

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

(21) **PI0606791-3 A2**



(22) Data de Depósito: 31/01/2006
(43) Data da Publicação: 09/02/2010
(RPI 2040)

(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/395 (2010.01)

(54) Título: **MÉTODOS DE REVERTER OU PREVENIR A RESISTÊNCIA DE UMA CÉLULA A UM AGONISTA DO RECEPTOR DA MORTE, DE TRIAR UMA CÉLULA QUANTO A UM BIOMARCADOR DA RESISTÊNCIA A UM AGONISTA DO RECEPTOR DA MORTE, DE MONITORAR A RESISTÊNCIA A UM AGONISTA DO RECEPTOR DA MORTE EM UM INDIVÍDUO, DE INDUZIR SELETIVAMENTE A APOPTOSE EM UMA CÉLULA ALVO EXPRESSANDO UM RECEPTOR DA MORTE, DE TRATAR DE UM INDIVÍDUO COM CÂNCER, DE TRATAR DE UM INDIVÍDUO COM UMA DOENÇA INFLAMATÓRIA OU AUTOIMUNE, DE BLOQUEAR A LIGAÇÃO DA PROTEÍNA CONTENDO CARD A UM RECEPTOR DA MORTE EM UMA CÉLULA, DE BLOQUEAR A ASSOCIAÇÃO DE UM IAP COM O RECEPTOR DA MORTE E DE TRIAR UM MODULADOR DE UMA PROTEÍNA CONTENDO CARD, COMPOSIÇÃO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR, CÉLULA, E, POLIPEPTÍDEO ISOLADO**

(57) Resumo: MÉTODOS DE REVERTER OU PREVENIR A RESISTÊNCIA DE UMA CÉLULA A UM AGONISTA DO RECEPTOR DA MORTE, DE TRIAR UMA CÉLULA QUANTO A UM BIOMARCADOR DA RESISTÊNCIA A UM AGONISTA DO RECEPTOR DA MORTE, DE MONITORAR A RESISTÊNCIA A UM AGONISTA DO RECEPTOR DA MORTE EM UM INDIVÍDUO, DE INDUZIR SELETIVAMENTE A APOPTOSE EM UMA CÉLULA ALVO EXPRESSANDO UM RECEPTOR DA MORTE, DE TRATAR DE UM INDIVÍDUO COM CÂNCER, DE TRATAR DE UM INDIVÍDUO COM UMA DOENÇA INFLAMATÓRIA OU AUTOIMUNE, DE BLOQUEAR A LIGAÇÃO DA PROTEÍNA CONTENDO CARD A UM RECEPTOR DA MORTE EM UMA CÉLULA, DE BLOQUEAR A ASSOCIAÇÃO DE UM IAP COM O RECEPTOR DA MORTE E DE TRIAR UM MODULADOR DE UMA PROTEÍNA CONTENDO CARD, COMPOSIÇÃO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR, CÉLULA, E, POLIPEPTÍDEO ISOLADO. É fornecido neste relatório um método de reverter ou prevenir a resistência de células alvo a um agonista dos receptores da morte. São igualmente fornecidos métodos de triagem quanto à resistência a biomarcadores e de monitorar a resistência dos agonistas dos receptores da morte. Igualmente fornecidos são os métodos de seletivamente induzir a apoptose em uma célula alvo, tratando-se de um indivíduo com câncer, doenças autoimunes ou inflamatórias, compreendendo administrar as composições fornecidas neste relatório. São ainda fornecidas composições compreendendo agentes que modulam as proteínas contendo CARD.

(30) Prioridade Unionista: 02/02/2005 US 60/649,437

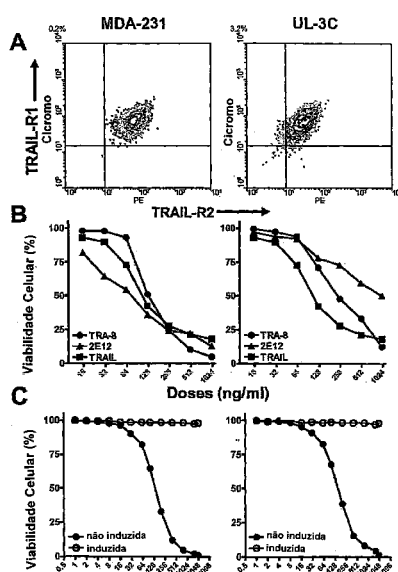
(73) Titular(es): THE UAB RESEARCH FOUNDATION

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

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2006003503 de 31/01/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/083937 de 10/08/2006



“MÉTODOS DE REVERTER OU PREVENIR A RESISTÊNCIA DE UMA CÉLULA A UM AGONISTA DO RECEPTOR DA MORTE, DE TRIAR UMA CÉLULA QUANTO A UM BIOMARCADOR DA RESISTÊNCIA A UM AGONISTA DO RECEPTOR DA MORTE, DE MONITORAR A
5 RESISTÊNCIA A UM AGONISTA DO RECEPTOR DA MORTE EM UM INDIVÍDUO, DE INDUZIR SELETIVAMENTE A APOPTOSE EM UMA CÉLULA ALVO EXPRESSANDO UM RECEPTOR DA MORTE, DE TRATAR DE UM INDIVÍDUO COM CÂNCER, DE TRATAR DE UM INDIVÍDUO COM UMA DOENÇA INFLAMATÓRIA OU AUTOIMUNE,
10 DE BLOQUEAR A LIGAÇÃO DA PROTEÍNA CONTENDO CARD A UM RECEPTOR DA MORTE EM UMA CÉLULA, DE BLOQUEAR A ASSOCIAÇÃO DE UM IAP COM O RECEPTOR DA MORTE E DE TRIAR UM MODULADOR DE UMA PROTEÍNA CONTENDO CARD, COMPOSIÇÃO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR, CÉLULA, E,
15 POLIPEPTÍDEO ISOLADO”

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório U.S. nº 60/649437, depositado em 2 de fevereiro de 2005, o qual fica por este meio aqui incorporado como referência em sua totalidade.

20 DECLARAÇÃO RELATIVAMENTE À PESQUISA FEDERALMENTE PATROCINADA

Esta invenção foi feita com apoio governamental sob as Subvenções nºs P50CA83591, P50CA89019 e U19AI056542 concedidas pelos Institutos Nacionais de Saúde. O governo tem certos direitos na
25 invenção.

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção apresentada diz respeito em geral a agentes que inibem a resistência aos agonistas indutores da apoptose dos receptores da morte e ao uso de tais agentes e agonistas e biomarcadores no tratamento do

câncer e de doenças autoimunes ou inflamatórias.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

O ligando indutor da apoptose relacionada ao TNF (TRAIL), um membro da superfamília do TNF, tem uma forte atividade indutora da apoptose contra as células cancerosas (Wiley, S. R. *et al.* 1995. *Immunity* 3: 673-682). Diferente de outros ligandos indutores da morte da superfamília do TNF, tais como o os ligandos TNF- α e Fas, o TRAIL tem sido de particular interesse no desenvolvimento da terapêutica do câncer, já que ele de preferência induz a apoptose das células tumorais, tendo pouco ou nenhum efeito sobre as células normais (Walczak, H. *et al.* 1999. *Nat Med* 5: 157-163). Pelo menos cinco receptores para TRAIL foram identificados, dois dos quais, DR4 (TRAIL-R1) e DR5 (TRAIL-R2) são capazes de transduzir o sinal da apoptose (Walczak, H. *et al.* 1997. *Embo J* 16: 5386-5397; Pan, G. *et al.* 1997. *Science* 276: 111-113; Chaudhary, P. M. *et al.* 1997. *Immunity* 7: 821-830), enquanto os outros três (TRAIL-R3, R4 e OPG) servem como receptores chamariz para bloquear a apoptose mediada pelo TRAIL (Pan, G. *et al.* 1997. *Science* 277: 815-818; Marsters, S. A. *et al.* 1997. *Curr Biol* 7: 1003-1006; Emery, J. G. *et al.* 1998. *J Biol Chem* 273: 14363-14367). Como o Fas e o TNFR1, os segmentos intracelulares de ambos DR4 e DR5 contêm um domínio de morte e transduzem um sinal da apoptose através de uma via dependente de FADD e caspase 8 (Walczak, H. *et al.* 1997. *Embo J* 16: 5386-5397; Chaudhary, P. M. *et al.* 1997. *Immunity* 7: 821-830; Kuang, A. A. *et al.* 2000. *J Biol Chem* 275: 25065-25068). A administração da forma solúvel recombinante do TRAIL em animais experimentais, incluindo camundongos e primatas, induz significativa regressão tumoral sem toxicidade sistêmica (Walczak, H. *et al.* 1999. *Nat Med* 5: 157-163). Entretanto, como foi observado que o TRAIL elicia efeitos colaterais tais como a toxicidade hepática nos seres humanos, outros agonistas dos receptores de TRAIL foram desenvolvidos.

O alvejamento seletivo do DR5 com um único anticorpo anti-DR5 monoclonal agonístico, o TRA-8, e suas versões humanizadas ou humanas, podem eficaz e seletivamente induzir a apoptose das células tumorais. Todas as células cancerosas sensíveis ao TRAIL foram observadas serem suscetíveis à apoptose mediada por TRA-8. Os agentes quimioterápicos podem sinergisticamente intensificar a apoptose mediada pelo TRAIL das células tumorais tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Por exemplo, a terapia de combinação do TRA-8 com Adriamicina resultou em uma taxa de regressão tumoral completa significativamente mais elevada do que qualquer agente isolado (Buchsbaum, D. J. *et al.* 2003. *Clin Cancer Res* 9: 3731-3741). Estes resultados sugerem que agentes quimioterápicos podem regular a transdução de sinal do DR5 ou o limiar de sinalização requerido para induzir a apoptose. O TRA-8 foi selecionado como um candidato para o desenvolvimento como uma terapia do câncer com base nas suas eficácia e segurança. Estudos pré-clínicos indicam que TRA-8 tem uma eficácia anticâncer muito intensa em modelos de xenoenxertos de câncer humano, particularmente em combinação com a quimioterapia (Buchsbaum, D. J. *et al.* 2003. *Clin Cancer Res* 9: 3731-3741). Existe outra indicação de que os macacos toleram bem a administração sistêmica do TRA-8. A ligação do TRA-8 ao DR5 dos macacos é semelhante àquela do DR5 humano, e os macacos toleraram doses tão elevadas quanto a dose de 48 mg/kg.

A expressão de um receptor da morte por uma célula alvo, no entanto, não é necessariamente suficiente para tornar a célula suscetível à indução da apoptose por um ligando quanto ao receptor. Como um exemplo, embora a maioria das células cancerosas expressem altos níveis de DR5, elas não são necessariamente suscetíveis à apoptose induzida por TRA-8, a qual é específica para o DR5 e não reage com os receptores chamarizes. Além disso, as células alvo tais como as células cancerosas podem apresentar resistência a TRA-8 ou outros agentes que induzem a apoptose através dos receptores da

morte (por exemplo, DR4 ou DR5). Necessário na técnica é um biomarcador para prever a resistência e um meio de reduzir a resistência das células alvo aos agonistas dos receptores da morte, tais como TRA-8.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

5 Em conformidade com a(s) finalidade(s) desta invenção, como contido e amplamente descrito neste relatório, esta invenção, em um aspecto, diz respeito a um método de reverter ou prevenir a resistência de uma célula alvo a um agonista do receptor da morte, compreendendo o contato da célula alvo com um modulador de uma ou mais atividades de uma proteína contendo
10 CARD, em que a modulação reverte ou previne a resistência ao agonista.

 É aqui fornecido um método de triagem de uma célula para um biomarcador da resistência a um agonista do receptor da morte, compreendendo ensaiar a célula quanto a DDX3total, ou um seu homólogo, em que altos níveis significam resistência ao agonista.

15 É aqui fornecido um método de triagem de uma célula para um biomarcador da resistência a um agonista do receptor da morte, compreendendo ensaiar a associação do receptor da morte com uma proteína contendo CARD, em que altos níveis de associação significam resistência ao agonista.

20 É aqui fornecido um método de triagem de uma célula para um biomarcador da resistência a um agonista do receptor da morte, compreendendo: proceder ao contato da célula com o agonista do receptor da morte, b) monitorar a associação fracionária do receptor da morte com uma proteína contendo CARD, em que a associação significa resistência ao
25 agonista.

 É ainda fornecido um método de triagem de uma célula para um biomarcador da resistência a um agonista do receptor da morte, compreendendo monitorar a associação de uma caspase ou modulador de caspases (por exemplo, cIAP1, cIAP2, XIAP, survivina) com a proteína

contendo CARD e comparando-se o nível de associação com uma amostra de células de controle resistentes e não resistentes conhecidas, em que a associação dos IAPs com a proteína contendo CARD em níveis similares àqueles das células resistentes significa resistência ao agonista.

- 5 Opcionalmente, a célula a ser ensaiada é colocada em pré-contato com um agonista do receptor da morte (por exemplo, anticorpo agonístico).

É aqui fornecido um método de monitorar a resistência a um agonista do receptor da morte em um indivíduo, compreendendo (a) adquirir uma amostra biológica do indivíduo e (b) detectar a associação de uma
10 proteína contendo CARD com um receptor da morte na amostra, a associação indicando resistência.

É ainda fornecido um método de monitorar a resistência a um agonista do receptor da morte em um indivíduo, compreendendo (a) adquirir uma amostra biológica do indivíduo e (b) detectar a associação de uma
15 caspase ou modulador da caspase com uma proteína contendo CARD na amostra, a associação indicando resistência.

Igualmente é fornecido um método de induzir seletivamente a apoptose em uma célula alvo expressando um receptor da morte, compreendendo as etapas de (a) colocar em contato a célula alvo com uma
20 quantidade terapêutica de um agonista do receptor da morte, que especificamente se ligue ao receptor da morte, e (b) administrar à célula alvo uma quantidade terapêutica de um modulador de uma ou mais atividades de uma proteína contendo CARD.

É fornecido um método de tratar de um indivíduo com câncer,
25 compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade terapêutica de (a) um agonista do receptor da morte e (b) um modulador de uma ou mais atividades de uma proteína contendo CARD, em que o modulador reduz a resistência ao agonista do receptor da morte.

Igualmente fornecido é um método de tratar de um indivíduo

com uma doença inflamatória ou autoimune, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade terapêutica de (a) um agonista do receptor da morte e (b) um agente que module uma ou mais atividades de uma proteína contendo CARD, em que o modulador reduza a resistência ao agonista do receptor da morte.

É fornecida aqui uma composição compreendendo (a) um agonista do receptor da morte e (b) um agente que modula uma ou mais atividades de uma proteína contendo CARD, em que o modulador reduz a resistência ao agonista do receptor da morte.

É ainda fornecido um ácido nucleico isolado compreendendo um shRNA, em que o shRNA inibe a expressão de uma proteína contendo CARD.

Igualmente fornecido é um polipeptídeo isolado codificando a proteína contendo CARD ligando a região de um receptor da morte, em que o polipeptídeo compreende menos do que 25 resíduos de aminoácidos.

É ainda fornecido um polipeptídeo isolado compreendendo o receptor da morte ligando o domínio de uma proteína contendo CARD.

Vantagens adicionais do método e das composições descritas serão apresentadas em parte na descrição que segue, e em parte serão entendidas do relatório descritivo, ou podem ser obtidas pela prática do método e das composições apresentadas. As vantagens do método e das composições apresentadas serão entendidas e alcançadas por meio dos elementos e combinações particularmente indicadas nas reivindicações anexas. Deve ficar entendido que tanto a descrição geral acima quanto a seguinte descrição detalhada são exemplos e explicações apenas, e não são restritivas da invenção, como reivindicado.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Os desenhos anexos, que são incorporados e constituem uma parte deste relatório descritivo, ilustram várias modalidades do método e

composições apresentadas e, juntos com o relatório descritivo, servem para explicar os princípios do método e composições apresentadas.

A Figura 1 apresenta a indução da resistência das células tumorais à apoptose mediada por TRA-8. O painel (A) mostra a análise de citometria de fluxo da expressão da superfície celular de TRAIL-R1 e TRAIL-R2. A linhagem celular do câncer de mama humano, MDA-231, e as linhagens celulares do câncer ovariano humano, UL-3C, foram manchadas com anti-TRAIL-R1 conjugado a CyChrome (2E12) e anti-TRAIL-R2 conjugado a PE (2B4), e analisadas por citômetro de fluxo FACSscan. O painel (B) mostra a suscetibilidade das células MDA-231 e UL-3C à apoptose mediada por TRA-8, 2E12 ou TRAIL. As células foram cultivadas em placa de 96 reservatórios com 1.000 células por reservatório em triplicata, e incubadas com as concentrações indicadas de cada agente indutor da apoptose. Quanto à apoptose induzida por 2E12, 2 µg/ml de IgG1 anticamundongo de cabra foram adicionados, e quanto à apoptose induzida por TRAIL, o anticorpo anti-Flag foi adicionado como o reticulador. A viabilidade celular foi determinada após a cultura noturna pelo ensaio de ATPLITE. A viabilidade celular foi determinada pelo percentual das contagens dos reservatórios tratados sobre aquele do controle do meio. Cada ponto representa uma média de triplicatas, e é representativo para pelo menos três experiências independentes. O painel (C) apresenta a suscetibilidade das células tumorais à apoptose mediada por TRA-8 durante a indução da resistência do TRA-8. A indução da resistência do TRA-8 foi iniciada pelo tratamento das células com 1 ng/ml de TRA-8 durante dois dias. As doses de TRA-8 foram dobradas a cada dois dias, até 2.000 ng/ml. Em cada ciclo das doses, a viabilidade celular das células não induzidas e induzidas sob o tratamento com cada dose correspondente, foi determinada pelo ensaio de ATPLITE. Os dados são apresentados como uma média da cultura em triplicata.

A Figura 2 mostra a seletividade da resistência do TRA-8 induzida nas células MDA-231 e UL-3C. O painel (A) mostra a apoptose induzida por TRAIL-R2 nas células MDA-231 e UL-3C. Tanto as células MDA231 precursoras e resistentes quanto UL-3C foram tratadas com as concentrações indicadas de TRA-8. O painel(B) mostra a apoptose induzida por TRAIL-R1 nas células MDA-231 e UL-3C. Tanto as células MDA231 precursoras e resistentes quanto UL-3C foram tratadas com as concentrações indicadas de 2E12. O painel (C) mostra a apoptose induzida por TRAIL nas células MDA-231 e UL-3C. Tanto as células MDA231 precursoras e resistentes quanto UL-3C foram tratadas com as concentrações indicadas de TRAIL solúvel recombinante. A viabilidade celular foi determinada após a cultura noturna pelo ensaio de ATPLITE como descrito acima. O painel (D) mostra a manutenção da resistência de TRA-8. Após a indução da resistência do TRA-8, o TRA-8 foi removido. A manutenção da resistência do TRA-8 foi determinada a cada semana após a remoção do TRA-8. As células foram tratadas com 1.000 ng/ml de TRA-8 durante a noite, e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de ATPLITE.

A Figura 3 mostra o TRAIL-R2 e a expressão reguladora da apoptose associada nas células resistentes a TRA-8. O painel (A) mostra a análise de Western blot da expressão protéica. Os lisados celulares totais foram separados em SDS-PAGE e submetidos a Western blot. As manchas foram sondadas com 1 µg/ml de anticorpo primário durante a noite e seguidas por anticorpo secundário conjugado a HRP. As proteínas foram reveladas por quimioluminescência de ECL. O painel (B) mostra a análise da disposição do cDNA das células precursoras e resistentes do MDA231. As disposições do cDNA da membrana para um painel de apoptose humana (painel superior) e genes associados com a sinalização celular (painel inferior) foram comprados da SuperArray, Inc. As sondas de cDNA rotuladas de ³²P foram preparadas do RNA total das células precursoras e resistentes de MDA231 e hibridizadas

com a disposição de cDNA sobre a mancha. Os perfis de expressão de genes foram analisados com CyClone Phosphor-Imager.

A Figura 4 mostra a ativação da via da caspase e da via da quinase JNK/p38 nas células resistentes a TRA-8. O painel (A) mostra a
 5 ativação da caspase deflagrada por TRAIL-R1 e R2. As células precursoras e resistentes de MDA231 foram tratadas com 1.000 ng/ml de TRA-8 (painel da esquerda) ou 2E12 (painel da direita) pelo tempo indicado. O Western blot dos lisados celulares totais foram sondados com anticaspase 8 policlonal (painel superior), anticaspase 3 (painel central) ou anti-PARP (painel
 10 inferior). As flechas indicam as proteínas de comprimento completo e clivadas. O painel (B) mostra a ativação da via da quinase de JNK/p38. As células foram tratadas da mesma maneira descrita acima. Os Western blots dos lisados celulares totais foram sondados com JNK policlonal antifosforilado (painel superior) ou p38 antifosforilado (painel inferior). As
 15 flechas indicam as proteínas fosforiladas.

A Figura 5 mostra a formação DISC alterada nas células resistentes a TRA-8. O painel (A) mostra o ensaio de co-imunoprecipitação da formação DISC. As células precursoras e resistentes de MDA231 foram tratadas com 1.000 ng/ml de TRA-8 (painel da esquerda) ou 2E12 (painel da
 20 direita) pelo tempo indicado. TRAIL-R1 e TRAIL-R2 foram imunoprecipitados com Sepharose 4B conjugada a 2E12 ou 2B4. Os Western blots das proteínas co-imunoprecipitadas e das proteínas celulares totais foram sondadas com anticorpo anti-FADD policlonal (painel superior) ou anticaspase 8 (painel central) ou anticorpo anti-cFLIP (painel inferior). Os
 25 painéis (B a E) mostram perfis proteômicos de duas dimensões das proteínas associadas a TRAIL-R2 das células resistentes a TRA-8. As células precursoras e resistentes de MDA231 foram tratadas com 1.000 ng/ml de TRA-8 por quatro horas ou permaneceram sem tratamento como controle. Após a imunoprecipitação de TRAIL-R2 com Sepharose 4B conjugada a 2B4,

as proteínas eluídas foram separadas por eletroforese de duas dimensões e manchadas com o tampão de manchamento SYPRO Ruby. Os pontos protéicos diferencialmente expressos como círculos foram identificados pelo software PDQuest. As experiências foram repetidas pelo menos três vezes quanto a um resultado reprodutível.

A Figura 6 mostra a reversão da resistência do TRA-8 pelos agentes quimioterápicos. O painel (A) mostra a suscetibilidade das células resistentes de TRA-8 à apoptose induzida pelo TRA-8 na presença de agentes quimioterápicos. As células resistentes a MDA231 e UL-3C foram tratadas com doses variáveis de TRA-8 na ausência ou presença de 0,1 μ M de taxol, 1 μ M Adriamicina, 100 μ M de cisplatina ou 5 μ M de BisVIII. A viabilidade celular foi determinada após a cultura noturna pelo ensaio de ATPLITE. O painel (B) mostra a ativação da cascata de caspase nas células resistentes a TRA-8 pela Adriamicina. As células resistentes a MDA231 foram cultivadas em meio de controle (faixa) ou tratadas com 1.000 ng/ml de TRA-8 e 1 μ M de Adriamicina por uma hora (faixa 2) ou quatro horas (faixa 3), ou 1 μ M de Adriamicina sozinha ou 1.000 ng/ml de TRA-8 sozinho (faixa 5). Os Western blots dos lisados celulares totais foram sondados com anticorpos monoclonais de caspase anti-humana. O painel (C) mostra o recrutamento de TRAIL-R2 de FADD em células resistentes ao TRA-8. O TRAIL-R2 de células resistentes a MDA231 diferentemente tratadas como indicado acima foi imunoprecipitado com sefarose 4B 2B4. A co-imunoprecipitação de FADD com TRAIL-R2 foi determinada por Western blot sondado com anticorpo anti-FADD.

A Figura 7 mostra a associação de DDX3 com TRAIL-R2. As células precursoras de MDA231 e as células resistentes foram transfectadas com o DDX3 recombinante de comprimento completo. 48 horas após a transfecção, as células foram tratadas com 500 ng/ml de TRA-8 pelo tempo indicado. As proteínas celulares totais foram sondadas com anticorpo monoclonal anti-His (painel superior). β -actina foi usada como o controle de

carga. O ensaio de co-imunoprecipitação do DDX3 recombinante associado com TRAIL-R2 foi determinado usando-se o anticorpo anti-His (painel inferior). Para analisar o DDX3 endógeno associado com TRAIL, as células precursoras de MDA231 e as células resistentes foram tratadas com 500 ng/ml de TRA-8 pelo tempo indicado. TRAIL-R2 foi imunoprecipitado com Sefarose 4Bconjugada a 2B4. As proteínas celulares totais foram sondadas com anticorpos anti-DDX3 monoclonais, 3E2 e 5A6 (painel superior). O DDX3 endógeno co-imunoprecipitado foi sondado com anticorpos anti-DDX3 monoclonais, 3E2 e 5A6 (painel inferior). Os TRAIL-R2 nas células precursoras e nas células resistentes foram determinados por Western blot com anticorpo policlonal anti-TRAIL-R2.

A Figura 8 mostra o mapeamento da região de interação do DDX3 e TRAIL-R2. A Figura 8A mostras construções de DDX3 deletado. Os cDNAs codificando os DDX3 de comprimento completo e deletado, como indicado, foram clonados no vetor de expressão pcDNA3.1-HisA. As células 293 foram transfectadas com o DDX3 deletado N-terminal, C-terminal, e DDX3 do tipo selvagem. 48 horas após a transfecção, as expressões de DDX3 recombinante foram detectadas por Western blot usando-se anticorpo anti-His (painel superior). O DDX3 recombinante co-imunoprecipitado com TRAIL-R2 foi determinado por análise de Western blot usando-se o anticorpo monoclonal anti-His (painel central). Os TRAIL-R2 foram determinados por Western blot com anticorpo policlonal anti-TRAIL-R2 (painel inferior). Faixa 1: não transfecção. Faixas 2 a 5: Δ 2-5 do DDX3 N-terminal. Faixas 6 a 9: Δ 3-6 do DDX3 C-terminal. Faixa 10: o DDX3 de comprimento completo. A Figura 8B mostra que a interação de DDX3 com TRAIL-R2 é independente no domínio de morte. Os cDNAs codificando os TRAIL-R2 de comprimento completo e o deletado como indicado, foram clonados em um vetor de CMV de transporte. Células 3T3 de murino foram cotransfectadas ou com TRAIL-R2 e DDX3 do tipo selvagem ou mutantes. 24 horas mais tarde, a expressão

da superfície celular foi examinada por análise de citometria de fluxo usando-se TRA e anti-mIgG1 conjugado a PE. 48 horas após a cotransfecção, os lisados celulares foram imunoprecipitados com TRA-8. DDX3 total (painel superior) e DDX3 associado a TRAIL-R2 (painel central) foram examinados por Western blot usando-se anticorpo anti-His. Faixa 1: sem transfecção; Faixa 2: DDX3 sozinho; Faixa 3: TRAIL-R2 e DDX3 do tipo selvagem; Faixa 4 a 9: Δ 1-6 de TRAIL-R2 e DDX3. Os TRAIL-R2 foram determinados Western Blot com anticorpo policlonal anti-TRAIL-R2 (painel inferior). A Figura 8C mostra os cDNAs codificando os TRAIL-R2 de comprimento completo e truncado como indicado, que foram clonados em um vetor de expressão de promotor dual com GFP como uma proteína repórter. As células 3T3 de murino foram cotransfectadas com TRAIL-R2 e DDX3 ou do tipo selvagem ou mutante. 24 horas mais tarde, a expressão da superfície celular foi examinada por análise de citometria de fluxo usando TRA-8 e anti-mIgG1 conjugado a PE. 48 horas após a cotransfecção, os lisados celulares foram imunoprecipitados com TRA-8. Os TRAIL-R2 foram determinados por Western Blot com anticorpo policlonal anti-TRAIL-R2 (painel superior). DDX3 total (painel inferior) e DDX3 associado ao TRAIL-R2 (painel central) foram examinados por Western blot com o uso do anticorpo anti-His. Faixa 1: DDX3 sozinho; Faixa 2: Δ TRAIL-R2-300-330 e DDX3; Faixa 3: Δ D330 e DDX3; Faixa 4: Δ D340 e DDX3; Faixa 5: TRAIL-R2 tipo selvagem e DDX3. A Figura 8D mostra o alinhamento de aminoácidos da região de ligação de DDX3 de TRAIL-R2 com DcR2 e DR4. A Figura 8E mostra que DDX3 serve como a ligação entre TRAIL-R2 e cIAP1. As células precursoras MDA231 e As células resistentes a MDA231 foram tratadas com 500 ng/ml de TRA-8 pelo tempo indicado. TRAIL-R2 foi imunoprecipitado com Sefarose 4B conjugada a 2B4. DDX3 foi imunoprecipitado com Sefarose 4B conjugada a 3E4. Western blots do DDX3 total, cIAP1 (painel superior), DDX3 co-imunoprecipitado com TRAIL-R2, cIAP1 (painel central), DDX3 co-

immunoprecipitated com DDX3, cIAP1 (painel inferior) foram sondados com 3E4, anticorpo anti-DDX3 monoclonal, e 1C12, anticorpo anti-cIAP1 monoclonal. TRAIL-R2 foi determinado por Western Blot com o uso de anticorpo policlonal anti-TRAIL-R2 (painel central).

5 A Figura 9 mostra a infra-regulação da resistência reversa ao DDX3 à apoptose induzida por TRA-8. A Figura 9A mostra sRNAi-DDX3 eficaz selecionada. As células precursoras MDA231 foram transfectadas com o vetor U6-Entry codificando os alvos sRNAi-DDX3. 48 horas após a transfecção, a expressão de DDX3 foi determinada pela análise de Western
10 blot com o uso de anticorpo anti-DDX3. β -actina foi usada como o controle de carga. A Figura 9B mostra as células resistentes a MDA231 que foram cotransfectadas com o vetor de expressão de GFP e sRNAi-DDX3. 24 horas após a transfecção, as células positivas de GFP foram classificadas por citometria e cultivadas com várias concentrações de TRA-8 durante a noite.
15 As expressões de DDX3 foram detectadas por Western blot com o uso do anticorpo anti-DDX3 (painel superior). TRAIL-R2 foi imunoprecipitado com Sefarose 4B conjugada a 2B4. Os DDX3 associados ao TRAIL-R2 foram sondados com 3E4, anticorpo anti-DDX3 monoclonal (painel central). 24 horas após a transfecção, as células foram tratadas com várias concentrações
20 de TRA-8 durante a noite. A suscetibilidade das células transfectadas à apoptose induzida por TRA-8 foi determinada pelo ensaio de ATPLite. A Figura 9D mostra que as células transfectadas submetendo-se à apoptose foram determinadas pelo manchamento de TUNEL. A Figura 9E mostra os painéis das células cancerosas que foram transfectadas com controle ou oligo
25 sRNAi-DDX3. 48 horas após a transfecção, a expressão reduzida de DDX3 foi detectada por Western blot com o uso do anticorpo anti-DDX3. β -actina foi usada como o controle de carga. A Figura 9F mostra, 24 horas após a transfecção, as células que foram tratadas com várias concentrações de TRA-8 durante a noite. A suscetibilidade das células transfectadas à apoptose

induzida por TRA-8 foi determinada pelo ensaio de ATPLite.

A Figura 10 mostra que o motivo de ligação de DDN3 carente de TRAIL-R2 é pró-apoptótico. Células 3T3 de murinos foram cotransfectadas com Δ D340-TRAIL-R2 e DDX3, TRAIL-R2 do tipo selvagem e DDX3, Δ T300-330-TRAIL-R2 e DDX3. 24 horas após a transfecção, as células foram tratadas com 500 ng/ml de TRA-8 durante a noite. As células apoptóticas foram determinadas por anticorpo anti-TRAIL-R2 conjugado a PE, anexina V conjugada à biotina em células positivas de GFP com o uso da análise de citometria de fluxo. As células apoptóticas foram apresentadas pelo gráfico de barras de coluna.

A Figura 11 mostra que o DDX3 serve cIPI de ligação protéica adaptadora ao TRAIL-R2. A Figura 11A mostra o mapeamento de CARD de ligação de cIAP1 de DDX3. 293 células foram transfectadas com uma série de DDX3 deletados como indicado (painel superior), os DDX3 N-terminais aa 1-aa 50 deletados (Faixa 1), N-terminais aa 1-aa 100 deletados (Faixa 2), N-terminais aa 1-aa 150 deletados (Faixa 3) e C-terminais aa 350-aa 662 deletados (Faixa 4) e o comprimento completo (Faixa 5). 48 horas após a transfecção, o DDX3 recombinante foi imunoprecipitado com as contas de níquel. cIAP1 total (painel central) e cIAP1 co-imunoprecipitado foram determinados pela análise de Western blot com o uso de anticorpo monoclonal anti-cIAP1 (painel inferior). A Figura 11B mostra a resistência de TRA-8 reversa de CARD carente de DDX3. Quatro linhagens de células tumorais resistentes a TRA-8 foram transfectadas com o vetor adenoviral codificando o DDX3 de comprimento completo (DDX3-FL) ou o DDX3 truncado de CARD (Δ CARD-DDX3). 48 horas após a transfecção, os lisados celulares foram imunoprecipitados com TRA-8 e seguido por análise de Western blot do DDX3 co- imunoprecipitado (painel superior), e cIAP1 (painel central). Os TRAIL-R2 foram determinados por Western Blot com o uso de anticorpo policlonal anti-TRAIL-R2 (painel inferior). A Figura 11C a

viabilidade celular determinada pelo ensaio de ATPLite. As células transfectadas foram incubadas com 500 ng/ml de TRA-8 durante a noite.

A Figura 12 mostra os complexos protéicos TRAIL-R2/DDX3/cIAP1 que bloqueiam a ativação da caspase-8 e a clivagem dos nas células resistentes ao TRA-8. A Figura 12A mostra complexos protéicos TRAIL-R2/DDX3/cIAP1 em células sensíveis e resistentes ao TRA-8. As células MDA231 precursoras (MDA231p) e resistentes induzidas (MDA231r), as células UL-3C precursoras (UL-3Cp) e resistentes induzidas (UL-3Cr) foram tratadas com 500 ng/ml de TRA-8 por oito horas. Os lisados celulares totais foram imunoprecipitados com Sefarose 4B conjugada aos anticorpos 2B4 e anti-TRAIL-R2 e eluídos com glicina-HCL pH2.0 e imediatamente neutralizados com tampão Tris 1M. Placas de ELISA foram revestidas com anticorpo anti-TRAIL-R2 de 2B4 e bloqueadas com 3 % de BSA PBS. Após a incubação com o complexo protéico do co-IP de TRAIL-R2, o TRAIL-R2 foi detectado por anticorpo anti-TRAIL-R2 policlonal conjugado à biotina, seguido por estreptavidina conjugada a HRP. A Figura 12B mostra que DDX3 foi detectado por 3E2 conjugado à biotina, anticorpo anti-DDC3, seguido por estreptavidina conjugada a HRP. A Figura 12C mostra que cIAP1 foi detectado por 1C12 conjugado à biotina, anticorpo anti-cIAP1, seguido por estreptavidina conjugada a HRP. A Figura 12D mostra a suscetibilidade diferencial do DDX3 à clivagem mediada pela caspase. DDX3 foi isolado das células indicadas por imunoprecipitação com sefarose 4B conjugada ao anticorpo anti-TRAIL-R2 2B4, e incubada com caspase-2 ou caspase-8 indicadas a 37 °C a partir de 4 horas. A Figura 12E mostra a quantidade de DDX3 que foi medida por ELISA de sanduíche com o uso de 5A6 como anticorpo de captura e 3E2 como anticorpo de detecção. Os resultados são apresentados como percentuais de DDX3 após a clivagem através dos controles não clivados. A Figura 12F mostra o efeito do complexo de DDX3/cIAP1 sobre a atividade da caspase 8. DDX3 foi isolado das células

indicadas por imunoprecipitação com sefarose 4B conjugada ao anticorpo anti-TRAIL-R22B4, e incubado com a caspase-8 humana ativa recombinante na presença de um substrato fluorescente da caspase-8, Ac-IETD-AMC, por 2 horas. A inibição da caspase-8 foi medida por intensidade de fluorescência reduzida. Os resultados são apresentados como percentual da atividade máxima nos reservatórios de controle.

A Figura 13 mostra o papel do domínio rico em serina de DDX3 na regulação da associação e clivagem. O painel (B) mostra DDX3 co-imunoprecipitado por GSK3 α (em cima). As células MDA231 sensíveis ao TRA-8 foram tratadas com TRA-8 com ou sem lítio por duas horas. O lisado celular total foi imunoprecipitado com contas anti-GSK3 α . As proteínas com GSK3 α foram analisadas por Western blot com o uso do anticorpo anti-DDX3. DDX3 fosforilados de GSK3 (B, inferior). O DDX3 recombinante e tau foram usados como os substratos incubados com GSK com ou sem PKA por uma hora. O ³²P incorporado foi contado e apresentado como cpm. (C) O GSK3 não consegue fosforilar o DDX3 do mutante Ser90. (D) As células de MDA231 foram transfectadas com DDX3 do tipo selvagem e DDX3 mutante de Ser90. Após o tratamento de TRA-8, a dissociação do DDX3 do DR5 e a clivagem do DDX3 foram determinadas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O método e as composições apresentadas podem ser entendidas mais facilmente mediante referência à seguinte descrição detalhada das modalidades particulares e ao Exemplo nelas incluídos e às figuras e à sua descrição anterior e a seguir.

A indução da apoptose mediada pelo receptor da morte das células tumorais é uma abordagem extremamente promissora para a terapia do câncer. Como na maior parte, senão em todas, das terapias, algumas células alvo são resistentes. Como um exemplo, TRA-8, um único anticorpo anti-DR5 monoclonal agonístico, induz a apoptose das células do câncer humano

sem a citotoxicidade de hepatócito (Ichikawa, K. *et al.* 2001. *Nat Med* 7: 954-960), apresenta intensa eficácia anticâncer em modelos de animais (Buchsbaum, D. J. *et al.* 2003. *Clin Cancer Res* 9: 3731-3741), e tem demonstrado segurança nos estudos da toxicidade em primatas não humanos.

5 Assim, o TRA-8 é usado como um exemplo neste relatório, mas outros agentes que induzem a apoptose através da ativação do receptor da morte (por exemplo, DR4 e DR5) podem ser usados nos métodos aqui apresentados. Embora TRA-8 e suas versões humanizadas e humanas se acham sob desenvolvimento clínico como uma terapia anticâncer, algumas linhagens de
10 células tumorais são resistentes à apoptose mediada pelo TRA-8 a despeito dos níveis razoáveis de expressão de DR5. Estas observações sugerem que a resistência não é relacionada à expressão do receptor, mas, ao invés, aos mecanismos de sinalização iniciado pelo DR5. Certamente a apoptose mediada por DR5 pode ser intensificada significativamente pelos agentes
15 quimioterápicos comuns (Ohtsuka, T. e T. Zhou. 2002. *J Biol Chem* 277: 29294-29303; Ohtsuka, T. D. *et al.* 2003. *Oncogene* 22: 2034-2044). São apresentadas composições e métodos para inibir a resistência aos agonistas do receptor da morte mediante o alvejamento de uma família das proteínas contendo CARD que se ligam aos receptores da morte e inibem a ativação da
20 caspase.

Deve ficar entendido que os métodos e composições apresentados não se limitam aos métodos sintéticos específicos, às técnicas analíticas específica, ou a reagentes particulares, a menos que de outra forma especificado, e, como tal, podem variar. Deve também ficar entendido que a
25 terminologia aqui usada é para os fins de descrever formas de realização particulares apenas e não se intenta seja limitativa.

