACCAAAGACTATTTCAAAATGTCCAGATGTAGGGGAGAGATGTTTACAGTATGATGAAAAATAATTTCCCAAGTAAAG
 2251 TATTTCCCTAGTTTGTGGGGATAGGAAGAAAGATTTGTACTGTATTTTAACTACATAAAAAATAGATCAATAA
 2401 GGTGAACCTTTTGTGCGTTTGTCTGCTCAAAATGTTTCCCTTAAACATGAACCTGAATAAGGAGAGAGATTT
 2551 TAAGTCTTCCCTTAAATGACTTTTCTTAAATGATACTGTGTGTTTCCCAAGCACTTTTAAAAAAATTTTATATAAT
 2701 TGAATGTTTGTGATATTAATAATTCAAATGCAGAAATACCTTGACTCATTTTAAAGCTAAATTTTGTACTGATTCAATTATAA
 2851 AACACAAATAAATCCTCAACACTAAAAAATAA

Fig. 4B-3

```

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

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

I L S Q N D *
GATACTTAGCCAAATGATTAAGTGTTCCCTTAAATTAAGTTGAAAAGGAAATATTCTTTCTCATAAAA

ATTTATATCTTTATGTAGCACTATCTACAGAAATCTGCAAGTTTCTGTTCCTTCAAAGCACAAATAACTAGTA
TGAAGTTTGTGTGTTTGTACACTTAGGGATATATATATAGCTACATTCACACACTCACAAATTTAAAA
ATGTCAGCATTTGGCCCTCTGTGTACAAACCAGAGCTTTTACAGATCCAGAAATTTATAGTTTAAATGCA
ITTAACACTTAAATTTCTTTGGCAAAATTTTAAACATTTTGTAGTCTGTAATACACTCCACTTGAGCACT
TACTATCTGTTGAAAAGGTGTCCTTTTCCCTTCTAGTATTTTCTTACCAAATTCACATAATCT
TTGTAATGGATTTTGGACTTTGTGAATGGATCTTTTCATCAAAAGCCCTTATTTTATCTATGTGGAA

```

A sequência de aminoácidos é mostrada em códigos de letra única. O segmento hidrofóbico que representa o domínio transmembrânico putativo está sublinhado com linha dupla (Kyte & Doolittle, window 8) (32) e a sequência adjacente de aminoácidos carregados adjacentes sublinhados com linha pontilhada. Quatro potenciais sítios ligados de N-glicosilação são indicados por asteriscos.

Fig. 4B-4

NSCLC IC50 SUMÁRIO			Apo2L 0.5% FBS MTT		10% FBS		DR5 Ab+XL 0.5% FBS MTT		10% FBS	
			Real	Estimado	Real	Estimado	Real	Estimado	Real	Estimado
1	H2122	adenocarcinoma	10.7	0.7	3.1	1.5	148.9	64.8	205.3	92.1
2	A427		12.4	2.8	9.6	1.4	5.8	5.6	46.3	58.1
3	H647	adenoescomoso	14.9	1.1	31.7	5.3	326.9	57.8	741.6	263.8
4	SK-MES-1	escamoso	73.4	14.8	16.6	1.2	450.3	112.9	288.3	12.2
5	H838	adenocarcinoma	63.2	0.7	90.0	2.5	1000.0	0.0	1000.0	0.0
6	H358	bronquioalveolar	126.7	62.3	224.2	209.8	1000.0	0.0	1000.0	0.0
7	H2126		364.4	21.1	171.6	89.3	1000.0	0.0	1000.0	0.0
8	H460	célula grande	47.8	16.7	623.7	532.2	543.9	185.0	1000.0	0.0
9	H1703	adenocarcinoma	509.9	693.2	1000.0	0.0	345.5	420.0	658.3	483.2
10	H2405	adenocarcinoma	567.1	510.1	1000.0	0.0	433.0	261.5	1000.0	0.0
11	H650	bronquioalveolar	287.6	30.8	1000.0	0.0	231.8	69.5	1000.0	0.0
12	H1568	adenocarcinoma	69.8	14.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
13	H1666	bronquioalveolar	1000.0	0.0	249.8	84.5	1000.0	0.0	897.5	145.0
14	H322T	bronquioalveolar	1000.0	0.0	509.1	694.2	1000.0	0.0	1000.0	0.0
15	SW1573	célula alveolar	1000.0	0.0	1000.0	0.0	466.6	157.3	1000.0	0.0
16	H292	epiderme mucosa	1000.0	0.0	1000.0	0.0	293.3	69.3	1000.0	0.0
17	H1650	bronquioalveolar	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	760.1	339.3
18	H522	adenocarcinoma	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
19	EKVX	adenocarcinoma	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
20	H661	célula grande	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
21	H23	adenocarcinoma	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
22	LXFL 529	célula grande	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
23	H226	escamoso	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
24	A549		1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
25	H1781	bronquioalveolar	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
26	H1299		1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
27	HOP 62	adenocarcinoma	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
28	H2009	adenocarcinoma	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
29	HOP 92	célula grande	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
30	H1793	adenocarcinoma	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
31	H1975	adenocarcinoma	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
32	H1651	adenocarcinoma	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
33	calu-1	célula epidermóide	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
34	H1435	adenocarcinoma	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
35	HOP 18	célula grande	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
36	H520	escamoso	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
37	H441	adenocarcinoma	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
38	H2030	adenocarcinoma	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
39	H1155		1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
40	H1838	adenocarcinoma	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
41	H596	adenoregular	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
42	HLF α	epidermóide	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0

Fig. 5

Câncer Pancreático Sumário IC50		Apo2L 0.5% FBS MTT		10% FBS		DR5 Ab+XL 0.5% FBS MTT		10% FBS	
		Real Estimado		Real Estimado		Real Estimado		Real Estimado	
		Real	Estimado	Real	Estimado	Real	Estimado	Real	Estimado
1	Panc 05.04	40.1	5.3	26.8	20.1	24.9	4.3	23.3	12.8
2	BxPC3	247.0	117.6	34.3	11.6	364.6	113.5	411.8	12.7
3	HPAC	1000.0	0.0	10.8	1.3	1000.0	0.0	580.8	323.7
4	SU.86.86	68.5	69.3	27.8	9.9	247.6	162.3	390.6	10.9
5	HuP-T3	629.3	524.3	57.5	62.3	421.0	271.5	367.7	95.7
6	PSN1	715.7	492.4	357.5	556.9	305.0	163.7	423.4	223.4
7	MiaPaCa-2	563.5	617.3	1000.0	0.0	66.0	16.1	137.4	50.8
8	Panc 08.13	1000.0	0.0	1000.0	0.0	44.8	28.7	17.0	3.1
9	PA-TU-8988T	1000.0	0.0	1000.0	0.0	368.0	133.8	375.4	119.4
10	Panc 03.27	1000.0	0.0	288.7	189.1	1000.0	0.0	1000.0	0.0
11	Capan-1	371.2	545.1	681.2	552.2	613.4	437.1	793.6	357.4
12	SW 1990	158.3	20.5	844.7	269.0	467.8	416.0	913.6	149.7
13	CFPAC-1	883.4	164.9	535.4	657.1	381.9	22.6	925.5	105.4
14	PL45	1000.0	0.0	1000.0	0.0	538.7	652.4	1000.0	0.0
15	PA-TU-8902	871.5	181.8	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
16	Aspc-1	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
17	Hs766T	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
18	Panc 10.05	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
19	Panc1	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
20	Capan-2	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
21	HPAF-II	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
22	Panc 02.03	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0
23	Panc 04.03	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0	1000.0	0.0

Fig. 6

Sumário NHL IC50			Apo2L 10% FBS MTT		DR5 Ab+XL 10% FBS MTT		
			Real	Estimado	Real	Estimado	
1	JEKO-1	MCL	11.5	6.4	61.8	10.7	7% Apo2L
2	SU-DHL-4	DLBCL	1504.1	1727.4	13.6	5.6	
3	OCI-LY-19	DLBCL	3000	0	26.2	15.8	29% DR5 Ab+
4	SR	DLBCL	3000	0	187.8	43.7	
5	Farage	DLBCL	3000	0	1269.1	1504.1	
6	DOHH-2	DLBCL, FL	3000	0	84% Morte	anti-hu IgG	
7	Toledo	DLBCL	3000	0	3000	0	
8	WSU-NHL	FL	3000	0	3000	0	
9	KARPAS-422	DLBCL, FL	3000	0	3000	0	
10	GRANTA-519	NHL, MCL	3000	0	3000	0	
11	Pfeiffer	DLBCL	3000	0	3000	0	
12	HT	DLBCL	3000	0	3000	0	
13	SC-1	FL	3000	0	3000	0	
14	DB	DLBCL	3000	0	3000	0	

Fig. 7

Fig. 8

DR5 Ab+ dados de sensibilidade e correlação com a expressão de GaINac-T14: NSCLC, Panc Ca, NHL