São apresentados materiais, composições e componentes que podem ser usados em combinação, podem ser usados na preparação, ou são produtos dos métodos e composições apresentadas. Estes e outros materiais

são apresentados neste relatório e fica entendido que, quando combinações, subconjuntos, interações, grupos etc. destes materiais sejam apresentados, embora referência específica de cada uma das várias combinações individuais e coletivas e permutações destes compostos possam não ser explicitamente apresentadas, cada um é especificamente considerado e aqui descrito. Por exemplo, se um vetor é apresentado e examinado, e vários componentes de vetor, incluindo os promotores, são examinados, cada uma e todas as combinações e permutações dos promotores e outros componentes de vetores e as modificações que sejam possíveis, são especificamente consideradas, a menos que especificamente indicado em contrário. Assim, se uma classe de moléculas A, B e C for apresentada, bem como uma classe de moléculas D, E e F e um exemplo de uma molécula de combinação, A-D, for apresentado, então, mesmo que cada um não seja individualmente citado, cada um é individual e coletivamente considerado. Assim, neste exemplo, cada uma das combinações A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E e C-F é especificamente considerada e deve ser considerada manifestada da apresentação de A, B e C; D, E e F; e a combinação de exemplo A-D. Da mesma forma, qualquer subconjunto ou combinação destas é também especificamente considerado e apresentado. Assim, por exemplo, os subgrupos de A-E, B-F e C-E são especificamente considerados e devem ser considerados revelados da apresentação de A, B e C; D, E e F; e a combinação A-D de exemplo. Este conceito se aplica a todos os aspectos deste pedido, incluindo, porém não limitando, as etapas nos métodos de produzir e usar as composições apresentadas. Assim, se existir uma variedade de etapas adicionais que possam ser realizadas, fica entendido que cada uma destas etapas adicionais pode ser realizada com qualquer modalidade específica ou combinação de modalidades dos métodos apresentados e que cada uma de tais combinações especificamente é levada em conta e deve ser considerada como apresentada.

Uma variedade de seqüências são aqui fornecidas e estas e

outras podem ser encontradas no Genbank, em ‘www.pubmed.gov’. Aqueles de experiência na técnica entendem como resolver as discrepâncias e diferenças das seqüências, e ajustar as composições e métodos relacionados a uma seqüência particular a outras seqüências relacionadas. Iniciadores e/ou sondas podem ser projetadas para qualquer seqüência, dada a informação aqui apresentada e conhecida na técnica.

É fornecido um método de reverter ou prevenir uma resistência de uma célula alvo em um agonista do receptor da morte compreendendo o contato da célula alvo com um modulador de uma ou mais atividades de proteínas contendo CARD, em que a modulação inverte ou previne a resistência ao agonista. O método tem utilidade para pesquisa da sinalização da apoptose e tratamento terapêutico de doenças tais como o câncer e distúrbios autoimunes e inflamatórios. Assim, a etapa de proceder ao contato, do método, pode ser realizada *in vivo* ou *in vitro*.

Como usado na totalidade deste relatório, “inverter” ou “reverter” significa mudar para a posição, direção ou curso opostos, tal como em mudar o curso de uma doença da piora para a melhora. Por exemplo, no caso da resistência do receptor da morte, reverter a resistência de uma célula alvo em um agonista do receptor da morte é tornar a célula menos resistente ao referido agonista. Assim, por exemplo, reverter a resistência de uma célula alvo que seja 100 % resistente pode resultar em que referida célula alvo seja 90 % a 0 % resistente ao agonista do receptor da morte, incluindo 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, e 0 % resistente.

Como usado na totalidade deste relatório, “prevenir” significa impedir, evitar, obviar, interceptar, interromper ou retardar alguma coisa de acontecer, especialmente pelo planejamento ou ação antecipados. Por exemplo, no caso da resistência do receptor da morte, para prevenir a resistência de uma célula alvo a um agonista do receptor da morte, é tornar a

célula menos capaz de tornar-se resistente ao referido agonista. Assim, por exemplo, a prevenção de 100 % da resistência em uma célula alvo pode resultar em que a referida célula alvo seja apenas de 0 % a 90 % resistente ao agonista do receptor da morte, incluindo 0 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % e 90 % resistente.

“Reverter” ou “prevenir” referem-se a uma mudança na grandeza ou a um retardo em qualquer mudança na grandeza. Assim, no caso da resistência do receptor da morte, “reverter” ou “prevenir” incluem reduzir o curso da resistência ou retardamento crescentes de um aumento na resistência.

Deve ser observado que, como usado neste relatório e nas reivindicações anexas, as formas singulares “um”, “uma”, “o” e “a” incluem as referências no plural, a menos que o contexto claramente declare de outra forma. Assim, por exemplo, a referência a “um polipeptídeo” inclui uma pluralidade de tais polipeptídeos, a referência a “o polipeptídeo” é uma referência a um ou mais polipeptídeos e equivalentes destes conhecidos daqueles habilitados na técnica, e assim por diante.

“Opcional” ou “opcionalmente” significam que o evento, a circunstância ou o material subsequentemente descritos podem ou não ocorrer ou estar presentes, e que a descrição inclui exemplos em que o evento, a circunstância ou o material ocorram ou estejam presentes, e exemplos em que não ocorram ou não estejam presentes.

As variações podem ser expressas neste relatório desde “aproximadamente” um valor particular, e/ou até “aproximadamente” outro valor particular. Quando uma tal variação é expressa, é também especificamente pretendida e considerada a variação a partir daquele valor particular e/ou até o outro valor particular, a menos que o contexto indique especificamente de outra forma. De forma semelhante, quando os valores

sejam expressos como aproximações, mediante o uso do antecedente “cerca de”, será entendido que o valor particular forma outra modalidade especificamente considerada que se deve considerar apresentada, a menos que o contexto especificamente indique de outra forma. Será ainda entendido que os pontos finais de cada uma das faixas são significativamente tanto em relação ao outro ponto final, quanto independentemente do outro ponto final, a menos que o contexto indique especificamente de outra forma. Finalmente, deve ficar entendido que todos os valores individuais e as sub-faixas de valores contidos dentro de uma faixa explicitamente apresentada, são também especificamente contemplados e devem ser considerados apresentados, a menos que o contexto especificamente indique de outra forma. O acima se aplica independentemente do fato de que, em casos particulares, algumas ou todas estas modalidades sejam explicitamente descritas.

Como usado na totalidade deste relatório, “célula alvo” significa uma célula carregando o receptor da morte alvejado, incluindo, por exemplo, uma célula que expresse DR5 e DR4 e ilustrativamente inclua células anormalmente cultivadas e células tumorais, tais como papilomas e verrugas; câncer de mama, câncer colônico, hepatomas, leucemias, câncer pulmonares, melanoma, mielomas, osteossarcomas, câncer ovariano, câncer pancreático, câncer prostático, câncer da cabeça e do pescoço, câncer tireóideo, câncer uterino, tumores do cérebro tais como astrocitomas, células imunes ativadas (por exemplo, células ativadas de linfocíticas, linfóides e mielóides), células inflamatórias, células sinoviais da artrite reumatóide, e células viralmente infectadas. *In vivo*, a célula alvo é uma célula de um indivíduo com uma condição patológica, incluindo aquelas em que a proliferação celular seja anormal ou desregulada, tal como no câncer e na artrite reumatóide. As células alvo incluem as células humanas, de primatas não humanos, gatos, cães, ratos, camundongos, porquinhos-da-índia, coelhos, cabras, carneiros, vacas, cavalos, galinhas, porcos, sagüis e doninhas, ou

células de várias linhagens celulares (por exemplo, as células de Jukart).

Por “receptor da morte” denota-se um receptor que inclui a apoptose celular uma vez ligada por um ligando. Os receptores da morte incluem, por exemplo, os membros da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) tendo os domínios da morte (por exemplo, TNFRI, Fas, DR3, 4,5,6) e os membros da superfamília do receptor de TNF sem os domínio da morte LTbetaR, CD40, CD27, HVEM.

A transdução de sinal através, por exemplo, de DR5, é um mecanismo chave no controle da apoptose mediada por DR5. Um aspecto comum dos receptores da morte da superfamília de TNFR é que eles todos têm um “domínio da morte” conservado em sua cauda citoplasmática (Zhou, T. *et al.* 2002. *Immunol Res* 26: 323-336). É bem estabelecido o fato de que a apoptose mediada por DR5 é iniciada no domínio da morte. A reticulação do DR5 na superfície celular mediante TRAIL ou o anticorpo anti-DR5 agonístico conduz à oligomerização do DR5 que é imediatamente seguida pelo recrutamento de FADD ao domínio da morte de DR5 (Bodmer, J. L. *et al.* 2000. *Nat Cell Biol* 2: 241-243; Chaudhary, P. M. *et al.* 1997. *Immunity* 7: 821-830; Kuang, A. A. *et al.* 2000. *J Biol Chem* 275: 25065-25068; Schneider, P. *et al.* 1997. *Immunity* 7: 831-836; Sprick, M. R. *et al.* 2000. *Immunity* 12: 599-609). O FADD comprometido no domínio da morte ainda recruta a procaspase 8 e/ou a procaspase 10 iniciadoras para formar um DISC através das interações DD homofílicas (Krammer, P. H. 2000. *Nature* 407: 789-795). As caspases 8 e 10 ativadas podem ativar a caspase 3 diretamente, ou clivar a proteína Bid contendo BH3 para ativar uma via da apoptose dependente das mitocôndrias através da liberação do citocromo C e ativação da caspase 9 (Desagher, S. e J. C. Martinou. 2000. *Trends Cell Biol* 10: 369-377; Scaffidi, C. *et al.* 1998. *Embo J* 17: 1675-1687). Em seguida à formação do complexo do domínio da morte, várias vias da transdução de sinal são ativadas, tais como a caspase, NF- κ B e JNK/p38. A ativação destas vias de

sinalização leva à regulação da apoptose mediada pelo receptor da morte através da família de proteínas Bcl-2 e IAP.

Por “agonista” denota-se uma substância (molécula, medicamento, proteína etc.) que seja capaz de se combinar com um receptor (por exemplo o receptor da morte) em uma célula e iniciar as mesmas reação ou atividade tipicamente produzidas pela ligação do ligando endógeno (por exemplo, a apoptose). O agonista do presente método pode ser um ligando do receptor da morte. Assim, o agonista pode ser TNF, Ligando Fas ou TRAIL. O agonista pode ainda ser um fragmento destes ligandos compreendendo o domínio de ligação do receptor da morte, de tal modo que o fragmento seja capaz de ligar e ativar o receptor da morte. O agonista pode ainda ser uma proteína de fusão compreendendo o domínio de ligação do receptor da morte, tal que a proteína de fusão seja capaz de ligar e ativar o receptor da morte. O agonista pode ainda ser uma proteína de fusão compreendendo o domínio de ligação do receptor da morte, tal que a proteína de fusão seja capaz de ligar e ativar o receptor da morte. O agonista pode ainda ser um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos com pelo menos 85 % de homologia ao TNF, Fas ou TRAIL, de tal modo que o homólogo seja capaz de ligar e ativar o receptor da morte.

O agonista pode ainda ser um anticorpo indutor da apoptose que se liga ao receptor da morte. O “anticorpo” pode ser um anticorpo monoclonal, policlonal, quimérico, de cadeia única, humanizado, completamente humano, ou qualquer um de seus fragmentos Fab ou F(ab')₂. Por “anticorpo indutor da apoptose” denota-se um anticorpo que causa a morte celular programada ou antes ou após a ativação com o uso dos métodos aqui fornecidos. Assim, o agonista do presente método pode ser um anticorpo específico para um receptor da morte de Fas, TNFR1 ou TRAIL, de tal modo que o anticorpo ative o receptor da morte. O agonista pode ser um anticorpo específico para DR4 ou DR5. O agonista pode ser um anticorpo DR5 tendo a

mesma especificidade de epítopo, ou secretado por um hibridoma entre camundongos tendo o Número de Acesso da ATCC PTA-1428 (por exemplo, o anticorpo TRA-8), o Número de Acesso da ATCC PTA-1741 (por exemplo, o anticorpo TRA-1), o Número de Acesso da ATCC PTA-1742 (por exemplo o anticorpo TRA-10). O agonista pode ser um anticorpo tendo a mesma especificidade de epítopo, ou secretado pelo hibridoma tendo o Número de Acesso da ATCC PTA-3798 (por exemplo, o anticorpo 2E12).

O receptor de TRAIL alvejado pelo anticorpo do presente método pode ser DR4 ou DR5. Tais receptores são descritos nos pedidos de patente publicados WO 99/03992, WO 98/35986, WO 98/41629, WO 98/32856, WO 00/66156, WO 98/46642, WO 98/5173, WO 99/02653, WO 99/09165, WO 99/11791, WO 99/12963 e Patente U.S. publicada nº 6.313.269, os quais são todos aqui incorporados como referência em sua totalidade quanto aos receptores apresentados neste relatório. Os anticorpos monoclonais específicos para estes receptores podem ser gerados com o uso de métodos conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Kohler e Milstein, *Nature*, 256: 495-497 (1975) e *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519 (1976), ambos os quais ficando aqui incorporados como referência em sua totalidade quanto a estes métodos. Ver também os métodos apresentados no pedido de patente publicado WO 01/83560, o qual é aqui incorporado como referência em sua totalidade.

O anticorpo do presente método pode ser um anticorpo conhecido na técnica, incluindo, por exemplo, um anticorpo de DR5 tendo a mesma especificidade de epítopo, ou secretado por um hibridoma entre camundongos tendo o Número de Acesso da ATCC PTA-1428 (por exemplo, o anticorpo TRA-8), o Número de Acesso da ATCC PTA-1741 (por exemplo, o anticorpo TRA-1), o Número de Acesso da ATCC PTA-1742 (por exemplo, o anticorpo TRA-10). Outros exemplos incluem um anticorpo tendo a mesma especificidade de epítopo, ou secretado pelos hibridomas tendo o Número de

Acesso da ATCC PTA-3798 (por exemplo, o anticorpo 2E12).

Por “proteína contendo CARD” denota-se uma família de proteínas que contêm um domínio de recrutamento associado à caspase (CARD) e são caracterizadas pela capacidade de se ligarem a um receptor da morte, em que a ligação fica opcionalmente fora do domínio da morte, e modular a ativação da apoptose pelo domínio da morte do referido receptor da morte. O DDX3 é um membro representativo desta família. As proteínas contendo o CARD incluem as helicases de RNA da família protéica de DEAD-box (SEQ ID NO: 21). A proteína apresentada contendo CARD pode ser, por exemplo, DDX3 (SEQ ID NO: 25, nº de acesso gi: 11344593), ou RIG-1 (nº de acesso gi: 6048564). A proteína contendo CARD pode ainda ser um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 85 % de homologia a DDX3, mda-5 ou RIG-1.

As helicases de RNA da família protéica de DEAD-box são altamente conservadas das bactérias aos mamíferos, são envolvidas em uma variedade de processos metabólicos envolvendo RNA, e são cruciais para a sobrevivência celular (Heinlein, U. A. 1998. *J Pathol* 184: 345-347). Todos os membros desta família de proteínas têm um motivo ATPase que é composto da sequência de aminoácidos característica D-E-A-D (Asp-Glu-Ala-Asp, SEQ ID NO: 21), dando o nome a esta família. Acredita-se geralmente que as proteínas DEAD-box (SEQ ID NO: 21) sejam RNA helicases, como as proteínas de ligação de ácido ribonucleico, necessária para a iniciação da translação, recomposição do RNA, montagem ribossômica, degradação do RNA, estabilidade do mRNA e formação do RNA. Enquanto algumas destas RNA helicases desempenhem um papel crucial na translação dos fatores transcricionais especiais, a superexpressão de algumas é relacionada à carcinogênese. O DDX1 é co-amplificado com N-myc nos neuroblastomas (George, R. E. *et al.* 1996. *Oncogene* 12: 1583-1587; Godbout, R. *et al.* 1998. *J Biol Chem* 273: 21161-21168). A RNA helicase,

p68, é consistentemente superexpressa nos tumores em comparação com o tecido normal compatibilizado. O p68 acumulado parece ser tornado poli-ubíquo, sugerindo um possível defeito na degradação mediada pelo proteassomo nestes tumores (Causevic, M. *et al.* 2001. *Oncogene* 20: 7734-7743), sugerindo que a desregulação da expressão de p68 ocorre prematuramente durante o desenvolvimento do tumor. O rck/p54 da família da proteína/RNA helicase do DEAD-box (SEQ ID NO: 21) pode contribuir para a proliferação celular e a carcinogênese no desenvolvimento dos tumores colorretais humanos no nível translacional mediante o aumento da síntese da proteína c-myc (Hashimoto, K. *et al.* 2001. *Carcinogenesis* 22: 1965-1970). O DDX3 é um membro desta família, embora a função de DDX3 da RNA helicase seja desconhecida (Fu, J. J. *et al.* 2002. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao* (Xangai) 34: 655-661). Foi relatado que o DDX3 pode interagir com a proteína de núcleo de HCV e regular a translação das proteínas virais de HCV (Owsianka, A. M. e A. H. Patel. 1999. *Virology* 257: 330-3400).

Algumas das RNA helicases contêm um CARD conservado (domínio de recrutamento da caspase; Yoneyama, M. *et al.* 2004. *Nat Immunol* 5: 730-737; Kang, D. C. *et al.* 2004. *Oncogene* 23: 1789-1800; Kang, D. C. *et al.* 2002. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 637-642). A hibridização de subtração identificou o gene-5 (mda-5) associado à diferenciação de melanoma como um gene induzido durante a diferenciação, a reversão do câncer e a morte celular programada (apoptose). Este gene contém tanto um domínio de recrutamento da caspase quanto domínios putativos da RNA helicase do grupo de DExH. O Mda-5 pode funcionar como um mediador da inibição do crescimento induzido por IFN e/ou apoptose (Kang, D. C. *et al.* 2002. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 637-642). Um estudo mais recente indica que o nível de mRNA de mda-5 é baixo nos tecidos normais, enquanto a expressão é induzida em um espectro de células

normais e cancerosas mediante IFN-beta. A expressão do mda-5 por meio de um adenovírus incompetente de replicação, o Ad.mda-5, induz a apoptose nas células HO-1 como confirmado pelos ensaios morfológicos, bioquímicos e moleculares (Kang, D. C. *et al.* 2004. *Oncogene* 23: 1789-1800). O gene I

5 indutível pelo ácido retinóico (RIG-I), que codifica uma RNA helicase DExD/H-box que contém um domínio de recrutamento da caspase, é um regulador essencial da sinalização induzida pelo dsRNA como avaliado pela triagem e ensaios funcionais. Um domínio da helicase com atividade de ATPase intacta foi responsável pela sinalização mediada pelo dsRNA. O

10 domínio de recrutamento da caspase transmitia sinais de 'jusante', resultando na ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e IRF-3. A ativação subsequente dos genes por estes fatores induziu as funções antivirais, incluindo a produção do interferon tipo I (Yoneyama, M. *et al.* 2004. *Nat Immunol* 5: 730-737).

As proteínas contendo um domínio de recrutamento associado

15 à caspase (CARD) foi estabelecido como reguladores chaves da morte celular. O CARD é composto de um feixe alfa-helicoidal conservado na N-terminal dos pró-domínios de certas caspases. Os CARDS podem também ser encontrados em uma variedade de outras proteínas. Como as proteínas do domínio da morte, os CARDS funcionam como motivos da interação de

20 proteínas hemotípicas que possibilitam as comunicações das proteínas através das interações de CARD/CARD. As proteínas com um CARD podem ser ou pró-apoptóticas ou anti-apoptóticas. As proteínas de CARD pró-apoptóticas incluem certas caspases tais como as caspases 2, 4 e 9, e Apaf1, que desempenham importantes papéis na iniciação da apoptose. As proteínas de

25 CARD anti-apoptóticas representativas incluem cIAP1 e cIAP2, que interagem com o CARD das caspases, e inibem a ativação das caspases através do seu domínio BIR. Muitos aspectos da função desta família de proteínas indicam sua utilidade potencial como novos alvos medicamentosos no tratamento do câncer. Várias proteínas contendo CARD são componentes

críticos da maquinaria da morte celular conservada, a qual, quando desregulada, promove a oncogênese e contribui proeminentemente para a resistência tumoral à quimioterapia. A Apafl protéica pró-apoptótica, que é inativada em alguns cânceres, é uma proteína de CARD que é indispensável para a apoptose induzida pelas mitocôndrias. Outras proteínas de CARD apoptóticas, tais como as proteínas da família IAP, têm-se mostrado protegerem os tumores contra os estímulos da morte celular e serem super-expressas em certas formas de câncer. Os agentes terapêuticos que ativam ou inibem as proteínas de CARD podem, portanto, ser utilizados como agentes quimiossensíveis ou como moduladores da apoptose quando usados em combinação com a quimioterapia convencional.

A resistência aos agonistas do receptor da morte pode ser atribuída à atividade das proteínas contendo CARD apresentadas. O presente método, portanto, fornece uma composição que modula uma ou mais atividades da proteína contendo CARD para prevenir a referida resistência. Por “modula” denota-se a supra-regulação, a infra-regulação, a ativação, o antagonismo, ou outra alteração na forma ou na função. As “atividades” de uma proteína incluem, por exemplo, a transcrição, a tradução, a translocação intracelular, a secreção, a fosforilação pelas quinases, a clivagem pelas proteases, a ligação homofílica e heterofílica a outras proteínas, a ubiquidade. Como a atividade da proteína contendo CARD é devida, em parte, à fosforilação nos, ou perto dos, aminoácidos de ligação ao receptor da morte, o modulador fornecido pode ser um inibidor da fosforilação da proteína contendo CARD. Assim, o modulador pode ser um inibidor de uma quinase ou fosfatase. Como um exemplo, o modulador pode ser um inibidor da atividade da glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3).

A GSK-3 é uma proteína quinase encontrada em uma variedade de organismos, incluindo de mamíferos. Duas formas de GSK-3 quase idênticas existem: GSK-3 α e GSK-3 β . O inibidor pode ser qualquer

inibidor de GSK-3 conhecido ou recém descoberto. De forma mais favorável, o inibidor de GSK-3 do método fornecido inibe pelo menos a GSK-3 β . A seqüência de aminoácidos para a GSK-3 β pode ser acessada no número de acesso do Genbank P49841, e a seqüência de nucleotídeos correspondente no
 5 número de acesso NM_002093. Para fins experimentais e de pesquisa, pode ser desejável usar um modelo de animal. Por exemplo, a seqüência de GSK-3 β de ratos pode ser acessada no número de acesso do Genbank P18266, e a de camundongos no número de acesso do Genbank AAD39258.

Os inibidores de GSK-3, como aqui usados, são compostos
 10 que reduzem direta ou indiretamente o nível de atividade da GSK-3 em uma célula, pela inibição enzimática competitiva ou não competitiva; pela redução dos níveis protéicos, por exemplo por um rompimento genético alvejado, pela redução da transcrição do gene da GSK-3, pelo aumento da instabilidade protéica, etc. Os inibidores podem ser moléculas orgânicas ou inorgânicas
 15 pequenas, ácidos nucleicos anti-sentido, anticorpos ou fragmentos deles derivados, etc. Outros inibidores da GSK-3 podem ser encontrados através triagem combinatória ou outras bibliotecas químicas para a inibição da atividade da GSK-3.

Exemplos de inibidores diretos da proteína da GSK-3 incluem
 20 o lítio (Li⁺) (Klein *et al.* 1996), o qual potencialmente inibe a atividade da GSK-3 β (K_i = 2 mM), mas não é um inibidor geral de outras proteínas quinases. Os íons de berílio (Be²⁺) são inibidores mais fortes da GSK-3, inibindo na faixa micromolar. Entretanto, este efeito inibidor não é tão seletivo quanto o do lítio, tendo em vista que ele também inibirá a CDK1 em
 25 baixas doses.

Os inibidores de GSK-3 também incluem a aloisina, a aloisina A, a kenpaullone. A aloisina [7-n-butil-6-(4-metoxifenil)[5H]pirrolo[2,3-b]pirazina] é um inibidor potente, seletivo, de permeação celular e competitivo a ATP de Cdk1/B (IC₅₀ = 700 nM), Cdk5/p35 (IC₅₀ = 1,5 uM) e

GSK-3 (IC₅₀ = 920 nM) (Mettey, Y. *et al.* (2003) *J Med Chem.* 46(2): 222-236), aqui incorporado como referência em sua totalidade para os preceitos relacionados a esta molécula. A aloisina A [7-n-butil-6-(4-metoxifenil)[5H]pirrolo[2,3-b]pirazina] é um composto de permeação celular que atua como um inibidor potente, seletivo, reversível e competitivo de ATP das quinases dependentes de ciclina, da quinase N-terminal c-Jun (JNK), e da glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) (GSK-3 alfa, IC₅₀ = 500 nM) (GSK-3 beta, IC₅₀ = 1,5 uM) (Mettey, Y. *et al.* (2003) *J Med Chem.* 46(2): 222-236), aqui incorporado como referência em sua totalidade quanto aos preceitos relacionados a esta molécula. Kenpaullone (9-bromo-7,12-diidroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-ona) é um inibidor potente de permeação celular da glicogênio sintase quinase-3b (GSK-3b, IC₅₀ = 230 nM), Lck e quinases dependentes da ciclina (Cdk) (Schultz, C. *et al.* (1999) *J. Med. Chem.* 42(15): 2909-2919; Zaharevitz, D. W. *et al.* (1999) *Cancer Res.* 59(11): 2566-2569; Kunick, C. *et al.* (2004) *J. Med. Chem.* 47(1): 22-36), os quais são todos aqui incorporados como referência em sua totalidade quanto aos preceitos relacionados a esta molécula.

Vários outros compostos têm sido observados inibirem a GSK-3. A maioria inibe a atividade da quinase através da interação com o sítio de ligação de ATP. Eles incluem as maleiminas Bisindóis e Anilino, alcalóides de Alsisina, Paullones, Indirrubinas e Piraloquinoxalinas. Por exemplo, as Paullones e seu uso na inibição da GSK-3 são descritas, por exemplo, em Kunick, C. *et al.* *J Med Chem.* 1 de janeiro de 2004; 47(1): 22-36, o qual é aqui incorporado como referência em sua totalidade quanto a seus preceitos sobre as Paullones. Tais compostos são eficazes nas concentrações nanomolares *in vitro* e nas micromolares baixas *in vivo*. Novamente, embora muitos tenham sido apresentados como sendo potentes, eles não são muito específicos quanto à GSK-3 e comumente inibem as CDKs relacionadas em níveis similares. Entretanto, duas maleimidas estruturalmente distintas

(SB216763 e SB415286) foram apresentadas como sendo potentes e têm alta especificidade para com a GSK-3. Elas podem ser usadas em substituição ao lítio como inibidoras da GSK-3 nos estudos celulares. Os membros da classe de compostos denominados granulatimidas ou didemnimidas também foram observados como atuando como inibidores da GSK-3) (pedido de patente internacional WO 99/47522, que é aqui incorporado quanto aos seus preceitos sobre estes compostos).

Alguns inibidores indiretos da GSK-3 incluem a wortmanina, que ativa a proteína quinase B, resultando na fosforilação e inibição da GSK-3. O isoproterenol, que atua principalmente através dos adrenorreceptores beta-3, reduz a atividade da GSK-3 a uma extensão semelhante (aproximadamente 50 %) como insulina (Moule *et al.* 1997). A p70 S6 quinase e a p90rsk-1 também fosforilam a GSK-3 β , resultando na sua inibição.

A GSK-3 também pode ser seletivamente alvejada com o uso de peptídeos específicos da GSK-3. Por exemplo, freqüentemente reajustado nos linfomas 1 de células T avançados (FRAT1), é um homólogo de mamífero de uma proteína de ligação de GSK3 (GBP). FRATida (um peptídeo correspondente aos resíduos 188 a 226 deFRAT1) se liga à GSK3 e bloqueia a fosforilação catalisada pela GSK3 da Axina e da beta-catenina (Thomas, G. M. *et al. FEBS Lett.* 17 de setembro de 1999 ; 458(2): 247-251).

O inibidor de GSK-3 do método fornecido pode também ser um ácido nucleico funcional. Os ácidos nucleicos funcionais são moléculas de ácido nucleico que têm uma função específica, tal como ligando uma molécula alvo ou catalisando uma reação específica. As moléculas de ácido nucleico funcionais podem ser divididas nas seguintes categorias, que não pretendem ser limitativas. Por exemplo, os ácidos nucleicos funcionais incluem moléculas anti-sentido, aptâmeros, ribozimas, moléculas formadoras de triplex, RNAi, e sequência de orientação externas. As moléculas funcionais

de ácido nucleico podem atuar como afetores, inibidores, moduladores e estimuladores de uma atividade específica possuída por uma molécula alvo, ou as moléculas funcionais de ácido nucleico podem possuir uma atividade sob nova forma independente de quaisquer outras moléculas.

5 Como as proteínas contendo CARD podem ser clivadas durante a apoptose induzida pelo receptor da morte, o modulador do presente método pode atuar pela promoção da clivagem da proteína contendo CARD. Como um exemplo, o DDX3 é desassociado do DR5 e clivado durante a apoptose induzida pelo TRA-8 (Figuras 9A e C) em paralelo com o
10 recrutamento de FADD (Figura 9E). Um dos sítios de clivagem para DDX3 é um motivo de DEDD relativamente conservado (SEQ ID NO: 7) entre os resíduos de aminoácido 132 a 135, os quais podem ser clivados pelas caspases 2, 3, 7 ou 10. Assim, o modulador pode ser uma caspase ou um derivado de uma caspase que cliva uma proteína contendo CARD (por exemplo, DDX3).

15 Como a atividade da proteína contendo CARD é dependente da sua ligação ao receptor da morte, o modulador do presente método pode ser um inibidor da interação entre a proteína contendo CARD e o receptor da morte. Em um exemplo, o modulador é uma substância (medicamento, molécula, polipeptídeo etc.) que liga uma proteína contendo CARD ao sítio
20 de ligação do receptor da morte. Assim, o modulador pode ser um polipeptídeo compreendendo os aminoácidos do receptor da morte correspondente ao sítio de ligação da proteína contendo CARD. Por exemplo, o modulador pode ser um polipeptídeo compreendendo os aminoácidos 250 a 340 de DR5 (SEQ ID NO: 22, nº de acesso gi: 3721878). Assim, o modulador
25 pode compreender a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 23. O modulador pode ainda ser um polipeptídeo compreendendo um fragmento da sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 23, de tal modo que o fragmento seja capaz de ligar o DDX3. Como um exemplo, o modulador pode ser um polipeptídeo compreendendo os aminoácidos 280 a 310 de DR5 (SEQ ID NO: 22, nº de

acesso gi: 3721878). Assim, o modulador pode compreender a seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 24. Como outro exemplo, o modulador pode ser um polipeptídeo compreendendo os aminoácidos 300 a 330 de DR5 (SEQ ID NO: 22, nº de acesso gi: 3721878), Assim sendo, o modulador pode
 5 compreender a seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 36.

Alternativamente, o modulador pode ser uma substância (medicamento, molécula, polipeptídeo etc.) que liga o sítio de ligação da proteína contendo CARD do receptor da morte sem inibir a apoptose. O modulador pode ser um polipeptídeo compreendendo os aminoácidos
 10 correspondentes ao sítio de ligação do receptor da morte da proteína contendo CARD.

O modulador do presente método pode afetar a capacidade de uma proteína contendo CARD para impedir a ativação da apoptose dependente da caspase. O domínio do CARD das proteínas contendo CARD é
 15 envolvido no recrutamento dos inibidores da apoptose (IAP), os quais suprimem a apoptose nas células hospedeiras durante a infecção viral (Crook, N. E. *et al.* 1993. *J Virol* 67: 2168-2174). A família dos IAP antagoniza a morte celular pela interação com as caspases maduras, e inibindo a atividade enzimática destas. Oito IAPs distintos de mamíferos foram identificados,
 20 incluindo XIAP, c-IAP1, c-IAP2 e ML-IAP/Livin (ver, por exemplo, Ashhab, Y. *et al.* 2001. *FEBS Lett* 495: 56-60; Kasof, G. M. e B. C. Gomes. 2001. *J Biol Chem* 276: 3238-3246; Vucic, D. *et al.* 2000. *Curr Biol* 10: 1359-1366, os quais são todos aqui incorporados como referência em sua totalidade, quando relacionados a estas moléculas de IAP). Todos os IAPs contêm um a
 25 três domínios de repetição de IAP de baculovírus (BIR) e têm seqüência homóloga (CX2CX16HX6C). Através do domínio de BIR, as moléculas de IAP se ligam e diretamente inibem as caspases (Deveraux, Q. L. e J. C. Reed. 1999. *Genes Dev* 13: 239-252; Deveraux, Q. L. *et al.* 1997. *Nature* 388: 300-304; Deveraux, Q. L. e J. C. Reed. 1999. *Genes Dev* 13: 239-252, os quais são

todos aqui incorporados como referência em sua totalidade, quando relacionados à interação dos IAPs e das caspases). As proteínas mitocondriais Smac/DIABLO podem ligar e antagonizar os IAPs (Suzuki, Y. *et al.* 2001. *J Biol Chem* 276: 27058-27063) para suprimir a função do IAP (Wieland, I. *et al.* 2000. *Oncol Res* 12: 491-500) (As referências citadas são todas incorporadas aqui como referência em sua totalidade, quando relacionadas à inibição dos IAPs). Assim, o modulador do presente método pode ser um inibidor da ligação dependente do CARD. O modulador pode afetar a capacidade de uma proteína contendo CARD para recrutar uma caspase ou modulador de caspase, tal como o IAP. O modulador pode ser uma substância (medicamento, molécula, polipeptídeo, proteína de fusão, anticorpo, fragmento de anticorpo, etc.) que liga uma proteína contendo CARD de tal modo que a proteína contendo CARD tenha ligação e recrutamento reduzidos dos IAPs. O modulador pode ser um fragmento de ligação da proteína contendo CARD de, por exemplo, caspase-1, caspase-2, caspase-4 ou caspase-5, cIAP1, cIAP2, XIAP ou survivina.

O modulador pode ainda ser um inibidor da expressão do gene protéico contendo IAP ou CARD na célula alvo. Existem vários métodos conhecidos de inibir a expressão de uma proteína em uma célula, incluindo as moléculas de formação de triplex, ribozimas, seqüências de orientação externa, moléculas anti-sentido e moléculas de RNAi.

As moléculas anti-sentido são projetadas para interagir com uma molécula alvo de ácido nucleico através do pareamento de base canônico ou não canônico. A interação da molécula anti-sentido e da molécula alvo é projetada para promover a destruição da molécula alvo através, por exemplo, da degradação híbrida de RNA-DNA mediada por RNaseH. Alternativamente, a molécula anti-sentido é projetada para interromper uma função de processamento que normalmente deva ter lugar sobre a molécula alvo, tal como a transcrição ou a replicação. As moléculas anti-sentido podem

ser projetadas com base na sequência da molécula alvo. Numerosos métodos para otimização da eficiência anti-sentido mediante o encontro das regiões mais acessíveis da molécula alvo, existem. Métodos exemplares devem ser as experiências de seleção *in vitro* e os estudos de modificação do DNA com o uso de DMS e DEPC. É preferível que as moléculas anti-sentido se liguem à molécula alvo com uma constante de dissociação (K_d) menor ou igual a 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} ou 10^{-12} . Uma amostra representativa dos métodos e técnicas que auxiliam no projeto e uso das moléculas anti-sentido pode ser encontrada nas Patentes U.S. 5.135.917, 5.294.533, 5.627.158, 5.641.754, 5.691.317, 5.780.607, 5.786.138, 5.849.903, 5.856.103, 5.919.772, 5.955.590, 5.990.088, 5.994.320, 5.998.602, 6.005.095, 6.007.995, 6.013.522, 6.017.898, 6.018.042, 6.025.198, 6.033.910, 6.040.296, 6.046.004, 6.046.319 e 6.057.437, as quais são aqui incorporadas como referência em sua totalidade quanto aos métodos e técnicas concernentes às moléculas anti-sentido.

Os aptâmeros são moléculas que interagem com uma molécula alvo, preferivelmente de uma maneira específica. Tipicamente os aptâmeros são ácidos nucleicos pequenos variando de 15 a 50 bases de comprimento, que se multiplicam em estruturas secundárias e terciárias definidas, tais como as alças tronco ou quartetos G. Os aptâmeros podem ligar as moléculas pequenas, tais como ATP (Patente U.S. 5.631.146) e teofilina (Patente U.S. 5.580.737), bem como moléculas grandes, tais como a transcriptase reversa (Patente U.S. 5.786.462) e a trombina (patente dos Estados Unidos 5.543.293). Os aptâmeros podem ligar-se muito firmemente com K_s da molécula alvo de menos do que 10^{-12} M. É preferível que os aptâmeros liguem a molécula alvo com um K_d de menos do que 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} ou 10^{-12} . Os aptâmeros podem ligar-se à molécula alvo com um grau muito elevado de especificidade. Por exemplo, foram isolados aptâmeros que têm mais do que uma diferença de duplicação de 10.000 nas afinidades de ligação entre a molécula alvo e outra molécula que difira em apenas uma única posição sobre

a molécula (Patente U.S. 5.543.293). É preferível que o aptâmero tenha um K_d com a molécula alvo de pelo menos 10, 100, 1000, 10.000 ou 100.000 vezes menor do que o K_d com uma molécula de ligação de base. É preferível, quando realizando a comparação para um polipeptídeo por exemplo, que a molécula de base seja um polipeptídeo diferente. Exemplos representativos de como fazer e usar aptâmeros para ligar uma variedade de diferentes moléculas alvo podem ser encontrados nas Patentes U.S. 5.476.766, 5.503.978, 5.631.146, 5.731.424, 5.780.228, 5.792.613, 5.795.721, 5.846.713, 5.858.660, 5.861.254, 5.864.026, 5.869.641, 5.958.691, 6.001.988, 6.011.020, 6.013.443, 6.020.130, 6.028.186, 6.030.776 e 6.051.698, as quais são aqui incorporadas como referência em sua totalidade, quanto aos métodos e técnicas relacionados aos aptâmeros.

As ribozimas são moléculas de ácido nucleico que são capazes de catalisar uma reação química, ou intramolecular ou intermolecularmente.

As ribozimas são assim ácido nucleico catalítico. É preferível que as ribozimas catalisem as reações intermoleculares. Existem vários tipos diferentes de ribozimas que catalisam a nuclease ou as reações do tipo de ácido nucleico polimerase, que se baseiam nas ribozimas encontradas nos sistemas naturais, tais como as ribozimas cabeça de martelo (Patentes U.S. 5.334.711, 5.436.330, 5.616.466, 5.633.133, 5.646.020, 5.652.094, 5.712.384, 5.770.715, 5.856.463, 5.861.288, 5.891.683, 5.891.684, 5.985.621, 5.989.908, 5.998.193, 5.998.203; Pedidos de Patente Internacional n^{os} WO 9858058 por Ludwig e Sproat, WO 9858057 por Ludwig e Sproat, e WO 9718312 por Ludwig e Sproat) ribozimas grampo de cabelo (por exemplo, as Patentes U.S. 5.631.115, 5.646.031, 5.683.902, 5.712.384, 5.856.188, 5.866.701, 5.869.339 e 6.022.962), e ribozimas tetraimenas (por exemplo, as Patentes U.S. 5.595.873 e 5.652.107). Existem também várias ribozimas que não são encontradas nos sistemas naturais, mas que têm sido engendradas para catalisar as reações específicas sob nova forma (por exemplo, as Patentes U.S.

5.580.967, 5.688.670, 5.807.718 e 5.910.408). As ribozimas preferidas clivam os substratos de RNA ou de DNA e, mais preferível, clivam os substratos de RNA. As ribozimas tipicamente clivam os substratos de ácido nucleico através do reconhecimento e ligação do substrato alvo com a subsequente clivagem. Este reconhecimento é freqüentemente baseado na maioria das vezes nas interações dos pares de base canônicas ou não canônicas. Esta propriedade torna as ribozimas particularmente bons candidatos para clivagem alvo específica dos ácidos nucleicos, porque o reconhecimento do substrato alvo baseia-se na seqüência de substratos alvo. Exemplos representativos de como produzir e usar as ribozimas para catalisar uma variedade de diferentes reações podem ser encontrados nas Patentes U.S. 5.646.042, 5.693.535, 5.731.295, 5.811.300, 5.837.855, 5.869.253, 5.877.021, 5.877.022, 5.972.699, 5.972.704, 5.989.906 e 6.017.756.

As moléculas triplex que formam ácido nucleico funcional são moléculas que podem interagir ou com ácido nucleico de filamento duplo ou de filamento único. Quando as moléculas triplex interagem com uma região alvo, uma estrutura denominada de um triplex é formada, em que existem três filamentos de DNA formando um complexo dependente tanto do pareamento de base de Watson-Crick quanto de Hoogsteen. As moléculas triplex são preferidas por que elas podem ligar regiões alvo com altas afinidade e especificidade. É preferível que as moléculas formadoras do triplex liguem a molécula alvo com um K_d menor do que 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} ou 10^{-12} . Exemplos representativos de como produzir e usar as moléculas formadoras de triplex para ligar uma variedade de diferentes moléculas alvo podem ser encontrados nas Patentes U.S. 5.176.996, 5.645.985, 5.650.316, 5.683.874, 5.693.773, 5.834.185, 5.869.246, 5.874.566 e 5.962.426.