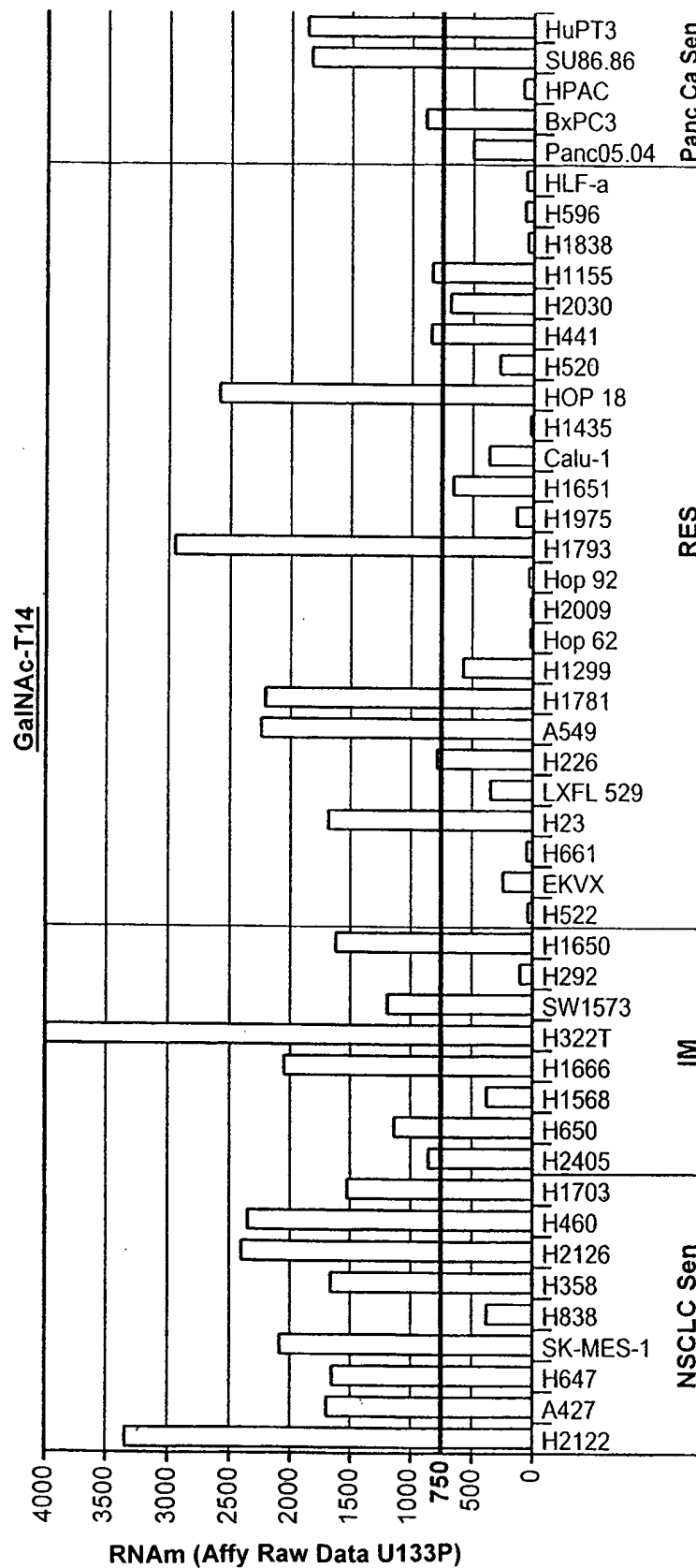


Fig. 8A

Sensibilidade 27/34=79%
Especificidade 35/43=81%
Valor preditivo positivo previsto 27/35=77%
Valor preditivo negativo previsto
35/42=83%

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

Teste Exato de Fischer
Valor de p = 8.251603801901834e-8 (para Apo2h: 0.000054)

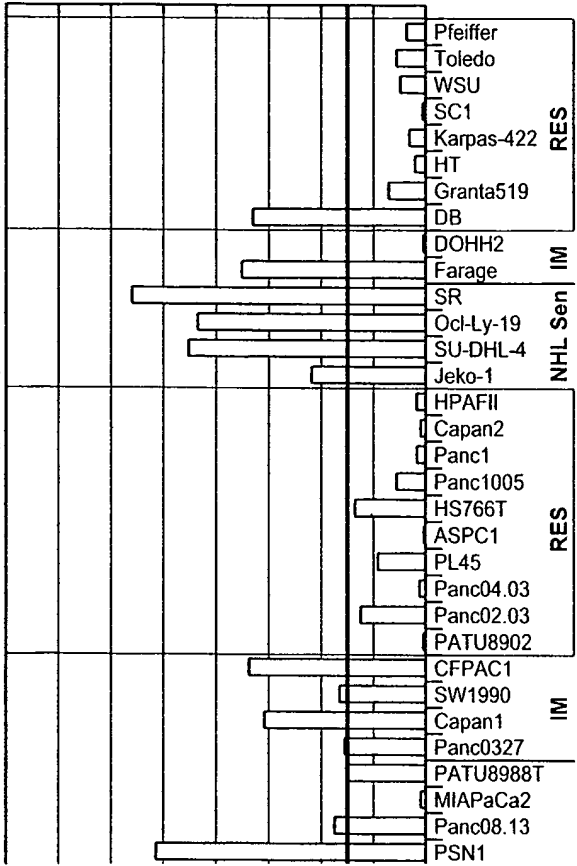
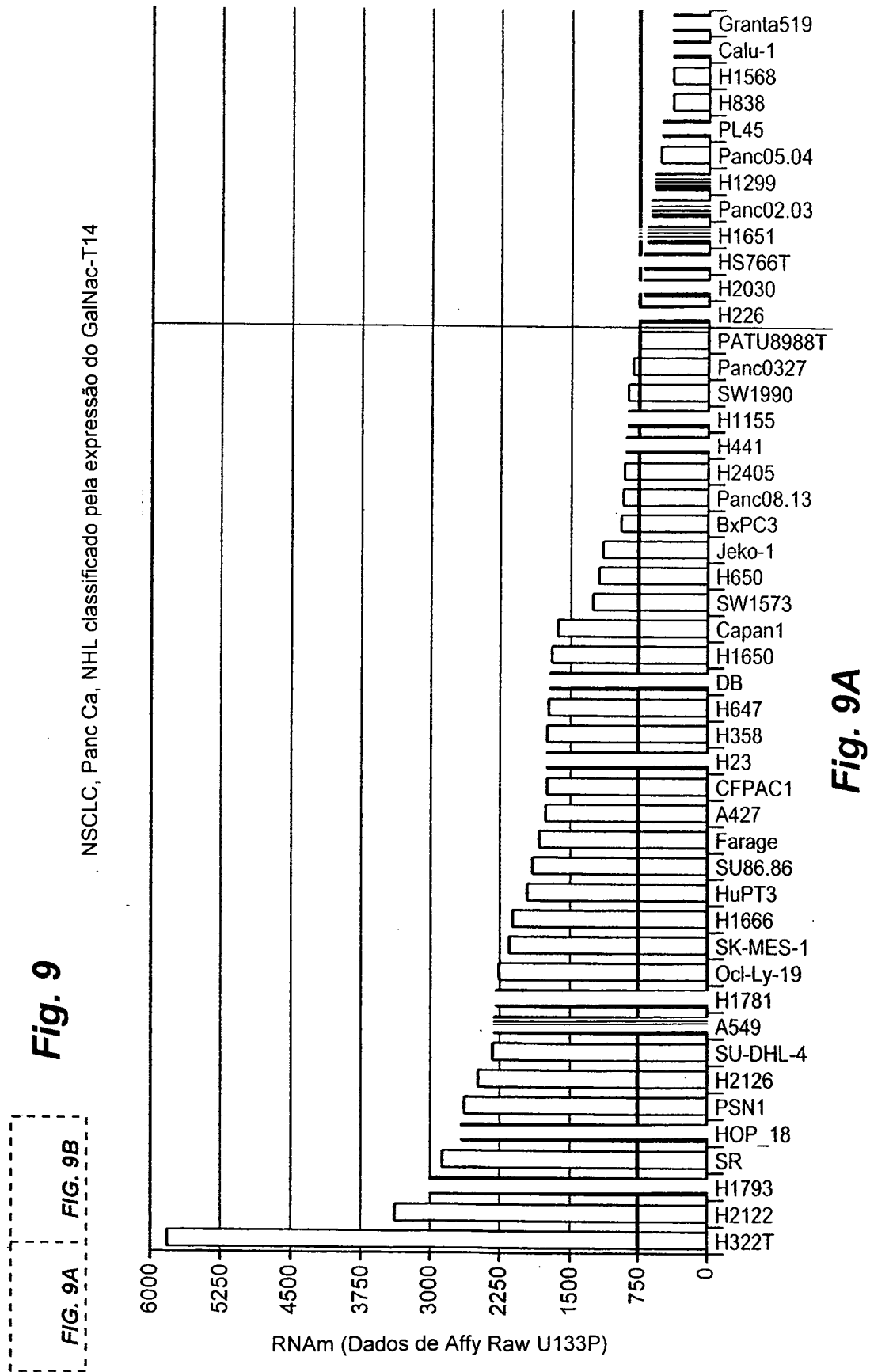


Fig. 8B



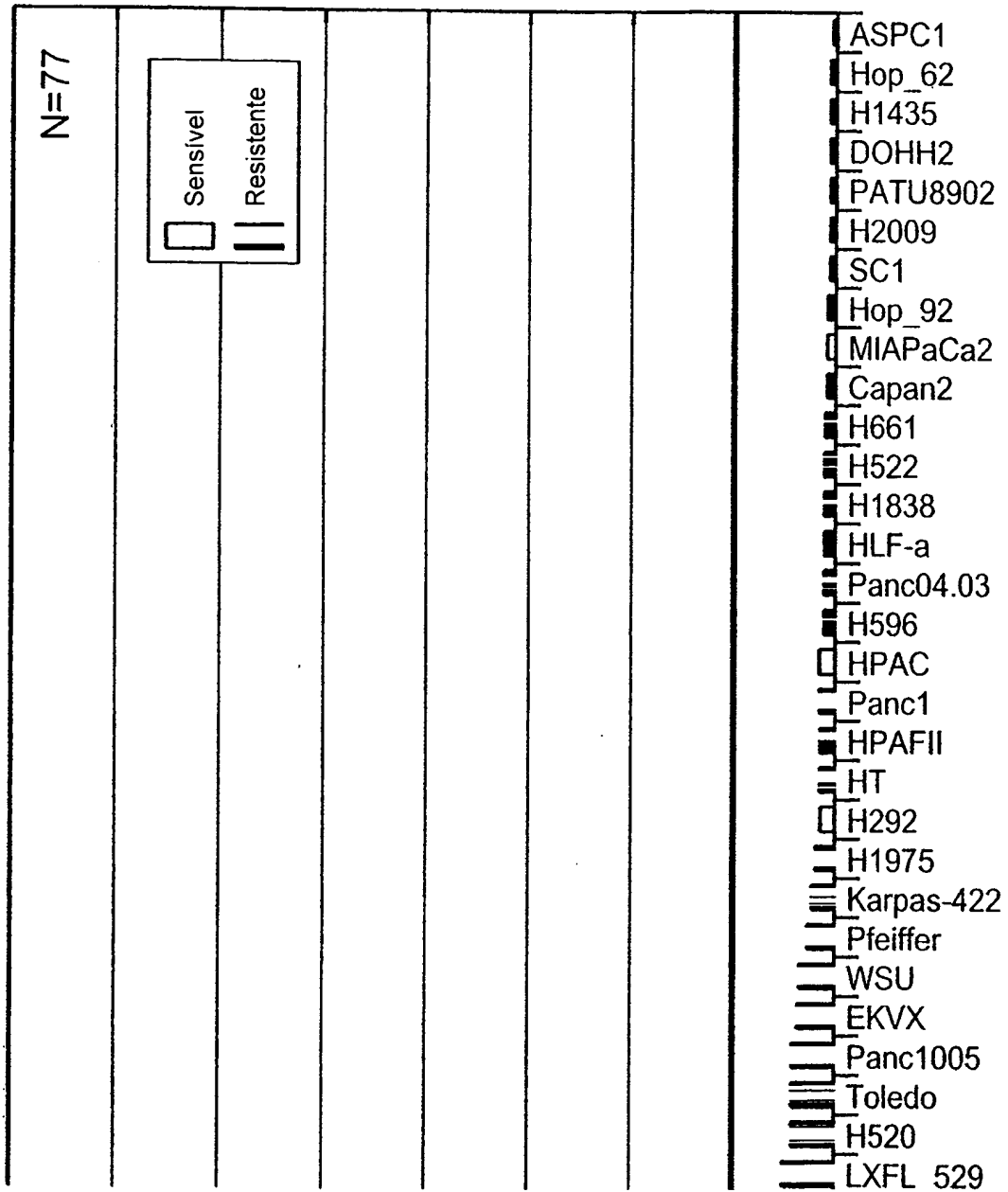
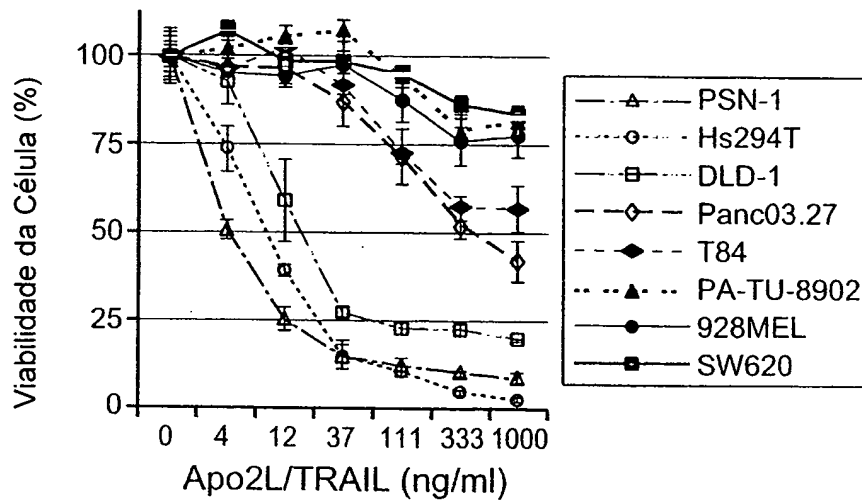
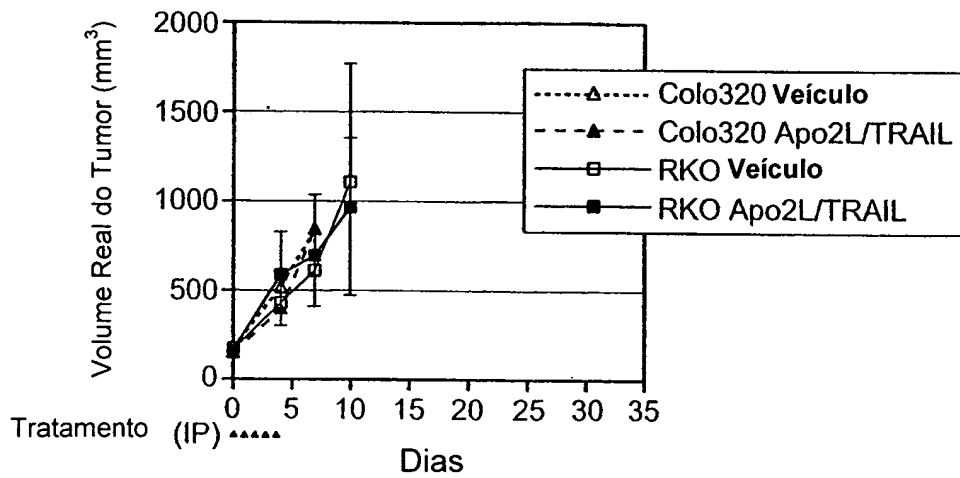
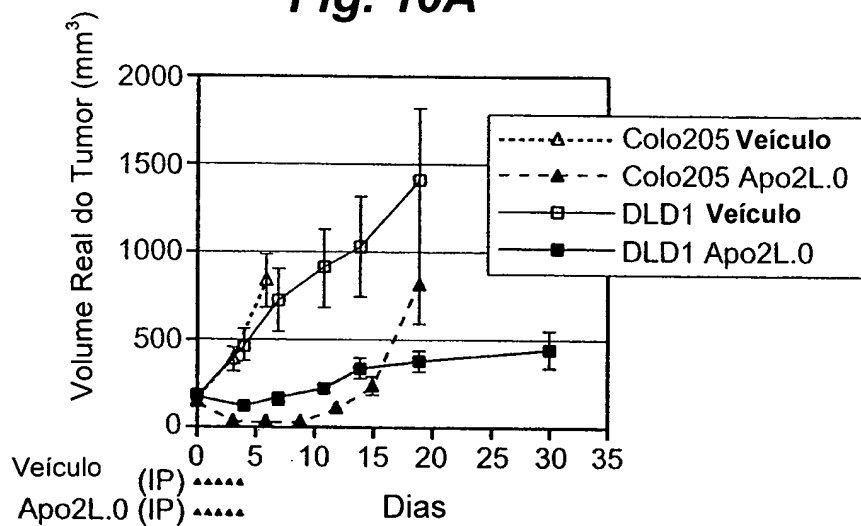