Seqüências guias externas (EGSs) são moléculas que se ligam a uma molécula de ácido nucleico alvo formando um complexo, e este complexo é reconhecido por RNase P, o qual cliva a molécula alvo. As EGSs

podem ser designadas para especificamente alvejar uma molécula de RNA de escolha. A RNase P auxilia no processamento do RNA de transferência (tRNA) dentro de uma célula. A RNase P pode ser recrutada para clivar virtualmente qualquer sequência de RNA mediante o uso de uma EGS que
 5 faça com que o complexo alvo de RNA:EGS imite o substrato natural de tRNA. [WO 92/03566 por Yale, e Forster e Altman, *Science* 238: 407-409 (1990)].

De forma semelhante, a clivagem de RNA dirigida a EGS/RNase P eucariótica pode ser utilizada para clivar alvos desejados
 10 dentro das células eucarióticas [Yuan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8006-8010 (1992); WO 93/22434 por Yale; WO 95/24489 por Yale; Yuan e Altman, *EMBO J* 14: 159-168 (1995), e Carrara *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 92: 2627-2631 (1995)]. Exemplos representativos de como produzir e usar moléculas de EGS para facilitar a clivagem de uma variedade de
 15 diferentes moléculas alvo podem ser encontradas nas Patentes U.S. 5.168.053, 5.624.824, 5.683.873, 5.728.521, 5.869.248 e 5.877.162.

A expressão de genes pode também ser eficazmente silenciada de uma maneira altamente específica através da interferência do RNA (RNAi). Este silêncio foi originalmente observado com a adição do RNA de
 20 filamento duplo (dsRNA) (Fire, A. *et al.* (1998) *Nature*, 391: 806-811; Napoli, C. *et al.* (1990) *Plant Cell* 2: 279-289; Hannon, G. J. (2002) *Nature*, 418: 244-251). Uma vez o dsRNA entre em uma célula, ele é clivado por uma enzima semelhante a RNase III, Dicer, em RNAs de interferência pequenos (siRNA) de filamento duplo de 21 a 23 nucleotídeos de comprimento, que
 25 contém 2 projeções de nucleotídeos nas extremidades 3' (Elbashir, S. M. *et al.* (2001) *Genes Dev.*, 15: 188-200; Bernstein, E. *et al.* (2001) *Nature*, 409: 363-366; Hammond, S. M. *et al.* (2000) *Nature*, 404: 293-296). Em uma etapa dependente de ATP, os siRNAs se tornam integrados em um complexo protéico de múltiplas subunidades, comumente conhecido como o complexo

silencioso induzido por RNAi (RISC), que guia os siRNAs para a sequência alvo de RNA (Nykanen, A. *et al.* (2001) *Cell*, 107: 309-321). Em algum ponto o duplex de siRNA se desenrola, e parece que o filamento anti-sentido permanece ligado ao RISC e dirige a degradação da sequência complementar do mRNA por uma combinação de endo e exonucleases (Martinez, J. *et al.* (2002) *Cell*, 110: 563-574). No entanto, o efeito do iRNA ou siRNA ou seu uso não são limitados a qualquer tipo de mecanismo.

O RNA de interferência curto (siRNA) é um RNA de duplo filamento que pode induzir o silenciamento do gene pós-transcricional específico da sequência, dessa forma reduzindo ou mesmo inibindo a expressão do gene. Em um exemplo, um siRNA deflagra a degradação específica das moléculas de RNA homólogas, tais como os mRNAs, dentro da região de identidade de sequências tanto entre o siRNA quanto o RNA. Por exemplo, a WO 02/44321 apresenta siRNAs capazes de degradação específica da sequência de mRNAs alvo quando pareados em base com as extremidades 3' projetando-se, aqui incorporada como referência quanto ao método de produzir estes siRNAs. O silenciamento dos genes específicos da sequência pode ser obtido em células de mamíferos com o uso de RNAs sintéticos de filamento duplo curtos que imitam os siRNAs produzidos pela enzima Dicer (Elbashir, S. M. *et al.* (2001) *Nature*, 411: 494-498) (Ui-Tei, K. *et al.* (2000) *FEBS Lett* 479: 79-82). o siRNA pode ser sintetizado quimicamente ou *in vitro* ou pode ser o resultado dos RNAs semelhantes a grampo de cabelo de filamento duplo curtos (shRNAs) que são processados nos siRNAs dentro da célula. Os siRNAs sintéticos são geralmente designados com o uso de algoritmos e um sintetizador de DNA/RNA convencional. Os fornecedores incluem a Ambion (Austin, Texas), a ChemGenes (Ashland, Massachusetts), Dharmacon (Lafayette, Colorado), Glen Research (Sterling, Virginia), MWB Biotech (Esbersberg, Alemanha), Proligo (Boulder, Colorado) e Qiagen (Vento, Países Baixos). O siRNA também pode ser sintetizado *in vitro* com o

uso de kits tais como o Kit de Construção de siRNA SILENCER® da Ambion. São aqui apresentados quaisquer siRNA designados como descrito acima com base nas seqüências para c-Kit ou SCF. Por exemplo, os siRNAs para expressão dos genes silenciadores de c-Kit são comercialmente disponíveis (siRNA c-Kit humano SURESILENCING®; Zymed Laboratories, San Francisco, CA).

A produção do siRNA de um vetor é mais comumente feita através da transcrição de um RNA tipo grampo de cabelo curto (shRNAs). Os kits para a produção de vetores compreendendo shRNA acham-se disponíveis, por exemplo, os Kits de Construção GENESUPPRESSOR® da Imgenex e o plasmídeo de RNAi e vetores lentivírus indutíveis BLOCK-IT® da Invitrogen. Acham-se aqui apresentados quaisquer shRNA designados como descrito acima com base nas seqüências para os mediadores inflamatórios aqui apresentados.

Assim sendo, o modulador do presente método pode compreender siRNA ou shRNA. O modulador pode ser um inibidor da expressão de genes de cIAP1 (acesso nº gi: 41349435), cIAP2 (acesso nº gi: 33946283), XIAP (acesso nº gi: 1184319), survivina (acesso nº gi: 2315862), DDX3 (SEQ ID NO: 25, acesso nº gi: 13514816), mda-5 (acesso nº gi: 11344593) ou RIG-1 (acesso nº gi: 6048564). Assim, o modulador pode compreender um shRNA derivado da seqüência de ácidos nucleicos de DDX3 (SEQ ID NO: 25, acesso nº gi: 13514816). Como um exemplo, o modulador pode compreender um shRNA codificado pela seqüência de ácidos nucleicos SEQ ID NO: 10, 12, 14 ou 16.

Existem vários reagentes de transfecção que podem ser usados para a liberação do siRNA a uma célula, tais como, por exemplo, a Lipofetamina 2000 da Invitrogen, o TransIT-TKO da Mirus, e o Reagente de Transfecção de siRNA RiboJuice da Novagen. Entretanto, os reagentes de transfecção geralmente não funcionam *in vivo*. O siRNA desnudo pode ser

liberado diretamente dentro da vasculatura de um indivíduo, o que tem a vantagem de que nenhuma outra proteína é liberada ou expressa, o que é crítico já que os ácidos nucleicos não são imunogênicos. Existem também métodos de liberar ácidos nucleicos através das barreiras epiteliais tais como a pele, com o uso de alguma forma de energia para romper o epitélio, por exemplo a sonoforese (Patente U.S. 5.421.816, Patente U.S. 5.618.275, Patente U.S. 6.712.805 e Patente U.S. 6.487.447, as quais são todas aqui incorporadas como referência quanto aos preceitos da liberação mediada pelo ultra-som dos compostos, através da pele).

10 É fornecido um método de triar uma célula quanto a um biomarcador de resistência a um agonista do receptor da morte, compreendendo ensaiar a célula quanto ao DDX3 total, ou um seu homólogo. É também fornecido um método de triar uma célula quanto a um biomarcador de resistência a um agonista do receptor da morte, compreendendo ensaiar a

15 associação do receptor da morte com uma proteína contendo CARD, em que altos níveis de associação significam resistência ao agonista. A associação entre o receptor da morte e a proteína contendo CARD indica resistência ao agonista. Opcionalmente, a célula a ser examinada é colocada em pré-contato com um agonista do receptor da morte (por exemplo, anticorpo agonístico).

20 Assim, é fornecido um método de triar uma célula quanto a um biomarcador de resistência a um agonista do receptor da morte, compreendendo colocar em contato a célula com um agonista do receptor da morte, e monitorar a associação fracionária do receptor da morte com uma proteína contendo CARD, em que a associação significa resistência ao agonista. Opcionalmente,

25 nos vários métodos que envolvem detectar a associação, pode-se medir a ~~dissociação e subtrair a quantidade dissociada do total para calcular a~~ quantidade associada.

A etapa de contato do presente método pode ser feita ou *in vivo* ou *in vitro*. A monitoração da associação entre o receptor da morte e a

proteína contendo CARD pode envolver o isolamento de um fragmento protéico (por exemplo, o receptor da morte) da(s) célula(s) usando anticorpos específicos (por exemplo, por imunoprecipitação). Este método pode ainda envolver a análise do fragmento protéico quanto às proteínas associadas (por exemplo, DDX3) mediante métodos de imunodeteção padrão, tais como o Western Blot, o radioimunoensaio (RIA), ou ELISA. Estes métodos com base em anticorpos são bem conhecidos na técnica e são facilmente ajustados a cada receptor da morte, proteína contendo CARD, caspase e modulador da caspase de interesse. Como uma ilustração, o presente método pode compreender o tratamento de uma célula de um indivíduo com anticorpo de TRA-8, isolando a proteína do lisado celular, imunoprecipitando a proteína DR5, separando DR5 por eletroforese em SDS-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (condições redutoras ou não redutoras), transferindo a proteína separada para uma membrana de nitrocelulose, e usando as técnicas padrão de Western blot para detectar DDX3 associado com DR5, em que a associação é evidência da resistência ao TRA-8 nessa célula.

É igualmente fornecido um método de triar uma célula quanto a um biomarcador de resistência a um agonista do receptor da morte compreendendo monitorar a associação de uma caspase ou modulador de caspase (exemplo, cIAP1, cIAP2, XIAP, survivina) com a proteína contendo CARD e comparando-se o nível de associação com uma amostra de células de controle resistentes e não resistentes conhecidas. A associação de IAPs com a proteína contendo CARD em níveis semelhantes àquele das células resistentes significa resistência ao agonista. Opcionalmente, a célula a ser examinada é pré-colocada em contato com um agonista do receptor da morte (por exemplo, anticorpo agonístico).

Como uma ilustração, o presente método pode compreender o tratamento de uma célula de um indivíduo com anticorpo de TRA-8, isolando a proteína do lisado celular, imunoprecipitando a proteína DDX3, separando

DDX3 por eletroforese em SDS-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (condições redutoras ou não redutoras), transferindo a proteína separada para uma membrana de nitrocelulose, e usando as técnicas padrão de Western blot para detectar caspases (por exemplo caspase-1, caspase-2, caspase-4, caspase-5) e IAPs (por exemplo, cIAP1, cIAP2, XIAP, survivina) associado com DDX3, em que a detecção dos IAPs com DDX3 é evidência da resistência ao TRA-8 naquela célula. O nível de associação pode ser comparado com um nível de controle. O nível de controle pode basear-se nas células não resistentes. Se o nível de teste for mais elevado do que aquele das células de controle não resistentes, então a resistência é indicada. O nível de controle pode basear-se nas células resistentes, de tal modo que uma similaridade entre os níveis de teste e os níveis de controle indique resistência.

É igualmente fornecido um método de triar quanto a um modulador de uma proteína contendo CARD. Em particular, é aqui fornecido um tal método de triagem em que o modulador reverte ou previne uma resistência da célula alvo a um agonista do receptor da morte. As etapas do método de triagem compreende fazer o contato da proteína contendo CARD com um agente candidato, e detectando-se uma mudança (por exemplo, decréscimo) em uma ou mais atividades da proteína contendo CARD na presença do agente candidato em comparação com a ausência do agente candidato, em que a atividade ou as atividades se correlacionam com a resistência da célula alvo ao agonista do receptor da morte. Um decréscimo na atividade ou atividades da proteína contendo CARD indica que o agente candidato modula a proteína contendo CARD. Este método pode ser modificado para utilizar proteína contendo CARD modificada, incluindo, por exemplo, modificações de ocorrência natural ou modificações de ocorrência não natural. Tais modificações podem incluir trunicações, mutações, proteínas quiméricas, etc. Por exemplo, a sequência da ácido nucleico para DDX3 é apresentada na SEQ ID NO: 25. Exemplos de mutações de DDX3 incluem as

substituições de adenosina em guanosina nas posições 1842 e 2493 na SEQ ID NO: 25.

Qualquer número de atividades da proteína contendo CARD pode ser avaliado nos métodos de triagem aqui descritos. Por exemplo, a atividade da proteína contendo CARD pode ser a fosforilação, incluindo, por exemplo, a fosforilação nos, ou perto dos, aminoácidos de ligação ao receptor da morte. Assim, o presente método pode compreender detectar a fosforilação da proteína contendo CARD. Os ensaios com base celular ou livre de células para detectar a fosforilação das proteínas são bem conhecidos na técnica e incluem o uso dos anticorpos, incluindo, por exemplo, a anti-Fosfoserine (Chemicon® AB 1603) (Chemicon, Temecula, CA), anti-Fosfotreonina (Chemicon® AB 1607), e anti-Fosfotirosina (Chemicon® AB1599). Os anticorpos específicos do sítio também podem ser gerados específicos para a forma fosforilada do DDX-3. Os métodos de gerar e usar referidos anticorpos são bem conhecidos na técnica.

Outra atividade da proteína contendo CARD que pode ser avaliada nos métodos de triagem aqui descritos é a atividade de ligação. Por exemplo, a atividade da proteína contendo CARD pode ser ligada ao receptor da morte. Assim, o presente método pode compreender detectar a interação entre a proteína contendo CARD e o receptor da morte. A atividade da proteína contendo CARD pode ser a ligação dependente do CARD. Assim, o presente método pode compreender detectar a ligação dependente do CARD a, por exemplo, cIAP1, cIAP2, XIAP, ou survivina. Os métodos para a detecção da ligação à proteína são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, a co-imunoprecipitação combinada com os ensaios imunoabsorventes ligados à enzima (ELISAs) ou Western blotting. Em outro exemplo, um ensaio de sanduíche pode ser usado, no qual um primeiro anticorpo captura o receptor da morte e em que um segundo anticorpo detecta a proteína contendo CARD. Em outro exemplo, um ensaio de sanduíche pode

ser usado em que um primeiro anticorpo captura a proteína contendo CARD e em que um segundo anticorpo detecta o receptor da morte.

Ainda aqui fornecidos são os ensaios de triagem em que a atividade avaliada da proteína contendo CARD é a clivagem, incluindo, por exemplo, a clivagem que ocorre durante a apoptose induzida pelo receptor da morte. Assim, o método de triagem pode compreender detectar a clivagem da proteína contendo CARD. Os métodos para a detecção da clivagem da proteína são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, o Western blotting.

A etapa de contato do método de triagem pode ser feita ou *in vivo* ou *in vitro*. O método de triagem pode ser ou com base celular ou livre de células. Assim, em um aspecto, a proteína contendo CARD se acha em uma célula alvo. A proteína contendo CARD pode ser de ocorrência natural na célula ou a célula pode ser geneticamente engendrada para produzir a proteína contendo CARD. Em um método livre de células, a proteína contendo CARD pode ser modificada para ser ligada a um substrato ou para formar uma proteína quimérica.

Opcionalmente, o método de triagem pode ainda compreender o contato da célula alvo, ou um sistema não celular compreendendo um receptor da morte, uma ou mais vezes com um agonista do receptor da morte, e detectar o nível de resistência ao agonista do receptor da morte. O nível de resistência ao agonista do receptor da morte pode ser detectado, por exemplo, pela medida da apoptose, um declínio na apoptose após exposição repetida ao agonista do receptor da morte indicando um aumento na resistência. Métodos para a detecção da apoptose são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, reagentes para detectar a rotulagem terminal do entalhe de dUTP terminal (TUNEL), a caspase3 ativa, a fosfatidilserina (PS) fosfolipídica da superfície celular pela Anexina V. Os reagentes para estes e outros métodos para detectar a apoptose acham-se comercialmente disponíveis.

Em geral, os agentes candidatos podem ser identificados de grandes bibliotecas de produtos naturais ou extratos sintéticos (ou semi-sintéticos) ou bibliotecas químicas de acordo com métodos conhecidos na técnica. Aqueles habilitados no campo da descoberta e desenvolvimento de medicamentos entenderão que a fonte precisa dos extratos ou compostos de teste não é crítica para o(s) procedimento(s) de triagem da invenção. Conseqüentemente, virtualmente qualquer número de peptídeos, extratos químicos ou compostos pode ser examinado com o uso dos métodos de exemplo aqui descritos. Exemplos de tais peptídeos, extratos ou compostos incluem, sem limitar, os extratos à base de plantas, fúngicos, procarióticos ou de animais, caldos de fermentação, e compostos sintéticos, bem como a modificação dos compostos existentes. Numerosos métodos se acham também disponíveis para gerar a síntese aleatória ou dirigida (por exemplo, semi-síntese ou síntese total) de qualquer número de compostos químicos, incluindo, mas sem limitar, os compostos à base de sacarídeos, lipídeos, peptídeos, polipeptídeos e ácidos nucleicos. As bibliotecas de compostos sintéticos são comercialmente disponíveis, por exemplo, da Brandon Associates (Merrimack, NH) e Aldrich Chemical (Milwaukee, WI). Alternativamente, as bibliotecas de compostos naturais na forma de extratos bacterianos, fúngicos, de plantas e de animais, acham-se comercialmente disponíveis de várias fontes, incluindo Biotics (Sussex, Reino Unido), Xenova (Slough, Reino Unido), Harbor Branch Oceanographics Institute (Ft. Pierce, Fla.), e PharmaMar, U.S.A. (Cambridge, Mass.). Além disso, as bibliotecas naturais e sinteticamente produzidas são produzidas, se desejável, de acordo com métodos conhecidos na técnica, por exemplo por métodos padrão de extração e de fracionamento. Além disso, se desejável, qualquer biblioteca ou composto é facilmente modificado com o uso de métodos padrão químicos, físicos ou bioquímicos. Além disso, aqueles habilitados na técnica da descoberta e desenvolvimento de medicamentos facilmente entenderão que

os métodos para desreplicação (por exemplo, a desreplicação taxonômica, a desreplicação biológica e a desreplicação química, ou qualquer combinação destas) ou eliminação dos replicados ou de repetições de materiais já conhecidos quanto ao seu efeito sobre uma atividade da proteína contendo CARD, devem ser empregados quando quer que seja possível.

Quando um extrato bruto seja observado ter uma atividade desejada, outro fracionamento do extrato de derivação positiva é necessário para isolar os constituintes químicos responsáveis pelo efeito observado. Assim, o objetivo do processo de extração, fracionamento e purificação é a caracterização e identificação cuidadosas de uma entidade química dentro do extrato bruto tendo uma atividade que estimule ou iniba uma atividade da proteína contendo CARD. Os mesmos ensaios aqui descritos para a detecção das atividades nas misturas dos compostos podem se usados para purificar o componente ativo e testar seus derivados. Os métodos de fracionamento e purificação de tais extratos heterogêneos são conhecidos na técnica. Se desejável, os compostos mostrados como sendo agentes úteis para tratamento são quimicamente modificados de acordo com métodos conhecidos na técnica. Os compostos identificados como sendo de valor terapêutico podem ser subsequenteemente analisados com o uso de modelos de animais para doenças ou condições em que seja desejável regular ou imitar uma atividade da proteína contendo CARD.

É fornecido um método de monitorar a resistência a um agonista do receptor da morte em um indivíduo, compreendendo adquirir uma amostra biológica do indivíduo e detectar a associação de uma proteína contendo CARD com um receptor da morte na amostra, a associação indicando resistência. Como descrito acima, o nível de associação pode ser comparado com um nível de controle.

Como ilustração, o presente método pode compreender o isolamento de uma amostra biológica de um indivíduo, em que o indivíduo

tenha sido tratado com um anticorpo anti-DR5 terapêutico (por exemplo, TRA-8), isolando-se a proteína da amostra biológica, imunoprecipitando-se a proteína de DR5, separando-se DR5 por eletroforese em SDS-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (condições redutoras ou não redutoras), transferindo a proteína separada para uma membrana de nitrocelulose, e usando-se anticorpos a DDX3 e as técnicas padrão de Western blot para detectar DDX3 associado com DR5, em que a associação seja evidência da resistência ao TRA-8 nessa célula.

É fornecido um método de monitorar a resistência a um agonista do receptor da morte em um indivíduo, compreendendo adquirir uma amostra biológica do indivíduo e detectar a associação de uma caspase ou modulador da caspase com uma proteína contendo CARD na amostra, a associação indicando resistência.

Como uma ilustração, o presente método pode compreender o isolamento de uma amostra biológica de um indivíduo em tratamento com um anticorpo anti-DR5 terapêutico (por exemplo, TRA-8), isolando-se a proteína da amostra biológica, imunoprecipitando-se a proteína de DDX-3, separando-se DDX-3 por eletroforese em SDS-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (condições redutoras ou não redutoras), transferindo a proteína separada para uma membrana de nitrocelulose, e usando-se as técnicas padrão de Western blot para detectar as caspases (por exemplo, a caspase 1, caspase-2, caspase-4, caspase-5) e IAPs (por exemplo, cIAP1, cIAP2, XIAP, survivina) associadas com DDX3, em que a detecção de cIAP1 com DDX3, por exemplo, seja evidência da resistência ao TRA-8 naquela célula.

É fornecido um método de monitorar a resistência ao agonista do receptor da morte em um indivíduo, compreendendo adquirir uma amostra biológica do indivíduo e detectar a fosforilação do DDX3. Os métodos para detectar a fosforilação das proteínas são bem conhecidos na técnica e incluem o uso de anticorpos, incluindo, por exemplo, a anti-Fosfoserina (Chemicon®)

AB 1603), anti-Fosfotreonina (Chemicon® AB 1607) e anti-Fosfotirosina (Chemicon® AB1599). Os anticorpos específicos do sítio podem também ser gerados específicos para a forma fosforilada do DDX-3. Os métodos de gerar e usar referidos anticorpos são bem conhecidos na técnica.

- 5 É fornecido um método de induzir seletivamente a apoptose em uma célula alvo expressando um receptor da morte, compreendendo as etapas de colocar em contato a célula alvo com uma quantidade terapêutica de um agonista do receptor da morte, que especificamente se ligue ao receptor da morte, e administrar à célula alvo uma quantidade terapêutica de um
10 modulador de uma ou mais atividades de uma proteína contendo CARD.

- A capacidade de um agonista e um modulador da proteína contendo CARD, de induzir a apoptose, pode ser confirmada pela cultura de células tais como a linhagem Jurkat de células da leucemia humana (American Type Culture nº TIB-152) e a linhagem celular de astrocitomas
15 1321N1 em meio em que a amostra de teste tenha sido adicionada. O índice de sobrevivência pode ser determinado, por exemplo, pelo uso de um ensaio de ATPLITE.

- Os métodos e composições aqui fornecidos podem ser usados no tratamento de doenças associadas com a sobrevivência ou proliferação não
20 apropriadas das células, incluindo aquelas atribuíveis à desregulação dos sistemas de apoptose no câncer ou em doenças inflamatórias e autoimunes. As doenças inflamatórias e autoimunes ilustrativamente incluem o lúpus eritematoso sistêmico, a doença de Hashimoto, a artrite reumatóide, a doença enxerto-versus-hospedeiro, a síndrome de Sjögren, a anemia perniciosa, a
25 doença de Addison, esclerodermia, síndrome de Goodpasture, doença de Crohn, anemia hemolítica autoimune, esterilidade, miastenia grave, esclerose múltipla, doença de Basedow, trombopenia púrpura, diabete melito insulino-dependente, alergia, asma, doença atópica, arteriosclerose, miocardite, cardiomiopatia, nefrite glomerular, anemia hipoplástica, rejeição após o

transplante de órgãos. Os cânceres incluem numerosas malignidades dos pulmões, da próstata, do fígado, dos ovários, do cólon, cervix, tecidos linfáticos e das mamas. Assim, as composições e métodos fornecidos podem ainda ser usados para alvejar e seletivamente induzir a apoptose nas células imunes ativadas, incluindo os linfócitos ativados, as células linfóides, as células mielóides e as células sinoviais reumatóides (incluindo sinoviócitos inflamatórios, sinoviócitos semelhantes a macrófago, sinoviócitos semelhantes a fibroblasto) e nas células viralmente infectadas (incluindo aquelas infectadas com o HIV), por exemplo), contanto que aquelas células alvejadas expressem ou possam ser produzidas para expressar os receptores da morte específicos (isto é, DR4 ou DR5).

É fornecido um método de tratamento de um indivíduo com câncer ou com uma doença autoimune ou inflamatória, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade terapêutica de um agonista do receptor da morte e um modulador de uma ou mais atividades de uma proteína contendo CARD, em que o modulador reduz a resistência ao agonista do receptor da morte.

Como usada na totalidade deste relatório, uma “quantidade terapêutica” de um agonista do receptor da morte e/ou modulador da proteína contendo CARD, é a quantidade suficiente para causar a apoptose na célula alvo. Como aqui usados, as expressões “quantidade terapêutica” e “quantidade farmacologicamente eficaz” são sinônimas. Uma pessoa de experiência na técnica pode facilmente determinar a quantidade terapêutica apropriada.

No tratamento da doença, por exemplo câncer, doenças autoimunes e inflamatórias, as combinações de tratamento podem também ser usadas. Por exemplo, os agonistas e moduladores da proteína contendo CARD dos métodos e composições fornecidas, podem ser administrados em combinação com outros agentes terapêuticos. Como aqui usado, um “agente terapêutico” é um composto ou composição eficazes em melhorar uma

condição patológica. A radioterapia pode também ser combinada com ou sem outros agentes terapêuticos. Uma pessoa habilitada na técnica deve adaptar a forma de radioterapia à doença.

Exemplos de agentes terapêuticos incluem os agentes quimioterápicos, agentes antiinflamatórios, Medicamento Anti-Reumático Modificador da Doença (DMARDs), anticorpos, membros da família do TNF, agentes antivirais, agentes anti-oportunistas, antibióticos, imunossuppressores, imunoglobulinas, agentes antimaláricos, agentes da artrite anti-reumatóide, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, e compostos anticâncer. Um composto anticâncer é um composto ou composição eficazes na inibição ou retenção do desenvolvimento de uma célula de crescimento anormal. Exemplos ilustrativos de compostos anticâncer incluem: bleomicina, carboplatina, clorambucil, cisplatina, colquicina, ciclofosfamida, daunorrubicina, dactinomicina, dietilestilbestrol, doxorubicina, etoposide, 5-fluorouracil, floxuridina, melfalan, metotrexato, mitomicina, 6-mercaptopurina, teniposide, 6-tioguanina, vincristina e vinblastina. Outros exemplos de compostos e agentes terapêuticos anticâncer são encontrados no *The Merck Manual of Diagnosis e Therapy*, 15^a Edição, Berkow *et al.*, eds., 1987, Rahway, N. J. e Sladek *et al. Metabolism and Action of Anti-Cancer Drugs*, 1987, Powis *et al.* eds., Taylor e Francis, New York, N.Y.

O inibidor de PKC, a bisindolilmaleimida VIII (BisVIII), facilita muito a apoptose mediada por Fas (Zhou, T. *et al.* 1999. *Nat Med* 5: 42-48). Foi observado que essa ativação sinérgica via de JNK/p38 desempenha um importante papel (Ohtsuka, T. e T. Zhou. 2002. *J Biol Chem* 277: 29294-29303), e que a intensificação da apoptose mediada pelo DR5 por três agentes quimioterápicos comuns parece ocorrer através de um mecanismo semelhante (Ohtsuka, T., D. *et al.* 2003. *Oncogene* 22: 2034-2044). Assim, os métodos fornecidos podem ainda compreender o uso de compostos indutores da apoptose, tais como o bisindolilmaleimida VIII (BisVIII) ou outros agentes

sensibilizantes como o SN-50 ou o LY294002. Assim, os agonistas e os moduladores da proteína contendo CARD dos métodos e composições fornecidas podem ser combinados com BisVIII. Os agonistas e moduladores da proteína contendo CARD dos métodos e composições fornecidas podem
5 ainda ser combinados com uma droga antiinflamatória não esteróide (NSAID) (por exemplo, o sulfeto de sulindaco ou outros inibidores de COX-1 ou COX-2).

A terapia usando os agonistas dos métodos e composições fornecidas também podem ser combinada com a terapia usando outros
10 agonistas. Por exemplo, um anticorpo para DR5 pode ser administrado a um indivíduo em sua necessidade junto, antes ou em seguida à administração de um anticorpo ao DR4. Tal terapia de anticorpos combinados pode ser ainda combinada com a administração de um ou mais dos moduladores da proteína contendo CARD aqui fornecida, e pode ainda ser combinada com outros
15 agentes terapêuticos.

É fornecida uma composição compreendendo um agonista do receptor da morte e um agente que module uma ou mais atividades de uma proteína contendo CARD, em que o modulador reduza a resistência ao agonista do receptor da morte. A composição fornecida pode compreender
20 ainda um agente terapêutico selecionado do grupo consistindo em um agente quimioterápico, um membro da família do TNF, um agente antiviral, agentes antiinflamatórios, agentes anti-oportunistas, antibióticos, imunossuppressores, imunoglobulinas, agentes antimaláricos, agentes da artrite anti-reumatóides, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento.

Os termos “proteína”, “peptídeo”, “polipeptídeo” ou “porção peptídica” são usados intercambiavelmente neste relatório e são aqui usados
25 para significar dois ou mais aminoácidos ligados por uma ligação peptídica. O termo “fragmento” é aqui usado para referir-se a uma porção de um polipeptídeo ou proteína de comprimento completo, tal porção podendo ser

produzida por uma reação proteolítica sobre um polipeptídeo, isto é, um peptídeo produzido após a clivagem de uma ligação peptídica no polipeptídeo. Deve ser reconhecido que o fragmento não precisa necessariamente ser produzido por uma reação proteolítica, mas pode ser produzido com o uso de métodos de síntese química ou métodos da tecnologia de DNA recombinante, para produzir um polipeptídeo sintético. Deve ser reconhecido que os termos “proteína” e “polipeptídeo” não são aqui usados para sugerir um tamanho ou número particular de aminoácidos compreendendo a molécula, e que um peptídeo da invenção pode conter até vários resíduos de aminoácido ou mais.

Por “isolado” ou “purificado” denota-se uma composição (por exemplo, um polipeptídeo ou ácido nucleico) que seja substancialmente livre de outros materiais, incluindo materiais com os quais a composição esteja normalmente associada por natureza. Os polipeptídeos da invenção, ou seus fragmentos, podem ser obtidos, por exemplo, por extração de uma fonte natural (por exemplo, fago), por expressão de um ácido nucleico recombinante codificando o polipeptídeo (por exemplo, em uma célula ou em um sistema de translação livre de células) ou quimicamente sintetizando o polipeptídeo. Além disso, os fragmentos de polipeptídeo podem ser obtidos por qualquer destes métodos, ou por clivagem dos polipeptídeos de comprimento completo. Um fragmento de uma proteína ou polipeptídeo de referência inclui apenas aminoácidos contíguos da proteína/polipeptídeo de referência, e é pelo menos um aminoácido mais curto do que a sequência de referência.

Quando as proteínas específicas são referidas neste relatório, as variantes, derivados e fragmentos são considerados. As variantes e derivados protéicos são bem entendidos por aqueles de experiência na técnica e podem envolver as modificações das sequências de aminoácidos. Por exemplo, as modificações das sequências de aminoácidos tipicamente se

situam dentro de uma ou mais de três classes: variantes substitutivas, de inserção ou de deleção. As inserções incluem fusões terminais de amino e/ou carboxila, bem como inserções entre seqüências de resíduos únicos ou múltiplos de aminoácidos. As inserções ordinariamente serão inserções

5 menores do que aquelas das fusões terminais amino ou carboxila, por exemplo, da ordem de um a quatro resíduos. As deleções são caracterizadas pela remoção de um ou mais resíduos de aminoácidos da seqüência de proteínas. Tipicamente, não mais do que cerca de 2 a 6 resíduos são deletados em qualquer um sítio dentro da molécula protéica, mas a deleção pode variar

10 de 1 a 30 resíduos. Estas variantes ordinariamente são preparadas por mutagênese específica do sítio dos nucleotídeos no DNA codificando a proteína, desse modo produzindo DNA codificando a variante, e depois disso expressando o DNA na cultura celular recombinante. As técnicas para produzir mutações de substituição nos sítios predeterminados no DNA tendo

15 uma seqüência conhecida são bem conhecidas e incluem, por exemplo, a mutagênese do iniciador M13 e a mutagênese de PCR. As substituições de aminoácidos são tipicamente de resíduos únicos, mas podem ocorrer em várias localizações diferentes ao mesmo tempo; as inserções usualmente serão da ordem de cerca de 1 a 10 resíduos de aminoácidos. As deleções ou

20 inserções preferivelmente são feitas em pares adjacentes, isto é, uma deleção de 2 resíduos ou inserção de 2 resíduos. As substituições, deleções, inserções ou qualquer combinação destas podem ser combinadas para se chegar a uma construção final. As mutações não devem colocar a seqüência fora da matriz de leitura e, preferivelmente, não criarão regiões complementares que possam

25 produzir estrutura de mRNA secundária, a menos que uma tal mudança na estrutura secundária do mRNA seja desejada. Variantes substitutivas são aquelas em que pelo menos um resíduo tenha sido removido e um diferente resíduo tenha sido introduzido em seu lugar. Tais substituições geralmente feitas de acordo com a Tabela 1 a seguir são referidas como substituições

conservativas.

TABELA 1
SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS

<u>Resíduo Original</u>	<u>Exemplos de Substituições</u>
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Pro	Gly
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

As mudanças substanciais na função ou na identidade imunológica são feitas mediante substituições de seleção que sejam menos conservativas do que aquelas da Tabela 1, isto é, resíduos de seleção que difiram mais significativamente em seu efeito em manter (a) a estrutura da cadeia principal do polipeptídeo na área da substituição, por exemplo como uma folha ou conformação helicoidal, (b) a carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio alvo ou (c) a massa da cadeia lateral. As substituições que em geral se espera produzam as maiores mudanças nas propriedades das proteínas, serão aquelas em que (a) um resíduo hidrofílico, por exemplo seril ou treonil, substitui (ou é substituído por) um resíduo hidrofóbico, por exemplo leucil, isoleucil, fenilalanil, valil ou alanil; (b) uma cisteína ou prolina substitui (ou é substituída por) qualquer outro resíduo; (c) um resíduo tendo uma cadeia lateral eletropositiva, por exemplo lisil, arginil ou histidil, substitui (ou é substituído por) um resíduo eletronegativo, por exemplo

glutamil ou aspartil; ou (d) um resíduo tendo uma cadeia lateral de massa, por exemplo fenilalanina, substitui (ou é substituído por) um não tendo uma cadeia lateral, por exemplo glicina, e (e) pelo aumento do número de sítios para sulfatação e/ou glicosilação.

5 Por exemplo, a substituição de um resíduo de aminoácido por outro que seja biológica e/ou quimicamente semelhante é conhecida das pessoas habilitadas na técnica como uma substituição conservativa. Por exemplo, uma substituição conservativa deve substituir um resíduo hidrofóbico por outro, ou um resíduo polar por outro. As substituições
10 incluem as combinações apresentadas na Tabela 1. As variações conservativamente substituídas de cada sequência explicitamente apresentada, são incluídas dentro dos polipeptídeos aqui fornecidos.

Tipicamente, as substituições conservativas têm pouco ou nenhum impacto sobre a atividade biológica de um polipeptídeo resultante.
15 Em um exemplo particular, uma substituição conservativa é uma substituição de aminoácido em um peptídeo que não afete substancialmente a função biológica do peptídeo. Um peptídeo pode incluir uma ou mais substituições de aminoácido, por exemplo de 2 a 10 substituições conservativas, de 2 a 5 substituições conservativas, de 4 a 9 substituições conservativas, tal como 2, 5
20 ou 10 substituições conservativas.

Um polipeptídeo pode ser produzido de modo a conter uma ou mais substituições conservativas mediante a manipulação da sequência de nucleotídeos que codifica esse polipeptídeo com o uso, por exemplo, de procedimentos padrão tais como a mutagênese dirigida ao sítio ou PCR.
25 Alternativamente, um polipeptídeo pode ser produzido de modo a conter uma ou mais substituições conservativas mediante o uso de métodos padrão de síntese de peptídeos. Uma varredura da alanina pode ser usada para identificar quais resíduos de aminoácidos em uma proteína pode tolerar uma substituição de aminoácido. Em um exemplo, a atividade biológica da proteína não é

reduzida em mais do que 25 %, por exemplo não mais do que 20 %, por exemplo não mais do que 10 %, quando a alanina, ou outro aminoácido conservativo (tal como aqueles listados abaixo), substitui um ou mais aminoácidos nativos.

5 Informações adicionais acerca das substituições conservativas podem ser encontradas, entre outros, em Ben-Bassat *et al.*, (*J. Bacteriol.* 169: 751-757, 1987), O'Regan *et al.*, (*Gene* 77: 237-251, 1989), Sahin-Toth *et al.*, (*Protein Sci.* 3: 240-247, 1994), Hochuli *et al.*, (*Bio/Technology* 6: 1321-1325, 1988) e nos livros de texto padrão de genética e biologia molecular.

10 A mutagênese substitutiva ou por deleção pode ser empregada para introduzir sítios para a N-glicosilação (Asn-X-Thr/Ser) ou O-glicosilação (Ser ou Thr). As deleções da cisteína ou de outros resíduos lábeis também podem ser desejáveis. As deleções ou substituições dos sítios de proteólise potencial, por exemplo Arg, são realizadas, por exemplo, pela deleção de um
15 dos resíduos básicos ou substituindo-se um deles por resíduos de glutaminil ou histidil.

Certas derivações pós-translacionais são o resultado da ação de células hospedeiras recombinantes sobre o polipeptídeo expresso. Os resíduos de glutaminil e de asparaginil são com freqüência pós-translacionalmente
20 desamidados nos resíduos correspondentes de glutamil e asparil. Alternativamente, estes resíduos são desamidados sob condições brandamente acídicas. Outras modificações pós-translacionais incluem a hidroxilação da prolina e da lisina, a fosforilação dos grupos hidroxila dos resíduos seril ou treonil, a metilação dos grupos o-amino das cadeias laterais da lisina, arginina
25 e histidina [T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco pp 79-86 (1983)], a acetilação da amina N-terminal e, em alguns casos, a amidação da carboxila C-terminal.

Entende-se que existem numerosos análogos de aminoácido e de peptídeo que podem ser incorporados nas composições apresentadas. Por

exemplo, existem numerosos aminoácidos D ou aminoácidos que têm um substituinte funcional diferente dos aminoácidos apresentados na Tabela 1. Os estereoisômeros opostos dos peptídeos de ocorrência natural são apresentados, assim como os estereoisômeros dos análogos peptídicos. Estes aminoácidos podem ser facilmente incorporados nas cadeias de polipeptídeos mediante a carga de moléculas de tRNA com o aminoácido de escolha e engendrando-se construções genéticas que utilizem, por exemplo, códons de âmbar, para introduzir o aminoácido análogo em uma cadeia de peptídeos em uma meio específico do sítio [Thorson *et al.*, *Methods in Molec. Biol.* 77: 43-73 (1991), Zoller, *Current Opinion in Biotechnology*, 3: 348-354 (1992); Ibba, *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 13: 197-216 (1995), Cahill *et al.*, *TIBS*, 14(10): 400-403 (1989); Benner, *TIB Tech*, 12: 158-163 (1994); Ibba e Hennecke, *Bio/technology*, 12: 678-682 (1994), todos os quais sendo aqui incorporados como referência pelo menos quando ao material relacionado aos análogos de aminoácidos].

Podem ser produzidas moléculas que se assemelhem aos polipeptídeos, porém que não sejam conectados através de uma articulação peptídica natural. Por exemplo, as articulações quanto aos aminoácidos ou aos análogos de aminoácidos podem incluir --CH₂NH--, --CH₂S--, --CH₂--CH₂--, --CH=CH-- (cis e trans), --COCH₂--, --CH(OH)CH₂-- e --CHH₂SO-- (Estas e outras podem ser encontradas em Spatola, A. F. em *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983); Spatola, A. F., Vega Data (Março de 1983), Vol. 1, Tiragem 3, *Peptide Backbone Modifications (general review)*; Morley, *Trends Pharm Sci* (1980) pp. 463-468; Hudson, D. *et al.*, *Int J Pept Prot Res* 14: 177-185 (1979) (--CH₂NH--, CH₂CH₂--); Spatola *et al.* *Life Sci* 38: 1243-1249 (1986) (--CHH₂--S); Hann J. *Chem. Soc Perkin Trans.* 1307-1314 (1982) (--CH--CH--, cis e trans); Almquist *et al.* *J. Med. Chem.* 23: 1392-1398 (1980) (--COCH₂--); Jennings-White *et al.* *Tetrahedron Lett*

23: 2533 (1982) (--COCH₂--); Szelke *et al.* Pedido Europeu, EP 45665 CA (1982): 97: 39405 (1982) (--CH(OH)CH₂--); Holladay *et al.* *Tetrahedron. Lett* 24: 4401-4404 (1983) (--C(OH)CH₂--); e Hruby *Life Sci* 31: 189-199 (1982) (--CH₂--S--); cada um dos quais sendo aqui incorporado como referência.

- 5 Uma articulação não peptídica particularmente preferida sendo --CH₂NH--. Fica entendido que os análogos peptídicos podem ter mais do que um átomo entre os átomos de ligação, tais como b-alanina, ácido g-aminobutírico, e outros.

- Os análogos de aminoácidos e análogos e análogos de peptídeo
- 10 freqüentemente têm propriedades intensificadas ou desejáveis, tais como a produção mais econômica, maior estabilidade química, propriedades farmacológicas intensificadas (meia-vida, absorção, potência, eficácia etc.), especificidade alterada (por exemplo, um amplo espectro de atividades biológicas), antigenicidade reduzida, e outras. Os aminoácidos D podem ser
- 15 usados para gerar peptídeos mais estáveis, porque os aminoácidos D não são reconhecidos pelas peptidases etc. A substituição sistemática de um ou mais aminoácidos de uma seqüência de consenso com um aminoácido D do mesmo tipo (por exemplo, a lisina D no lugar da lisina L) pode ser usada para gerar peptídeos mais estáveis. Os resíduos de cisteína podem ser usados para
- 20 ciclizar ou ligar dois ou mais peptídeos entre si. Isto pode ser benéfico para sujeitar os peptídeos a conformações particulares. (Rizo e Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61: 387 (1992), aqui incorporado como referência).

- É entendido que uma maneira de definir qualquer variantes, modificações ou derivados dos genes e proteínas apresentadas neste relatório
- 25 é através da definição das variantes, modificação e derivados em termos de homologia a seqüências específicas conhecidas. Especificamente apresentadas são as variantes dos ácidos nucleicos e polipeptídeos aqui apresentados, os quais têm 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 por cento de homologia com a

seqüência estabelecida ou conhecida. Aqueles de experiência na técnica facilmente entendem como determinar a homologia de duas proteínas ou ácidos nucleicos. Por exemplo, a homologia pode ser calculada após o alinhamento das duas seqüências, de modo que ela esteja em seu nível mais elevado.

Outro meio de calcular a homologia pode ser realizado pelos algoritmos publicados. O alinhamento ótimo das seqüências para comparação pode ser conduzido pelo algoritmo de homologia local de Smith e Waterman *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), pelo algoritmo de alinhamento da homologia de Needleman e Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), pela pesquisa quanto ao método de similaridade de Pearson e Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2444 (1988), pelas implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Pacote de Programas de Genética Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), ou por inspeção. Estas referências são aqui incorporadas como referência em sua totalidade quanto aos métodos de calcular a homologia.

Os mesmos tipos de homologia podem ser obtidos para os ácidos nucleicos mediante, por exemplo, os algoritmos apresentados em Zuker, M. *Science* 244: 48-52, 1989, Jaeger *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7706-7710, 1989, Jaeger *et al. Methods Enzymol.* 183: 281-306, 1989, os quais são aqui incorporados como referência pelo menos quanto ao material relacionado ao alinhamento do ácido nucleico.

As composições fornecidas podem ser administradas pelas vias oral, retal, intracisternal, intraventricular, intracraniana, intra-articular, intravaginal, parenteral (intravenosa, intramuscular ou subcutânea), local (pós, ungüentos ou gotas), por injeção intraperitoneal, transdérmica, por inalação ou como uma pulverização bucal ou nasal. A quantidade exata do anticorpo ou agente terapêutico necessária variará de indivíduo para indivíduo, dependendo da idade, do peso e das condições gerais do indivíduo,

da severidade da doença que esteja sendo tratada, da localização e do tamanho do tumor, dos compostos particulares usados, do modo de administração, etc. Uma quantidade apropriada pode ser determinada por uma pessoa de experiência normal na técnica com o uso apenas da experimentação de rotina

5 dada nos preceitos deste relatório. As dosagens únicas típicas do anticorpo variam de 0,1 a 10.000 microgramas, preferível entre 1 e 100 microgramas. As concentrações típicas dos anticorpos em um carreador varia de 0,2 a 2000 nanogramas por mililitro liberado. Para injeção em uma articulação, os

10 volumes de anticorpo e carreador variarão dependendo da articulação, mas aproximadamente 0,5 a 10 ml e, de preferência, 1 a 5 ml, são injetados em um joelho humano e aproximadamente 0,1 a 5 ml, e preferivelmente 1 a 2 ml, no tornozelo humano.

A composição ainda pode compreender um carreador farmacêuticamente aceitável. Por “farmacêuticamente aceitável” denota-se

15 um material que não seja biologicamente ou de outra forma indesejável, o qual possa ser administrado a um indivíduo junto com o substrato selecionado sem causar efeitos biológicos significativos indesejáveis ou interagir de uma maneira deletéria com qualquer um dos outros componentes da composição farmacêutica em que ele esteja contido.

20 Dependendo do modo de administração pretendido, o anticorpo ou agente terapêutico pode estar em composições farmacêuticas nas formas de dosagem sólida, semi-sólida ou líquida, tais como, por exemplo, tabletes, supositórios, pílulas, cápsulas, pós, líquidos ou suspensões, preferivelmente na forma de dosagem unitária adequada para administração

25 única de uma dosagem precisa. As composições incluirão uma quantidade eficaz do substrato selecionado, em combinação com um carreador farmacêuticamente aceitável e, além disso, podem incluir outros agentes medicinais, agentes farmacêuticos, carreadores ou diluentes. Composições adequadas para injeção parenteral podem compreender soluções aquosas ou

não aquosas estéreis fisiologicamente aceitáveis, dispersões, suspensões ou emulsões, e pós estéreis para reconstituição em soluções ou dispersões injetáveis estéreis. Exemplos de carreadores aquosos e não aquosos adequados, diluentes, solventes ou veículos incluem água, etanol, polióis (propileno glicol, polietileno glicol, glicerol e outros), misturas adequadas destes, óleos vegetais (tais como o azeite) e ésteres orgânicos injetáveis, tais como o oleato de etila. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como a lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso das dispersões, e pelo uso de tensoativos.

Estas composições também podem conter adjuvantes tais como agentes preservativos, umectantes, emulsificantes, e de dispensação. A prevenção da ação dos microorganismos pode ser garantida por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, e outros. Pode também ser desejável incluir agentes isotônicos, por exemplo açúcares, cloreto de sódio e outros. A absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser causada pelo uso de agentes de absorção retardada, por exemplo o monoestearato de alumínio e a gelatina.

As formas de dosagem sólida para administração oral incluem as cápsulas, tabletes, pílulas, pós e grânulos. Em tais formas de dosagem sólida, o composto ativo é misturado com pelo menos um excipiente (ou carreador) costumeiro inerte, tal como o citrato de sódio ou o fosfato dicálcico ou (a) enchedores ou extensores, como, por exemplo, amidos, lactose, sacarose, glicose, manitol e ácido salicílico, (b) aglutinantes, como, por exemplo, carboximetilcelulose, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarose e acácia, (c) umectantes como, por exemplo, glicerol, (d) agentes desintegrantes, como, por exemplo, ágar-ágar, carbonato de cálcio, fécula de batata ou de mandioca, ácido algínico, certos silicatos complexos, e carbonato de sódio, (e) retardadores de solução, como, por exemplo, a parafina, (f) aceleradores da absorção, como, por exemplo, os compostos de amônio

quaternário, (g) agentes umectantes, como, por exemplo, o álcool cetílico e o monoestearato de glicerol, (h) adsorventes, como, por exemplo, o caulim e a bentonita, e (i) lubrificantes, como, por exemplo, talco, estearato de cálcio, estearato de magnésio, polietilenos glicóis sólidos, lauril sulfato de sódio, ou misturas destes. No caso de cápsulas, tabletes e pílulas, as formas de dosagem podem também compreender agentes de tamponamento.

As composições sólidas de um tipo semelhante também podem ser empregadas como enchedores em cápsulas de gelatina enchidas macias e duras com o uso de excipientes tais como lactose ou açúcar lácteo, bem como polietilenoglicóis de elevado peso molecular, e outros.

As formas sólidas de dosagem, tais como tabletes, drágeas, cápsulas, pílulas e grânulos, podem ser preparadas com revestimentos e cascas, tais como revestimentos entéricos e outros bem conhecidos na técnica. Elas podem conter agentes opacificadores, e podem também ser de composição tal que elas liberem o composto ou compostos ativos em uma certa parte do trato intestinal, de uma maneira retardada. Exemplos de composições de inclusão que podem ser usadas são as substâncias poliméricas e as ceras. Os compostos ativos podem também estar na forma micro-encapsulada, se apropriado, com um ou mais dos excipientes acima mencionados.

As formas de dosagem líquidas para administração oral incluem as emulsões, soluções, suspensões, xaropes e elixires farmacologicamente aceitáveis. Além dos compostos ativos, as formas de dosagem líquidas podem conter diluentes inertes comumente usados na técnica, tais como água ou outros solventes, agentes solubilizantes, e emulsificantes; como, por exemplo, o álcool etílico, álcool isopropílico, carbonato de etila, acetato de etila, álcool benzílico, benzoato de benzila, propileno glicol, 1,3-butileno glicol, dimetilformamida, óleos, em particular o óleo de semente de algodão, óleo de amendoim, óleo de germe de milho, óleo

de oliva, óleo de mamona e óleo de sésamo, glicerol, álcool tetraidrofurfurílico, polietileno glicóis e ésteres de ácidos graxos de sorbitano, ou misturas destas substâncias, etc.

5 Além de tais diluentes inertes, a composição também pode incluir adjuvantes, tais como os agentes umectantes, agentes emulsificantes e de suspensão, edulcorantes, aromatizantes e agentes de fragrância.

10 As suspensões, além dos compostos ativos, podem conter agentes de suspensão, como, por exemplo, os álcoois isoestearílicos etoxilados, polioxietileno sorbitol e os ésteres de sorbitano, a celulose microcristalina, metaidróxido de alumínio, bentonita, ágar-ágar e tragacanto, ou misturas destas substâncias, etc.

15 As composições para administração retal são preferivelmente supositórios que podem ser preparados pela mistura dos compostos da presente invenção com excipientes ou carreadores não irritantes adequados, tais como a manteiga de cacau, o polietileno glicol ou uma cera de supositório, que sejam sólidos na temperatura comum, mas líquidos na temperatura do corpo e que, portanto, derretam no reto ou na cavidade vaginal e liberem o componente ativo.

20 As formas de dosagem para administração tópica de um composto desta invenção incluem ungüentos, pós, pulverizações e inalantes. O componente ativo é misturado sob condições estéreis com um carreador fisiologicamente aceitável e quaisquer preservativos, tampões ou propulsores, conforme possa ser necessário. As formulações oftálmicas, ungüentos, pós e soluções são também consideradas como situando-se dentro do escopo desta
25 invenção.

A expressão “sais, ésteres, amidas e pró-medicamentos farmaceuticamente aceitáveis” como aqui usada refere-se àqueles sais de carboxilato, sais de adição de aminoácidos, ésteres, amidas, e pró-medicamentos dos compostos da presente invenção, que se situam dentro do

escopo do julgamento médico idôneo, adequados para uso em contato com os tecidos dos indivíduos sem as indevidas toxicidade, irritação, resposta alérgica, etc., em ligação com uma relação razoável de benefício/ risco, e eficaz quando ao seu uso pretendido, bem como as formas zwitteriônicas, quando possível, dos compostos da invenção. O termo “sais” refere-se aos sais de adição de ácidos inorgânicos e orgânicos, relativamente não tóxicos, dos compostos da presente invenção. Estes sais podem ser preparados *in situ* durante o isolamento e a purificação finais dos compostos ou pela reação separada do composto purificado em sua forma de base livre com um ácido orgânico ou inorgânico adequado, e isolando-se o sal assim formado. Sais representativos incluem os sais bromídricos, clorídricos, de sulfato, bissulfato, nitrato, acetato, oxalato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartarato, naftilato, mesilato, glicoeptonato, lactobionato, metano sulfonato e laurilsulfonato, e outros. Estes podem incluir cátions com base nos metais alcalinos e alcalino-terrosos, tais como o sódio, lítio, potássio, cálcio, magnésio e outros, bem como cátions não tóxicos de amônio, amônio quaternário e amina, incluindo, porém sem limitar, amônio, tetrametilamônio, tetraetilamônio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina, e outros. (Ver, por exemplo, S. M. Barge *et al.*, “*Pharmaceutical Salts*,” *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66: 1-19, que é aqui incorporado como referência).

É fornecido um ácido nucleico isolado compreendendo RNA de filamento duplo (dsRNA) para uso na interferência do RNA (RNAi). O dsRNA pode ser RNA de interferência curta (siRNA) ou RNA tipo grampo de cabelo curto (shRNA). Assim, é fornecido um ácido nucleico isolado compreendendo um shRNA, em que o shRNA inibe a expressão de uma proteína contendo CARD. O shRNA pode ser codificado pela sequência de ácido nucleico SEQ ID NO: 10, 12, 14 ou 16.

Os ácidos nucleicos apresentados são compostos, por exemplo, de nucleotídeos, análogos de nucleotídeos ou substitutos de nucleotídeos. Exemplos não limitativos destas e de outras moléculas são examinados neste relatório. Entende-se, por exemplo, que, quando um vetor seja expresso em
5 uma célula, o mRNA expresso será tipicamente composto de A, C, G e U. Da mesma forma, entende-se, por exemplo, que, se uma molécula anti-sentido for introduzida em uma célula ou ambiente celular através, por exemplo, de liberação exógena, será vantajoso que a molécula anti-sentido seja composta de análogos de nucleotídeos que reduzam a degradação da molécula anti-
10 sentido no ambiente celular.

Por “ácido nucleico isolado” ou “ácido nucleico purificado” denota-se o DNA que é livre dos genes que, no genoma de ocorrência natural do organismo do qual o DNA da invenção seja derivado, flanqueiam o gene. A expressão, portanto, inclui, por exemplo, um DNA recombinante que é
15 incorporado em um vetor, tal como um plasmídeo ou vírus de replicação autônoma; ou incorporado em um DNA genômico de um procariota ou eucariota (por exemplo, um transgene); ou que existe como uma molécula separada (por exemplo, um cDNA ou um fragmento genômico ou de cDNA produzido por PCR, digestão de endonuclease de restrição, ou síntese química
20 ou *in vitro*). Também inclui um DNA recombinante que é parte de uma sequência de polipeptídeos adicional codificando um gene híbrido. A expressão “ácido nucleico isolado” também se refere a RNA, por exemplo uma molécula de mRNA, que é codificada por uma molécula de DNA, ou que é quimicamente sintetizada, ou que é separada ou substancialmente livre de
25 pelo menos alguns componentes celulares, por exemplo, outros tipos de moléculas de RNA ou moléculas de polipeptídeos.

É fornecido aqui um vetor compreendendo qualquer dos ácidos nucleicos fornecidos neste relatório, operavelmente ligado a uma sequência de controle de expressão. Promotores preferidos que controlam a

transcrição dos vetores nas células hospedeiras de mamíferos podem ser obtidos de várias fontes, por exemplo os genomas dos vírus, tais como: políoma, vírus símio 40 (SV40), adenovírus, retrovírus, vírus da hepatite B e o mais preferível o citomegalovírus, ou de promotores heterólogos de mamíferos, por exemplo o promotor da actina beta ou o promotor EF1, ou de promotores híbridos ou quiméricos (por exemplo o promotor citomegalovírus fundido ao promotor da actina beta). Os promotores prematuros e tardios do vírus SV40 são convenientemente obtidos como um fragmento de restrição de SV40, o qual também contém a origem viral de SV40 de replicação [Fiers *et al.*, *Nature*, 273: 113 (1978)]. O promotor prematuro imediato do citomegalovírus humano é convenientemente obtido como um fragmento de restrição HindIII E [Greenway, P. J. *et al.*, *Gene* 18: 355-360 (1982)]. Naturalmente, os promotores da célula hospedeira ou espécies relacionadas também são úteis neste relatório.

“Intensificador” geralmente se refere a uma sequência de DNA que funciona em nenhuma distância fixada do sítio de início da transcrição e pode ser ou 5’ [Laimins, L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 993 (1981)] ou 3’ [Lusky, M. L. *et al.*, *Mol. Cell Bio.* 3: 1108 (1983)] até a unidade de transcrição. Além disso, os intensificadores podem situar-se dentro de um íntron [Banerji, J. L. *et al.*, *Cell* 33: 729 (1983)] bem como dentro da própria sequência codificadora [Osborne, T. F. *et al.*, *Mol. Cell Bio* 4: 1293 (1984)]. Eles se situam, usualmente, entre 10 e 300 pares de base de comprimento, e eles funcionam em cis. Os intensificadores funcionam para aumentar a transcrição dos promotores próximos. Os intensificadores também freqüentemente contêm elementos de resposta que medeiam a regulação da transcrição. Os promotores podem também conter elementos de resposta que medeiam a regulação da transcrição. Os intensificadores freqüentemente determinam a regulação da expressão de um gene. Embora muitas seqüências intensificadoras sejam agora conhecidas dos genes de mamíferos (globina,

elastase, albumina, fetoproteína e insulina), tipicamente se usará um intensificador de um vírus de célula eucariótica para expressão geral. Exemplos preferidos são o intensificador de SV40 no lado tardio da origem de replicação (100 270 pares de base), o intensificador do promotor prematuro do citomegalovírus, o intensificador do poliovírus no lado tardio da origem de replicação, e os intensificadores de adenovírus.

O promotor e/ou o intensificador podem ser especificamente ativados ou pela luz ou por eventos químicos específicos que deflagram sua função. Os sistemas podem ser regulados por reagentes tais como a tetraciclina e a dexametasona, fatores de transcrição sintéticos, auto-clivagem de RNA dirigida (Yen, L. *et al.* 2004. *Nature* 431: 471-476), e outras abordagens. Existem também meios de intensificar a expressão de genes do vetor viral pela exposição à irradiação, tal como a irradiação gama, ou alquilação das drogas de quimioterapia.

O promotor e/ou a região intensificadora podem atuar como um promotor constitutivo e/ou intensificador para maximizar a expressão da região da unidade de transcrição a ser transcrita. Em certas construções, o promotor e/ou a região intensificadora podem ser ativos em todos os tipos de célula eucariótica, mesmo que ela seja apenas expressa em um tipo particular de célula em um tempo particular. Um promotor preferido deste tipo é o promotor de CMV(650 bases). Outros promotores preferidos são os promotores de SV40, o citomegalovírus (mais uma sequência de íntrons ligada), beta-actina, fator-1 de alongamento (EF-1) e vetor LTR retroviral.

Foi observado que todos os elementos reguladores específicos podem ser clonados e usados para construir vetores de expressão que sejam seletivamente expressos em tipos celulares específicos tais como as células de melanoma. O promotor da proteína acética fibrilar glial (GFAP) foi usado para expressar seletivamente genes nas células de origem glial (astrocítica). Os promotores HLA-DR, CD11c, Fascin e CD68 foram todos usados para

expressar seletivamente genes nas células apresentando antígenos, incluindo as células macrófagas e dendríticas (Brocker, T. *et al.* 1997. *J Exp Med* 185: 541-550; Gough, P. J. e Raines, E. W. 2003. *Blood* 101: 485-491; Cui, Y. *et al.* 2002. *Blood* 99: 399-408; Sudowe, S. *et al.* 2003. *Mol Ther* 8: 567-575), e
 5 elementos promotores dos genes específicos das células dendríticas (tais como CD83) podem também provar serem úteis a este respeito (Berchtold, S. *et al.* 2002. *Immunobiology* 205: 231-246).

Os vetores de expressão usados nas células hospedeiras eucarióticas (levedura, fungos, insetos, plantas, animais, humanas ou células
 10 nucleadas) podem também conter seqüências necessárias para o término da transcrição, a qual pode afetar a expressão do mRNA. Estas regiões são transcritas como segmentos poliadenilados na porção não transladada da proteína do fator tecidual codificando mRNA. As regiões não transladadas 3' também incluem os sítios de término da transcrição. É preferível que a
 15 unidade de transcrição também contenha uma região de poliadenilação. Um benefício desta região é que ela aumenta a probabilidade de que a unidade transcrita venha a ser processada e transportada como mRNA. A identificação e o uso dos sinais de poliadenilação nas construções de expressão são bem estabelecidos. É preferível que os sinais homólogos de poliadenilação sejam
 20 usados nas construções de transgenes. Em certas unidades de transcrição, a região de poliadenilação é derivada do sinal de poliadenilação prematuro de SV40 e consiste de cerca de 400 bases. É igualmente preferível que as unidades transcritas contenham outras seqüências padrão isoladas ou em combinação com a expressão de melhora das seqüência acima, ou
 25 estabilidade, da construção.

Os vetores virais podem incluir a seqüência de ácidos nucleicos codificando um produto marcador. Este produto marcador é usado para determinar se o gene foi liberado à célula e, uma vez liberado, esteja sendo expresso. Genes marcadores preferidos incluem o gene lacZ de *E. coli*,

o qual codifica a galactosidase β , a proteína fluorescente verde (GFP), e luciferase.

Em algumas formas de realização, o marcador pode ser um marcador selecionável. Exemplos de marcadores selecionáveis adequados para as células de mamíferos são a diidrofolato redutase (DHFR), a timidina quinase, neomicina, análogo G418 da neomicina, higromicina e puromicina. Quando tais marcadores selecionáveis são transferidos com sucesso para uma célula hospedeira de mamífero, a célula hospedeira de mamífero transformada pode sobreviver se colocada sob pressão seletiva. Existem duas categorias distintas amplamente usadas dos regimes seletivos. A primeira categoria baseia-se em um metabolismo de células e no uso de uma linhagem de células mutantes que careçam da capacidade de crescerem independentemente de um meio suplementado. Dois exemplos são: células de DHFR de CHO e células LTK de camundongos. Estas células carecem da capacidade de crescer sem a adição de nutrientes tais como a timidina ou a hipoxantina. Tendo em vista que estas células carecem de certos genes necessários para uma completa via de síntese de nucleotídeos, elas não podem sobreviver, a menos que os nucleotídeos faltantes sejam fornecidos em um meio suplementado. Uma alternativa para suplementar o meio é introduzir um gene DHFR ou TK intacto nas células carentes dos genes respectivos, assim alterando suas exigências de crescimento. As células individuais que não tenham sido transformadas com o gene DHFR ou TK não serão capazes de sobreviver em meios não suplementados.

A segunda categoria é a seleção dominante que se refere a um esquema de seleção usado em qualquer tipo de célula e não requer o uso de uma linhagem de células mutantes. Estes esquemas tipicamente usam uma droga de interrupção do crescimento de uma célula hospedeira. Essas células, que têm um novo gene, devem expressar uma proteína conduzindo à resistência da droga e sobreviver à seleção. Exemplos de tal seleção

dominante usam os medicamentos neomicina [Southern, P. e Berg, P., *J. Molec. Appl. Genet.* 1: 327 (1982)], ácido micofenólico, [Mulligan, R. C. e Berg, P. *Science* 209: 1422 (1980)] ou higromicina, [Sugden, B. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5: 410-413 (1985)]. Os três exemplos empregam genes bacterianos sob controle eucariótico para comunicar resistência ao medicamento G418 apropriado ou à neomicina (geneticina), xgpt (ácido micofenólico) ou higromicina, respectivamente. Outros incluem o análogo G418 da neomicina e a puromicina.

É fornecida uma célula compreendendo qualquer dos vetores aqui fornecidos. A célula apresentada pode ser qualquer célula usada para clonar ou propagar os vetores aqui fornecidos. Assim, a célula pode ser de qualquer cultura celular primária ou linhagem celular estabelecida. O tipo de célula pode ser selecionado por uma pessoa versada na técnica, com base na escolha do vetor e do uso desejado.

É fornecido um polipeptídeo isolado compreendendo a região de ligação da proteína contendo CARD de um receptor da morte, em que o polipeptídeo compreende menos do que 25 resíduos de aminoácidos.

Assim, o polipeptídeo fornecido pode ser a região de ligação da proteína contendo CARD do Receptor Fas (acesso nº gi: 119833). O polipeptídeo fornecido pode ser a região de ligação da proteína contendo CARD de um receptor de TRAIL. Assim, o polipeptídeo fornecido pode ser a região de ligação da proteína contendo CARD de DR4 (acesso nº gi: 21264525). O polipeptídeo fornecido pode ser a região de ligação da proteína contendo CARD de DR5 (acesso nº gi: 3721878). O polipeptídeo fornecido pode ser um fragmento da sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 22, em que o fragmento se liga a uma proteína contendo CARD aqui apresentada. Como um exemplo ilustrativo, o polipeptídeo fornecido pode compreender os aminoácidos 250 a 340 de DR5. Assim, o polipeptídeo pode compreender a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 23. O polipeptídeo pode ainda

compreender uma sequência de fragmento de aminoácido SEQ ID NO: 23, de tal modo que o fragmento seja capaz de ligar-se ao DDX3. Como um exemplo, o modulador pode ser um polipeptídeo compreendendo os aminoácidos 280 a 310 de DR5. Assim, o modulador pode compreender a

5 sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 24. Como outro exemplo, o modulador pode ser um polipeptídeo que compreenda os aminoácidos 300 a 330 de DR5. Assim, o modulador pode compreender a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 36. Por “ligar-se” denota-se que o polipeptídeo forma ligações não covalentes (por exemplo, ligações de hidrogênio) com a

10 proteína contendo CARD com suficiente afinidade que possa ser detectada com métodos bioquímicos padrão. Em um aspecto, o polipeptídeo fornecido se liga a uma proteína contendo CARD com uma afinidade igual ou maior do que o receptor da morte do qual ela seja derivada.

A região de ligação da proteína contendo CARD do receptor

15 da morte tem utilidade como um receptor solúvel para inibição competitiva da ligação da proteína contendo CARD. Assim, é fornecido um método de bloquear a ligação da proteína contendo CARD a um receptor da morte em uma célula, compreendendo proceder ao contato da célula com um polipeptídeo codificando a região de sobrevivência de um receptor da morte,

20 como aqui apresentado, ou um seu fragmento que bloqueie a ligação. É também fornecido um método de reverter a resistência de uma célula a um agonista do receptor da morte em uma célula, compreendendo o contato da célula com o polipeptídeo.

É fornecido um polipeptídeo isolado compreendendo o

25 domínio de ligação do receptor da morte de uma proteína contendo CARD. O polipeptídeo fornecido pode ser o domínio de ligação do receptor da morte do DDX3 (SEQ ID NO: 25, acesso nº gi: 13514816). O polipeptídeo fornecido pode ser um fragmento da sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 25, em que o fragmento se liga a um receptor da morte aqui apresentado. O DDX3 se liga

com o DR5 aproximadamente nos aminoácidos 200 a 250 e 350 a 400. Assim, o modulador pode ser um polipeptídeo compreendendo os aminoácidos 200 a 250 do DDX3, ou seus fragmentos. Deste modo, o modulador pode compreender a seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 37. Assim, o

5 modulador pode ser um polipeptídeo compreendendo os aminoácidos 350 a 400 do DDX3, ou seus fragmentos. Deste modo, o modulador pode compreender a seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 38. O polipeptídeo fornecido pode ser o domínio de mda-5 de ligação do receptor da morte (acesso nº gi: 11344593). O polipeptídeo fornecido pode ser o domínio de

10 ligação do receptor da morte de RIG-1 (acesso nº gi: 6048564).

Um polipeptídeo isolado compreendendo o domínio de ligação do receptor da morte de uma proteína contendo CARD tem utilidade como um inibidor negativo dominante da ligação do receptor da morte pelas proteínas contendo CARD, se o polipeptídeo for incapaz de inibir a apoptose

15 induzida pelo receptor da morte. Assim sendo, em um aspecto, o polipeptídeo isolado pode não se ligar às caspases ou aos IAPs. O motivo de CARD responsável por ligar os IAPs de DDX3 situa-se aproximadamente nos aminoácidos 50 a 100. Desta forma, o polipeptídeo fornecido pode compreender o domínio de ligação do receptor da morte de DDX3, mas não

20 compreender os aminoácidos 50 a 100 de DDX3. Portanto, o modulador pode ser um polipeptídeo compreendendo os aminoácidos 200 a 250 e/ou os aminoácidos 350 a 400 do DDX3, mas não compreendendo os aminoácidos 50 a 100 do DDX3. Por exemplo, é fornecido um polipeptídeo consistindo dos aminoácidos 151 a 662 do DDX3. Assim, o modulador pode compreender

25 um polipeptídeo consistindo da seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 39.

Em um outro aspecto, o polipeptídeo pode bloquear a associação das proteínas contendo CARD endógenas com o receptor da morte. Em um outro aspecto, o polipeptídeo pode impedir o recrutamento dos IAPs para o receptor da morte. Em outro aspecto, o polipeptídeo pode não

inibir o recrutamento de FADD para o receptor da morte. Qualquer combinação destes aspectos é considerada.

A capacidade das proteínas contendo CARD tais como DDX3 de inibir a apoptose induzida pelo receptor da morte é, pelo menos em parte, 5 devida ao recrutamento dos IAPs para o receptor da morte pelo domínio de CARD da proteína contendo CARD. Desde modo, é fornecido um método de bloquear a associação dos IAPs com um receptor da morte, compreendendo colocar em contato a célula com o polipeptídeo apresentado. Também é fornecido um método de reverter uma resistência da célula a um agonista do 10 receptor da morte, compreendendo o contato da célula com o polipeptídeo apresentado.

As composições aqui apresentadas e as composições necessárias para realizar os métodos apresentados, podem ser produzidas com o uso de qualquer método conhecido da pessoa habilitada na técnica para 15 aquele reagente ou composto particular, a menos que de outra forma especificamente observado.

Por exemplo, os ácidos nucleicos podem ser produzidos com o uso dos métodos de síntese química padrão ou podem ser produzidos com o uso de métodos enzimáticos ou de qualquer outro método conhecido. Esses 20 métodos podem variar da digestão enzimática padrão seguida pelo isolamento do fragmento de nucleotídeo [ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a Edição (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) Capítulos 5 e 6) até os métodos puramente sintéticos, por exemplo pelo método do cianoetil fosforamidita, 25 com o uso de um sintetizador Milligen ou Beckman System lPlus DNA (por exemplo, o sintetizador automático Modelo 8700 da Milligen-Bioscience, Burlington, MA ou Modelo 380B da ABI). Os métodos sintéticos úteis para produzir oligonucleotídeos também são descritos por Ikuta *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.* 53: 323-356 (1984), (métodos de fosfotriéster e fosfitotriéster), e

por Narang *et al.*, *Methods Enzymol.*, 65: 610-620 (1980), (método de fosfotriéster). As moléculas de ácido nucleico protéico podem ser produzidas com o uso de métodos conhecidos, tais como aqueles descritos por Nielsen *et al.*, *Bioconjug. Chem.* 5: 3-7 (1994).

5 Um método de produzir os polipeptídeos apresentados é ligar dois ou mais peptídeos ou polipeptídeos entre si mediante técnicas da química protéica. Por exemplo, os peptídeos ou polipeptídeos podem ser quimicamente sintetizados usando-se equipamento de laboratório correntemente disponível ou da química de Fmoc (9-
10 fluorenilmetiloxycarbonila) ou de Boc (terc-butiloxycarbonila) (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Uma pessoa habilitada na técnica pode facilmente observar que um peptídeo ou polipeptídeo correspondente às proteínas apresentadas, por exemplo, pode ser sintetizado por reações químicas padrão. Por exemplo, um peptídeo ou polipeptídeo pode ser
15 sintetizado e não clivado de sua resina de síntese, enquanto o outro fragmento de um peptídeo ou proteína pode ser sintetizado e clivado subsequente da resina, desse modo expondo um grupo terminal que seja funcionalmente bloqueado no outro fragmento. Pelas reações de condensação de peptídeos, estes dois fragmentos podem ser covalentemente unidos através de uma
20 ligação de peptídeo em seus terminos carboxila e amino, respectivamente, para formar um anticorpo, ou seu fragmento [Grant, G. A. (1992) *Synthetic Peptides: A User Guide*. W. H. Freeman and Co., N.Y. (1992); Bodansky, M. e Trost, B., Ed. (1993) *Principles of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag Inc., NY, os quais são aqui incorporados como referência pelo menos quanto ao
25 material relacionado à síntese peptídica). Alternativamente, o peptídeo ou o polipeptídeo são independentemente sintetizados *in vivo*, como aqui descrito. Uma vez isolados, estes peptídeos ou polipeptídeos independentes podem ser ligados para formar um peptídeo ou seu fragmento através de reações de condensação de peptídeos semelhantes.

Por exemplo, a ligação enzimática dos segmentos peptídicos clonados ou sintéticos permite que fragmentos de peptídeos relativamente curtos sejam unidos para produzir fragmentos de peptídeos maiores, polipeptídeos ou domínios protéicos completos [Abrahmsen, L. *et al.*, *Biochemistry*, 30: 4151 (1991)]. Alternativamente, a ligação química nativa dos peptídeos sintéticos pode ser utilizada para construir sinteticamente grandes peptídeos ou polipeptídeos dos fragmentos de peptídeos mais curtos. Este método consiste em uma reação química de duas etapas [Dawson *et al.* *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. Science*, 266: 776-779 (1994)]. A primeira etapa é a reação quimiosseletiva de um tioéster peptídico sintético desprotegido com outro segmento peptídico desprotegido contendo um resíduo Cys amino-terminal para dar um intermediário ligado ao tioéster como o produto covalente inicial. Sem uma mudança nas condições de reação, este intermediário sofre reação intramolecular espontânea e rápida para formar uma ligação peptídica nativa no sítio de ligação [Baggiolini, M. *et al.* (1992) *FEBS Lett.* 307: 97-101; Clark-Lewis, I. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269: 16075 (1994); Clark-Lewis, I. *et al.*, *Biochemistry*, 30: 3128 (1991); Rajarathnam, K. *et al.*, *Biochemistry* 33: 6623-6630 (1994)].

Alternativamente, os segmentos peptídicos desprotegidos são quimicamente ligados, em que a ligação formada entre os segmentos peptídicos, como um resultado da ligação química, é uma ligação não natural (não peptídica) [Schnolzer, M. *et al.* *Science*, 256: 221 (1992)]. Esta técnica foi usada para sintetizar análogos de domínios protéicos, bem como grandes quantidades de proteínas relativamente puras com atividade biológica completa [deLisle Milton, R. C. *et al.*, *Techniques in Protein Chemistry IV. Academic Press, New York*, pp. 257-267 (1992)].

Os seguintes exemplos são apresentados abaixo para ilustrar os métodos e resultados em conformidade com a presente invenção. Não se pretende que estes exemplos sejam inclusivos de todos os aspectos da

presente invenção, mas, ao invés disso, ilustrem métodos e resultados representativos. Estes exemplos não excluem equivalentes e variações da presente invenção que sejam evidentes a uma pessoa habilitada na técnica.

EXEMPLOS

5 EXEMPLO 1

RESISTÊNCIA INDUTÍVEL DE CÉLULAS TUMORAIS À APOPTOSE
MEDIADA POR TRAIL-R2 PELA GERAÇÃO DE UM BLOQUEIO NA
FUNÇÃO DO DOMÍNIO DA MORTE

Materiais e Métodos

10 *Linhagens Celulares, Anticorpos e Reagentes:* A linhagem de células cancerosas de mamas humanas, MDA-MB-231, foi comprada da American Tissue Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA). A linhagem de células cancerosas ovarianas humanas, UL-3C, foi obtida. As células foram mantidas em DMEM ou RPMI1640 suplementados com 10 % de FCS
15 inativado pelo calor, 50 µg/ml de estreptomicina e 50 U/ml de penicilina (Cellgro, Mediatec, Inc., Herndon, VA). Anticorpos monoclonais TRAIL-R1 anti-humano (clone: 2E12) e TRAIL-R2 anti-humano (clone: TRA-8) foram anteriormente descritos (Ichikawa *et al.* 2003; Ichikawa *et al.* 2001). O TRAIL-R2 anti-humano (clone: 2B4) para os ensaios de citometria de fluxo e
20 imunoprecipitação foi desenvolvido. O TRAIL solúvel recombinante foi comprado da Alexis Biochemicals (San Diego, CA). Os anticorpos anticaspase 3 e anticaspase 8 policlonais foram comprados da BD PharMingen (San Diego, CA). Os anticorpos caspase 2, 3, 8, 9 e 10 anti-humanos monoclonais, e os anticorpos anti-humanos monoclonais Bcl-2, Bcl-xL, Bax, cIAP-1, cIAP-2, XIAP e survivina foram preparados. Os anticorpos
25 policlonais anti-fosfo-SAPK/JNK (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵), anti-fosfo-p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²), anti-PARP foram comprados da Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA). O anticorpo anti-β-actina foi comprado da Sigma (St. Louis, MO). O anti-FADD foi comprado da Transduction Laboratories

(Lexington, KY). O anti-FLIP foi comprado da ProSci Inc. (Poway, CA). Todos os reagentes secundários conjugados à peroxidase de raiz forte (HRP) foram comprados da Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham, AL).

- 5 *Análise de Citometria de Fluxo da expressão da superfície celular de TRAIL-RI e -R2:* 10^6 células foram incubadas com 1 $\mu\text{g/ml}$ de 2E12 biotinilado e 1 $\mu\text{g/ml}$ de 2B4 conjugado a PE sobre gelo por 30 minutos. Após lavagem por duas vezes com tampão de GACS (PBS com 5 % de FBS e 0,01 % de NaN_3), as células foram incubadas com Estreptavidina-Cicromo.
- 10 10.000 células viáveis foram analisadas pelo citômetro de fluxo FACScan (BD, CA).

- Análise de citotoxicidade da suscetibilidade das células tumorais à apoptose mediada por TRA-8, 2E12 e TRAIL:* As células (1.000 células por reservatório) foram semeadas em placas de 96 reservatórios em
- 15 triplicata com oito concentrações (diluições seriais duplas de 1000 ng/ml) de TRA-8, 2E12 ou TRAIL. A viabilidade celular foi determinada após cultura noturna com o uso do ensaio de ATPLITE de acordo com as instruções do fabricante (Packard Instruments, Meriden, CT). Os resultados são
- 20 apresentados como o percentual de células viáveis nos reservatórios tratados, em comparação com os reservatórios de controle do meio.

- Indução da resistência das células tumorais ao TRAIL-R2:* As células ($5 \times 10^5/\text{ml}$) foram incubadas com uma dose de partida de 1 ng/ml de TRA-8 por dois dias. As células foram separadas com meio fresco e incubadas com uma dose dupla de TRA-8 a cada dois dias, até que a dose de
- 25 TRA-8 alcançasse 2.000 ng/ml. Em cada ciclo de tratamento, a viabilidade celular das células não induzidas (precursoras) e induzidas tratadas com uma dose indutora de TRA-8 foi determinada pelo ensaio de ATPLITE.

Clonagem e seqüenciação do TRAIL-R2: Os cDNAs de comprimento completo do TRAIL-R2 foram obtidos pela reação em cadeia da

polimerase (PCR) com o uso da polimerase de revisão de provas do DNA de platina (Invitrogen). Os cDNAs foram clonados dentro do vetor pCR2.1-TOPO (Invitrogen). Pelo menos cinco clones independentes foram selecionados para seqüenciação.