Fig. 9B

**Fig. 10A****Fig. 10D**

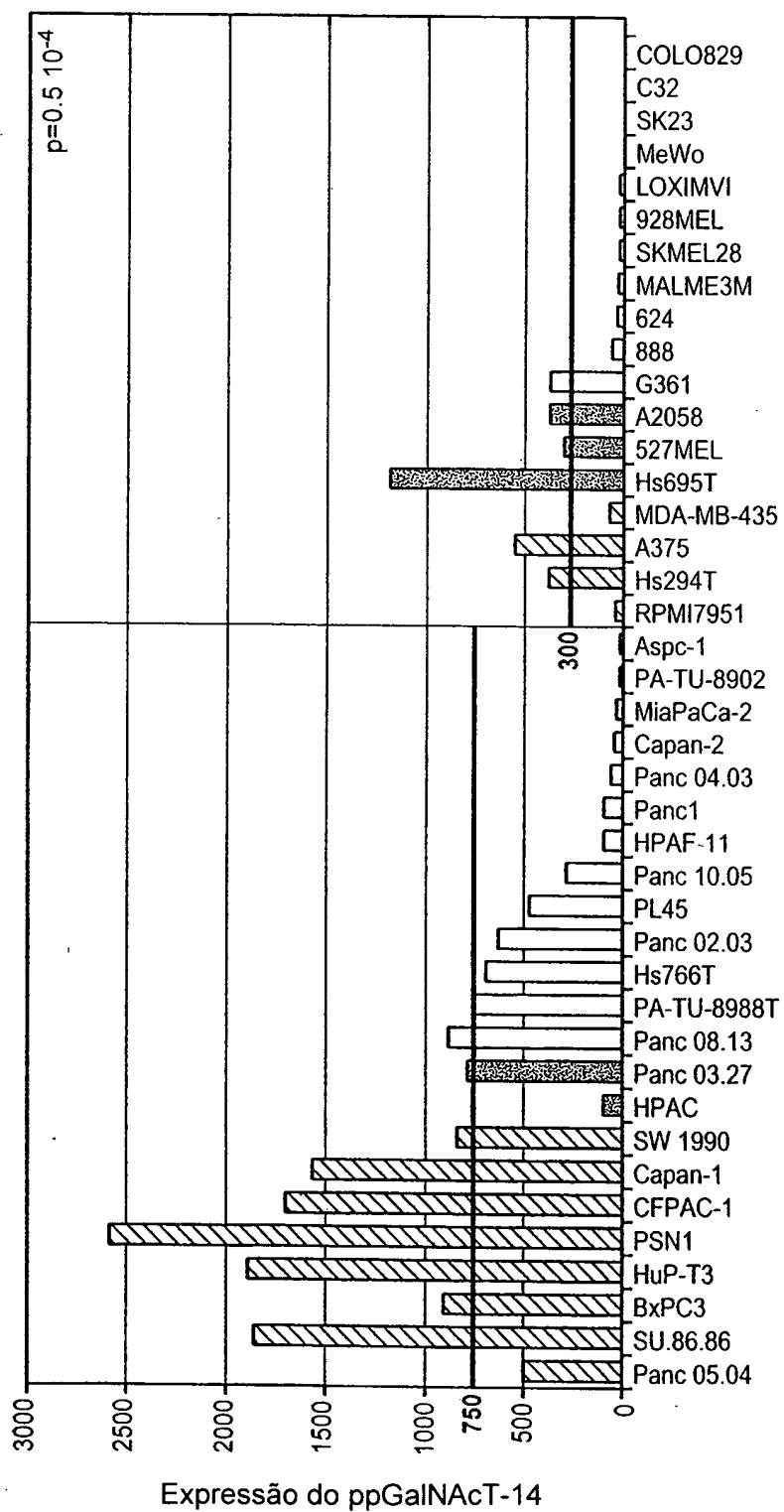


Fig. 10B

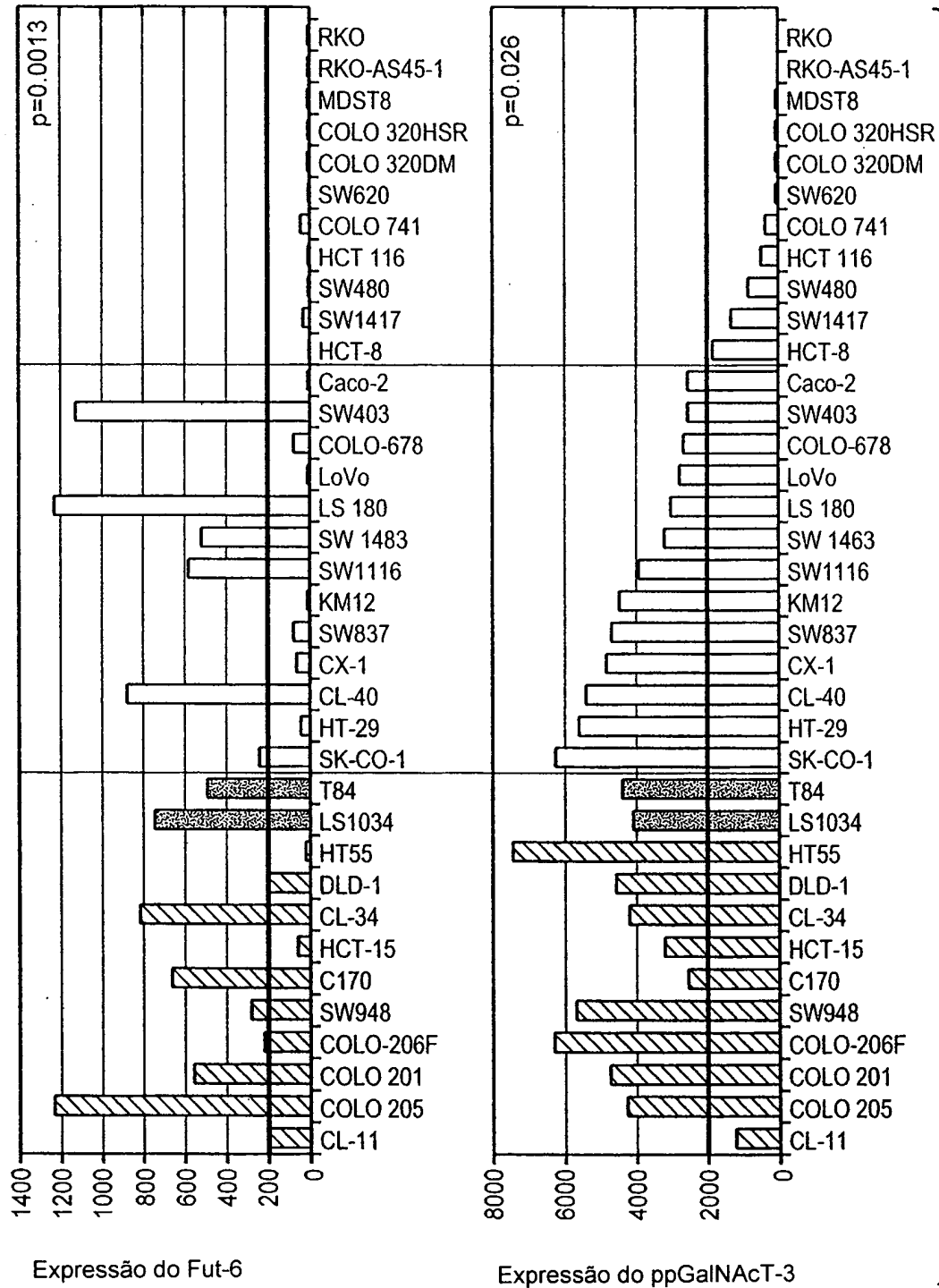
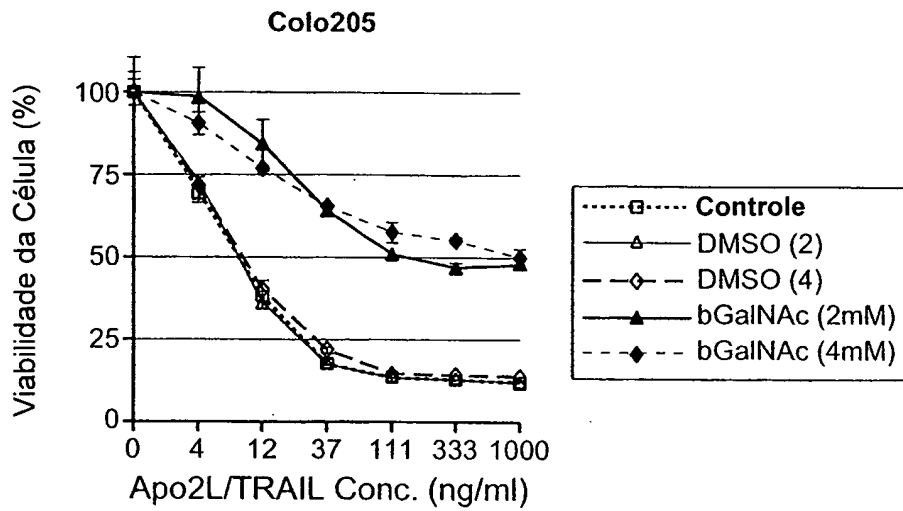
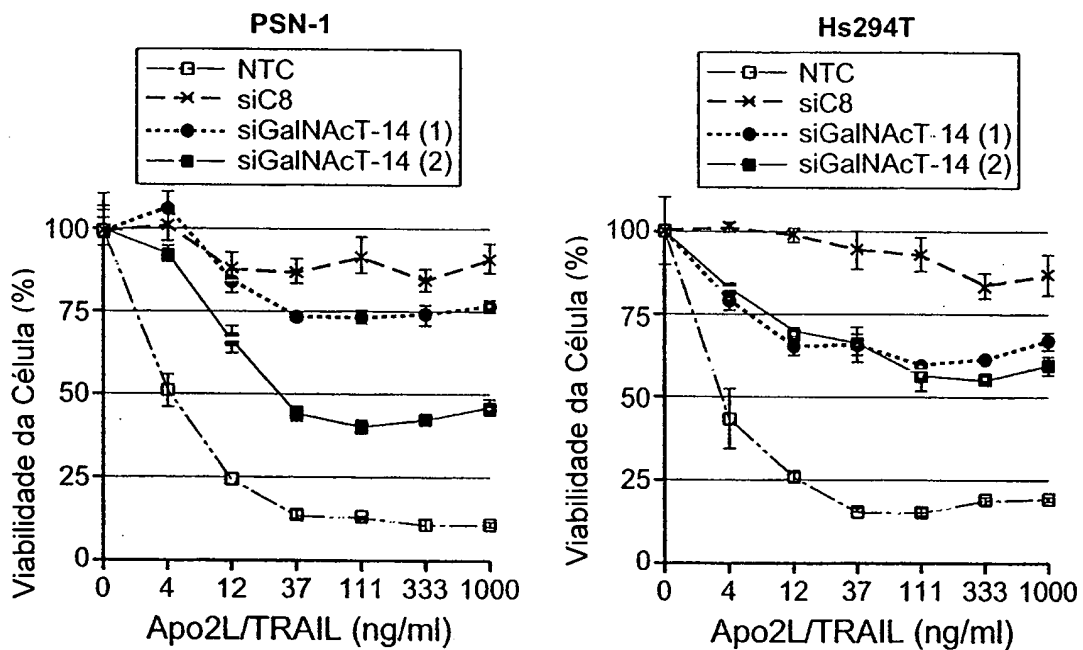
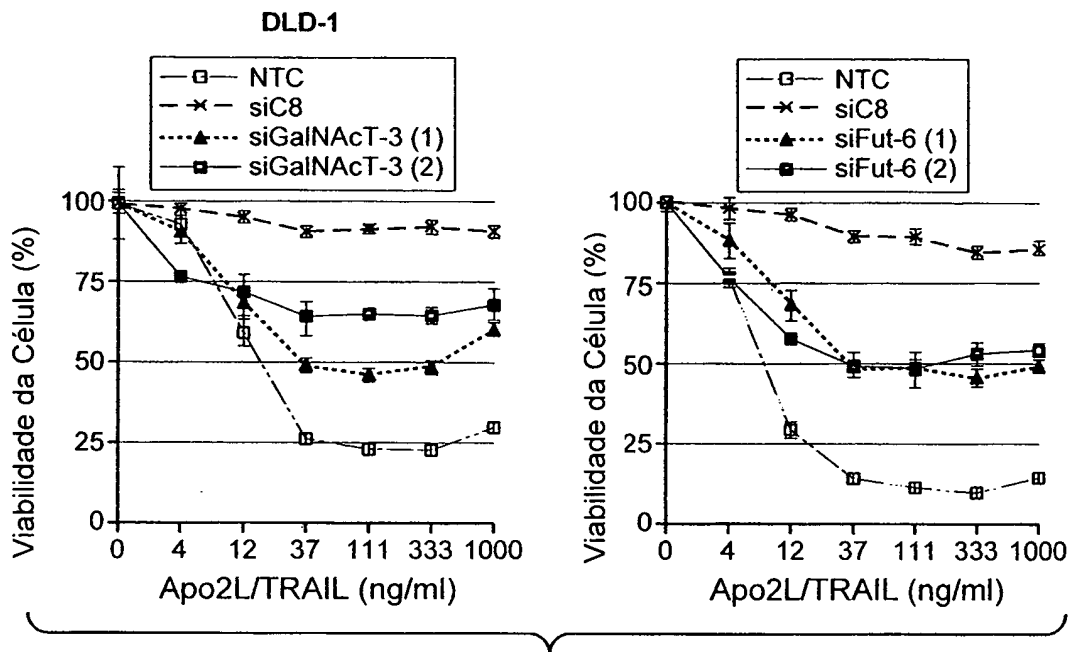
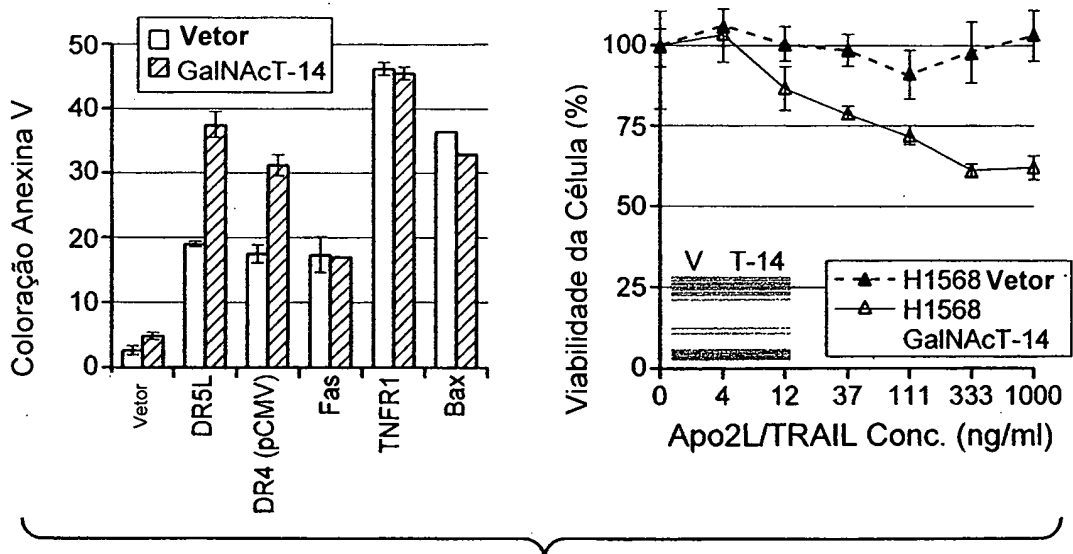


Fig. 10C

**Fig. 11A****Fig. 11B**

**Fig. 11C****Fig. 11D**

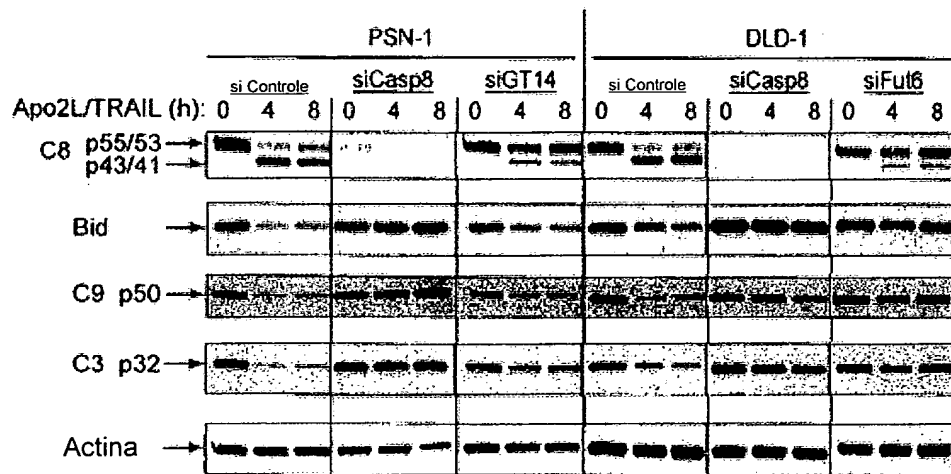


Fig. 12A

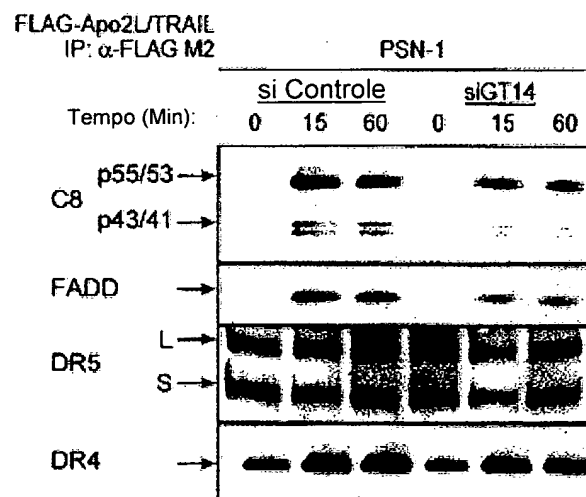
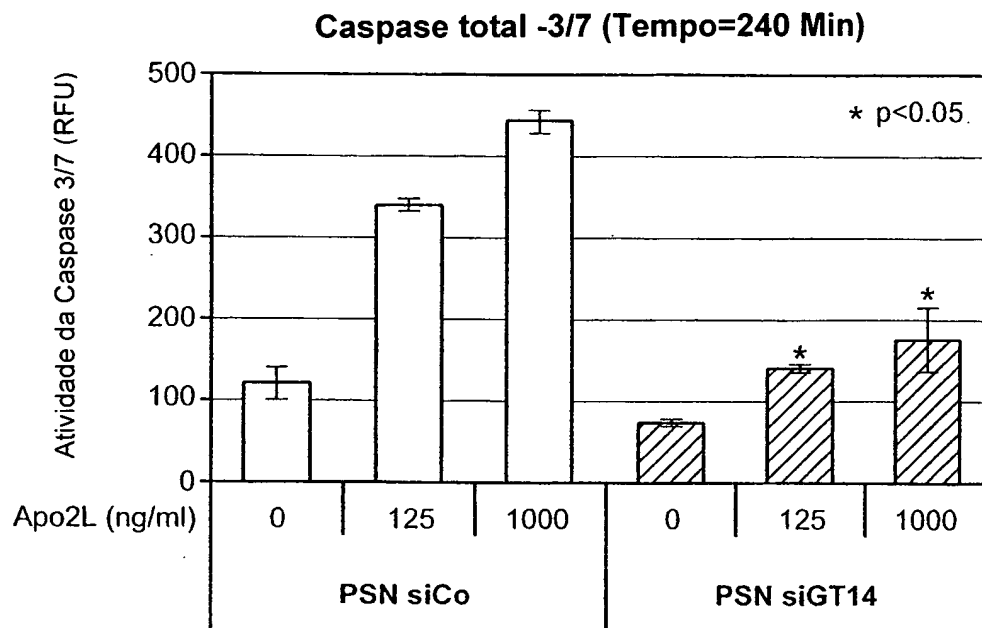
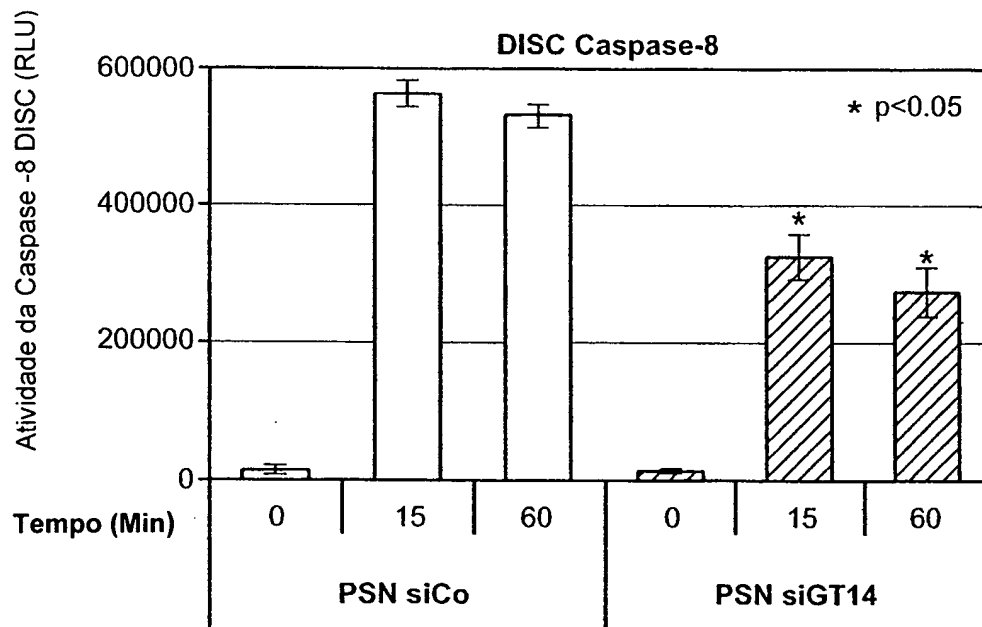