5 *Análise de Western blot das proteínas associadas à apoptose:*

As células tumorais (3×10^6) foram lavadas duas vezes com PBS frio e lisadas com 300 µl de tampão de lise contendo Tris 10 mM-HCl (pH 7,6), NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM, EGTA 1 mM, 0,1 % de SDS, ortovanadato de sódio 1 mM, e uma mistura de inibidores da protease (fluoreto de fenilmetilsulfonila 1 mM, 1 µg/ml de pepstatina A, 2 µg/ml de aprotinina). Os lisados foram sonificados por 10 segundos, e centrifugados por 20 minutos em 12.000 g. Os lisados celulares com igual quantidade de proteínas totais foram ebulidos por 5 minutos com tampão de amostra de SDS-PAGE. Os lisados celulares totais foram separados em 8 %, 10 % ou 12 % de SDS-PAGE, e eletroforeticamente transferidos para membrana de nitrocelulose. As manchas foram bloqueadas com 5 % de leite em pó sem gordura em tampão de TBST [Tris 20 mM-HCl (pH 7,4), NaCl 500 mM, e 0,1 % de Tween 20) e incubadas com anticorpo primário em tampão de bloqueio a 4 °C durante a noite. As manchas foram lavadas por três vezes com TBST e sondadas com anticorpos secundários conjugados a HRP por uma hora na temperatura ambiente. Após a lavagem por quatro vezes com TBST, as proteínas sondadas foram visualizadas com o uso do sistema de detecção de Western blotting ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) de acordo com as instruções do fabricante.

25 *Análise da disposição do cDNA da regulação transcricional dos genes associados à apoptose e à sinalização celular:* A Disposição de Genes da Apoptose Humana (HS-002) e a Disposição dos Genes PathwayFinder de Transdução de Sinal Humanos (HS-008) foram compradas da SuperArray, Inc (Frederick, MD). O RNA total foi extraído das células com o uso do protocolo TRIZOL[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA). As sondas de

cDNA foram sintetizadas com ^{32}P -dCTP. Os cDNAs nas manchas da membrana foram hibridizados com as sondas rotuladas de ^{32}P -dCTP em 60 °C durante a noite. Os perfis de expressão dos genes foram analisados com o uso do CYCLONE PHOSPHORIMAGER[®] (Packard Instruments, Meridien, CT).

5 *Co-imunoprecipitação de TRAIL-R1 e TRAIL-R2*: 10^7 células foram lavadas com PBS gelado, e lisadas por 15 minutos sobre gelo com tampão de lise [1 % de Triton X-100, NaCl 150 mM, 10 % de glicerol, Tris 20 mM-HCl (pH 7,5), EDTA 2 mM, PMSF 0,57 mM, e um coquetel inibidor da protease). Os lisados foram então depurados duas vezes por centrifugação
10 a 16.000 g por 10 minutos a 4 °C. A fração solúvel foi incubada com 30 µl de TRA-8 ou Sefarose 4B conjugada com 2B4 a 4 °C durante a noite. Após sete lavagens com tampão de lise e três lavagens com Tris 10 mM, as proteínas ligadas foram eluídas por ebulição por 3 minutos em tampão de carga de SDS-PAGE e separadas em SDS-PAGE. A presença da caspase 8 e FADD foi
15 determinada pela análise de Western blot.

Eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional: Após a co-imunoprecipitação com Sefarose 4B de 2B4, as proteínas foram eluídas e dessalinizadas com acetona, e reconstituídas no tampão de amostra de IEF (Bio-Rad, Hercules, CA). 160 µg de proteínas totais foram carregadas na tira
20 de IPG (Bio-Rad) na temperatura ambiente durante a noite, e depois separadas na Célula PROTEAN IEF[®] (BioRad). As tiras de proteína foram equilibradas com os Tampões de Equilíbrio ReadyPrep (Bio-Rad), e ainda separadas em gel de SDS-PAGE a 10 %. Após a conclusão, os géis foram fixados com um tampão contendo 10 % de metanol e 7 % de ácido acético, e manchados com
25 tampão de Manchamento Rubi SYPRO[®] (Bio-Rad). Os géis foram convertidos em imagem com o uso do Sistema de Formação de imagem Digital VERSADOC[®] (Bio-Rad) e analisados com o programa PDQUEST[®] (Bio-Rad).

RESULTADOS

Indução da resistência seletiva à apoptose mediada por

TRAIL-R2: Uma linhagem de células cancerosas de mamas humanas, MDA-231, e uma linhagem de células cancerosas ovarianas humanas, UL-3C, foram selecionadas para indução da resistência ao TRAIL-R2, tendo em vista que elas co-expressavam altos níveis de TRAIL-R1 e R2 da superfície celular, como determinado pela análise de citometria de fluxo de duas cores usando-se anticorpos anti-TRAIL-R1 (2E12) e anti-TRAIL-R2 (2B4) (Figura 1A). Duas linhagens de células tumorais foram suscetíveis à apoptose induzida pelos anticorpos receptores anti-TRAIL agonísticos, 2E12 e TRA-8, bem como TRAIL como determinado pelo ensaio de citotoxicidade *in vitro* (Figura 1B), indicando que ambos os receptores para TRAIL são funcionais nas duas linhagens de células tumorais. Para determinar se estas células tumorais desenvolvem resistência da apoptose a TRA-8 após o tratamento, as células foram tratadas iniciando-se com uma dose não de apoptose (1 ng/ml) de TRA-8 por dois dias, e as doses foram então dobradas a cada dois dias até 2.000 ng/ml antes da extração do TRA-8. A viabilidade celular foi medida em cada dose tanto nas células tratadas quanto nas não tratadas. Nas doses de TRA-8 menores do que 10 ng/ml, não houve nenhuma morte celular significativa tanto nas células tratadas quanto nas não tratadas. Quando as doses de TRA-8 foram aumentadas para 50 ng/ml ou mais, uma redução dependente da dose de TRA-8 da viabilidade celular foi observada nas células não tratadas. Ao contrário, não houve nenhuma morte celular significativa nas células tratadas até 2000 ng/ml (Figura 1C). Estes resultados indicam que o tratamento repetido das células tumorais com baixas doses de TRA-8 não indutoras da apoptose induz a resistência da apoptose e que a resistência induzida não é devida a um processo de seleção pela remoção das células sensíveis à apoptose.

Quatro semanas após a remoção do TRA-8, tanto as células precursoras (MDA-231P, UL-3CP) quanto as células tratadas (MDA-231R,

UL-3CR) foram testadas quanto à sua suscetibilidade à apoptose induzida por TRA-8, 2E12 ou TRAIL. Em comparação com quase 100 % de morte celular das células precursoras após o tratamento com 1.000 ng/ml de TRA-8, nenhuma morte celular significativa foi induzida em ambas as células MDA-231R e UL-3CR com uma faixa de concentrações de TRA-8 (Figura 2A), indicando que as células se tornam altamente resistentes à apoptose induzida pelo TRA-8. Ao contrário, a suscetibilidade das células tumorais resistentes ao TRA-8 à apoptose induzida por 2E12 permaneceu imutável (Figura 2B). Embora a suscetibilidade tenha sido reduzida, as células induzidas resistentes ao TRA-8 ficaram ainda suscetíveis à apoptose mediada por TRAIL (Figura 2C). Estes resultados indicam que a resistência à apoptose induzida por TRA-8 é seletiva para TRAIL-R2. Após a remoção do TRA-8, as células permaneceram em um estado resistente ao TRA-8 por pelo menos 3 meses, e depois a suscetibilidade foi lentamente restaurada a aproximadamente 30 % dos níveis das células precursoras por quatro meses (Figura 2D), indicando que a resistência induzida ao TRA-8 teve longa duração, porém parcialmente reversível.

A resistência induzida do TRAIL-R2 não é devida à expressão da superfície celular alterada ou à mutação de TRAIL-R, ou a um defeito intrínseco da apoptose. Que a resistência à apoptose induzida por TRA-8 tenha sido seletiva quanto a TRAIL-R2 indica que a expressão do TRAIL-R2 pode ser seletivamente reduzida ou uma mutação do TRAIL-R2 pode ocorrer após a indução da resistência ao TRA-8. Para excluir estas possibilidades, a expressão da superfície celular de TRAIL-R2 foi examinada, e determinou-se que não houve nenhuma alteração nos níveis de expressão do TRAIL-R2 em ambas as células resistentes ao TRA-8 em comparação com as suas células precursoras (Figura 3A). Este resultado foi ainda confirmado pela análise de Western blot, mostrando que os dois isoformas da proteína de TRAIL-R2 foram igualmente expressos nas células precursoras e nas resistentes (Figura

3A). Os clones de cDNA de comprimento completo do TRAIL-R2 isolado de ambas as linhagens de células resistentes foram seqüenciados, e nenhuma mutação foi identificada. Estes resultados indicaram que a resistência induzida e seletiva ao TRAIL-R2 não é devida às alterações do próprio TRAIL-R2.

A apoptose mediada pelo TRAIL-R2 pode ser regulada por várias proteínas reguladoras da apoptose, tal como o inibidor da família da apoptose (IAP) (Park *et al.* 2002; Ng *et al.* 2002; Roa *et al.* 2003; Cummins *et al.* 2004; Li *et al.* 2004; Bockbrader *et al.* 2005) e a família de Bcl-2 (Hinz *et al.* 2000; Rokhlin *et al.* 2001; Fulda *et al.* 2002; Carthy *et al.* 2003; Chawla-Sarkar *et al.* 2004; Sinicrope *et al.* 2004). Com o uso de um painel dos anticorpos monoclonais recém-desenvolvidos, os níveis protéicos da expressão de cIAP1, cIAP2, XIAP, survivina, Bcl-2, Bcl-xL e Bax foram examinados pela análise de Western blot. Embora MDA231 e UL-3C expressassem níveis variáveis destas proteínas, não houve nenhuma diferença significativa entre as células precursoras e as resistentes (Figura 3A), indicando que os níveis de expressão destas proteínas são improváveis de serem envolvidos na indução de TRA-8. Uma triagem mais ampla para as alterações transcricionais potenciais entre um painel dos genes associados à apoptose e à sinalização celular, foi realizada com o uso das disposições de cDNA da membrana (Sperarray, Frederick, MD), que incluíam mais do que 200 genes relacionados à apoptose bem conhecidos (Figura 3B, painel superior) e aos genes de sinalização celular (Figura 3B, painel inferior). Uma comparação paralela entre as células precursoras de MDA231 e as resistentes indica que não houve nenhuma alteração significativa no perfil de expressão destes genes após a indução da resistência ao TRA-8.

Bloqueio seletivo da transdução de sinal da apoptose de TRAIL-R2 nas células tumorais resistentes ao TRA-8. A ativação seqüencial da caspase 8 a montante e da caspase a jusante é um evento chave na

transdução de sinal da apoptose de TRAIL-R2. Assim, a ativação dependente do tempo destas duas caspases foi examinada. Como mostrado anteriormente, o tratamento das células MDA231 precursoras sensíveis ao TRA-8 com TRA-8 induziu a ativação da caspase 8 (Figura 4A, painel superior) e da caspase 3 (Figura 4A, painel central) como mostrado pela geração dos fragmentos de caspases clivados após o tratamento com TRA-8. Como um marcador muito sensível da ativação da caspase, o PARP foi rapidamente clivado (Figura 4A, painel inferior). Entretanto, a ativação da caspase 8, da caspase 3, e a subsequente clivagem do PARP não ocorreu nas células resistentes após o tratamento com TRA-8. O fracasso da ativação de uma cascata de caspases não é devido a um defeito intrínseco nas vias das caspases já que a ativação da caspase de TRAIL-R1 deflagrada por 2E12 não foi prejudicada nas células resistentes ao TRA-8 (Figura 4A, painel da esquerda). Estes resultados indicam que a cascata de caspases associada ao TRAIL-R2 é seletivamente bloqueada no nível da caspase 8 de montante após a indução da resistência ao TRA-8.

A ativação da via de JNK/quinase p38 dependente da caspase 8 desempenha um papel sinérgico crítico na apoptose mediada pelo TRAIL-R2 (Ohtsuka *et al.* 2003; Ohtsuka *et al.* 2002). A ativação das quinases JNK/p38 foi medida pela análise de Western blot da fosforilação das quinases JNK/p38 durante o tratamento de TRA-8. Correspondentes à ativação da caspase 8, JNK (Figura 4, painel superior) e p38 (Figura 4B, painel inferior) foram rapidamente fosforilados de uma forma dependente do tempo. No entanto, nas células resistentes a TRA-8, apenas 2E12, mas não TRA-8, foi capaz de induzir a fosforilação do JNK/p38, indicando que as vias das quinases JNK/p38 também são seletivamente inibidas nas células resistentes a TRA-8.

Bloqueio seletivo da função do domínio da morte de TRAIL-R2 nas células tumorais resistentes a TRA-8. Quando FADD e a caspase 8 são

recrutadas para o domínio da morte de TRAIL-R2 e são os componentes principais de DISC, a capacidade de formar um DISC em TRAIL-R1 e TRAIL-R2 foi examinada tanto nas células precursoras quanto nas resistentes pelo ensaio de co-imunoprecipitação. Nas células precursoras MDA231, após o tratamento com TRA-8 ou 2E12, existiu um aumento dependente do tempo de FADD (Figura 5A, painel superior) e caspase 8 (Figura 5A, painel central), que foram co-imunoprecipitados com TRAIL-R2 (Figura 5A, painel da esquerda) ou TRAIL-R1 (Figura 5A, painel da direita), respectivamente. Nas células resistentes a TRA-8, não existiu nenhum FADD nem caspase 8 co-imunoprecipitados com TRAIL-R2 durante a apoptose mediada por TRA-8, mas a co-imunoprecipitação de FADD e caspase 8 com TRAIL-R1 após o tratamento de 2E12, não foi afetada. Além disso, para determinar se cFLIP, um competidor inibidor para a caspase 8 ao domínio da morte, desempenha um papel no bloqueio da formação de DISC, a co-imunoprecipitação do cFLIP com TRAIL-R1 e TRAIL-R2 foi também examinada. Em um padrão semelhante dependente do tempo, cFLIP foi co-imunoprecipitado com TRAIL-R2 durante a apoptose mediada por TRA-8 nas células precursoras, mas não nas células resistentes (Figura 5A, painel inferior). A co-imunoprecipitação do cFLIP com TRAIL-R1 durante a apoptose mediada por 2E12 não foi diferente entre as células precursoras e resistentes a TRA-8. Uma vez tendo havido níveis semelhantes de expressão da proteína total de FADD, caspase 8 e cFLIP, a falha do recrutamento destas proteínas associadas ao domínio da morte não foi devida à expressão defeituosa destas proteínas. Estes resultados indicam que a resistência ao TRA-8 induzida é provavelmente devida a um defeito seletivo para TRAIL-R2 recrutar FADD e caspase 8 na formação do DISC após o tratamento de TRA-8.

A falha da montagem de DISC no domínio da morte de TRAIL-R2 nas células resistentes a TRA-8 indica que a função e a composição do complexo protéico de TRAIL-R2 é alterada, em que uma

proteína recém-gerada ou funcionalmente alterada pode associar-se com TRAIL-R2 e impedir o recrutamento de FADD e caspase 8 para o domínio da morte de TRAIL-R2. Assim, os perfis proteômicos das proteínas associadas a TRAIL-R2 foram comparados nas células MDA231 precursoras sensíveis a TRA-8 e resistentes a TRA-8 antes e após o tratamento de TRA-8 mediante duas análises proteonômica de dimensão e espectrometria de massa. As proteínas diferencialmente expressas que foram co-imunoprecipitadas com TRAIL-R2 foram analisadas pelo programa PDQuest, que nos levou a focalizar-nos sobre três pontos de proteínas que foram alterados durante a apoptose mediada por TRA-8 entre as células precursoras e as resistentes (Figura 5B). Os pontos 1 e 2 representando uma massa protéica com um peso molecular de 50 kDa ou 20 kDa, respectivamente, apareceram apenas nas células precursoras MAD-231 após o tratamento com TRA-8, mas não nas células não tratadas nem nas células resistentes tratadas com TRA-8, indicando que estas proteínas podem ser recrutadas para o TRAIL-R2 durante a apoptose mediada por TRA-8. Com base no seu peso molecular e no ponto isoelétrico, a proteína no ponto 1 foi confirmada como caspase 8 (Figura 5C), e o ponto 2 como FADD (Figura 5D) pela análise de Western blot. As proteínas no ponto 3 foram interessantes, porque elas ficaram constantemente associadas com TRAIL-R2 e um deslocamento ocorreu durante a apoptose mediada por TRA-8 de uma proteína de peso molecular mais elevado até uma proteína de peso molecular menor (Figura 5E). Esta conversão pareceu ser relevante para a resistência de TRA-8 induzida, já que ela foi apenas observada nas células precursoras MDA231 tratadas com TRA-8, mas não nas células resistentes. Além disso, a análise de espectrometria de massa identificou que ambos os pontos haviam sido derivados de DDX3, um membro da família da RNA helicase DEAD-box. Por causa de uma forma de peso molecular mais elevado de DDX3 ser constantemente associada com TRAIL-R2 nas células resistentes a TRA-8, ela pode ser um fator que impeça

o recrutamento de FADD e caspase 8 para o domínio da morte de TRAIL-R2.

Reversão da resistência de TRA8 por agentes quimioterápicos

Os agentes quimioterápicos intensificam sinergisticamente a apoptose mediada por TRA-8, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Ohtsuka *et al.* 2003; Ohtsuka *et al.* 2002; Buchsbaum *et al.* 2003), particularmente naquelas células resistentes a TRA-8. Para se determinar se os agentes quimioterápicos são capazes de reverter a resistência ao TRA-8 induzida, o efeito de um grupo de agentes quimioterápicos, a Adriamicina, o Texol, a Cisplatina e a Bisindolilmaleimida VIII (BisVIII), foi examinado na apoptose mediada por TRA-8 das células resistentes induzidas. Na presença das concentrações indicadas dos agentes quimioterápicos, uma resposta dependente da dose de TRA-8 foi restaurada tanto nas células MDA-231 resistentes ao TRA-8 quando nas UL-3C (Figura 6A), indicando que todos os agentes quimioterápicos são capazes de reverter a resistência induzida pelo TRA-8. A ativação da cascata de caspases nas células resistentes MAD-231 após o tratamento de combinação com Adriamicina e TRA-8, foi examinada com o uso de um painel de anticorpos anticaspase monoclonais. Como a anticaspase 8 (clone: 2F4) e a anticaspase 2 (clone: 2A3) apenas reconhecem as pró-formas das caspases 8 e 2 respectivamente, a ativação das caspases 8 e 2 foi demonstrada pela quantidade reduzida das pró-formas devidas à clivagem. A anticaspase 9 (Clone: 4B4) e a anti-caspase 3 (clone: 1H6) reconhecem tanto as pró-formas quanto as formas clivadas das caspases 9 e 3, respectivamente, sua ativação foi mostrada pela presença dos fragmentos clivados das caspases 9 e 3. O tratamento do agente único sozinho com TRA-8 (Figura 6B, faixa 5) ou Adriamicina (Figura 6B, faixa 4) em 4 horas não induziu qualquer ativação significativa de todas as caspases testadas em comparação com os controles não tratados (Figura 6B, faixa 1). Ao contrário, a ativação das caspases 2, 9 e 3 foi induzida tão cedo quanto uma hora após o tratamento de combinação com Adriamicina e TRA-8 (Figura 6B, faixa 2), a qual foi ainda intensificada no

ponto do tempo de quatro horas (Figura 6B, faixa 3). A ativação da caspase 8 ficou evidente no ponto do tempo de quatro horas após o tratamento de combinação. Estes resultados indicam que o tratamento com Ariamicina restaurou a cascata de caspases associada com TRAIL-R2 nas células resistentes a TRA-8. Na presença de Ariamicina, o TRA-8 foi capaz de deflagrar o recrutamento de FADD para TRAIL-R2 (Figura 6C, faixas 2 e 3), a função de recrutamento de TRAIL-R2 tendo sido restaurada pelo tratamento de Adriamicina.

EXEMPLO 2

10 PAPEL DO DDX3 NA APOPTOSE MEDIADA POR TRAIL-r2

Materiais e Métodos

Linhagens Celulares, Anticorpos e Reagentes. A linhagem celular do câncer de mamas humano, MDA-MB-231, foi comprada da American Tissue Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA). A linhagem celular do câncer ovariano humano, UL-3C, foi obtida. As células foram mantidas em DMEM ou RPMI1640 suplementados com 10 % de FCS inativado pelo calor, 50 µg/ml de estreptomicina, e 50 U/ml de penicilina (Cellgro, Medi-atec, Inc., Herndon, VA). Anticorpos monoclonais de TRAIL-R1 anti-humano (clone: 2E12) e de TRAIL-R2 anti-humano (clone: TRA-8) foram anteriormente descritos (Ichikawa *et al.*, 2003; Ichikawa *et al.*, 2001). TRAIL-R2 anti-humano (clone: 2B4) foi desenvolvido por citometria de fluxo e ensaios de imunoprecipitação. O TRAIL solúvel recombinante foi comprado da Alexis Biochemicals (San Diego, CA). Os anticorpos policlonais anti-caspase 3 e anti-caspase 8 foram comprados da BD Pharmingen (San Diego, CA). Os anticorpos das caspases 2, 3, 8, 9 e 10 anti-humanos monoclonais, e os anticorpos anti-humanos monoclonais de Bcl-2, Bcl-xL, Bax, cIAP-1, cIAP-2, XIAP e survivina foram preparados. O anticorpo anti-PARP foi comprado da Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA). O anticorpo anti-actina-β foi comprado da Sigma. Os anti-

FADD foram comprados dos Transduction Laboratories (Lexington, KY). Todos os reagentes secundários conjugados à peroxidase de raiz-forte (HRP) foram comprados da Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham, AL). As Caspase-1, Caspase-2, Caspase-3, Caspase-6, Caspase-7, Caspase-8, Caspase-9 e Caspase-10 foram compradas da EMD Biosciences, Inc. (San Diego, CA). Os derivados peptídicos fluorogênicos Ac-Val-Asp-Val-Asp-AMC (Ac-VDVAD-AMC, 260060M001, SEQ ID NO: 40), Ac-Asp-Glu-Val-Asp-amino-4-metilcumarina (Ac-DEVD-AMC, 260031M001, SEQ ID NO: 41), e Ac-carbonil-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amido-4-metilcumarina (Z-IETD-AMC, 260042M001, SEQ ID NO: 42) foram comprados da Alexis Biochemicals, San Diego, CA. O inibidor das caspases-2, -3, -8, -10 (FMKSP01) foi comprado da R&D Systems, Inc.

Análise da citotoxicidade da suscetibilidade celular tumoral à apoptose mediada por TRA-8, 2E12 e TRAIL. As células (1.000 células por reservatório) foram semeadas em placas de 96 reservatórios em triplicata com oito concentrações (diluições seriais duplas de 1000 ng/ml) TRA-8, 2E12 ou TRAIL. A viabilidade celular foi determinada após cultura noturna com o uso de um ensaio de ATPLITE® de acordo com instruções do fabricante (Packard Instruments, Meriden, CT). Os resultados são apresentados como o percentual das células viáveis nos reservatórios tratados em comparação com os reservatórios de controle do meio.

Citometria de fluxo. As células (10^6) foram lavadas uma vez com PBS e recolocadas em suspensão em 1 ml de tampão de FACS frio (PBS com 5 % de FBS e 0,01 % de NaN_3) contendo o anticorpo primário 1 $\mu\text{g/ml}$ de TRA-8). As células foram manchadas sobre gelo por 60 minutos, depois lavadas com 3 ml de tampão de FACS frio, e incubadas com o anticorpo secundário (diluição a 1:100 de IgG anticamundongo de cabra conjugado a PE) em 4 °C por 60 minutos no escuro. Após uma lavagem adicional de 3 ml com tampão de FACS, 10.000 células por amostra foram analisadas por

citometria de fluxo FACSCAN (BD Biosciences, San Jose, CA).

Análise de Western blot das proteínas associadas com a apoptose. Células tumorais (3×10^6) foram lavadas por duas vezes com PBS frio e lisadas com 300 µl de tampão de lise contendo Tris 10 mM-HCl (pH 7,6), NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM, EGTA 1 mM, SDS 0,1 %, ortovanadato de sódio 1 mM, e uma mistura de inibidores da protease (fluoreto de fenilmetilsulfonila 1 mM, 1 µg/ml de pepstatina A, 2 µg/ml de aprotinina). Os lisados celulares foram sonicados por 10 segundos e centrifugados por 20 minutos em 12.000 g. Os lisados celulares com iguais quantidades de proteínas totais foram ebulidos por 5 minutos com tampão de amostra de SDS-PAGE. Os lisados celulares totais foram separados em 8 %, 10 % ou 12 % de SDS-PAGE, e eletroforeticamente transferidos para uma membrana de nitrocelulose. As manchas foram bloqueadas com 5 % de leite em pó não gorduroso em tampão de TBST (Tris 20 mM-HCl (pH 7,4), NaCl 500 mM, e 0,1 % de Tween 20) e incubadas com anticorpo primário em tampão de bloqueio a 4 °C durante a noite. As manchas foram lavadas por três vezes com TBST e sondadas com anticorpos secundários conjugados a HRP por 1 hora na temperatura ambiente. Depois de serem lavadas por quatro vezes com TBST, as proteínas sondadas foram visualizadas com o uso do sistema de detecção de Western blotting de ECL (Amersham Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante.

Subexpressão de DDX3. Uma ferramenta de esquema on-line, BLOOK-iT RNAi Designer (Invitrogen) foi usada para identificar alvos de RNAi para DDX3. Cinco seqüências alvejadas de shRNA foram selecionadas dos alvos de RNAi de classificação mais elevada 10 de topo (ver Tabela 2).

TABELA 2

ORIENTAÇÃO DO shRNA: SENTIDO-circuito-ANTI-SENTIDO

Construção	Filamento	Seqüência	
1	108- 128	topo CACCAAGCTTGCCTATATTCCTCATTTCgaaAAAT GAGGAGGAATATAGCGCCTCGAG	SEQ ID NO:8
	fundo	AAAACCTCGAGGCGCTATATTCCTCCTCATTTCgAAAT GAGGAGGAATATAGCGCAAGCTT	SEQ ID NO:9
2	562- 582	topo CACCGGAGAAATTATCATGGGAAACcgaaGTTTCCCAT GATAATTTCTCC	SEQ ID NO:10
	fundo	AAAAGGAGAAATTATCATGGGAAACctcgGTTTCCCAT GATAATTTCTCC	SEQ ID NO:11
3	1554- 1574	topo CACCGCCAAGTGATATTGAAGAATAaagcTATTCTTCA ATATCACTTGGC	SEQ ID NO:12
	fundo	AAAAGCCAAGTGATATTGAAGAATAcgttTATTCTTCAA TATCACTTGGC	SEQ ID NO:13
4	5'UTR	topo CACCGCTTCCAGCGGGTATATTAGcgaaCTAATATACC CGCTGGAAAGC	SEQ ID NO:14
	fundo	AAAAGCTTCCAGCGGGTATATTAGttcgCTAATATACC CGCTGGAAAGC	SEQ ID NO:15
5	1045- 1065	topo CACCGCTGATCGGATGTTGGATATGcgaaCATATCCAA CATCCGATCAGC	SEQ ID NO:16
	fundo	AAAAGCTGATCGGATGTTGGATATGttcgCATATCCAAC ATCCGATCAGC	SEQ ID NO:17

Elas foram então clonadas dentro do vetor de entrada BLOCK-iT U6. O shRNA é conduzido pelo promotor U6 e pode ser transientemente exposto na maioria dos tipos celulares de mamífero divisores ou não divisores. Células resistentes foram transfectadas com LIPOFECTAMINE 2000 usada de RNAi (Invitrogen) para a resposta do RNAi. A expressão do DDX3 reduzida foi determinada pela análise de Western blot usando o anticorpo anti-DDX3 36 horas após a transfecção. Uma vez reduzida a expressão de DDX3 foi obtida, o oligo siRNA foi sintetizado (Seqüência alvo: GGAGAAATTATCATGGGAAAC (SEQ ID NO: 27): RNA de Sentido 5'-Fl-GGAGAAATTATCATGGGAAAC (Fl-SEQ ID NO: 27) (Fl = fluoresceína); RNA anti-sentido 5'-GUUCCCAUGAUAAUUCUCC-3' (SEQ ID NO: 28), e oligo de controle de RNAi (RI-010-DP) foram comprados da Molecula (Columbia, MD).

Geração dos Vetores de Expressão. O DDX3 de comprimento completo foi clonado no plasmídeo pcDNA3.1 (Invitrogen) com um rótulo His no término N do DDX3. O cDNA de DDX3 e TRAIL-R2 foi gerado pela reação em cadeia da polimerase de transcriptase reversa (RT-PCR) realizada

com RNA total extraído das células MDA231 com o uso do seguinte par de iniciadores: iniciador dianteiro de DDX31 com BamHI: 5'-acggatccaaatgagtcgtgtggcagtgga-3' (SEQ ID NO: 29); iniciador reverso DDX3662 com xhoI: 5'-ctctcgagcaaagcaggctcagttaccc-3' (SEQ ID NO: 30).

5 Iniciador dianteiro de TRAIL-R21 com KpnI: 5'-aaaggtaccagccatggaacaacggggacag-3' (SEQ ID NO: 31); iniciador reverso de TRAIL-R2441 com EcoV: 5'-aaagatatcttaggacatggcagagtctgcatt-3' (SEQ ID NO: 32); o fragmento isolado da reação em cadeia da polimerase de DDX3 ficou em matriz dentro do vetor pcDNA3.1 (Invitrogen). O cDNA de TRAIL-
10 R2 foi clonado no vetor pshutter-CMV. As seqüências corretas foram confirmadas por seqüenciação de DNA.

O plasmídeo de expressão DDX3/pcDNA3.1-His foi gerado pela supressão da seqüência de DDX3 entre os sítios BamHI e xhoI. O iniciador dianteiro DDX3151 com BamHI: 5'-
15 acggatccaaatgttttctggaggcaacactggg-3' (SEQ ID NO: 33); o plasmídeo de expressão TRAIL-R2/pshutter-CMV foi gerado pela supressão da seqüência de TRAIL-R2 com o uso do seguinte iniciador: iniciador reverso TRAIL-R2340 com EcoRV: 5'-aaagatatcttactgtctcagagtctcagtgggatc-3' (SEQ ID NO: 34); o iniciador reverso TRAIL-R2330 com EcoRV e xhoI: 5'-
20 aaagatatcctcgagattgtggaaccagcagcct-3' (SEQ ID NO. 35).

Construções dos Plasmídeos de Expressão para DDX3 nas Bactérias. O fragmento de DDX3 ou de cIAP1 foi introduzido no vetor TOPO100 (Invitrogen). Os plasmídeos resultantes foram transformados na cepa BL21 (DE3) de *E. coli*, a qual foi cultivada em meio de LB para as fases
25 exponenciais e induzida com isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosídeo 0,4 mM por 3 horas. As células foram pelotizadas, recolocadas em suspensão em tampão de lise (Tris 30 mM-HCl, pH 7,5, NaCl 0,1 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, 1 % de Nonidet P-40 e 20 μ g/ml de PMSF), e sonicadas. O sobrenadante, após a centrifugação a 14.000 x g por 15 minutos, foi

purificado por coluna de Ni. A concentração protéica foi determinada pelo ensaio de BCA (Pierce, Rockford, IL), e alíquotas foram armazenadas em 80 °C.

Transfecções Transientes de Células 293 ou 3T3. Células 293

5 ou 3T3 foram transfectadas com vetores de expressão usando-se LIPOFECTAMINE® 2000 (Invitrogen, Inc.). Após 24 horas de transfecção, a expressão protéica foi determinada pela análise de Western blot com o uso do anticorpo monoclonal respectivo. Para a análise de co-imunoprecipitação, as células foram lisadas com tampão de lise de imunoprecipitação contendo um
10 coquetel inibidor da protease.

Ensaio de co-imunoprecipitação. O anticorpo anti-DDX3 ou anti-TRAIL-R2 foi conjugado a contas de Sefarose (Sigma). A composição do DISC de TRAIL-R2 foi determinada como segue: 5×10^6 células (caso não de outra forma indicado) foram tratadas com 500 ng/ml de TRA-8 pelo tempo
15 indicado a 37 °C e depois lisadas em tampão de lise de imunoprecipitação (Tris 20 mM-HCl, pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,2 % de NONIDET P40, e 10 % de glicerol e coquetel inibidor da protease completa) ou lisadas sem tratamento (condição não estimulada). O DISC de TRAIL-R2 foi então precipitado durante a noite a 4 °C com 30 µl de contas. Após a
20 imunoprecipitação, as contas foram lavadas por quatro vezes com tampão de lise. As contas foram então lavadas por cinco vezes com tampão de Tris 10 mM e recolocadas em suspensão em tampão de carga para as análises de SDS-PAGE e imunomanchamento.

Ensaio da atividade da caspase in vitro. Os ensaios
25 fluorométricos foram conduzidos em placas de fundo transparente de 96 reservatórios, e todas as medições foram realizadas em reservatórios em triplicata. 100 µl de tampão de ensaio (HEPES 10 mM, pH 7,0, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM, EDTA 5 mM, e DTT 1 mM) foram adicionados. A caspase-8 ativa e os substratos peptídicos (Ac-IETD-AMC) foram adicionados a cada

reservatório até uma concentração final de 100 ng/μl. A fração eluída por co-
 imunoprecipitação foi adicionada para iniciar a reação. A fluorescência de
 fundo foi medida nos reservatórios contendo o tampão de ensaio, o substrato,
 e o tampão de lise sem os lisados celulares. As placas de ensaio foram
 5 incubadas a 37 °C por 1 hora. A fluorescência foi medida sobre uma leitora de
 placa de fluorescência (Bio-Tek, Winooski, VT) estabelecida em 355-nm de
 excitação e 440-nm de emissão.

Ensaio de clivagem da caspase in vitro. A capacidade das
 caspases de clivar DDX3 foi examinada em um ensaio *in vitro*. As reações de
 10 clivagem realizadas por 30 minutos a 37 °C, incluindo 10 ul da fração eluída
 do TRAIL-R2 co-IP, 10 ul do tampão de reação [HEPES 10 mM (pH 7,0),
 NaCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 5 mM, DTT 1 mM, ATP 2 mM), e 5 ul
 (0,1 U/μl) de formas ativas recombinantes de caspases. A clivagem foi
 determinada por Western blot com anticorpo anti-DDX3.

15 RESULTADOS

*Análise proteômica de uma proteína candidata, DDX3, que
 causa um bloqueio do domínio da morte do TRAIL-R2 nas células resistentes.*
 A resistência da apoptose espontaneamente desenvolvida ou induzida aos
 agentes terapêuticos, TRAIL e anticorpos agonísticos, que alveja os
 20 receptores da morte, representa um obstáculo principal no tratamento eficaz
 do câncer com estes agentes. De modo a determinar as composições
 alternativas dos complexos do domínio da morte de TRAIL-R2 nas células
 resistentes, os perfis proteômicos das proteínas existentes associadas ao
 TRAIL-R2 foram comparados nas células MDA231 precursoras sensíveis ao
 25 TRA-8 e resistentes ao TRA-8 antes e após o tratamento com TRA-8 pela
 análise proteômica bidimensional e de espectrometria de massa. No exame
 dos géis bidimensionais manchados com rubi SYPRO® (Molecular Probes,
 Eugene, OR), um ponto protéico de cerca de ~80 KDa foi encontrado. A
 associação desta proteína com TRAIL-R2 bloqueia a formação do DISC de

TRAIL-R2, desse modo causando a resistência ao TRA-8. A proteína de ~80 kd foi excisada da SDS-PAGE e digerida com tripsina, e as seqüências de peptídeos foram analisadas por espectrometria de massa. As seqüências de aminoácidos protéicos de seis fragmentos digeridos eram 100 % idênticas à seqüência do Genbank de DDX3 humano (Tabela 3), indicando que o DDX3 se desassocia do TRAIL-R2 durante a apoptose induzida por TRA-8 correlacionada com a formação de DISC. Se esta proteína permanecer associada com o complexo protéico associado a TRAIL-R2, ela pode impedir o recrutamento de FADD e causar a falha da formação do DISC.

TABELA3

FRAGMENTOS DE DDX3

Peptídeo	Seqüência	DDX3	SEQ ID
1	HVINFDLPSDIEEYVHR	aa512-528	SEQ ID NO:1
2	DFLDEYIFLAVGR	aa395-407	SEQ ID NO:2
3	DLDDLVEAK	aa555-564	SEQ ID NO:3
4	SFLDLLNATGK	aa429-440	SEQ ID NO:4
5	TAAFLLPILSQIYSDGPGEALR	aa231-252	SEQ ID NO:5
6	QYPISLVLAFT	aa265-275	SEQ ID NO:6

DDX3 é uma nova proteína associada a TRAIL-R2 na apoptose mediada pelo TRAIL-R2. Para determinar se DDC3 é de fato associado com TRAIL-R2, o comprimento completo (aa 1 a 662), fragmento N-terminal (aa 1 a 316), e um fragmento C-terminal (aa 310 a 662) de DDX3 foram clonados em PCDNAIII3.1 com o rótulo 6-His no término N. Estes vetores de expressão foram transfectados nas células precursoras MDA231 para se obter a superexpressão dos mutantes de DDX3 recombinantes de comprimento completo e de deleção. Entretanto, apenas o DDX3 de comprimento completo, não seus mutantes de deleção N-terminais e C-terminais, foi associado com TRAIL-R2 como detectado pela análise de co-imunoprecipitação seguida pela análise de Western blot com o uso do anticorpo anti-6-His (Figura 8A). Estes resultados confirmaram que o DDX3 associado com TRAIL-R2 e sua ligação ao TRAIL-R2 são dependentes do

comprimento completo. O DDX3 foi imunoprecipitado com as anti-TRAIL-R2 nas células MDA231. Para ainda confirmar que a associação do DDX3 com TRAIL-R2, o fragmento N-terminal, C-terminal, e as versões de DDX3 de comprimento completo, foram expressas em *E. coli*. As proteínas foram purificadas e usadas como um antígeno para gerar anticorpos policlonais e um painel de monoclonais contra DDX3. O DDX3 associado com o TRAIL-R2 foi detectado pela análise de co-imunoprecipitação e de Western blot com o uso de anticorpo monoclonal anti-DDX3 de camundongo. Os resultados demonstraram que DDX3 foi co-imunoprecipitado com TRAIL-R2 tanto nas células precursoras não apoptóticas quanto nas resistentes (Figura 7). Houve um decréscimo de DDX3 dependente do tempo nas células sensíveis ao TRA-8, mas não nas células resistentes ao TRA-8 durante a apoptose. Além disso, pela análise de Western blot, um rápido decréscimo e clivagem do DDX3 associado ao TRAIL-R2 durante a apoptose induzida pelo TRA-8 foram observados. Isto indicou que a clivagem do DDX3 é dependente da caspase. Com base nestes resultados, a sequência de DDX3 foi escrutinada quanto aos sítios de clivagem potenciais no N-terminal, e um motivo de clivagem da caspase relativamente conservada DKSEDD (SEQ ID NO: 46) foi encontrado nos aminoácidos 129 a 135. É evidente que a clivagem ocorre no DISC e resulta em um elemento funcional crítico de DDX3 sendo liberado do TRAIL-R2. Os dados foram compatíveis com o último modelo, o que sugere que a caspase iniciada é rapidamente recrutada a TRAIL-R2 e cliva DDX3 facilmente. Além disso, FADD e caspase-8 se associam e recrutam a TRAIL-R2 para formar DISC, o que por sua vez leva à ativação da cascata de caspase correlacionada à clivagem de DDX3 associada a TRAIL-R2, e isto indica que, em certas circunstâncias, o DDX3 é essencial ao programa apoptótico, ilustrando que o DDX3 se associa com TRAIL-R2 envolveu a resistências à apoptose mediada pelo TRAIL-R2.

Região de interação do mapeamento de DDX3 com TRAIL-R2.

A fim de melhor se entender a regulação do DDX3 na transdução de sinal mediada pelo TRAIL-R2, a região de DDX3 aproximada que é requerida para ligar TRAIL-R2 foi determinada com o uso das células HEK293A que haviam sido transientemente transfectadas com mutantes de deleção de DDX3 codificando os plasmídeos (Figura 8A). A interação do DDX3 e TRAIL-R2 recombinantes foi determinada por co-imunoprecipitação com o uso de TRA-8. O DDX3 de comprimento completo, DDX3 Δ 201-662, ou DDX3 Δ 1-400 ligaram-se a TRAIL-R2. Entretanto, nem o DDX3 Δ 251-662 nem o DDX3 Δ 1-350 puderam ligar-se ao TRAIL-R2 (Figura 8A), e isto indica que DDX3 tem dois motivos de ligação em TRAIL-R2. Um é localizado no término N (aa 200-250); o outro é adjacente a aa 350-400. A análise de Western blot dos lisados das mesmas células confirmou a produção de quantidades comparáveis de DDX3 do tipo selvagem e fragmentos de deleção de DDX3, os quais excluem as diferenças na expressão protéica como uma explicação para estes resultados.

DDX3 é permanentemente associado com TRAIL-R2 e se correlaciona com o bloqueio do recrutamento de FADD nas células resistentes de TRA-8, indicando que o DDX3 associado ao TRAIL-R2 impede o recrutamento de FADD. Pode haver uma conexão entre DDX3 e FADD através de TRAIL-R2. Para testar se DDX3 e FADD compartilham um motivo de ligação comum no domínio da morte de TRAIL-R2 ou os dois motivos de ligação se acham próximos, de modo que o DDX3 pré-envolvido interfira com o recrutamento de FADD, a localização do domínio de ligação do DDX3 no TRAIL-R2 foi determinada. Os vetores codificando o TRAIL-R2 de comprimento completo, e uma série de deleções de domínios amino-terminais de TRAIL-R2, incluindo a deleção completa do domínio da morte, foram construídos (Figura 8B). Em uma abordagem análoga para avaliar a função do DDX3, e para excluir o TRAIL-R2 humano endógeno, uma linhagem celular de fibroblastos de murinos, NIH3T3, foi escolhida como a

célula hospedeira para a co-expressão do TRAIL-R2 e DDX3 humanos. As células 3T3 foram co-transfectadas com os plasmídeos codificando DDX3 rotulado de His e TRAIL-R2 de comprimento completo, DDX3 e uma série de mutantes de deleção de TRAIL-R2, e DDX3 isoladamente. A expressão do TRAIL-R2 da superfície celular foi examinada por citometria de fluxo usando-se o manchamento de TRA-8. Todas as células transfectadas apresentaram níveis similares de TRAIL-R2 da superfície celular (Figura 8B), indicando que a deleção do domínio intracelular não alterou o TRAIL-R2 da superfície celular. Além disso, todas as células transfectadas expressaram níveis semelhantes de DDX3 recombinante, como detectado pela análise de Western blot dos lisados celulares totais usando-se o anticorpo anti-6-his. A associação do DDX3 recombinante com os mutantes de deleção de TRAIL-R2 foi examinada por co-imunoprecipitação com TRA-8 e a análise de Western blot com o anticorpo anti-6-His (Figura 8B). A interação de TRAIL-R2 com DDX3 é independente do domínio da morte do TRAIL-R2. Para ainda definir o motivo de ligação de TRAIL-R2 mais precisamente, outros mutantes de deleção do TRAIL-R2, o D330, e o truncamento de TRAIL-R2 (T300-330) foram construídos (Figura 8C), cotransfectados com DDX3 nas células 3T3, e analisados quanto às suas interações. Os resultados demonstraram que DDX3 não se ligou ao domínio da morte de TRAIL-R2, mas, ao invés, a uma região próxima da membrana (aa 300-330) perto do domínio da morte (aa 340-aa 420) (Figura 8C). Isto indica que DDX3 pode desempenhar um papel diferente a partir das proteínas associadas ao domínio da morte previamente identificadas na sinalização de TRAIL-R2. Além disso, esta região é altamente homóloga com TRAIL-R1 e DcR2 (Figura 8D). Estes dados indicam que DDX3 é uma proteína adaptadora comum com membros da família do receptor da morte.

DDX3 contém CARD. A significância funcional do DDX3 na apoptose mediada por TRAIL-R2 foi a seguir pesquisada mediante análise da

propriedade específica desta molécula. Pelo menos duas RNA helicases da família protéica DEAD box foram recentemente identificadas, que contêm um domínio de recrutamento da caspase (CARD). O CARD, nestas RNA helicases, funciona como um regulador para a apoptose. Como o DDX3 desempenha um importante papel na regulação da apoptose mediada pelo TRAIL-R2, o DDX3, um membro das helicases da família protéica DEAD box, pode ter um CARD também, e a função do DDX3 inibidora da apoptose pode ser diretamente dependente do CARD. Assim sendo, a possibilidade de que o DDX3 seja uma proteína de CARD foi examinada. A análise de alinhamento de aminoácidos indica que DDX3 contém um motivo de ação conservado entre aa50 - aa 150, como o fazem o MDA5 e RIGI. O CARD é um motivo de interação homotípica. As proteínas contendo CARD podem interagir uma com a outra através deste domínio. Como DDX3 é uma nova helicase contendo CARD altamente conservado, ele é capaz de interagir com outras proteínas de CARD. cIAP1, uma proteína contendo CARD também, tem sido amplamente considerado como um inibidor da caspase e é recrutado ao TNFR1 e TNFR2 para regular a apoptose mediada pelo TNFR1. Se DDX3 é capaz de interagir com cIAP1 foi testado com o uso do anticorpo anti-DDX3 ou anti-TRAIL-R2 em uma experiência de co-imunoprecipitação. Foi determinado que o cIAP1 pode ser facilmente co-imunoprecipitado com DDX3 e com o complexo de TRAIL-R2 analisado por TRAIL-R2 co-imunoprecipitado e DDX3 co-imunoprecipitado tanto nas células precursoras não tratadas com TRA-8 quanto nas resistentes (Figura 8E). Entretanto, o cIAP1 foi rapidamente liberado do complexo de TRAIL-R2-DDX3, e isto se correlacionou com a clivagem de DDX3 nas células precursoras. Ao contrário, o nível de cIAP1 aumentou no complexo de TRAIL-R2-DDX3 nas células resistentes após o tratamento de TRA-8 (Figura 8E). Estes resultados indicam que o DDX3 pode servir como a ligação entre TRAIL-R2 e cIAP1.

Resistência inversa pelo DDX3 de reversão: Para estudar o

papel do DDX3 na sinalização do TRAIL-R2, a importância do DDX3 endógeno na apoptose induzida pelo TRA8 foi examinada. Como o DDX3 não decresceu nas células resistentes durante a apoptose induzida por TRA-8, um nível reduzido de expressão do DDX3 pode ser necessário para que as

5 células cancerosas sejam suscetíveis da apoptose. Uma estratégia de RNAi foi empregada para determinar o papel do DDX3 na resistência à apoptose mediada pelo TRAIL-R2. Uma ferramenta de esquema on-line, BLOCK-IT[®] RNAi Designer (Invitrogen), foi usada para identificar alvos de RNAi para DDX3. Cinco seqüências alvejadas de shRNA foram selecionadas dos alvos

10 de RNAi de classificação mais elevada 10 de topo e clonadas no vetor de entrada BLOCK-IT[®] U6. Células MDA231 resistentes ao TRA-8 foram transfectadas com cinco construções de RNAi, e os níveis de expressão protéica do DDX3 foram determinados pela análise de Western blot usando-se anticorpo monoclonal anti-DDX3 48 horas após a transfecção. Quatro das

15 cinco construções de RNAi testadas foram inibidores da expressão de DDX3 muito eficazes (mais de 50 % de redução) em comparação com os controles não transfectados ou transfectados com GFP (Figura 9A). A mais eficaz destas construções, a 2, foi selecionada para análise do efeito da reversão do DDX3 na apoptose mediada pelo TRA-8. Para se determinar se a reversão da

20 expressão de DDX3 inverte a suscetibilidade do TRA-8 nas células resistentes ao TRA-8, as células MDA231 resistentes ao TRA-8 foram cotransfectadas com o vetor RNAi (construção 2) e um vetor de expressão de GFP como um indicador das células transfectadas. 48 horas após a transfecção, o DDX3 foi co-imunoprecipitado com TRAIL-R2 e sondado com um anticorpo anti-

25 DDX3. Como esperado, a expressão do DDX3 foi significativamente reduzida em comparação com as células de controle (Figura 9B). As células positivas em GFP foram escolhidas e cultivadas com várias concentrações de TRA-8 durante a noite. Com o uso do ensaio de ATPLITE, as células MDA231 transfectadas com GFP e vetores de controle não sofreram de

apoptose após o tratamento de TRA-8, indicando que as células haviam conservado resistência ao TRA-8. No entanto, as células cotransfectadas com o RNAi de DDX3 e GFP apresentaram morte celular dependente da dose de TRA-8 (Figura 9C). Usando-se o mancha TUNEL, um número significativo de células de reversão de DDX3 foi observado estar experimentando apoptose (Figura 9D). Estes resultados indicam que a infra-regulação da expressão do DDX3 reverte a resistência ao TRA-8. Para ainda determinar o papel causal do DDX3 na apoptose mediada pelo TRAIL-R2, a expressão do DDX3 foi reduzida em um painel de células tumorais e sua suscetibilidade à apoptose induzida pelo TRA-8 analisada. O RNAi de DDX3 reduziu a quantidade de DDX3 endógeno e intensificou a apoptose induzida pelo TRA-8 no painel de células tumorais, incluindo algumas células resistentes espontâneas (Figuras 9E-F). Ao contrário, as células transfectadas com um oligonucleotídeo de controle apresentaram expressão de DDX3 normal e permaneceram resistentes à apoptose induzida pelo TRA-8 (Figuras 9E-F). Assim, o DDX3 é um componente crítico do aparelho de transdução de sinal do TRAIL-R2 e é essencial para a resistência à apoptose mediada pelo TRAIL-R2.

TRAIL-R2 sem a região de ligação a DDX3 é pró-apoptótico.

Para testar se o motivo de ligação a DDX3 representa um novo domínio regulador negativo modulando a função do domínio da morte do TRAIL-R2, a função de indução apoptótica do TRAIL-R2 mutante foi comparada ao TRAIL-R2 do tipo selvagem. As células transfectadas com TRAIL-R2 sem o domínio da morte pareceram não responder ao tratamento de TRA-8, mas as células transfectadas com TRAIL-R2 com um domínio de ligação de DDX3 truncado pareceram pró-apoptóticas apresentaram mais suscetibilidade à apoptose induzida pelo TRA-8 em comparação com as células transfectadas com TRAIL-R2 do tipo selvagem (Figura 10). Houve um efeito inibidor pronunciado do DDX3, que pôde suprimir a apoptose mediada pelo TRAIL-

R2. Estas descobertas indicam que o DDX3 é um mediador inibidor da apoptose induzida pelo TRAIL-R2.

DDX3 é uma proteína de CARD que regula a apoptose mediada pelo TRAIL-R2. Para dissecar a sinalização de TRAIL-R2-DDX3-cIAP1, a região necessária para sua ligação ao cIAP1 foi avaliada. Como o CARD se acha no término N do DDX3 e é suposto interagir com cIAP1, esta região pode ser responsável por ligar o cIAP1. As células HEK293A foram transfectadas com plasmídeos codificando DDX3, DDX3 Δ 51-662, DDX3 Δ 101-662, DDX3 Δ 151-662 ou DDX3 Δ 1-350. Tanto o DDX3 de comprimento completo quanto o deletado C-terminal foram capazes de co-
 5 imunoprecipitar cIAP1, o DDX3 com os primeiros 100 aminoácidos deletados foi incapaz de co-imunoprecipitar cIAP1 (Figura 11A). Estes resultados confirmam que o CARD N-terminal de DDX3 é responsável pelo recrutamento de cIAP1 para o complexo de TRAIL-R2. É igualmente
 10 indicado que o motivo de ligação do cIAP1 se acha localizado nos aminoácidos 50 a 100 do DDX3 em frente do sítio de clivagem, aminoácidos 129 a 135 (DKSDEDD; SEQ ID NO: 46). Se o DDX3 for clivado durante a apoptose mediada pelo TRAIL-R2, o fragmento N-terminal da combinação de DDX3 com cIAP1 deve ser desembaraçado do complexo de TRAIL-R2,
 15 dessa forma aliviando a inibição do cIAP1 para a sinalização da morte. Assim, o DDX3 é um candidato para acoplar o cIAP1 e os receptores da morte à resistência da apoptose.

Para ainda evidenciar este conceito, o DDX3 mutante negativo dominante carecendo dos aminoácidos 1 a 150 foi usado. Este DDX3 Δ CARD
 25 (DDX3 Δ 151-662) mutante falha ao interagir com cIAP1, mas é ainda capaz de ligar-se ao TRAIL-R2 (Figura 11B). Assim, se o DDX3 Δ 151-662 pode ser um inibidor negativo dominante do DDX3 endógeno mediante a competição com o DDX3 do tipo selvagem ligando-se ao TRAIL-R2, foi avaliado. Células de quatro tipos foram transfectadas com DDX3 Δ CARD. Como a

Figura 5B mostra, as células transfectadas com DDX3 Δ CARD apresentaram níveis mais elevados de expressão de DDX3 Δ CARD em comparação com DDX3 endógeno de comprimento completo, sugerindo que o DDX3 truncado seja capaz de competir com o DDX3 endógeno para ligação do TRAIL-R2.

5 Como a Figura 11B mostra, o cIAP1 foi co-imunoprecipitado com o DDX3 de comprimento completo, mas não com DDX3 Δ CARD, como analisado por TRAIL-R2-co-IP e sondado por Western blotting com anticorpo anti-DDX3 e anti-cIAP1. Além disso, a suscetibilidade das células transfectadas à apoptose mediada pelo TRA-8 foi examinada com o uso do ensaio de ATPLITE. A
10 expressão do DDX3 recombinante de comprimento completo não alterou a suscetibilidade à apoptose mediada pelo TRA-8 já que todas as células testadas permaneceram resistentes após o tratamento de TRA-8. Entretanto, as células tumorais resistentes ao TRA-8 que expressavam altos níveis de DDX3 Δ CARD recuperaram sua suscetibilidade à apoptose induzida pelo
15 TRA-8 após o cIAP1 associado ao TRAIL-R2 infra-regulado. Estes dados indicam que a inibição do cIAP1 à apoptose induzida por TRA-8 é mediada pelo CARD intacto do DDX3. O DDX3 desprovido do CARD N-terminal pode servir como um negativo dominante que reverte parcialmente a resistência ao TRA-8. A suscetibilidade potencial das células de câncer à
20 apoptose induzida por TRA-8 pode ser regulada pelo nível de DDX3 e cIAP1 no complexo associado ao TRAIL-R2.

O complexo de TRAIL-R2-DDX3-cIAP1 inibe a ativação da caspase-8. O DDX3 foi quantificado para se triar quais os níveis de DDX3 presentes nas células correlacionadas com o recrutamento e processamento da
25 caspase-8 no DISC de TRAIL-R2. As células precursoras e resistentes MDA231 e UL-3C foram tratadas com TRA-8 por quatro horas, e o TRAIL-R2 foi imunoprecipitado com um novo anticorpo monoclonal anti-TRAIL-R2 (clone: 2B4), que reconhece um epítipo de TRAIL-R2 diferente do TRA-8. O complexo de TRAIL-R2/DDX3/cIAP1 foi liberado das contas, e o DDX3 e

cIAP1 associados ao TRAIL-R2 foram submetidos ao imunomanchamento e à análise de ELISA de sanduíche usando-se anticorpo anti-DDX3 e anti-cIAP1. As placas de ELISA foram revestidas com anticorpo anti-TRAIL-R2 2B4 para capturar o TRAIL-R2 imunoprecipitado, e o DDX3 e cIAP1 foram medidos por anticorpos monoclonais específicos em relação a DDX3 (3E2) e cIAP1. O tratamento das células tumorais ou sensíveis precursoras ou resistentes induzidas, com TRA-8 não alterou os níveis protéicos de TRAIL-R2 (Figura 12A). Entretanto, os níveis de DDX3 associado a TRAIL-R2 foram significativamente alterados pelo tratamento de TRA-8 nas células tanto sensíveis quanto resistentes. Primeiro, as células resistentes não tratadas expressaram níveis de DDX3 associados a TRAIL-R2 mais elevados em comparação com as células sensíveis não tratadas, como detectado por anticorpo 3E2 anti-DDX3 (Figura 12B). De forma importante, após o tratamento de TRA-8, o DDX3 associado ao TRAIL-R2 foi aumentado significativamente nas células resistentes a TRA-8, mas demonstraram um decréscimo marcante nas células sensíveis. O nível de cIAP1 no complexo de TRAIL-R2 também foi alterado no mesmo padrão do DDX3 (Figura 12C). Estes resultados sugerem que o domínio CARD de DDX3 foi liberado por clivagem do complexo de TRAIL-R2 nas células sensíveis a TRA-8 durante a apoptose pela clivagem, ao passo que o DDX3 e o cIAP1 de fato foram recrutados mais eficientemente para o TRAIL-R2 após o estímulo do TRA-8 nas células resistentes, em vez de nas células sensíveis.

Para formar DISC funcional, é essencial para as células cancerosas liberarem cIAP1 do complexo de TRAIL-R2 para reduzir sua supressão à caspase durante a apoptose induzida por TRA-8. Este processo requer a clivagem do DDX3, indicando que esta etapa é importante para iniciar um circuito de amplificação da apoptose de alimentação. Tendo em vista que a resistência do DDX3 associado a TRAIL-R2, à clivagem, é correlacionada com uma deficiência de formação de DISC nas células

resistentes, a suscetibilidade à clivagem do DDX3 no complexo TRAIL-R2-DDX3-cIAP1 é diferente entre as células precursoras e as resistentes. O potencial de clivagem do DDX3 associado ao TRAIL-R2 por diferentes caspases foi analisado em ambas as células. O complexo de TRAIL-R2-DDX3-cIAP1 foi co-imunoprecipitado com anticorpo anti-TRAIL-R2. A fração eluída das contas foi incubada com as caspases-2 e -8 ativas. A clivagem do DDX3 foi detectada pela análise de Western com anticorpo anti-DDX3. Estes resultados na combinação com a análise de ELISA (Figura 12E) demonstrou que a clivagem de DDX3 pela caspase-8 nas células resistentes foi altamente atenuada em comparação com as células sensíveis, embora a caspase-2 apresentasse potencial de protease similar em ambas as células (Figura 12E). Estes resultados indicam que existe uma diferença funcional no complexo de DDX3 entre as células sensíveis ao TRA-8 e as resistentes. Isto também indica que a deficiência de clivagem do DDX3 pelas caspases iniciais associadas ao receptor da morte é uma etapa chave no desenvolvimento da resistência ao TRA-8.

Como a clivagem do DDX3 foi inibida nas células resistentes inibidas, promoveu-se um estudo para se determinar a etapa na sinalização da apoptose em que o DDX3 inibe a apoptose mediada pelo TRAIL-R2. O complexo de DDX3/cIAP1 foi previsto inibir a ativação da caspase-8; portanto, a ativação da caspase-8 no complexo de TRAIL-R2-DDX3-cIAP1 como um dos primeiros eventos detectáveis após a deflagração do receptor foi examinada. Para avaliar o efeito do complexo de TRAIL-R2-DDX3-cIAP1 sobre a ativação da caspase-8, a atividade da caspase foi medida com o uso do substrato fluorofênico, Ac-IETD-AMC, incubado com a caspase-8 ativa e frações eluídas de DDX3 co-IP das células sensíveis precursoras ou resistentes induzidas. Uma inibição dependente da dose da atividade da caspase-8 foi observada através de uma ampla faixa de diluições na fração eluída de TRAIL-R2 co-IP das células resistentes em comparação com as

células sensíveis. Além disso, o cIAP1 purificado também suprimiu a atividade de protease da caspase-8 completamente (Figura 12F). É plausível que o cIAP1 associado ao DDX3 seja um inibidor na ativação inicial da caspase-8, desse modo impedindo a clivagem do DDX3. Assim, estes dados
 5 forneceram evidência direta de que o DDX3-cIAP1 poderia regular a atividade da caspase-8 e indicam que DDX3-cIAP1 é um regulador específico da caspase-8 comprometida pelo TRAIL-R2.

O efeito do TRAIL-R2-DDX3-cIAP1 sobre a ativação da caspase-8 foi examinado por análise direta da caspase-8 inibida pelo cIAP1
 10 em combinação com a clivagem do DDX3 pelo ensaio da caspase, e mostrou que o DDX3-cIAP1 também funciona como um novo tipo de inibidor da caspase. O complexo de DDX3-cIAP1 é capaz de impedir os sinais pró-apoptóticos do receptor da morte mediante supressão da ativação da caspase-8, dessa forma inibindo a clivagem do DDX3 associado ao TRAIL-R2 pela
 15 caspase inicial. Este modelo mostra que o DDX3 protege as células contra a apoptose induzida pelo TRA-8 através do recrutamento do cIAP1, e contribui para o bloqueio das vias de sinalização da morte nas células de câncer.

EXEMPLO 3

REGULAÇÃO DA LIGAÇÃO DO DDX3 AO DR5 MEDIANTE A 20 FOSFORILAÇÃO DA SERINA EM UMA REGIÃO N-TERMINAL

A pesquisa da bioinformática conduz à identificação de um domínio rico em serina no DDX3 (SEQ ID NO: 20, correspondente aos aminoácidos 70 a 90 da SEQ ID NO: 26) que é conservado quanto a um substrato potencial de GSK3 (Figura 13A). Em comparação com a β -catenina
 25 e à glicogênio sintetase, que são os dois melhores substratos de GSK-3, o DDX3 tem cinco serinas sequenciais N-terminais ao sítio preparado. Existem várias linhas que apoiam a evidência de que o DDX3 é um substrato para GSK3: (1) o DDX3 é diretamente associado com GSK3 α como demonstrado por co-imunoprecipitação do DDX3 com GSK3 α , e o GSK3 é capaz de

fosforilar o DDX3 (Figura 13B); (2) o GSK3 falha em fosforilar o DDX3 com uma mutação pontual em Ser90 (Figura 13C). (3) O DDX3 mutante de Ser90 apresenta desassociação aumentada do DR5 e clivagem durante a apoptose mediada por TRA-8 (Figura 13D). Estes resultados mostram que o domínio rico em serina no N-terminal do DDX3 desempenha um papel regulador na associação do DDX3 com DR5.

A menos que de outra forma definido, todos os termos técnicos e científicos usados neste relatório têm os mesmos significados comumente entendidos por uma pessoa habilitada na técnica, ao qual o método e as composições apresentadas pertencem. Não obstante quaisquer métodos e materiais semelhantes ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser usados na prática ou nos testes dos presentes métodos e composições, os métodos, dispositivos e materiais particularmente úteis são conforme descritos. As publicações aqui citadas e os materiais quanto aos quais elas são citadas, são aqui especificamente incorporadas como referência. Nada aqui deve ser interpretado como uma admissão de que a presente invenção não esteja habilitada a antecipar tais apresentações em virtude de invenção anterior. Nenhuma admissão é feita de que qualquer referência constitua a técnica anterior. O exame das referências estabelece o que seus autores afirmam, e os requerentes se reservam o direito de objetar quanto a precisão e a pertinência dos documentos citados. Será claramente entendido que, embora várias publicações sejam aqui referidas, tal referência não constitui uma admissão de que qualquer destes documentos faz parte do conhecimento geral comum na técnica.

Na totalidade da descrição e das reivindicações deste relatório descritivo, a palavra “compreender” e variações desta palavra, tais como “compreendendo” e “compreende”, significam “incluindo, mas não limitando”, e não se destinam a excluir, por exemplo, outros aditivos, componentes, inteiros ou etapas.

Aqueles versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de apurar, o uso de não mais do que a experimentação de rotina, muitos equivalentes às formas de realização específicas dos métodos e composições aqui descritos. Pretende-se que tais equivalentes sejam abrangidos pelas reivindicações anexas.

REFERÊNCIAS

Akao, Y., Yoshida, H., Matsumoto, K., Matsui, T., Hogetu, K., Tanaka, N. e Usukura, J. (2003). *A tumour-associated DEAD-box protein, rck/p54 exhibits RNA unwinding activity toward c-myc RNAs in vitro*. *Genes Cells* 8, 671-676.

Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A., Thornberry, W. W. Wong, e J. Yuan. 1996. *Human ICE/CED-3 protease nomenclature*. *Cell* 87: 171.

Andrejeva, J., Childs, K. S., Young, D. F., Carlos, T. S., Stock, N., Goodbourn, S. e Randall, R. E. (2004). *The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, e inhibit its activation of the IFN-beta promoter*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17264-17269.

Ashhab, Y., A. Alian, A. Polliack, A. Panet e D. Ben Yehuda. 2001. *Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern*. *FEBS Lett* 495: 56-60.

Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D. A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A. E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I. L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokh, Z. e Schwall, R. H. *Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand*. *J Clin Invest* 1999; 104: 155-162.

Baldwin, A. S. 2001. *Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB*. *J Clin Invest* 107: 241-246.

Baldwin, A. S., Jr. 1996. *The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. Annu Rev Immunol* 14: 649-683.

Belka, C, B. Schmid, P. Marini, E. Durand, J. Rudner, H. Faltin, M. Bamberg, K. Schulze-Osthoff e W. Budach. 2001. *Sensitization of resistant lymphoma cells to irradiation-induced apoptosis by the death ligand TRAIL. Oncogene* 20: 2190-2196.

Bockbrader, K. M., Tan, M. e Sun, Y. (2005). *A small molecule Smac-mimic compound induces apoptosis and sensitizes TRAIL- and etoposide-induced apoptosis in breast cancer cells. Oncogene.*

10 Bodmer, J. L., N. Holler, S. Reynard, P. Vinciguerra, P. Schneider, P. Juo, J. Blenis e J. Tschopp. 2000. *TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. Nat Cell Biol* 2: 241-243.

Boldin, M. P., E. E. Varfolomeev, Z. Pancer, L. L. Mett, J. H. Camonis e D. Wallach. 1995. *A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. J Biol Chem* 270: 7795-7798.

Boldin, M. P., T. M. Goncharov, Y. V. Goltsev e D. Wallach. 1996. *Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. Cell* 85: 803-815.

20 Bonavida, B, Ng, C. P., Jazirehi, A., Schiller, G. e Mizutani, Y. *Selectivity of TRAIL- mediated apoptosis of cancer cells and synergy with drugs: the trail to non-toxic cancer therapeutics (review). Int J Oncol* 1999; 15: 793-802.

Buchsbaum, D. J., Zhou, T., Grizzle, W. E., Oliver, P. G., Hammond, C. J., Zhang, S., Carpenter, M. e LoBuglio, A. F. (2003). *Antitumor efficacy of TRA-8 anti-DR5 monoclonal antibody alone or in combination with chemotherapy and/or radiation therapy in a human breast cancer model. Clin Cancer Res* 9, 3731-3741.

Budihardjo, I., H. Oliver, M. Lutter, X. Luo e X. Wang. 1999.

Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annu Rev Cell Dev Biol 15: 269-290.

Carthy, C. M., Yanagawa, B., Luo, H., Granville, D. J., Yang, D., Cheung, P., Cheung, C., Esfandiarei, M., Rudin, C. M., Thompson, C. B.,
 5 Hunt, D. W. e McManus, B. M. *Bcl-2 and Bcl-xL overexpression inhibits cytochrome c release, activation of multiple caspases, and virus release following coxsackievirus B3 infection. Virology* 2003; 313: 147-157

Causevic, M., R. G. Hislop, N. M. Kernohan, F. A. Carey, R. A. Kay, R. J. Steele e F. V. Fuller-Pace. 2001. *Overexpression and poly-ubiquitylation of the DEAD-box RNA helicase p68 in colorectal tumours. Oncogene* 20: 7734-7743.

Chang, H. Y., H. Nishitoh, X. Yang, H. Ichijo e D. Baltimore. 1998. *Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. Science* 281: 1860-1863.

15 Chaudhary, P. M., M. Eby, A. Jasmin, A. Bookwalter, J. Murray e L. Hood. 1997. *Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. Immunity* 7: 821-830.

Chawla-Sarkar, M., Bae, S. I., Reu, F. J., Jacobs, B. S.,
 20 Lindner, D. J. e Borden, E. C. *Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. Cell Death Differ* 2004; 11: 915-923

Chen, C., L. C. Edelstein e C. Gelinas. 2000. *The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). Mol Cell Biol* 20: 2687-2695.

Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, M. Tewari e V. M. Dixit. 1995. *FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. Cell* 81: 505-512.

Chinnaiyan, A. M., Prasad, U., Shankar, S., Hamstra, D. A.,

Shanaiah, M., Chenevert, T. L., Ross, B. D. e Rehemtulla, A. *Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1754-1759.

5 Crook, N. E., R. J. Clem e L. K. Miller. 1993. *An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. J Virol* 67: 2168-2174.

Cuello, M., Ettenberg, S. A., Nau, M. M. e Lipkowitz, S. *Synergistic induction of apoptosis by the combination of trail and chemotherapy in chemoresistant ovarian cancer cells. Gynecol Oncol* 2001; 10 81: 380-390.

Cummins, J. M., Kohli, M., Rago, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. e Bunz, F. *X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is a nonredundant modulator of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human cancer cells. Cancer Res* 2004; 15 64: 3006-3008 Damiano, J. S. e J. C. Reed. 2004. *CARD proteins as therapeutic targets in cancer. Curr Drug Targets* 5: 367-374.

Degli-Esposti, M. A., W. C. Dougall, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, C. A. Smith e R. G. Goodwin. 1997. *The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. Immunity* 7: 813-820. 20

Desagher, S. e J. C. Martinou. 2000. *Mitochondria as the central control point of apoptosis. Trends Cell Biol* 10: 369-377.

Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S. e Reed, J. C. (1998). *IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. Embo J* 17, 2215-2223. 25

Deveraux, Q. L. e J. C. Reed. 1999. *IAP family proteins-suppressors of apoptosis. Genes Dev* 13: 239-252.

Deveraux, Q. L., R. Takahashi, G. S. Salvesen e J. C. Reed. 1997. *X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. Nature* 388: 300-304.

Dubey, P., Hendrickson, R. C., Meredith, S. C., Siegel, C. T.,
5 Shabanowitz, J., Skipper, J. C., Engelhard, V. H., Hunt, D. F. e Schreiber, H. (1997). *The immunodominant anti-gen of an ultraviolet-induced regressor tumor is generated by a somatic point mutation in the DEAD box helicase p68. J Exp Med* 185, 695-705.

Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn,
10 S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E. R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R. A., James, I. E., Rosenberg, M., Lee, J. C. e Young, P. R. *Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. J Biol Chem* 1998; 273: 14363-14367.

Fesik, S. W. 2000. *Insights into programmed cell death*
15 *through structural biology. Cell* 103: 273-282.

Fu, J. J., L. Y. Li e G. X. Lu. 2002. *Molecular cloning and characterization of human DDX36 and mouse Ddx36 genes, new members of the DEAD/H box superfamily. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 34: 655-661.

Fulda, S., Meyer, E. e Debatin, K. M. *Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. Oncogene* 2002; 21: 2283-2294

Fulda, S., E. Meyer, C. Friesen, S. A. Susin, G. Kroemer e K. M. Debatin. 2001. *Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis. Oncogene* 20: 1063-1075.

George, R. E., R. M. Kenyon, A. G. McGuckin, A. J. Malcolm, A. D. Pearson e J. Lunec. 1996. *Investigation of co-amplification of the candidate genes ornithine decarboxylase, ribonucleotide reductase, syndecan-1 and a DEAD box gene, DDX1, with N-myc in neuroblastoma. United Kingdom Children's Cancer Study Group. Oncogene* 12: 1583-1587.

Gliniak, B. e Le, T. *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand's antitumor activity in vivo is enhanced by the chemotherapeutic agent CPT-11*. *Cancer Res* 1999; 59: 6153-6158.

Godbout, R., M. Packer e W. Bie. 1998. *Overexpression of a DEAD box protein (DDX1) in neuroblastoma and retinoblastoma cell lines*. *J Biol Chem* 273: 21161- 21168.

Green, A. M. e N. D. Steinmetz. 2002. *Monitoring apoptosis in real time*. *Cancer J* 8: 82-92.

Green, D. R. 1998. *Apoptotic pathways: the roads to ruin*. *Cell* 94: 695-698.

Green, D. R. 2000. *Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors*. *Cell* 102: 1-4.

Griffith, T. S., Rauch, C. T., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Lynch, D. H., Smith, C. A., Goodwin, R. G. e Kubin, M. Z. *Functional analysis of TRAIL receptors using monoclonal antibodies*. *J Immunol* 1999; 162: 2597-2605.

Grimm, S., B. Z. Stanger e P. Leder. 1996. *RIP and FADD: two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10923-10927.

Hashimoto, K., Y. Nakagawa, H. Morikawa, M. Niki, Y. Egashira, I. Hirata, K. Katsu e Y. Akao. 2001. *Co-overexpression of DEAD box protein rck/p54 and c-myc protein in human colorectal adenomas and the relevance of their expression in cultured cell lines*. *Carcinogenesis* 22: 1965-1970.

Heim, M. H. (2005). *RIG-I: an essential regulator of virus-induced interferon production*. *J Hepatol* 42, 431-433.

Heinlein, U. A. 1998. *Dead box for the living*. *J Pathol* 184: 345-347.

Hernandez, A., Q. D. Wang, S. A. Schwartz e B. M. Evers.

2001. *Sensitization of human colon cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis. J Gastrointest Surg* 5: 56-65.

Hinz, S., Trauzold, A., Boenicke, L., Sandberg, C., Beckmann, S., Bayer, E., Walczak, H., Kalthoff, H. e Ungefroren, H. *Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. Oncogene* 2000; 19: 5477-5486

Ichijo, H. 1998. [Molecular mechanisms for cell life and cell death]. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 65: 155-163.

Ichijo, H., E. Nishida, K. Irie, P. ten Dijke, M. Saitoh, T. Moriguchi, M. Takagi, K. Matsumoto, K. Miyazono e Y. Gotoh. 1997. *Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. Science* 275: 90-94.

Ichikawa, K., W. Liu, L. Zhao, Z. Wang, D. Liu, T. Ohtsuka, H. Zhang, J. D. Mountz, W. J. Koopman, R. P. Kimberly e T. Zhou. 2001. *Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. Nat Med* 7: 954-960.

Ichikawa, K., W. Liu, M. Fleck, H. Zhang, L. Zhao, T. Ohtsuka, Z. Wang, D. Liu, J. D. Mountz, M. Ohtsuki, W. J. Koopman, R. Kimberly e T. Zhou. 2003. *TRAIL-R2 (DR5) mediates apoptosis of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. J Immunol* 171: 1061-1069.

Ip, Y. T. e R. J. Davis. 1998. *Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development. Curr Opin Cell Biol* 10: 205-219.

Irmeler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French e J. Tschopp. 1997. *Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. Nature* 388: 190-195.

Jo, M., T. H. Kim, D. W. Seol, J. E. Esplen, K. Dorko, T. R. Billiar e S. C. Strom. 2000. *Apoptosis induced in normal human hepatocytes*

by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 6: 564-567.

Kang, D. C., R. V. Gopalkrishnan, L. Lin, A. Randolph, K. Valerie, S. Pestka e P. B. Fisher. 2004. *Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene. Oncogene* 23: 1789-1800.

Kang, D. C., R. V. Gopalkrishnan, Q. Wu, E. Jankowsky, A. M. Pyle e P. B. Fisher. 2002. *mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 637-642.

Kasof, G. M. e B. C. Gomes. 2001. *Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. J Biol Chem* 276: 3238-3246.

Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O. e Akira, S. (2005). *IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. Nat Immunol* 6, 981-988.

Keane, M. M., Ettenberg, S. A., Nau, M. M., Russell, E. K. e Lipkowitz, S. *Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. Cancer Res* 1999; 59: 734-741.

Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, A. Chuntharapai, P. Schow, K. J. Kim e A. Ashkenazi. 2000. *Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. Immunity* 12: 611-620.

Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, A. Tinel, H. LeBlanc, A. Virmani, P. Schow, A. Gazdar, J. Blenis, D. Arnott e A. Ashkenazi. 2001. *Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. J Biol Chem* 276: 46639-46646.

Krammer, P. H. 2000. *CD95's deadly mission in the immune*

system. *Nature* 407: 789-795.

Krueger, A., I. Schmitz, S. Baumann, P. H. Krammer e S. Kirchhoff. 2001. *Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex*. *J Biol Chem* 276: 20633-20640.

Krueger, A., S. Baumann, P. H. Krammer e S. Kirchhoff. 2001. *FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis*. *Mol Cell Biol* 21: 8247-8254.

Kuang, A. A., G. E. Diehl, J. Zhang A. Winoto. 2000. *FADD is required for DR4- and DR5-mediated apoptosis: lack of trail-induced apoptosis in FADD-deficient mouse embryonic fibroblasts*. *J Biol Chem* 275: 25065-25068.

Lassus, P., X. Opitz-Araya e Y. Lazebnik. 2002. *Requirement for caspase-2 in stress- induced apoptosis before mitochondrial permeabilization*. *Science* 297: 1352-1354.

Lawrence, D., Z. Shahrokh, S. Marsters, K. Achilles, D. Shih, B. Mounho, K. Hillan, K. Totpal, L. DeForge, P. Schow, J. Hooley, S. Sherwood, R. Pai, S. Leung, L. Khan, B. Gliniak, J. Bussiere, C. A. Smith, S. S. Strom, S. Kelley, J. A. Fox, D. Thomas e A. Ashkenazi. 2001. *Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions*. *Nat Med* 7: 383-385.

LeBlanc, H., Lawrence, D., Varfolomeev, E., Totpal, K., Morlan, J., Schow, P., Fong, S., Schwall, R., Sinicropi, D. e Ashkenazi, A. *Tumor-cell resistance to death receptor-induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax*. *Nat Med* 2002;8:274-281.

Li, L., Thomas, R. M., Suzuki, H., De Brabander, J. K., Wang, X. e Harran, P. G. (2004). *A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNFalpha-mediated cell death*. *Science* 305, 1471-1474.

Lin, Y., A. Devin, A. Cook, M. M. Keane, M. Kelliher, S. Lipkowitz e Z. G. Liu. 2000. *The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of IkappaB kinase and c-Jun N-terminal kinase. Mol Cell Biol* 20: 6638-6645.

5 MacFarlane, M., M. Ahmad, S. M. Srinivasula, T. Fernandes-Alnemri, G. M. Cohen e E. S. Alnemri. 1997. *Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. J Biol Chem* 272: 25417-25420.

10 Marsters, S. A., J. P. Sheridan, R. M. Pitti, A. Huang, M. Skubatch, D. Baldwin, J. Yuan, A. Gurney, A. D. Goddard, P. Godowski e A. Ashkenazi. 1997. *A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. Curr Biol* 7: 1003-1006.

15 Matsuzaki, H., Schmied, B. M., Ulrich, A., Standop, J., Schneider, M. B., Batra, S. K., Picha, K. S. e Pour, P. M. *Combination of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and actinomycin D induces apoptosis even in TRAIL-resistant human pancreatic cancer cells. Clin Cancer Res* 2001; 7: 407-414.

20 McCarthy, J. V., J. Ni e V. M. Dixit. 1998. *RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. J Biol Chem* 273: 16968-16975.

Mitsiades, C. S., S. P. Treon, N. Mitsiades, Y. Shima, P. Richardson, R. Schlossman, T. Hideshima e K. C. Anderson. 2001. *TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. Blood* 98: 795-804.

25 Mitsiades, N., C. S. Mitsiades, V. Poulaki, K. C. Anderson e S. P. Treon. 2002. *Intracellular regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human multiple myeloma cells. Blood* 99: 2162-2171.

Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, F. C. Kischkel, K. O'Rourke,

A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, J. D. Bretz, M. Zhang, R. Gentz, M. Mann, P. H. Krammer, M. E. Peter e V. M. Dixit. 1996. *FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex*. Cell 85: 817-827.

5 Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. Cell 88: 355-365.

Ng, C. P. e Bonavida, B. *X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) blocks Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of prostate cancer cells in the presence of mitochondrial activation: sensitization by overexpression of second*
 10 *mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP- binding protein with low pl (Smac/DIABLO)*. Mol Cancer Ther 2002; 1: 1051-1058

Nicholson, D. W. (2000). *From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents*. Nature 407, 810-816.

Nishitoh, H., M. Saitoh, Y. Mochida, K. Takeda, H. Nakano,
 15 M. Rothe, K. Miyazono e H. Ichijo. 1998. *ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2*. Mol Cell 2: 389-395.

Ohtsuka, T. e T. Zhou. 2002. *Bisindolylmaleimide VIII enhances DR5-mediated apoptosis through the MKK4/JNK/p38 kinase and the mitochondrial pathways*. J Biol Chem 277: 29294-29303.

20 Ohtsuka, T., D. Buchsbaum, P. Oliver, S. Makhija, R. Kimberly e T. Zhou. 2003. *Synergistic induction of tumor cell apoptosis by death receptor antibody and chemotherapy agent through JNK/p38 and mitochondrial death pathway*. Oncogene 22: 2034-2044.

Owsianka, A. M. e A. H. Patel. 1999. *Hepatitis C virus core protein interacts with a human DEAD box protein DDX3*. Virology 257: 330-
 25 340. Pan, G., J. Ni, Y. F. Wei, G. Yu, R. Gentz e V. M. Dixit. 1997. *An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL*. Science 277: 815-818.

Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M., Gentz, R., Ebner,

R., Ni, J. e Dixit, V. M. (1997). *The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. Science* 276, 111-113.

Park, S. Y., Billiar, T. R. e Seol, D. W. *IFN-gamma inhibition of TRAIL-induced IAP-2 upregulation, a possible mechanism of IFN-gamma-enhanced TRAIL-induced apoptosis. Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 233-236

Payan e Y. Luo. 1999. *Identification of RIP3, a RIP-like kinase that activates apoptosis and NFkappaB. Curr Biol* 9: 539-542.

Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A. e Ashkenazi, A. (1996). *Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. J Biol Chem* 271, 12687-12690.

Roa, W. H., Chen, H., Fulton, D., Gulavita, S., Shaw, A., Th'ng, J., Farr- Jones, M., Moore, R. e Petruk, K. *X-linked inhibitor regulating TRAIL-induced apoptosis in chemoresistant human primary glioblastoma cells. Clin Invest Med* 2003; 26: 231-242

Rokhlin, O. W., Guseva, N., Tagiyev, A., Knudson, C. M. e Cohen, M. B. *Bcl-2 oncoprotein protects the human prostatic carcinoma cell line PC3 from TRAIL-mediated apoptosis. Oncogene* 2001; 20: 2836-2843

Saleh, A., S. M. Srinivasula, S. Acharya, R. Fishel e E. S. Alnemri. 1999. *Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. J Biol Chem* 274: 17941-17945.

Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer e M. E. Peter. 1998. *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. Embo J* 17: 1675-1687.

Schneider, P., J. L. Bodmer, M. Thome, K. Hofmann, N. Holler e J. Tschopp. 1997. *Characterization of two receptors for TRAIL. FEBS Lett* 416: 329-334.

Schneider, P., M. Thome, K. Burns, J. L. Bodmer, K.

Hofmann, T. Kataoka, N. Holler e J. Tschopp. 1997. *TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. Immunity* 7:831-836.

Sheridan, J. P., S. A. Marsters, R. M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C. L. Gray, K. Baker, W. I. Wood, A. D. Goddard, P. Godowski e A. Ashkenazi. 1997. *Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. Science* 277: 818-821.

Sinicrope, F. A., Penington, R. C. e Tang, X. M. *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis is inhibited by Bcl-2 but restored by the small molecule Bcl-2 inhibitor, HA 14-1, in human colon cancer cells. Clin Cancer Res* 2004; 10: 8284-8292

Sprick, M. R., M. A. Weigand, E. Rieser, C. T. Rauch, P. Juo, J. Blenis, P. H. Krammer e H. Walczak. 2000. *FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. Immunity* 12: 599-609.

Stanger, B. Z., P. Leder, T. H. Lee, E. Kim e B. Seed. 1995. *RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. Cell* 81: 513-523.

Sun, S. Y., Yue, P., Hong, W. K. e Lotan, R. *Augmentation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by the synthetic retinoid 6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid (CD437) through up-regulation of TRAIL receptors in human lung cancer cells. Cancer Res* 2000; 60: 7149-7155.

Suzuki, Y., Y. Nakabayashi, K. Nakata, J. C. Reed e R. Takahashi. 2001. *X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. J Biol Chem* 276: 27058-27063.

Ting, A. T., F. X. Pimentel-Muinos e B. Seed. 1996. *RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not*

Fas/APO-1-initiated apoptosis. Embo J 15: 6189-6196.

Toshiaki Ohtsuka, Buchsbaum, D., Patsy Oliver, Sharmila Makhija, Robert Kimberly e Tong Zhou *Synergistic Induction of Tumor Cell Apoptosis by Death Receptor Antibody and Chemotherapy Agent Through*
 5 *JNK/p38 and Mitochondrial Death Pathway. Oncogene* 2003; no prelo

Tournier, C., P. Hess, D. D. Yang, J. Xu, T. K. Turner, A. Nimnual, D. Bar-Sagi, S. N. Jones, R. A. Flavell e R. J. Davis. 2000. *Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. Science* 288: 870-874.

10 Vucic, D., H. R. Stennicke, M. T. Pisabarro, G. S. Salvesen e V. M. Dixit. 2000. *ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. Curr Biol* 10: 1359-1366.

Wagner, K. W., Engels, I. H. e Deveraux, Q. L. *Caspase-2 can function upstream of bid cleavage in the TRAIL apoptosis pathway. J Biol*
 15 *Chem* 2004; 279: 35047-35052

Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R. G., Rauch, C. T., Schuh, J. C. e Lynch, D. H. *Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo.*
 20 *Nat Med* 1999; 5: 157-163.

Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Timour, M. S., Gerhart, M. J., Schooley, K. A., Smith, C. A. *et al.* (1997). *TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. Embo J* 16, 5386-5397.

25 Walczak, H., M. A. Degli-Esposti, R. S. Johnson, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, M. S. Timour, M. J. Gerhart, K. A. Schooley, C. A. Smith, R. G. Goodwin e C. T. Rauch. 1997. *TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. Embo J* 16: 5386-5397.

Wang, C. Y., D. C. Guttridge, M. W. Mayo e A. S. Baldwin,

Jr. 1999. *NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue Al/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. Mol Cell Biol* 19: 5923-5929.

Wieland, I., Ropke, A., Stumm, M., Sell, C., Weidle, U. H. e
 5 Wieacker, P. F. (2000). *Molecular characterization of the DICE1 (DDX26) tumor suppressor gene in lung carcinoma cells. Oncol Res* 12, 491-500.

Wiley, S. R., K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C. P.
 Huang, J. K. Nicholl, G. R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch, C. A. Smith,
et al. 1995. *Identification and characterization of a new member of the TNF*
 10 *family that induces apoptosis. Immunity* 3: 673-682.

Yamanaka, T., K. Shiraki, K. Sugimoto, T. Ito, K. Fujikawa,
 M. Ito, K. Takase, M. Moriyama, T. Nakano e A. Suzuki. 2000.
Chemotherapeutic agents augment TRAIL-induced apoptosis in human
hepatocellular carcinoma cell lines. Hepatology 32: 482-490.

15 Yang, X., R. Khosravi-Far, H. Y. Chang e D. Baltimore. 1997.
Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. Cell 89:
 1067-1076.

Yang, Y. L. e Li, X. M. (2000). *The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. Cell Res* 10, 169-177.

20 Yedavalli, V. S., Neuveut, C., Chi, Y. H., Kleiman, L. e Jeang, K. T. (2004) *Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-I Rev-RRE export function. Cell* 119, 381-392.

Yoneyama, M. e Fujita, T. (2004). [*RIG-I: critical regulator for virus-induced innate immunity*]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 49, 2571-
 25 2578.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T.,
 Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y. M., Gale, M., Jr., Akira, S. *et al.*
 (2005). *Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. J Immunol* 175, 2851-2858.

Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira e T. Fujita. 2004. *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. Nat Immunol* 5: 730-737.

5 Zhou, T., J. D. Mountz e R. P. Kimberly. 2002. *Immunobiology of tumor necrosis factor receptor superfamily. Immunol Res* 26: 323-336.

 Zhou, T., L. Song, P. Yang, Z. Wang, D. Lui e R. S. Jope. 1999. *Bisindolylmaleimide VIII facilitates Fas-mediated apoptosis and inhibits T cell-mediated autoimmune diseases. Nat Med* 5: 42-48.

10

 Zhu, N., Ware, C. F. e Lai, M. M. (2001). *Hepatitis C virus core protein enhances FADD-mediated apoptosis and suppresses TRADD signaling of tumor necrosis factor receptor. Virology* 283, 178-187.

 Zong, W. X., L. C. Edelstein, C. Chen, J. Bash e C. Gelinas. 1999. *The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. Genes Dev* 13: 382-387.

15

 Zou, H., Y. Li, X. Liu e X. Wang. 1999. *An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. J Biol Chem* 274: 11549-11556.

20

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

```

<110> THE UAB RESEARCH FOUNDATION
      ZHOU, Tong
      KIMPERLY, Robert P.

<120> AGENTES E MÉTODOS RELACIONADOS À REDUÇÃO DA
      RESISTÊNCIA AOS AGONISTAS DO RECEPTOR DA MORTE
      INDUTORES DA APOPTOSE

<130> 21085.0132p1

<160> 46

<170> FastSEQ para Windows Versão 4.0

<210> 1
<211> 17
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 1
His Val Ile Asn Phe Asp Leu Pro Ser Asp Ile Glu Glu Tyr Val His
 1           5           10           15
Arg

<210> 2
<211> 13
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 2
Asp Phe Leu Asp Glu Tyr Ile Phe Leu Ala Val Gly Arg
 1           5           10

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 3
Asp Leu Leu Asp Leu Leu Val Glu Ala Lys
 1           5           10

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

```

<400> 4
 Ser Phe Leu Leu Asp Leu Leu Asn Ala Thr Gly Lys
 1 5 10

<210> 5
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 5
 Thr Ala Ala Phe Leu Leu Pro Ile Leu Ser Gln Ile Tyr Ser Asp Gly
 1 5 10 15
 Pro Gly Glu Ala Leu Arg
 20

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 6
 Gln Tyr Pro Ile Ser Leu Val Leu Ala Pro Thr
 1 5 10

<210> 7
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 7
 Asp Glu Asp Asp
 1

<210> 8
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 8
 caccaagctt gcgctatatt cctcctcatt tcgaaaaatg aggaggaata tagcgctcg 60
 ag 62

<210> 9
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 9
 caccggagaa attatcatgg gaaaccgaag ttcccatga taatttctcc 50

<210> 10
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 10
 caccggagaa attatcatgg gaaaccgaag ttcccatga taatttctcc 50

<210> 11
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 11
 aaaaggagaa attatcatgg gaaacttcgg ttcccatga taatttctcc 50

<210> 12
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 12
 caccgccaag tgatattgaa gaataaacgt attcttcaat atcacttggc 50

<210> 13
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 13
 aaaagccaag tgatattgaa gaatacgttt attcttcaat atcacttggc 50

<210> 14
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 14
 caccgtttc cagcgggtat attagcgaac taatataccc gctggaaagc 50

<210> 15
 <211> 50
 <212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição da Seqüência Artificial; nota = construção sintética

<400> 15

aaaagctttc cagcgggtat attagttcgc taatataccc gctggaaagc 50

<210> 16

<211> 50

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição da Seqüência Artificial; nota = construção sintética

<400> 16

caccgctgat cggatggttg atatggaac atatccaaca tccgatcagc 50

<210> 17

<211> 50

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição da Seqüência Artificial; nota = construção sintética

<400> 17

aaaagctgat cggatggttg atatgttcgc atatccaaca tccgatcagc 50

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição da Seqüência Artificial; nota = construção sintética

<400> 18

Ser	Gly	Ile	His	Ser	Gly	Ala	Thr	Thr	Thr	Ala	Pro	Ser
1				5					10			

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição da Seqüência Artificial; nota = construção sintética

<400> 19

Ser	Val	Pro	Pro	Ser	Pro	Ser	Gly	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Pro	Gln	Ser
1				5					10					15	

(Ser

<210> 20

<211> 21

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição da Seqüência Artificial; nota = construção sintética

<400> 20

Ser Ser Phe Gly Ser Arg Ser Asp Ser Arg Gly Lys Ser Ser Phe Phe
 1 5 10 15
 Ser Asp Arg Gly Ser
 20

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 21

Asp Glu Ala Asp
 1

<210> 22

<211> 440

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 22

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 Leu
 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 Val Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu
 65 70 75 80
 Cys Pro Pro Gly 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 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
 Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val Asn Met Leu Ser
 290 295 300

```

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

```

<210> 23
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

```

<400> 23
Gly Gly Gly Gly Asp Pro Glu Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro
1          5          10          15
Gly Ala Glu Asp Asn Val Leu Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro
20        25        30
Thr Gln Val Pro Glu Gln Glu Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro
35        40        45
Thr Gly Val Asn Met Leu Ser Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu
50        55        60
Pro Ala Glu Ala Glu Arg Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala
65        70        75        80
Asn Gly Asp Pro Thr Glu Thr Leu Arg Gln
          85          90

```

<210> 24
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

```

<400> 24
Gln Pro Thr Gln Val Pro Glu Gln Glu Met Glu Val Gln Glu Pro Ala
1          5          10          15
Glu Pro Thr Gly Val Asn Met Leu Ser Pro Gly Glu Ser Glu
20        25        30

```

<210> 25
 <211> 3408
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 25

ctttccctt	actcegetcc	cctcttttcc	ctccctctcc	tcccttccc	tctgttctct	60
cctctcttc	ccctccctc	ccccgtccg	ggcactctat	attcaagcca	ccgtttctctg	120
cttcacaaa	tggccacgc	acgcgacacc	tacggtcacg	tggcctgccg	ccctctcagt	180
ttcgggaatc	tgcctagctc	ccactaagg	gaggtctacc	gcggaagagc	gagggcagat	240
tagaccggag	aaatccacc	acatctccaa	gcccgggaac	tgagagagga	agaagagtga	300
aggccagtgt	taggaaaaa	aaaaacaaa	acaaaaaaa	cgaaaaacga	aagctgagtg	360
catagagtgt	gaaaggggag	cgaatgcgta	agggttgaaa	ggggggcgaa	gaggcctagg	420
ttaacatttt	caggcgtctt	agccggtgga	aagcgggaga	cgcaagttct	cgcgagatct	480
cgagaactcc	gaggctgaga	ctagggtttt	agcggagagc	acgggaagtg	tagctcgaga	540
gaactgggac	agcatttcgc	accctaagct	ccaaggcagg	actgctaggg	gcgacaggac	600
taagtgaata	atcccttgag	cttagacctg	agggagcgcg	cagtagccgg	gcagaagtcg	660
ccgcgacagg	gaattgcggt	gtgagagggg	gggcacacgt	tgtacgtgct	gacgtagccg	720
gctttccagc	gggtatatta	gatccgtggc	cgcgcggtgc	gctccagagc	cgagttcttc	780
ccgtgagagg	gccttcgcgg	tggaaacaa	actcgcttag	cagcgggaag	ctccgagttc	840
tccgtactct	tcagggatga	gtcatgtggc	agtggaaaat	gcgctcgggc	tggaccagca	900
gtttgcgtgg	ctagacctga	actcttcaga	taatcagagt	ggaggaagta	cagccagcaa	960

agggcgctat	attcctctcc	atttaaggaa	ccgagaagct	actagagggt	tctacgataa	1020
agacagttca	gggtggagtt	ctagcaaaga	taaggatgcg	tatagcagtt	ttggatctcg	1080
tagtgattca	agagggaggt	ctagcttctt	cagtgatcgt	ggaagtggat	caaggggaag	1140
gtttgatgat	cgtggacgga	gtgattacga	tggcattggc	agccgtggtg	acagaagtgg	1200
ctttggcaaa	tttgaacgtg	gtggaaacag	tcgctggtgt	gacaaatcag	atgaagatga	1260
ttggtcaaaa	ccactccacc	caagtgaacg	cttggaaacg	gaactctttt	ctggaggcaa	1320
cactgggatt	aattttgaga	aatacgatga	cattccagtt	gaggcaacag	gcaacaactg	1380
tcctccacat	attgaaagtt	tcagtgatgt	tgagatggga	gaaattatca	tgggaaacat	1440
tgagcttact	cgttatactc	gcccaactcc	agtgcaaaag	catgctattc	ctattatcaa	1500
agagaaaaga	gacttgatgg	cttgtgcccc	aacagggtct	ggaaaaactg	cagcatttct	1560
gttgcccatc	ttgagtcaga	tttattcaga	tgggtccaggc	gaggctttga	gggccatgaa	1620
ggaaaaatgga	aggatatggc	gccgcaaaca	ataccocaatc	tccttggtat	tagcaccaac	1680
gagagagttg	gcagtacaga	tctacgaaga	agccagaaaa	ttttcatacc	gatctagagt	1740
tcgtccctgc	gtggtttatg	gtggtgccga	tatttggtcag	cagattccag	acttggaaacg	1800
tggatgccat	ttgttagtag	ccactccagg	acgtctagtg	gatatgatgg	aaagaggaaa	1860
gattggatta	gacttttgca	aatacttggg	gttagatgaa	gctgatccga	tgttggatat	1920
gggggtttgag	cctcagattc	gtagaatagt	cgaacaagat	actatgcctc	caaagggtgt	1980
ccgccacagt	atgatgttta	gtgctacttt	tcctaaggaa	atacagatgc	tggctcgtga	2040
tttcttagat	gaatatatct	tcctggctgt	aggaagagtt	ggctctacct	ctgaaaacat	2100
cacacagaaa	gtagtttggg	tggagaatc	agacaaacgg	tcatttctgc	ttgacctcct	2160
aaatgcaaca	ggcaaggatt	cactgacctt	agtgtttgtg	gagacaaaa	aggggtgcaga	2220
ttctctggag	gatttcttat	accatgaagg	atacgcagtg	accagcatcc	atggagaccg	2280
ttctcagagg	gatagagaag	aggcccttca	ccagttccgc	tcaggaaaaa	gcccaatttt	2340
agtggctaca	gcagtacgag	caagaggact	ggacatttca	aatgtgaaac	atgttatcaa	2400
ttttgacttg	ccaagtgata	ttgaagaata	tgtacatcgt	attggtcgta	cgggacgtgt	2460
agggaaacctt	ggcctggcaa	cctcattctt	taacgagagg	aacataaata	ttactaagga	2520
tttgttggat	cttcttgttg	aagctaaaca	agaagtgcg	tccttggttag	aaaacatggc	2580
ttatgaacac	cactacaagg	gtagcagtcg	tggacgttct	aagagttagca	gatttagtgg	2640
aggggtttggt	gccagagact	accgacaaag	tagcgggtgcc	agcagttcca	gcttcagcag	2700
cagccgcgca	agcagcagcc	gcagtggcgg	aggtggccac	ggtagcagca	gaggattttg	2760
tggaggtggc	tatggagggt	tttacaacag	tgatggatat	ggaggaaatt	ataactccca	2820
gggggttgac	tgggtgggta	actgagcctg	ctttgcagta	ggtcaccttg	ccaaacacgc	2880
taatatggaa	accacatgta	acttagccag	actatacctt	gtgtagtttc	aagaactcgc	2940
agtacattac	cagctgtgat	tctccactga	aatttttttt	ttaagggagc	tcaaggtcac	3000
aagaagaaat	gaaaggaaca	atcagcagcc	ctgttcagaa	ggatcatgct	catctgtgga	3060
gcaagtgcgc	ccatgaaatg	ccatattttg	tgaagaaagt	gcatgcagga	atattcaggg	3120
agtccagcat	gtagtcatgg	cagccttagg	tatttgagac	cgaccaaccc	tcctgatgaa	3180
gacaaccata	actcatgcag	aacttggagc	gtgatccca	gaagtgtgtg	aactggtctg	3240
tgaccacaaa	gatgagaacc	gcatgctgag	attggtggaa	tggagatttc	agtgagccta	3300
catgcagatg	acatgggtgac	acccgtgcc	agcctgagct	gttttcttct	ggccctctta	3360
ttacatgaga	aaaataaaca	cctatgcacc	ttggcctcaa	aaaaaaaa		3408

<210> 26

<211> 662

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 26

Met Ser His Val Ala Val Glu Asn Ala Leu Gly Leu Asp Gln Gln Phe
 1 5 10 15
 Ala Gly Leu Asp Leu Asn Ser Ser Asp Asn Gln Ser Gly Gly Ser Thr
 20 25 30
 Ala Ser Lys Gly Arg Tyr Ile Pro His Leu Arg Asn Arg Glu Ala
 35 40 45
 Thr Arg Gly Phe Tyr Asp Lys Asp Ser Ser Gly Trp Ser Ser Ser Lys
 50 55 60
 Asp Lys Asp Ala Tyr Ser Ser Phe Gly Ser Arg Ser Asp Ser Arg Gly
 65 70 75 80
 Lys Ser Ser Phe Phe Ser Asp Arg Gly Ser Gly Ser Arg Gly Arg Phe
 85 90 95
 Asp Asp Arg Gly Arg Ser Asp Tyr Asp Gly Ile Gly Ser Arg Gly Asp
 100 105 110
 Arg Ser Gly Phe Gly Lys Phe Glu Arg Gly Gly Asn Ser Arg Trp Cys
 115 120 125
 Asp Lys Ser Asp Glu Asp Asp Trp Ser Lys Pro Leu Pro Pro Ser Glu
 130 135 140
 Arg Leu Glu Gln Glu Leu Phe Ser Gly Gly Asn Thr Gly Ile Asn Phe
 145 150 155 160
 Glu Lys Tyr Asp Asp Ile Pro Val Glu Ala Thr Gly Asn Asn Cys Pro
 165 170 175
 Pro His Ile Glu Ser Phe Ser Asp Val Glu Met Gly Glu Ile Ile Met
 180 185 190
 Gly Asn Ile Glu Leu Thr Arg Tyr Thr Arg Pro Thr Pro Val Gln Lys
 195 200 205
 His Ala Ile Pro Ile Ile Lys Glu Lys Arg Asp Leu Met Ala Cys Ala
 210 215 220
 Gln Thr Gly Ser Gly Lys Thr Ala Ala Phe Leu Leu Pro Ile Leu Ser
 225 230 235 240
 Gln Ile Tyr Ser Asp Gly Pro Gly Glu Ala Leu Arg Ala Met Lys Glu
 245 250 255
 Asn Gly Arg Tyr Gly Arg Arg Lys Gln Tyr Pro Ile Ser Leu Val Leu
 260 265 270
 Ala Pro Thr Arg Glu Leu Ala Val Gln Ile Tyr Glu Glu Ala Arg Lys
 275 280 285
 Phe Ser Tyr Arg Ser Arg Val Arg Pro Cys Val Val Tyr Gly Gly Ala
 290 295 300
 Asp Ile Gly Gln Gln Ile Arg Asp Leu Glu Arg Gly Cys His Leu Leu
 305 310 315 320
 Val Ala Thr Pro Gly Arg Leu Val Asp Met Met Glu Arg Gly Lys Ile
 325 330 335
 Gly Leu Asp Phe Cys Lys Tyr Leu Val Leu Asp Glu Ala Asp Arg Met
 340 345 350
 Leu Asp Met Gly Phe Glu Pro Gln Ile Arg Arg Ile Val Glu Gln Asp
 355 360 365
 Thr Met Pro Pro Lys Gly Val Arg His Thr Met Met Phe Ser Ala Thr
 370 375 380
 Phe Pro Lys Glu Ile Gln Met Leu Ala Arg Asp Phe Leu Asp Glu Tyr
 385 390 395 400
 Ile Phe Leu Ala Val Gly Arg Val Gly Ser Thr Ser Glu Asn Ile Thr
 405 410 415
 Gln Lys Val Val Trp Val Glu Glu Ser Asp Lys Arg Ser Phe Leu Leu
 420 425 430
 Asp Leu Leu Asn Ala Thr Gly Lys Asp Ser Leu Thr Leu Val Phe Val
 435 440 445
 Glu Thr Lys Lys Gly Ala Asp Ser Leu Glu Asp Phe Leu Tyr His Glu
 450 455 460
 Gly Tyr Ala Cys Thr Ser Ile His Gly Asp Arg Ser Gln Arg Asp Arg
 465 470 475 480
 Glu Glu Ala Leu His Gln Phe Arg Ser Gly Lys Ser Pro Ile Leu Val
 485 490 495
 Ala Thr Ala Val Ala Ala Arg Gly Leu Asp Ile Ser Asn Val Lys His
 500 505 510
 Val Ile Asn Phe Asp Leu Pro Ser Asp Ile Glu Glu Tyr Val His Arg
 515 520 525
 Ile Gly Arg Thr Gly Arg Val Gly Asn Leu Gly Leu Ala Thr Ser Phe
 530 535 540

Phe Asn Glu Arg Asn Ile Asn Ile Thr Lys Asp Leu Leu Asp Leu Leu
 545 550 555 560
 Val Glu Ala Lys Gln Glu Val Pro Ser Trp Leu Glu Asn Met Ala Tyr
 565 570 575
 Glu His His Tyr Lys Gly Ser Ser Arg Gly Arg Ser Lys Ser Ser Arg
 580 585 590
 Phe Ser Gly Gly Phe Gly Ala Arg Asp Tyr Arg Gln Ser Ser Gly Ala
 595 600 605
 Ser Ser Ser Ser Phe Ser Ser Ser Arg Ala Ser Ser Ser Arg Ser Gly
 610 615 620
 Gly Gly Gly His Gly Ser Ser Arg Gly Phe Gly Gly Gly Tyr Gly
 625 630 635 640
 Gly Phe Tyr Asn Ser Asp Gly Tyr Gly Gly Asn Tyr Asn Ser Gln Gly
 645 650 655
 Val Asp Trp Trp Gly Asn
 660

<210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 27
 ggagaaatta tcatgggaaa c 21

<210> 28
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 28
 guuucccaug auaauuucuc c 21

<210> 29
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 29
 acggatccaa atgagtcattg tggcagtgga 30

<210> 30
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 30
 ctctcgagca aagcaggctc agttaccc 28

<210> 31
 <211> 31

<212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

 <220>
 <223> Descrição da Seqüência Artificial; nota = construção sintética

 <400> 31
aaaggtacca gccatggaac aacggggaca g 31

 <210> 32
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

 <220>
 <223> Descrição da Seqüência Artificial; nota = construção sintética

 <400> 32
aaagatatct taggacatgg cagagtctgc att 33

 <210> 33
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

 <220>
 <223> Descrição da Seqüência Artificial; nota = construção sintética

 <400> 33
acggatccaa atgttttctg gaggcaaacac tggg 34

 <210> 34
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Seqüência Artificial

 <220>
 <223> Descrição da Seqüência Artificial; nota = construção sintética

 <400> 34
aaagatatct tactgtctca gagtctcagt gggatc 36

 <210> 35
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

 <220>
 <223> Descrição da Seqüência Artificial; nota = construção sintética

 <400> 35
aaagatatcc tcgagatttg ctggaaccag cagcct 36

 <210> ~~36~~
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Seqüência Artificial

 <220>
 <223> Descrição da Seqüência Artificial; nota = construção sintética

 <400> 36

Val Asn Met Leu Ser Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala
 1 5 10 15
 Glu Ala Glu Arg Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn
 20 25 30

<210> 37
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 37
 Tyr Thr Arg Pro Thr Pro Val Gln Lys His Ala Ile Pro Ile Ile Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Arg Asp Leu Met Ala Cys Ala Gln Thr Gly Ser Gly Lys Thr
 20 25 30
 Ala Ala Phe Leu Leu Pro Ile Leu Ser Gln Ile Tyr Ser Asp Gly Pro
 35 40 45
 Gly Glu Ala
 50

<210> 38
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 38
 Val Tyr Gly Gly Ala Asp Ile Gly Gln Gln Ile Arg Asp Leu Glu Arg
 1 5 10 15
 Gly Cys His Leu Leu Val Ala Thr Pro Gly Arg Leu Val Asp Met Met
 20 25 30
 Glu Arg Gly Lys Ile Gly Leu Asp Phe Cys Lys Tyr Leu Val Leu Asp
 35 40 45
 Glu Ala Asp
 50

<210> 39
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 39
 Phe Ser Gly Gly Asn Thr Gly Ile Asn Phe Glu Lys Tyr Asp Asp Ile
 1 5 10 15
 Pro Val Glu Ala Thr Gly Asn Asn Cys Pro Pro His Ile Glu Ser Phe
 20 25 30
 Ser Asp Val Glu Met Gly Glu Ile Ile Met Gly Asn Ile Glu Leu Thr
 35 40 45
 Arg Tyr Thr Arg Pro Thr Pro Val Gln Lys His Ala Ile Pro Ile Ile
 50 55 60
 Lys Glu Lys Arg Asp Leu Met Ala Cys Ala Gln Thr Gly Ser Gly Lys
 65 70 75 80
 Thr Ala Ala Phe Leu Leu Pro Ile Leu Ser Gln Ile Tyr Ser Asp Gly
 85 90 95
 Pro Gly Glu Ala Leu Arg Ala Met Lys Glu Asn Gly Arg Tyr Gly Arg
 100 105 110

Arg	Lys	Gln	Tyr	Pro	Ile	Ser	Leu	Val	Leu	Ala	Pro	Thr	Arg	Glu	Leu
	115						120					125			
Ala	Val	Gln	Ile	Tyr	Glu	Glu	Ala	Arg	Lys	Phe	Ser	Tyr	Arg	Ser	Arg
	130					135					140				
Val	Arg	Pro	Cys	Val	Val	Tyr	Gly	Gly	Ala	Asp	Ile	Gly	Gln	Gln	Ile
	145				150					155					160
Arg	Asp	Leu	Glu	Arg	Gly	Cys	His	Leu	Leu	Val	Ala	Thr	Pro	Gly	Arg
		165						170						175	
Leu	Val	Asp	Met	Met	Glu	Arg	Gly	Lys	Ile	Gly	Leu	Asp	Phe	Cys	Lys
		180						185					190		
Tyr	Leu	Val	Leu	Asp	Glu	Ala	Asp	Arg	Met	Leu	Asp	Met	Gly	Phe	Glu
	195						200					205			
Pro	Gln	Ile	Arg	Arg	Ile	Val	Glu	Gln	Asp	Thr	Met	Pro	Pro	Lys	Gly
	210					215					220				
Val	Arg	His	Thr	Met	Met	Phe	Ser	Ala	Thr	Phe	Pro	Lys	Glu	Ile	Gln
	225				230					235					240
Met	Leu	Ala	Arg	Asp	Phe	Leu	Asp	Glu	Tyr	Ile	Phe	Leu	Ala	Val	Gly
			245						250					255	
Arg	Val	Gly	Ser	Thr	Ser	Glu	Asn	Ile	Thr	Gln	Lys	Val	Val	Trp	Val
		260						265					270		
Glu	Glu	Ser	Asp	Lys	Arg	Ser	Phe	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	Asn	Ala	Thr
	275						280					285			
Gly	Lys	Asp	Ser	Leu	Thr	Leu	Val	Phe	Val	Glu	Thr	Lys	Lys	Gly	Ala
	290					295					300				
Asp	Ser	Leu	Glu	Asp	Phe	Leu	Tyr	His	Glu	Gly	Tyr	Ala	Cys	Thr	Ser
	305				310					315					320
Ile	His	Gly	Asp	Arg	Ser	Gln	Arg	Asp	Arg	Glu	Glu	Ala	Leu	His	Gln
			325					330						335	
Phe	Arg	Ser	Gly	Lys	Ser	Pro	Ile	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Val	Ala	Ala
		340					345						350		
Arg	Gly	Leu	Asp	Ile	Ser	Asn	Val	Lys	His	Val	Ile	Asn	Phe	Asp	Leu
		355					360					365			
Pro	Ser	Asp	Ile	Glu	Glu	Tyr	Val	His	Arg	Ile	Gly	Arg	Thr	Gly	Arg
	370					375					380				
Val	Gly	Asn	Leu	Gly	Leu	Ala	Thr	Ser	Phe	Phe	Asn	Glu	Arg	Asn	Ile
	385				390					395					400
Asn	Ile	Thr	Lys	Asp	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	Val	Glu	Ala	Lys	Gln	Glu
			405					410						415	
Val	Pro	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn	Met	Ala	Tyr	Glu	His	His	Tyr	Lys	Gly
		420					425						430		
Ser	Ser	Arg	Gly	Arg	Ser	Lys	Ser	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Gly	Phe	Gly
		435					440					445			
Ala	Arg	Asp	Tyr	Arg	Gln	Ser	Ser	Gly	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Phe	Ser
	450					455					460				
Ser	Ser	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Arg	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	His	Gly	Ser
	465				470					475					480
Ser	Arg	Gly	Phe	Gly	Gly	Gly	Gly	Tyr	Gly	Gly	Phe	Tyr	Asn	Ser	Asp
			485					490					495		
Gly	Tyr	Gly	Gly	Asn	Tyr	Asn	Ser	Gln	Gly	Val	Asp	Trp	Trp	Gly	Asn
		500						505					510		

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 40

Val Asp Val Ala Asp

1

5

<210> 41

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 41

Asp Glu Val Asp

1

<210> 42

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 42

Ile Glu Thr Asp

1

<210> 43

<211> 27

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 43

Ser Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala Glu Ala Glu Arg

1

5

10

15

Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn

20

25

<210> 44

<211> 27

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 44

Ser Pro Glu Glu Pro Gln Arg Leu Leu Glu Gln Ala Glu Ala Glu Gly

1

5

10

15

Cys Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Val Asn

20

25

<210> 45

<211> 27

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial; nota = construção sintética

<400> 45

Ser Pro Gly Glu Ala Gln Cys Leu Leu Gly Pro Ala Glu Ala Glu Gly

1

5

10

15

Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn

20

25

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição da Seqüência Artificial; nota = construção sintética

<400> 46

Asp Lys Ser Asp Glu Asp Asp
1 5

REIVINDICAÇÕES

1. Método de reverter ou prevenir a resistência de uma célula a um agonista do receptor da morte, caracterizado pelo fato de que compreende colocar em contato uma célula alvo com um modulador de uma ou mais
5 atividades de uma proteína contendo CARD, em que a modulação reverte ou previne a resistência ao agonista.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agonista é selecionado do grupo consistindo de um anticorpo DR5, um anticorpo DR4, Fas, TNF e TRAIL.

10 3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o receptor da morte é Fas, TNFR1 ou um receptor de TRAIL.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o receptor de TRAIL é selecionado do grupo consistindo em DR4 e DR5.

15 5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o modulador é um inibidor da quinase, um promotor da clivagem deDDX3, um inibidor da ligação dependente do CARD, um inibidor do IAP, ou um inibidor da expressão de DDX3.

20 6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o inibidor da expressão de DDX3 é um RNAi, siRNA ou shRNA.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a proteína contendo CARD é selecionada do grupo consistindo em DDX3, mda-5 e RIG-1.

25 8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a proteína contendo CARD é um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 85 % de homologia ao DDX3, mda-5 e RIG-1.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o modulador inibe a ligação da proteína contendo CARD ao

receptor da morte.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o modulador aumenta ou reduz a ligação da proteína contendo CARD a uma caspase ou modulador de caspase (IPA).

5 11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a caspase é caspase-1, caspase-2, caspase-4 ou caspase-5.

12. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o modulador da caspase é um IAP selecionado do grupo consistindo em cIAP1, cIAP2, XIAP e survivina.

10 13. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a célula alvo se acha *in vitro*.

14. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a célula alvo se acha *in vivo*.

15 15. Método de triar uma célula quanto a um biomarcador da resistência a um agonista do receptor da morte, caracterizado pelo fato de que compreende monitorar a associação do receptor da morte e uma proteína contendo CARD, em que a associação significa resistência ao agonista.

20 16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que ainda compreende proceder ao pré-contato da célula com o agonista do receptor da morte.

25 17. Método de triar uma célula quanto a um biomarcador da resistência a um agonista do receptor da morte, caracterizado pelo fato de que compreende monitorar a associação de uma caspase ou modulador de caspase (IAP) com uma proteína contendo CARD, em que a associação dos IAPs com a proteína contendo CARD indica resistência ao agonista.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que compreende o pré-contato da célula com o agonista do receptor da morte.

19. Método de acordo com as reivindicações 15 ou 17,

caracterizado pelo fato de que a proteína contendo CARD é selecionada do grupo consistindo em DDX3, mda-5 e RIG-1.

20. Método de acordo com as reivindicações 15 ou 17, caracterizado pelo fato de que a proteína contendo CARD é o polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 85 % de homologia aos DDX3, mda-5 e RIG-1.

21. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a caspase é caspase-1, caspase-2, caspase-4 ou caspase-5.

22. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o modulador da caspase é um IAP selecionado do grupo consistindo em cIAP1, cIAP2, XIAP e survivina.

23. Método de monitorar a resistência a um agonista do receptor da morte em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende

(a) adquirir uma amostra biológica do indivíduo, e
(b) detectar a associação de uma caspase ou modulador de caspase com DDX3 na amostra, a associação indicando resistência.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a caspase é caspase 1, caspase-2, caspase-4 ou caspase-5.

25. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o modulador da caspase é um IAP selecionado do grupo consistindo em cIAP1, cIAP2, XIAP e survivina.

26. Método de monitorar a resistência a um agonista do receptor da morte em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende

(a) adquirir uma amostra biológica do indivíduo, e
(b) detectar a associação da proteína contendo CARD com um receptor da morte na amostra, um nível de associação semelhante àquele de uma célula resistente indicando resistência.

27. Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que ainda compreende detectar a associação de um IAP com a proteína contendo CARD, um nível de associação entre a proteína contendo IAP e CARD semelhante àquele de uma célula resistente indicando
5 resistência.

28. Método de induzir seletivamente a apoptose em uma célula alvo expressando um receptor da morte, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de

(a) colocar a célula alvo em contato com uma quantidade
10 terapêutica de um agonista do receptor da morte, que especificamente se ligue ao receptor da morte e induza a apoptose, e

(b) administrar à célula alvo uma quantidade terapêutica de um modulador de uma ou mais atividades de uma proteína contendo CARD.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado
15 pelo fato de que o agonista é selecionado do grupo consistindo em um anticorpo DR5, um anticorpo DR4 e TRAIL.

30. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o receptor da morte é Fas, TNFR1, ou um receptor de TRAIL.

20 31. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o receptor de TRAIL é selecionado do grupo consistindo em DR4 e DR5.

32. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o modulador é um inibidor da quinase, um promotor da
25 clivagem de DDX3, um inibidor da ligação dependente do CARD, um inibidor de IAP, ou um inibidor da expressão do DDX3.

33. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o inibidor da expressão do DDX3 é um RNAi, siRNA ou shRNA.

34. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que as proteínas contendo CARD são selecionadas do grupo consistindo em DDX3, mda-5 e RIG-1.

5 35. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que a proteína contendo CARD é um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 85 % de homologia ao DDX3, ao mda-5 e ao RIG-1.

10 36. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o modulador inibe a ligação da proteína contendo CARD ao receptor da morte.

37. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o modulador afeta a ligação da proteína contendo CARD a uma caspase ou modulador de caspase (IAP).

15 38. Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que a caspase é caspase-1, caspase-2, caspase-4 ou caspase-5.

39. Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o modulador da caspase é um IAP selecionado do grupo consistindo em cIAP1, cIAP2, XIAP e survivina.

20 40. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que a célula se acha *in vitro*.

41. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que a célula se acha *in vivo*.

25 42. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que a célula alvo é uma célula de câncer, uma célula sinovial da artrite reumatóide, um linfócito ativado, ou uma célula viralmente infectada.

43. Método de tratar de um indivíduo com câncer, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade terapêutica de (a) um agonista do receptor da morte e (b) um modulador de uma ou mais atividades de uma proteína contendo CARD, em

que o modulador reduz a resistência ao agonista do receptor da morte.

44. Método de tratar de um indivíduo com uma doença inflamatória ou autoimune, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade terapêutica de (a) um agonista do receptor da morte e (b) um agente que modula uma ou mais atividades de uma proteína contendo CARD, em que o modulador reduz a resistência ao agonista do receptor da morte.

45. Método de acordo com as reivindicações 43 ou 44, caracterizado pelo fato de que o agonista é selecionado do grupo consistindo em um anticorpo de DR5, um anticorpo de DR4, e TRAIL.

46. Método de acordo com as reivindicações 43 ou 44, caracterizado pelo fato de que o receptor da morte é Fas, TNFR1 ou um receptor de TRAIL.

47. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o receptor de TRAIL é selecionado do grupo consistindo em DR4 e DR5.

48. Método de acordo com as reivindicações 43 ou 44, caracterizado pelo fato de que o modulador é um inibidor da quinase, um promotor da clivagem do DDX3, um inibidor do IAP, ou um inibidor da expressão do DDX3 (RNAi).

49. Método de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que o inibidor da expressão do DDX3 é um RNAi, um siRNA ou um shRNA.

50. Método de acordo com as reivindicações 43 ou 44, caracterizado pelo fato de que as proteínas contendo CARD são selecionadas do grupo consistindo em DDX3, mda-5 e RIG-1.

51. Método de acordo com as reivindicações 43 ou 44, caracterizado pelo fato de que a proteína contendo CARD é um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 85 % de homologia aos

DDX3, mda-5 e RIG-1.

52. Método de acordo com as reivindicações 43 ou 44, caracterizado pelo fato de que o modulador inibe a ligação da proteína contendo CARD ao receptor da morte.

5 53. Método de acordo com as reivindicações 43 ou 44, caracterizado pelo fato de que o modulador aumenta ou reduz a ligação da proteína contendo CARD a uma caspase ou modulador da caspase (IAP).

54. Método de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que a caspase é caspase-1, caspase-2, caspase-4 ou caspase-5.