Fig. 12C

**Fig. 12B****Fig. 12D**

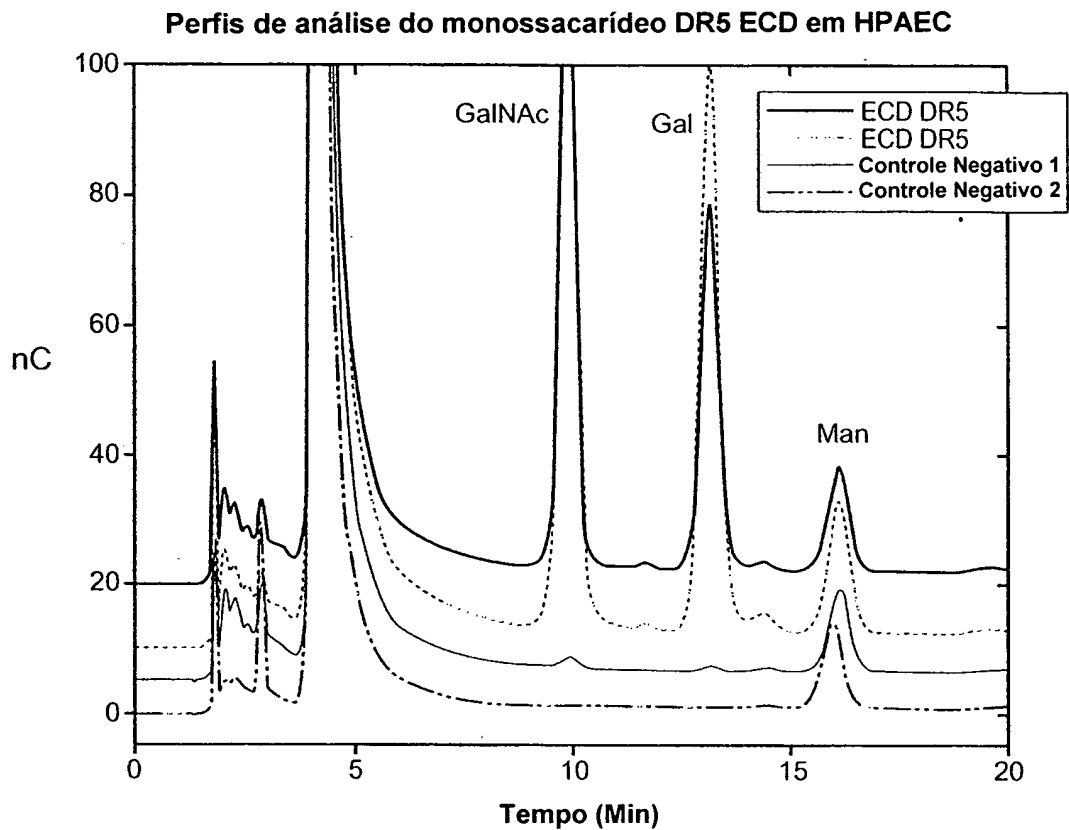


Fig. 13A

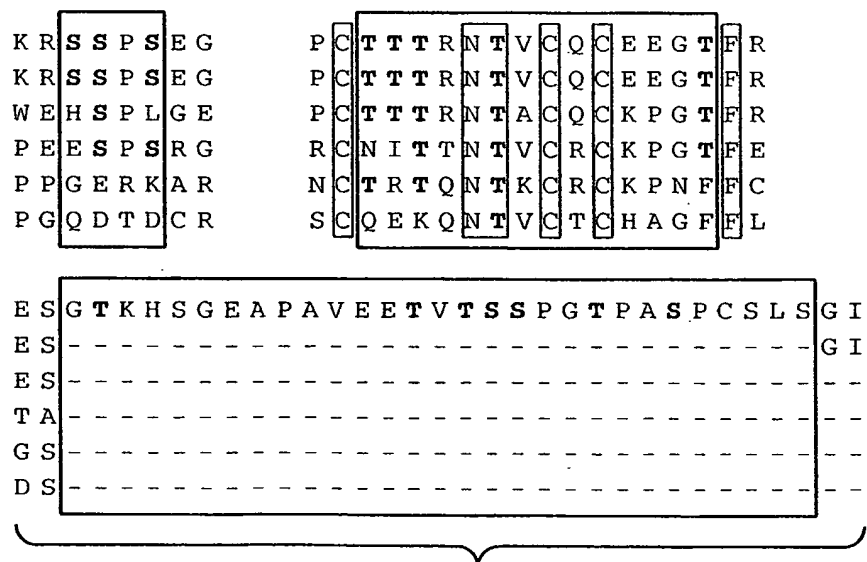


Fig. 13B

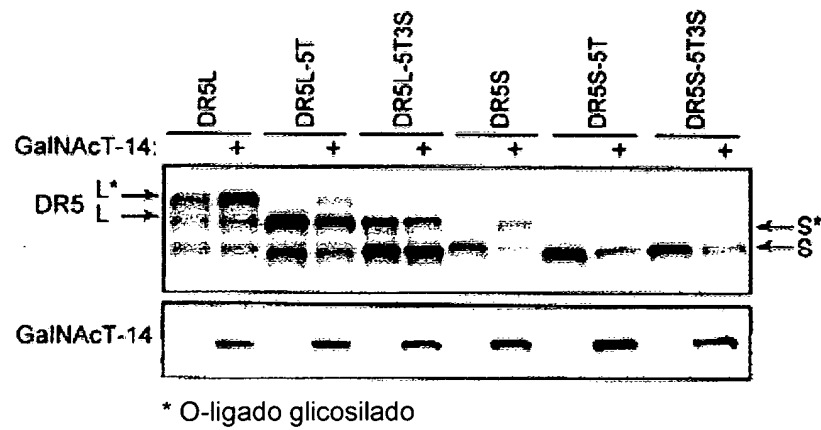


Fig. 13C

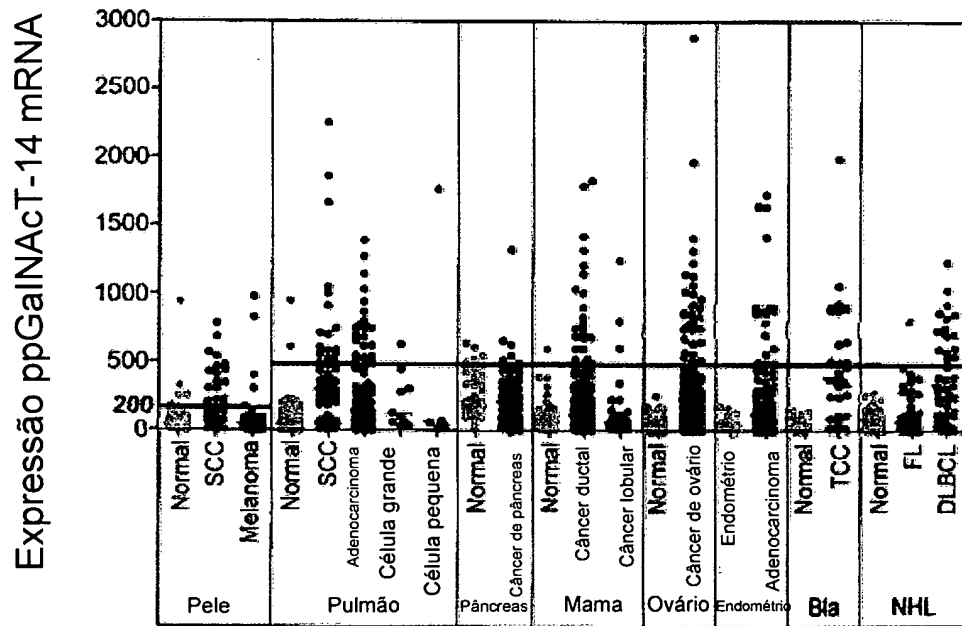
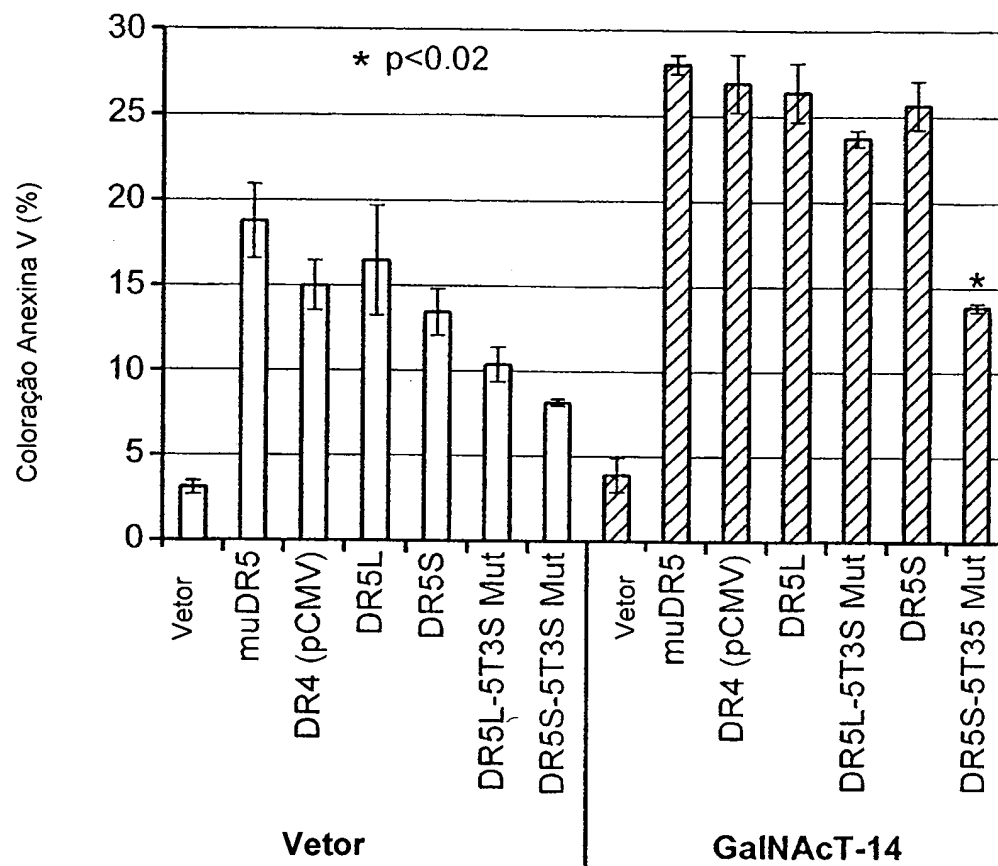
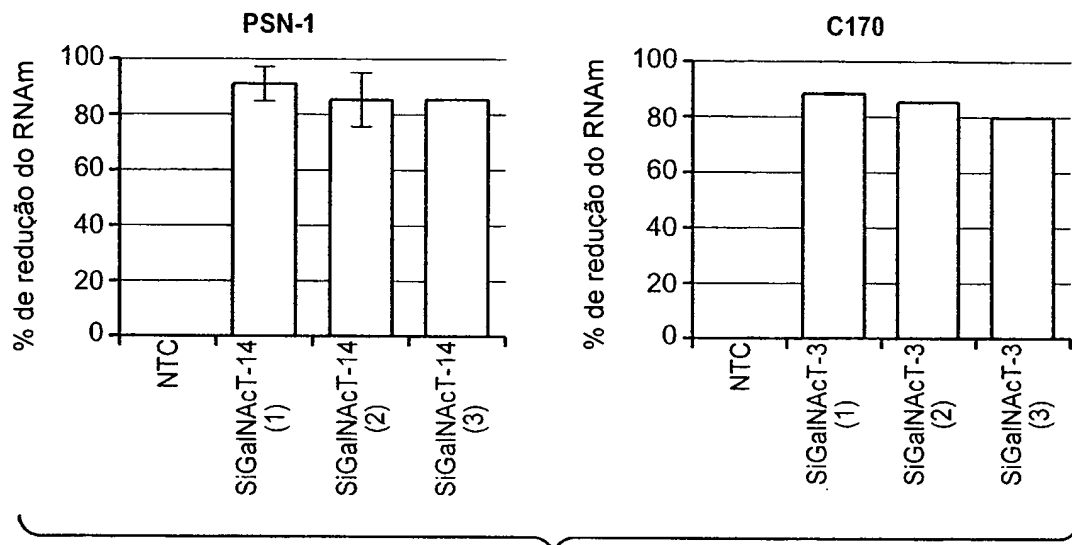
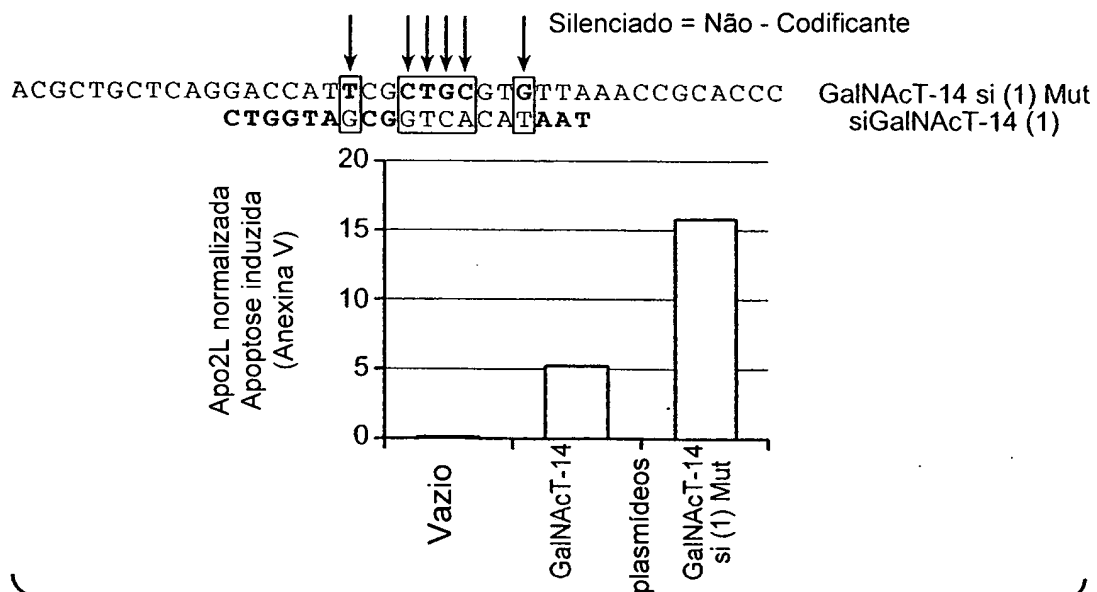
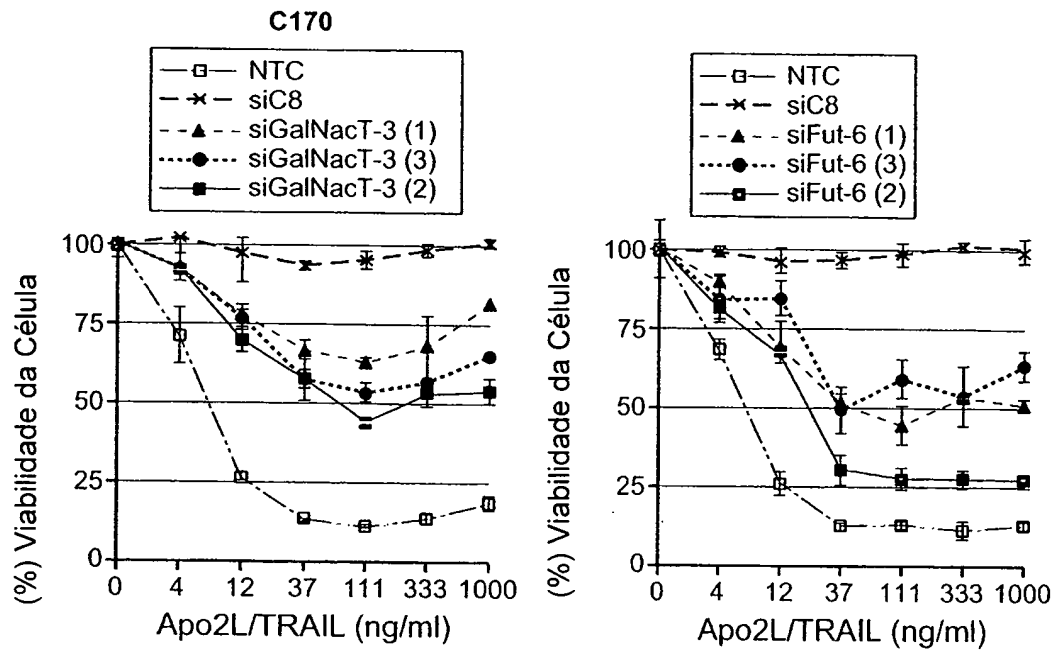


Fig. 13E

**Fig. 13D**

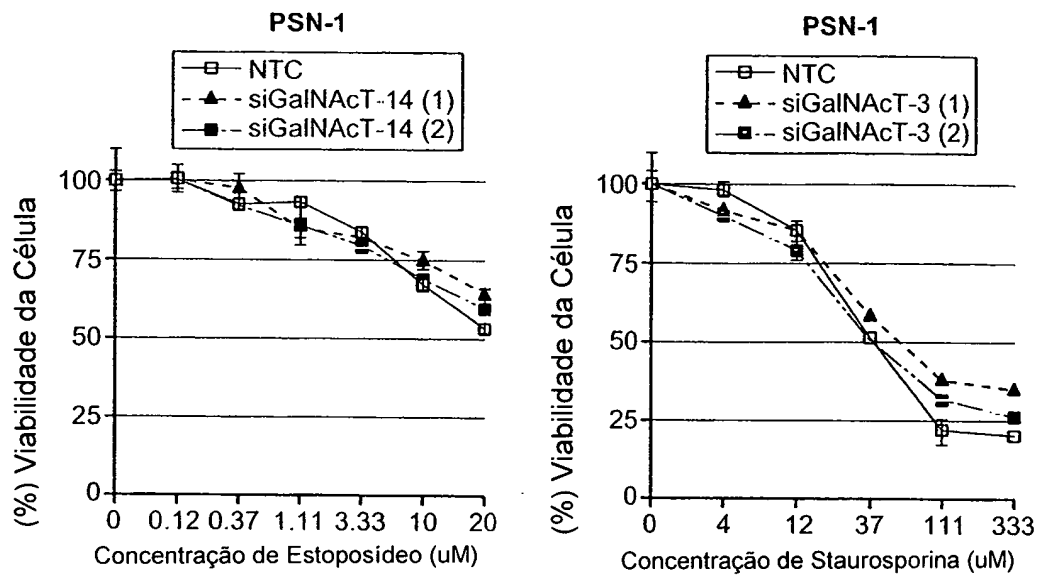
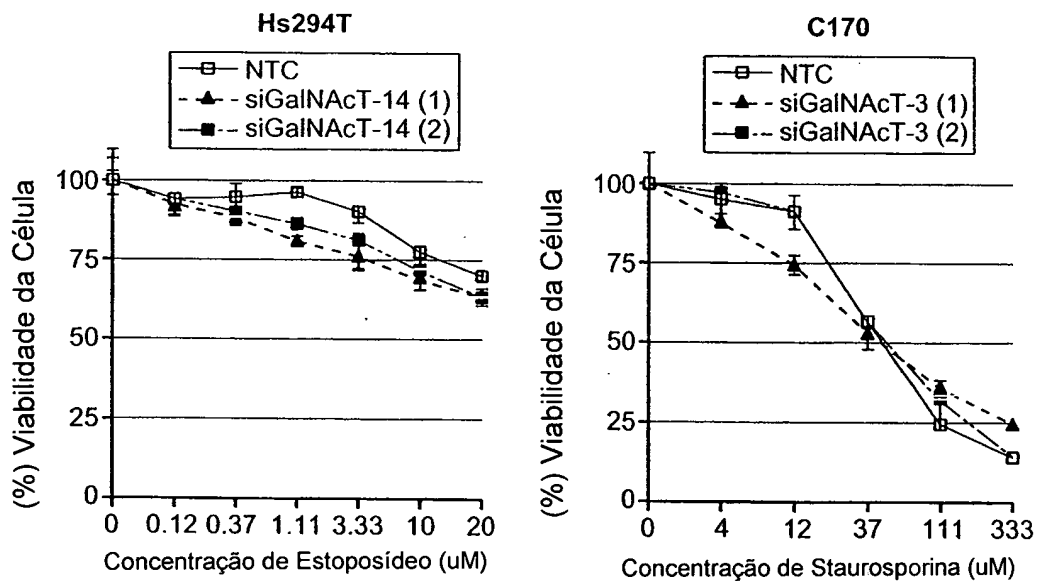
**Fig. 14A****Fig. 14B**

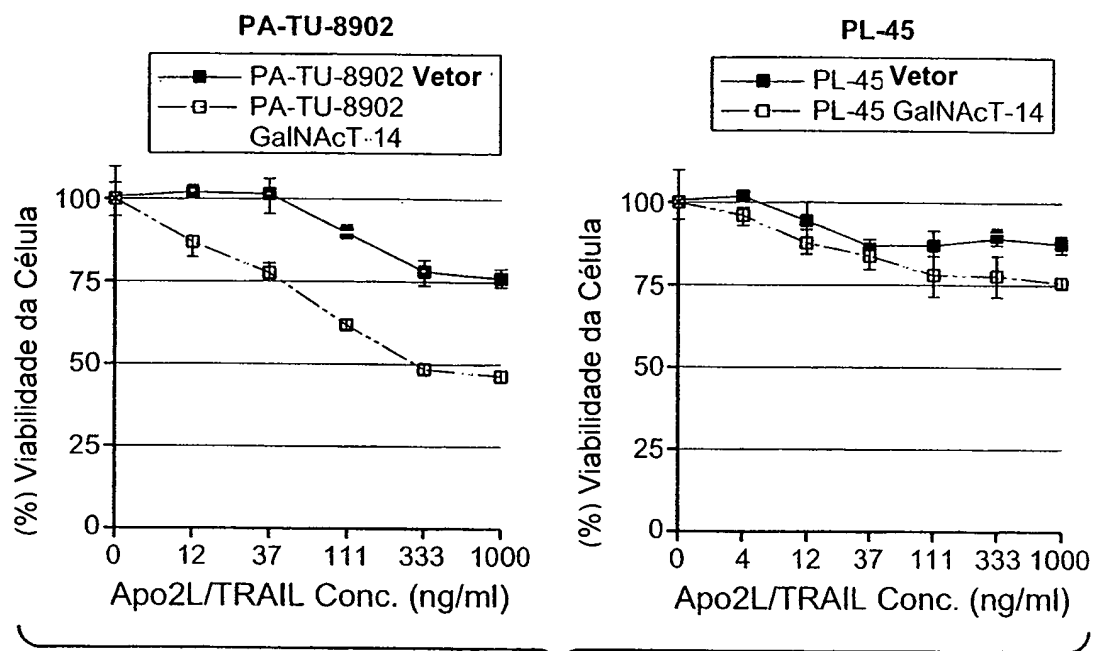


T1

Tipo de Tumor	Linhagem Celular	RNAi Transitório	shRNA Retroviral	Apo2L/TRAIL Proteção para Knock-down		
				ppGalNAcT-14	ppGalNAcT-13	Fut-6
Câncer Pancreático	PSN-1 Panc 05.04 Panc 03.27 Su.86.8 Hup-13	Sim	Sim	++		
		Sim		++		
		Sim		+		
		Não		+		
		Sim		0		
Melanoma	A375 Hs294T	Sim Sim		4/5		
				++		
				++		
Câncer Colateral	C170 DLD-1 SW948	Sim Sim Sim		2/2		
					++ ++ 0 2/3	++ ++ 0 2/3

Fig. 14C

**Fig. 14D****Fig. 14E**

**Fig. 14F**

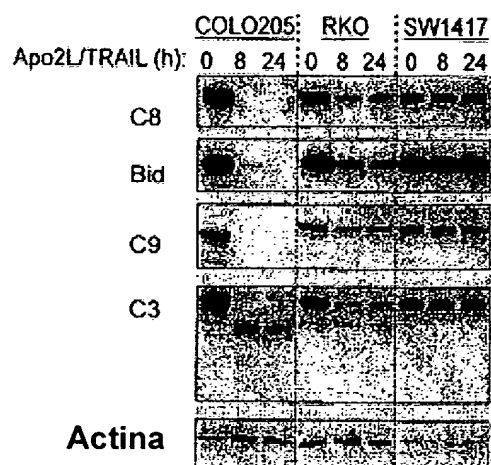


Fig. 15A

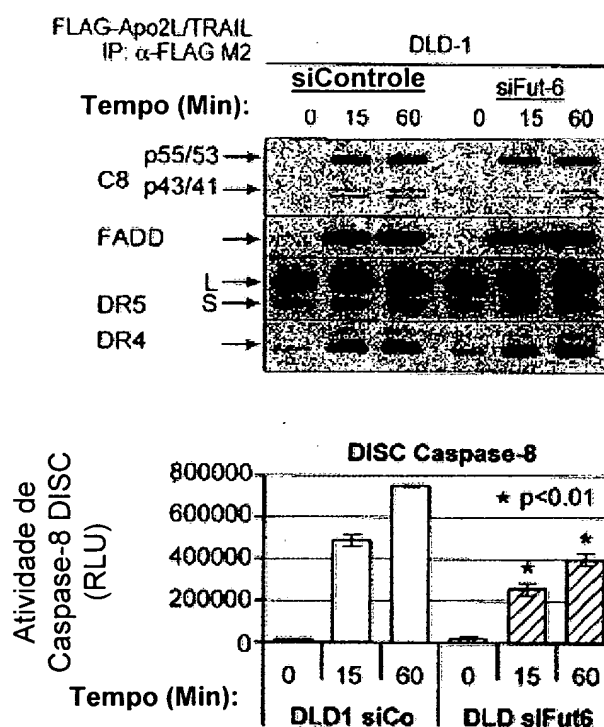
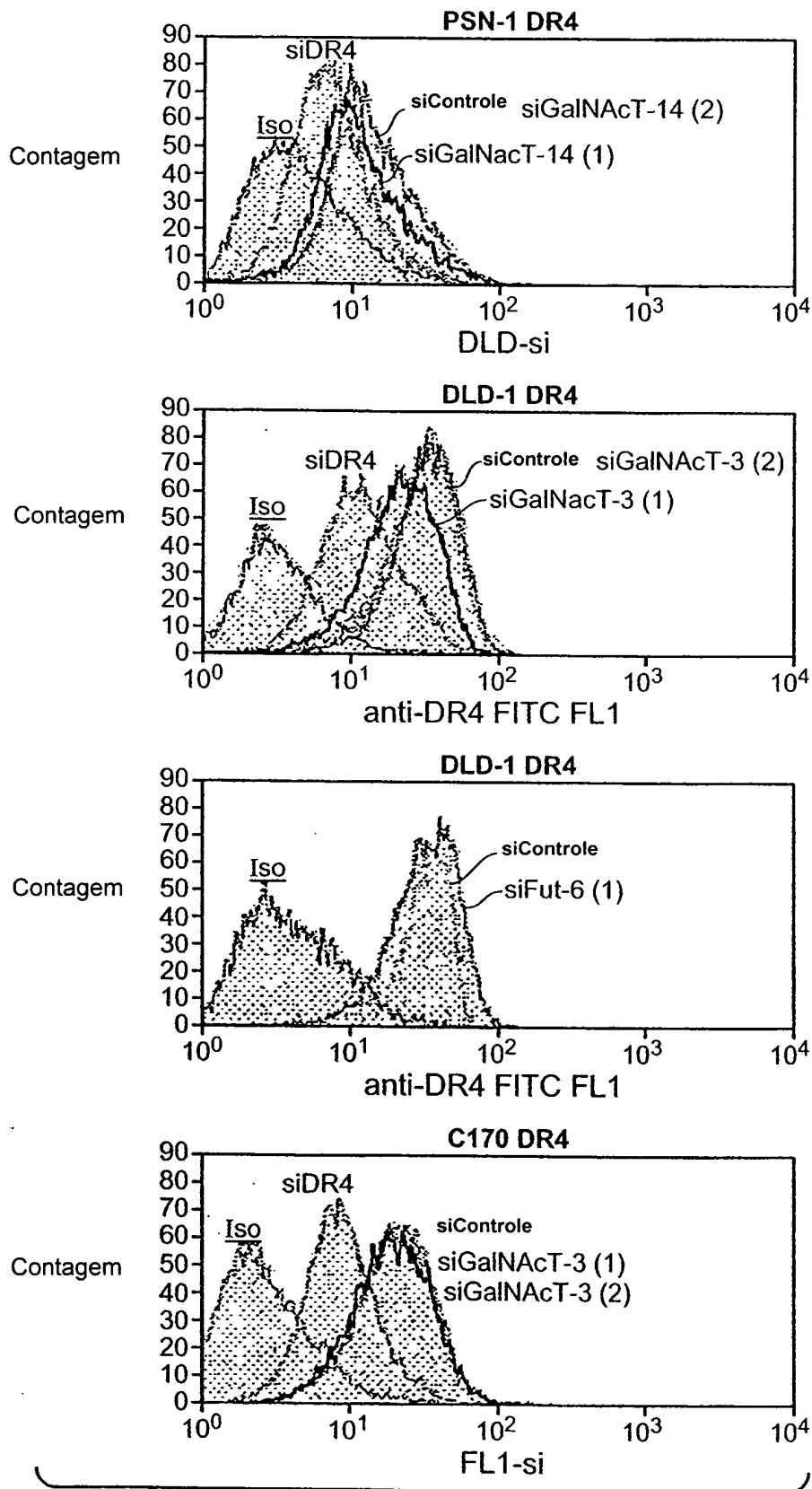
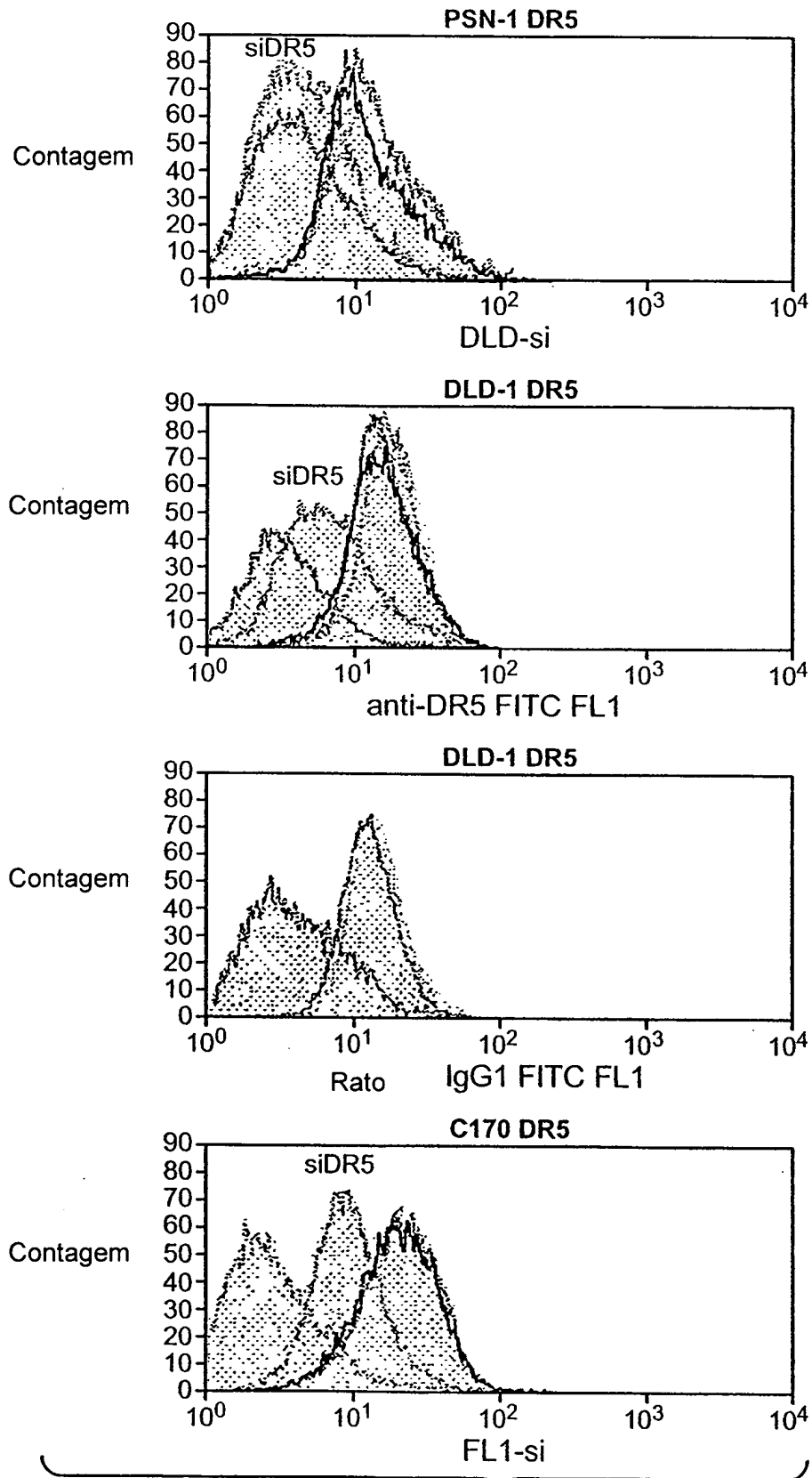


Fig. 15B

**FIG. 15C-1**

**FIG. 15C-2**

RESUMO**“MÉTODO PARA PREVER A SENSIBILIDADE DE UMA AMOSTRA DE
CÉLULA OU TECIDO, MÉTODO PARA INDUZIR APOPTOSE EM UMA
AMOSTRA DE CÉLULA OU TECIDO, MÉTODO DE TRATAMENTO DE UMA
5 DISFUNÇÃO E USO DE APO2L/TRAIL”**

A presente invenção refere-se a métodos e testes que examinam
expressão de um ou mais biomarcadores em uma amostra de célula ou tecido
de mamífero. De acordo com os métodos e testes divulgados, a detecção da
expressão de moléculas relacionadas à GalNac-T, tais como GalNac-T14 ou
10 GalNac-T3, é preditiva ou indicativa de que a amostra de célula ou tecido será
sensível a agentes de indução de apoptose tais como Apo2L/TRAIL e
anticorpos agonistas de anti-DR5. Kits e artigos de fabricação são também
fornecidos.