10 55. Método de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que o modulador da caspase é um IAP selecionado do grupo consistindo em cIAP1, cIAP2, XIAP e survivina.

56. Método de acordo com as reivindicações 43 ou 44, caracterizado pelo fato de que a célula se acha *in vitro*.

15 57. Método de acordo com as reivindicações 43 ou 44, caracterizado pelo fato de que a célula se acha *in vivo*.

58. Método de acordo com as reivindicações 43 ou 44, caracterizado pelo fato de que ainda compreende administrar um agente terapêutico selecionado do grupo consistindo em agentes quimioterápicos, anticorpos, membros da família do TNF, agentes antivirais, agentes antiinflamatórios, agentes anti-oportunísticos, antibióticos, imunossuppressores, imunoglobulinas, agentes antimaláricos, agentes anti-artrite reumatóide, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento.

20

59. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende
 25 (a) um agonista do receptor da morte, e (b) um agente que modula uma ou mais atividades de uma proteína contendo CARD, em que o modulador reduz a resistência ao agonista do receptor da morte.

60. Composição de acordo com a reivindicação 59, caracterizada pelo fato de que o agonista é selecionado do grupo consistindo

em um anticorpo DR5, um anticorpo DR4, e TRAIL.

61. Composição de acordo com a reivindicação 59, caracterizada pelo fato de que o receptor da morte é Fas, TNFR1, ou um receptor de TRAIL.

5 62. Composição de acordo com a reivindicação 61, caracterizada pelo fato de que o receptor de TRAIL é selecionado do grupo consistindo em DR4 e DR5.

63. Composição de acordo com a reivindicação 59, caracterizada pelo fato de que o modulador é um inibidor da quinase, um
10 promotor da clivagem do DDX3, um inibidor da ligação dependente do CARD, um inibidor do IAP, ou um inibidor da expressão do DDX3.

64. Composição de acordo com a reivindicação 59, caracterizada pelo fato de que o inibidor da expressão do DDX3 é um RNAi, um siRNA ou um shRNA.

15 65. Composição de acordo com a reivindicação 59, caracterizada pelo fato de que a proteína contendo CARD é selecionada do grupo consistindo em DDX3, mda-5 e RIG-1.

66. Composição de acordo com a reivindicação 59, caracterizada pelo fato de que a proteína contendo CARD é um polipeptídeo
20 tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 85 % de homologia aos DDX3, mda-5 e RIG-1.

67. Composição de acordo com a reivindicação 59, caracterizada pelo fato de que o modulador inibe a ligação da proteína contendo CARD ao receptor da morte.

25 68. Composição de acordo com a reivindicação 59, caracterizada pelo fato de que o modulador aumenta ou reduz a ligação da proteína contendo CARD a uma caspase ou modulador da caspase (IAP).

69. Composição de acordo com a reivindicação 68, caracterizada pelo fato de que a caspase é caspase-1, caspase-2, caspase-4 ou

caspase-5.

70. Composição de acordo com a reivindicação 68, caracterizada pelo fato de que o modulador da caspase é um IAP selecionado do grupo consistindo em cIAP1, cIAP2, XIAP e survivina.

5 71. Composição de acordo com a reivindicação 59, caracterizada pelo fato de que ainda compreende um agente terapêutico selecionado do grupo consistindo em um agente quimioterápico, um membro da superfamília do TNF, um agente antiviral, um agente antiinflamatório, um agente anti-oportunístico, um antibiótico, um imunossupressor, uma
10 imunoglobulina, um agente antimalárico, um agente anti-artrite reumatóide, uma citocina, uma quimiocina e um fator de crescimento.

72. Composição de acordo com a reivindicação 59, caracterizada pelo fato de que ainda compreende um carreador farmacologicamente aceitável.

15 73. Ácido nucleico isolado, caracterizado pelo fato de que compreende um RNA tipo grampo de cabelo curto (shRNA), em que o shRNA inibe a expressão de uma proteína contendo CARD.

20 74. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que a proteína contendo CARD é selecionada do grupo consistindo em DDX3, mda-5 e RIG-1.

75. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que a proteína contendo CARD é um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 85 % de homologia a DDX3, mda-5 e RIG-1.

25 76. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que o RNAi é um RNA tipo grampo de cabelo curto (shRNA) compreendendo as sequências de ácidos nucleicos SEQ ID NO: 1, 2, 3 ou 4.

77. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende o ácido

nucleico como definido na reivindicação 73, operavelmente articulado a uma sequência de controle da expressão.

78. Célula, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor como definido na reivindicação 77.

5 79. Polipeptídeo isolado codificando a região de sobrevivência de um receptor da morte, caracterizado pelo fato de que compreende menos do que 25 resíduos de aminoácido.

10 80. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de que o receptor da morte é Fas, TNFR1, ou um receptor de TRAIL.

81. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o receptor de TRAIL é selecionado do grupo consistindo em DR4 e DR5.

15 82. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de que o domínio de sobrevivência é um domínio de ligação de proteína contendo CARD.

20 83. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 82, caracterizado pelo fato de que o receptor da morte é selecionado do grupo consistindo em um domínio de ligação de DDX3 do domínio de ligação de DR5 e DDX3 de DR4.

84. Método de bloquear a ligação da proteína contendo CARD a um receptor da morte em uma célula, caracterizado pelo fato de que compreende colocar em contato a célula com o polipeptídeo como definido na reivindicação 79, ou um seu fragmento que bloqueie a ligação.

25 85. Método de reverter a resistência de uma célula a um agonista do receptor da morte em uma célula, caracterizado pelo fato de que compreende colocar em contato a célula com o polipeptídeo como definido na reivindicação 79.

86. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de que

compreende o domínio de ligação do receptor da morte de uma proteína contendo CARD.

5 87. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 86, caracterizado pelo fato de que a proteína contendo CARD é selecionada do grupo consistindo em DDX3, mda-5 e RIG-1.

88. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 86, caracterizado pelo fato de que a proteína contendo CARD é o polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 85 % de homologia aos DDX3, mda-5 e RIG-1.

10 89. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 86, caracterizado pelo fato de que não se liga às caspases ou aos IAPs, em que o polipeptídeo bloqueia a associação dos IAPs com o receptor da morte, e em que o polipeptídeo não impede a ligação de FADD ao receptor da morte.

15 90. Método de bloquear a associação de um IAP com o receptor da morte, caracterizado pelo fato de que compreende colocar em contato a célula com o polipeptídeo como definido na reivindicação 86.

20 91. Método de reverter a resistência de uma célula a um agonista do receptor da morte, caracterizado pelo fato de que compreende colocar em contato a célula com o polipeptídeo como definido na reivindicação 86.

25 92. Método de triar um modulador de uma proteína contendo CARD, em que o modulador reverte ou previne a resistência de uma célula alvo a um agonista do receptor da morte, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. colocar em contato com um agente candidato a proteína contendo CARD, e

b. detectar um decréscimo em uma ou mais atividades da proteína contendo CARD na presença do agente candidato em comparação com a ausência do agente candidato, em que a atividade ou atividades se

correlacionam com a resistência da célula alvo ao agonista do receptor da morte,

um decréscimo na atividade ou atividades da proteína contendo CARD indicando que o agente candidato modula a proteína contendo CARD.

5

93. Método de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que a proteína contendo CARD se acha em uma célula, em que a célula é ainda colocada em contato por uma ou mais vezes com o agonista do receptor da morte, e em que o nível de resistência ao agonista do receptor da morte é detectado.

10

94. Método de acordo com a reivindicação 93, caracterizado pelo fato de que o nível de resistência ao agonista do receptor da morte é detectado pela medição da apoptose.

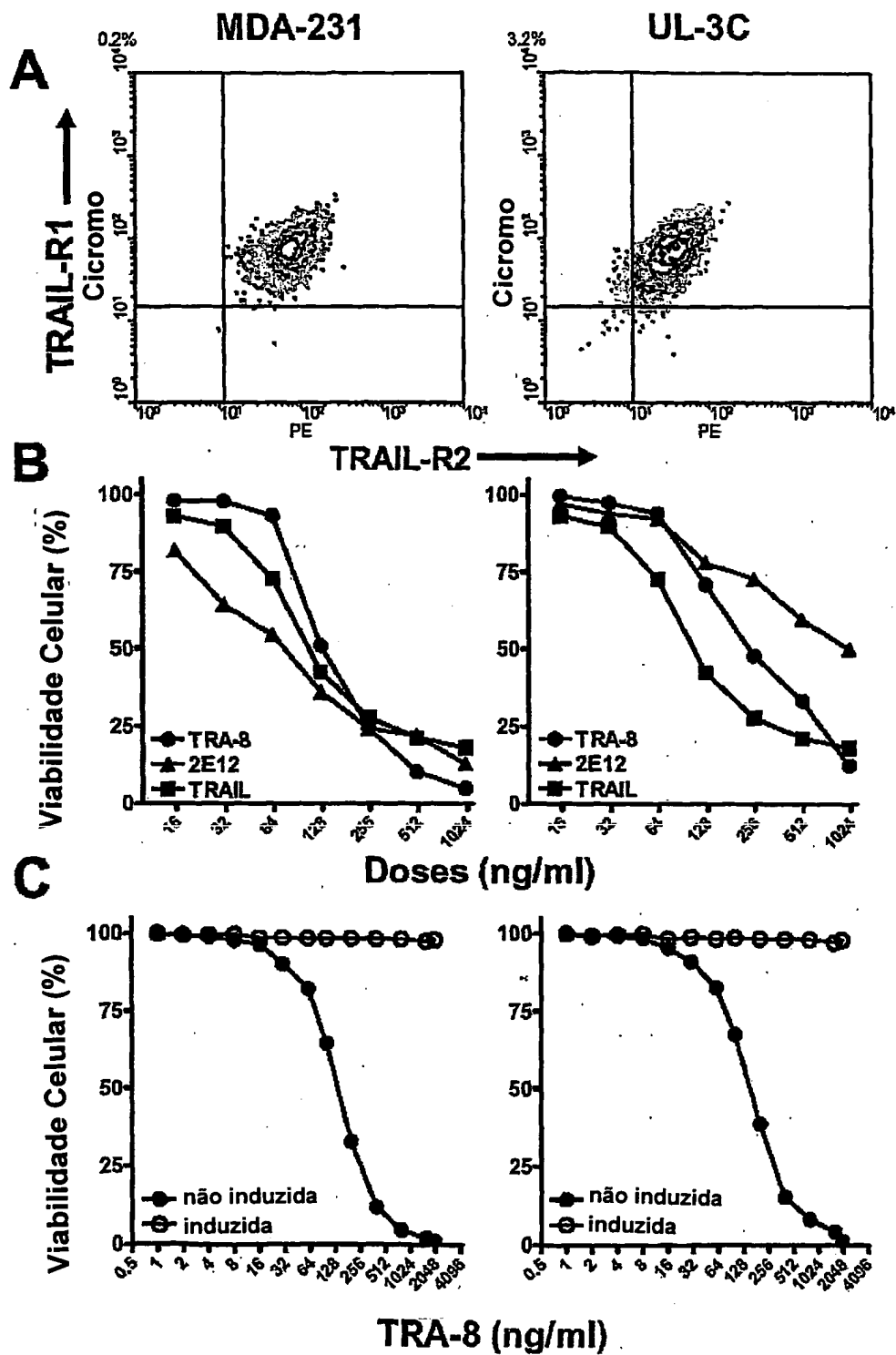


FIG. 1

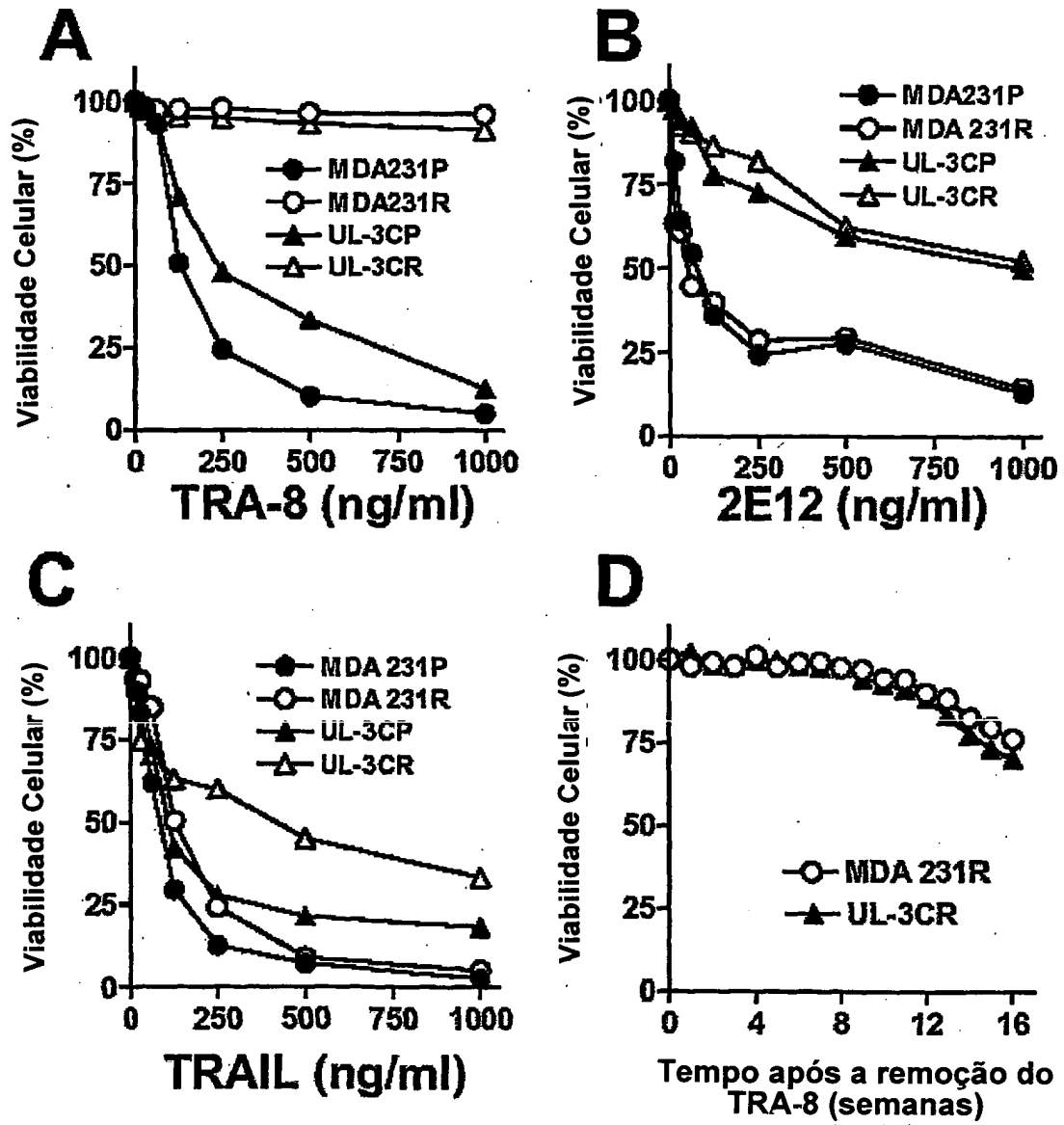


FIG. 2

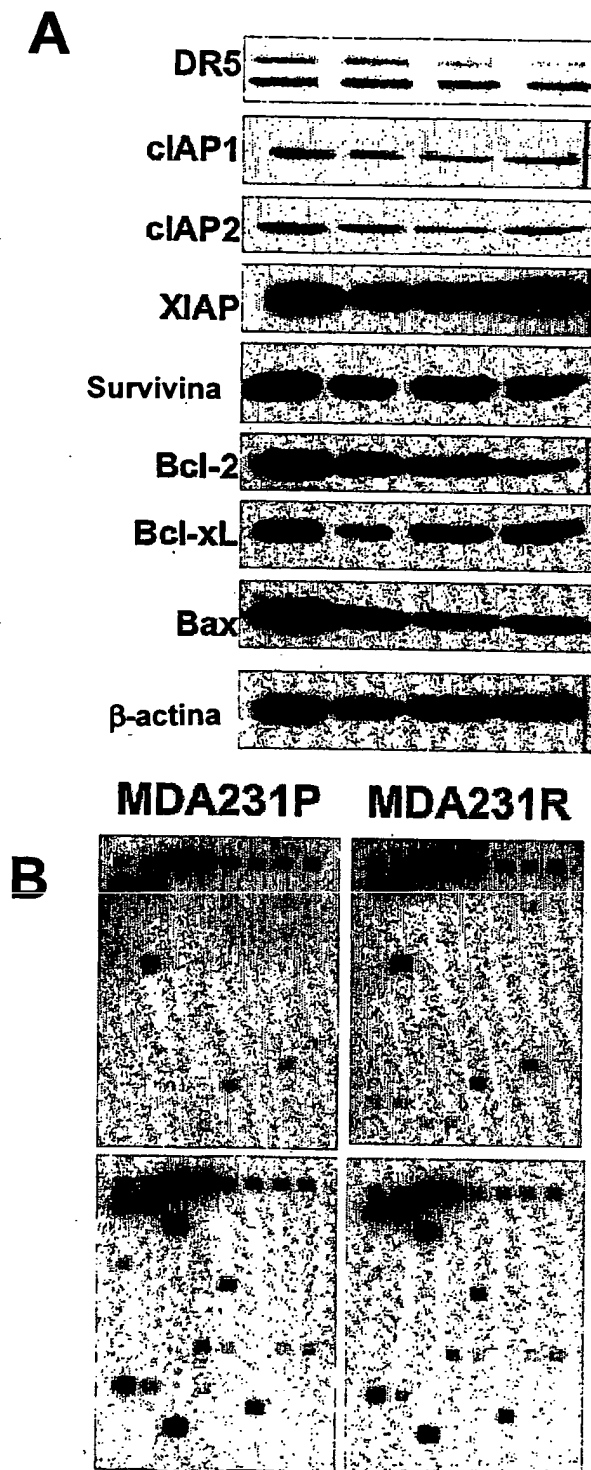
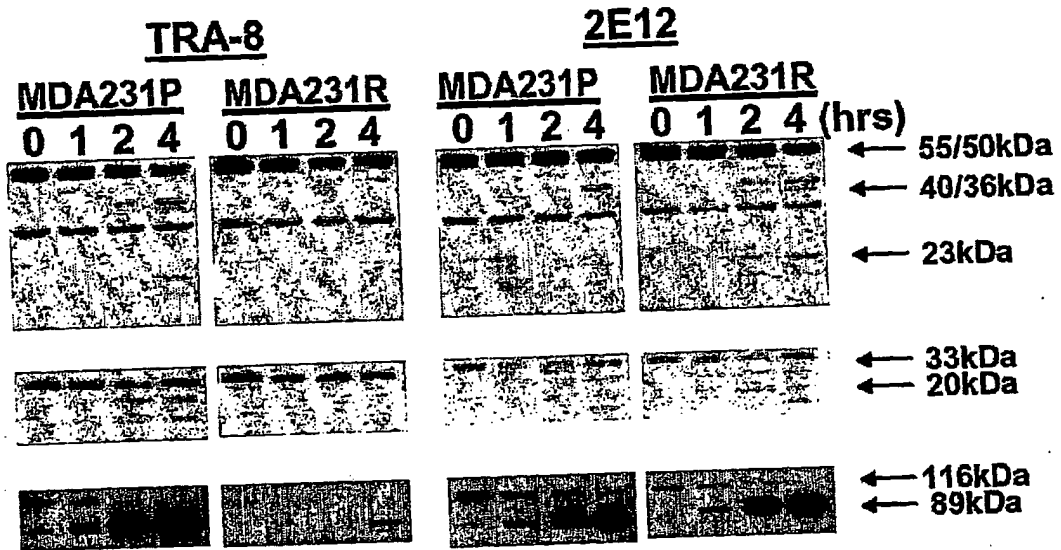
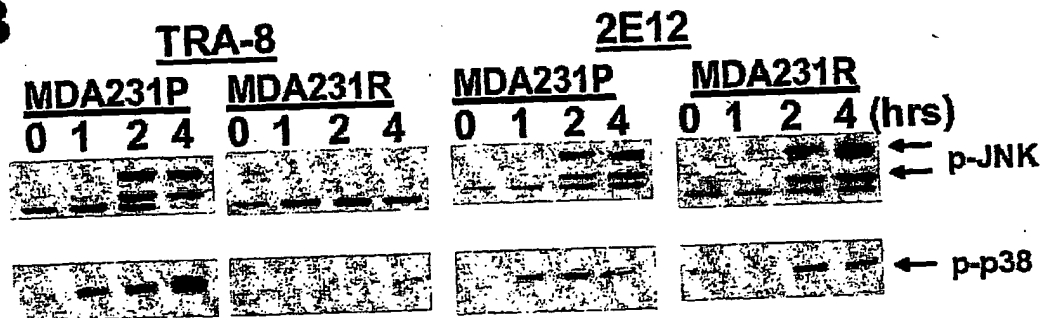


FIG. 3

A**B****FIG. 4**

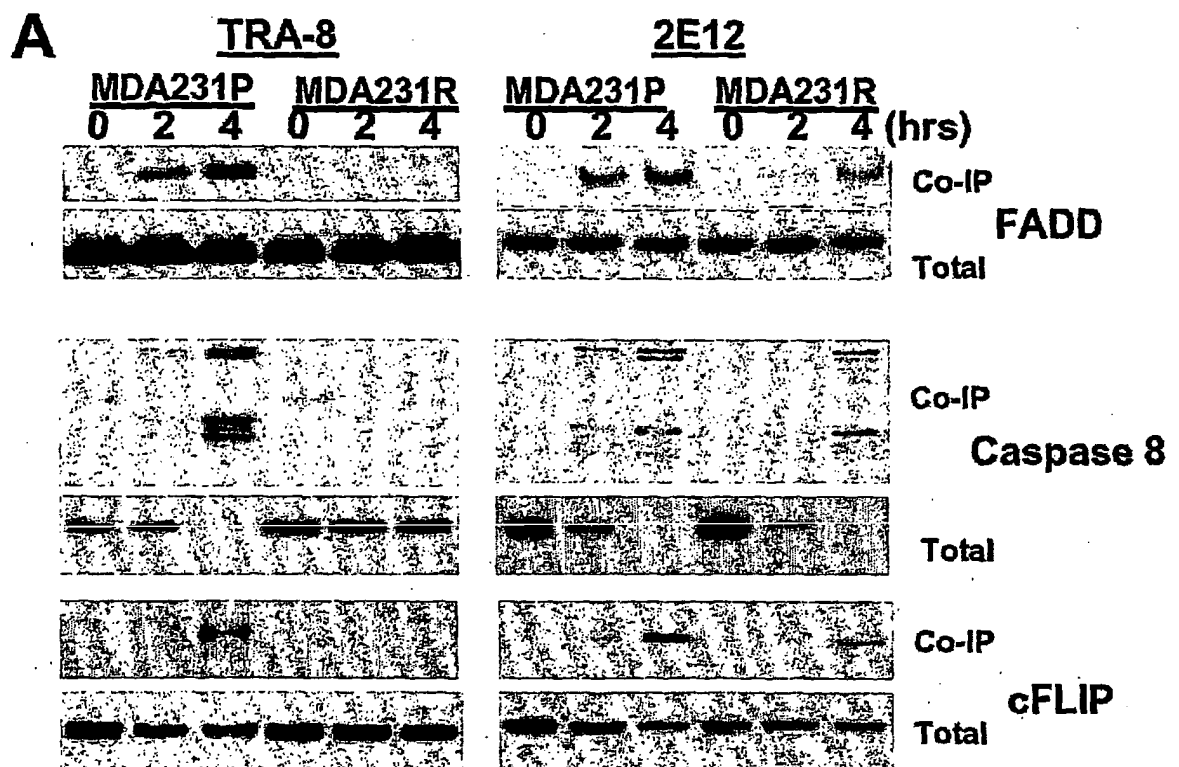
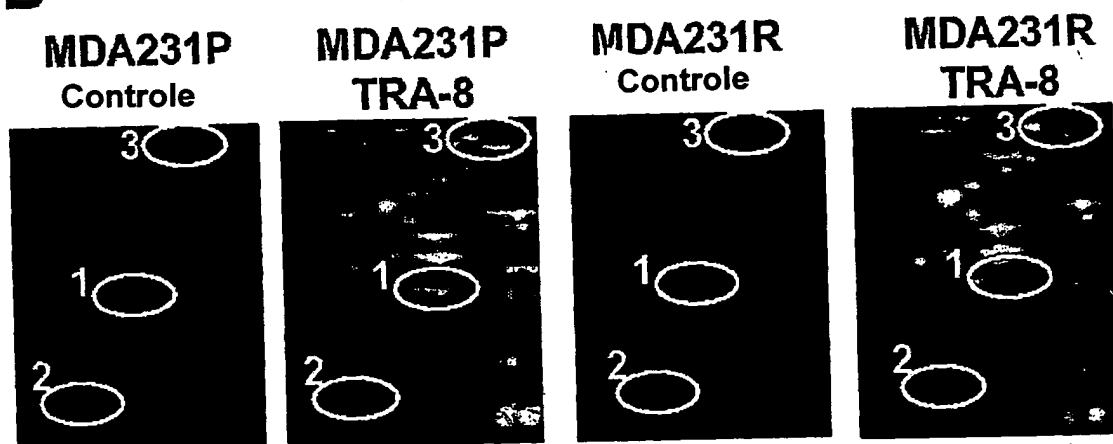
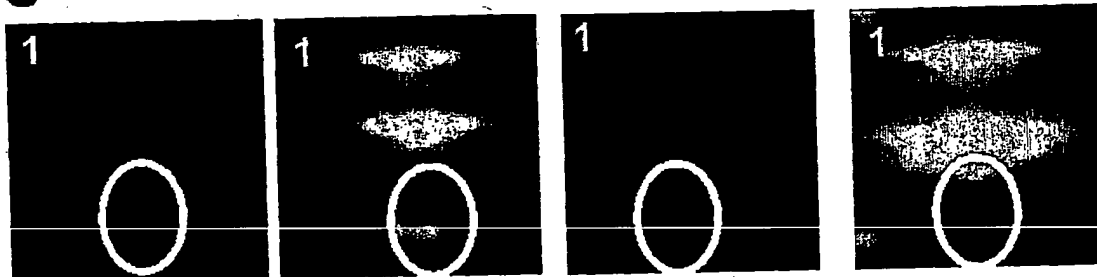


FIG. 5A

B**C****D****E****FIG. 5B**

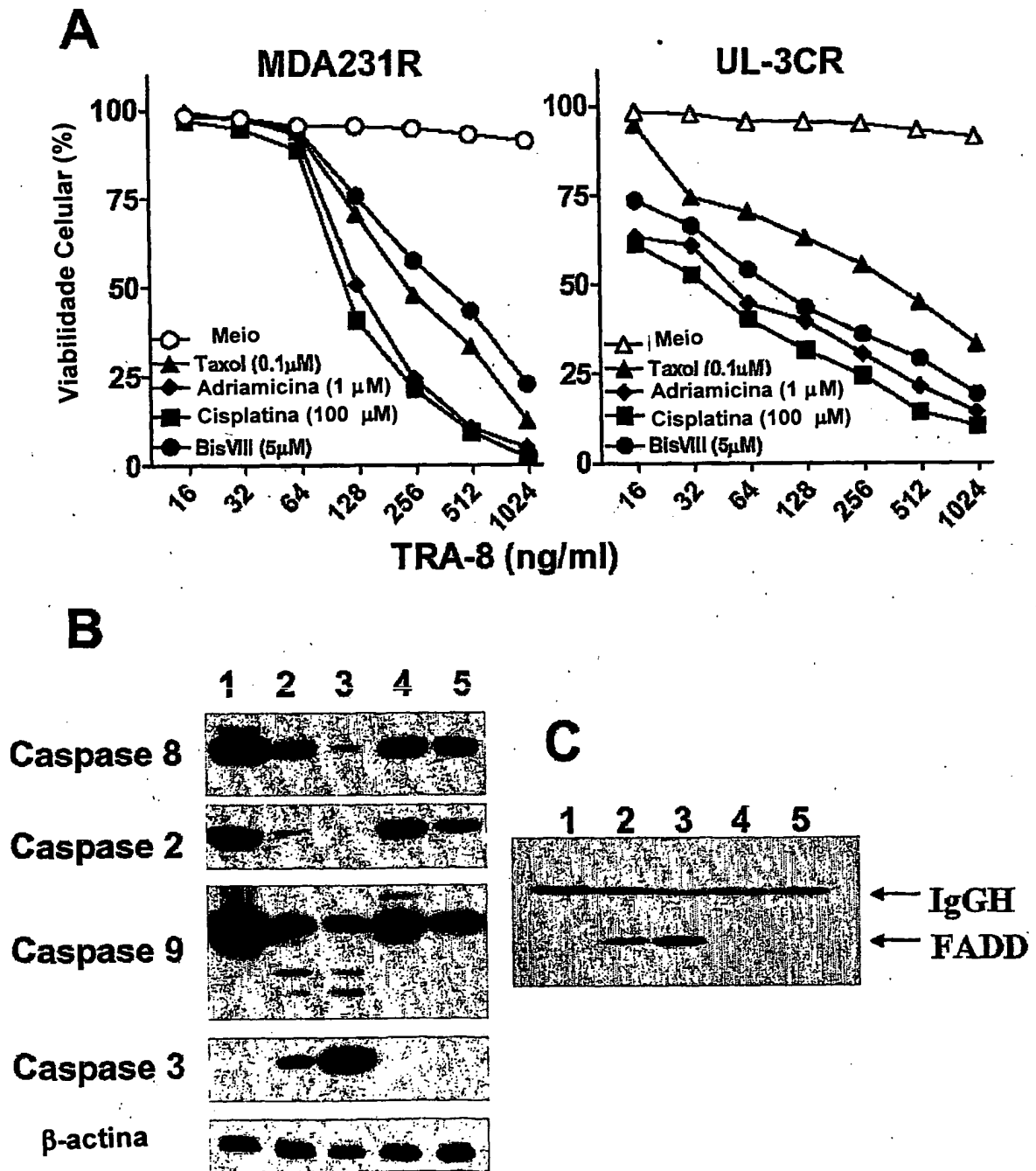


FIG. 6

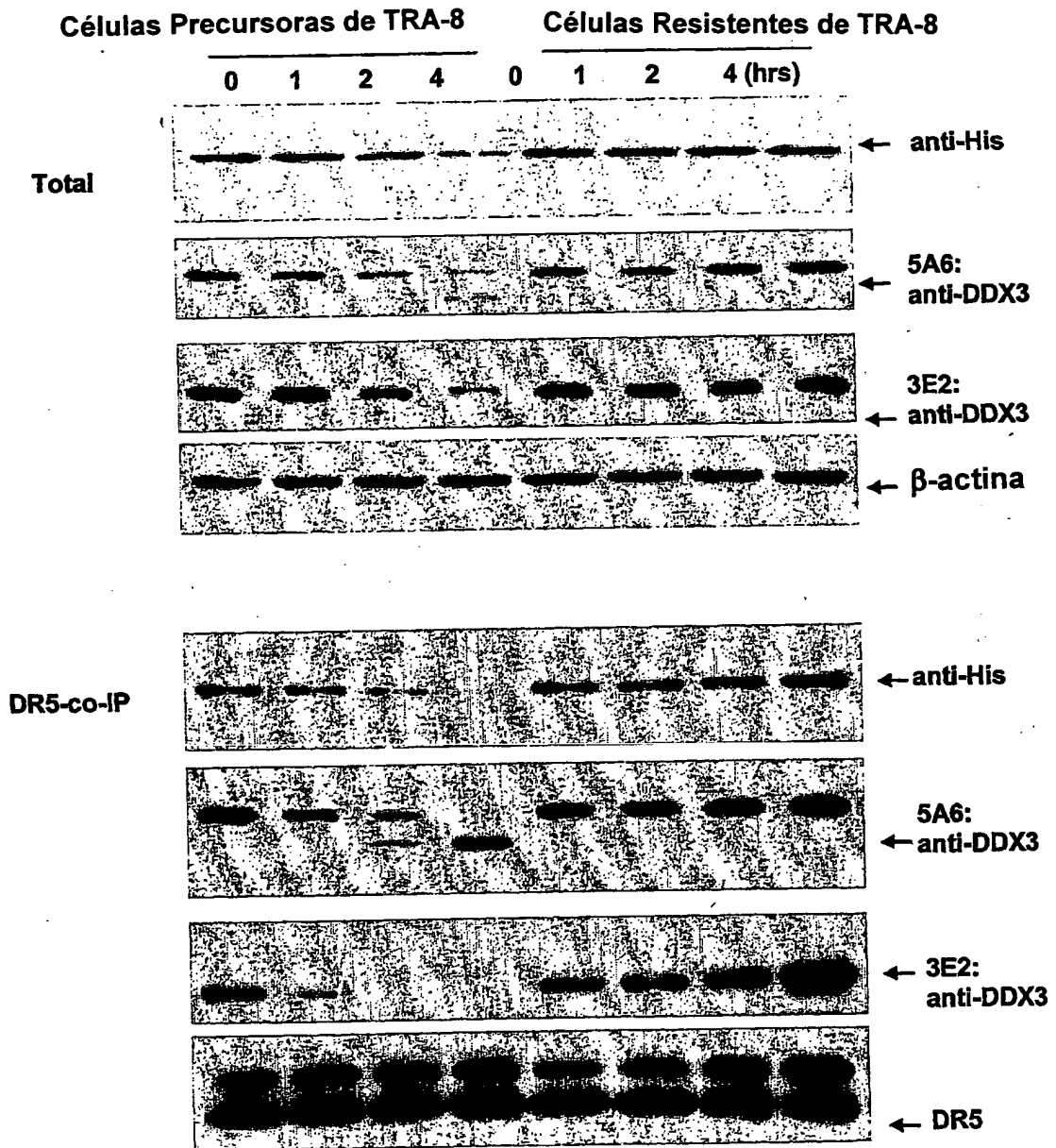


FIG. 7

		Ligação ao DR5
FL DDX3: 1-662 aa		+
ND1 DDX3: 50-662 aa		+
ND2 DDX3: 100-662 aa		+
ND3 DDX3: 150-662 aa		+
ND4 DDX3: 200-662 aa		+
ND5 DDX3: 250-662 aa		--
ND6 DDX3: 300-662 aa		--
CD1 DDX3: 1-550 aa		+
CD2 DDX3: 1-500 aa		+
CD3 DDX3: 1-450 aa		+
CD4 DDX3: 1-400 aa		+
CD5 DDX3: 1-350 aa		--
CD6 DDX3: 1-300 aa		--

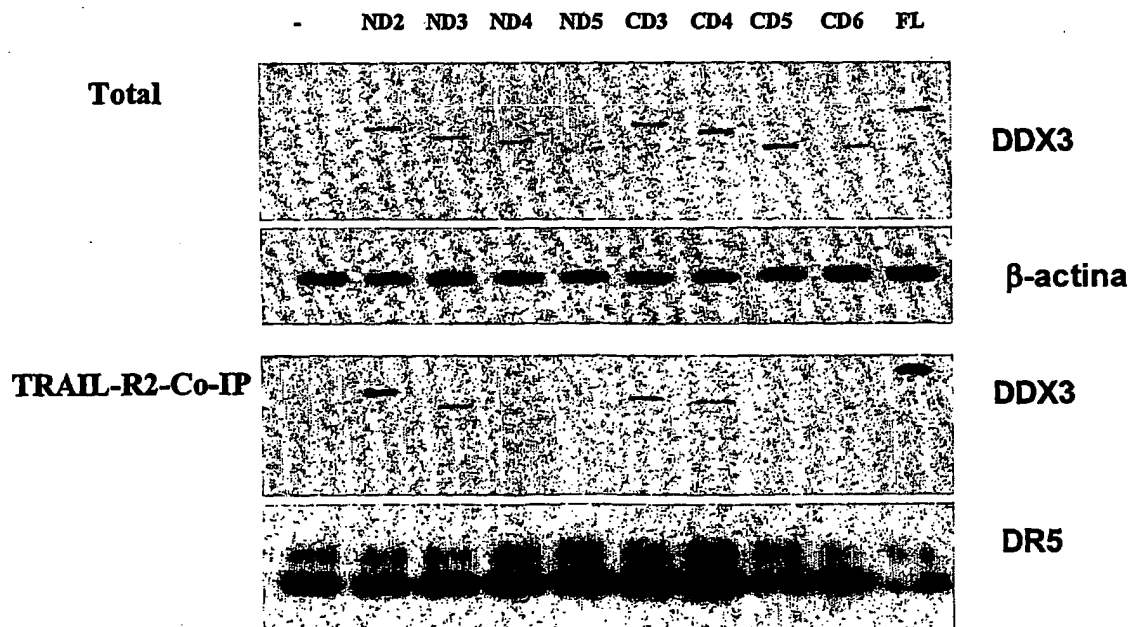


FIG. 8A

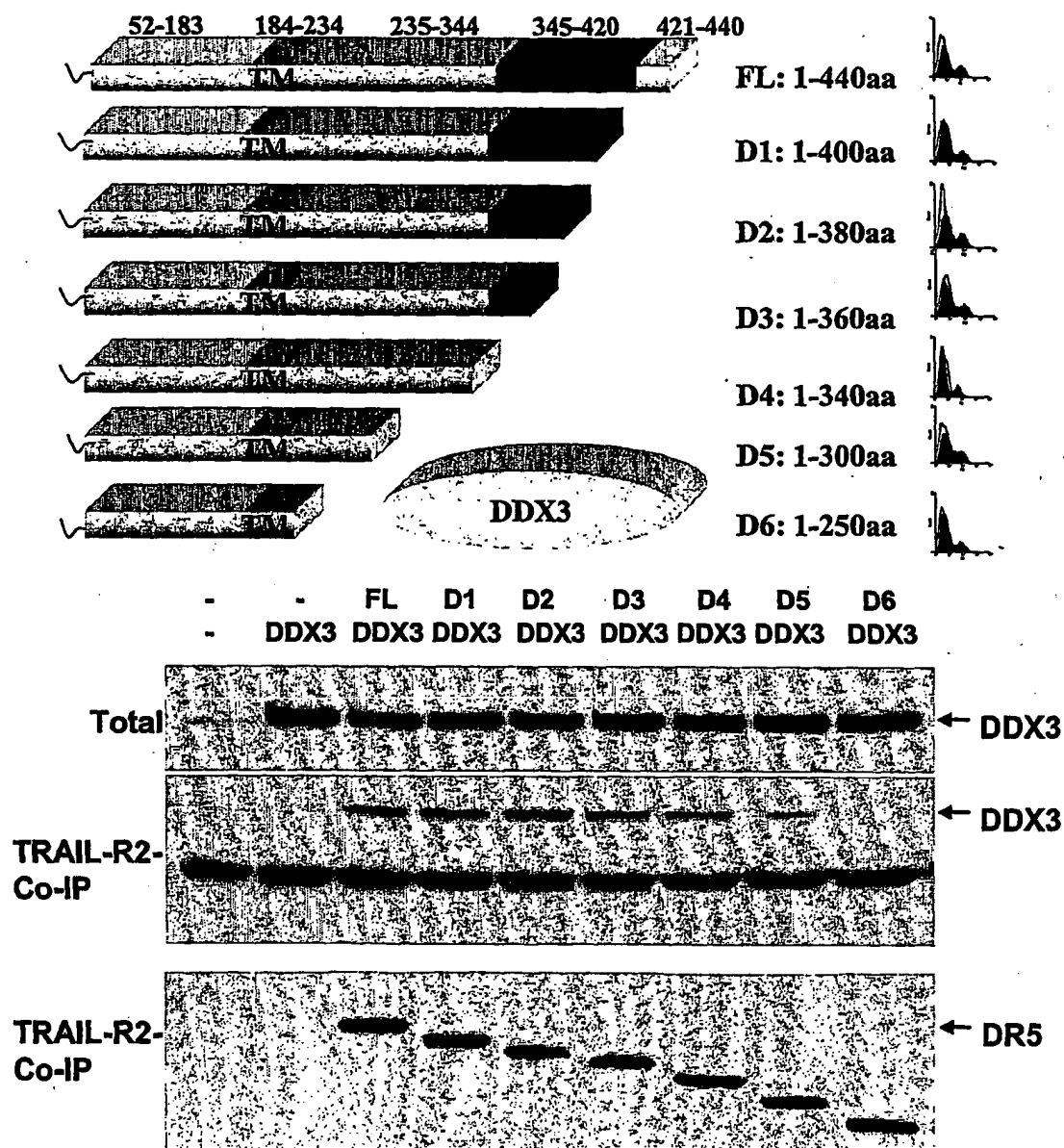


FIG. 8B

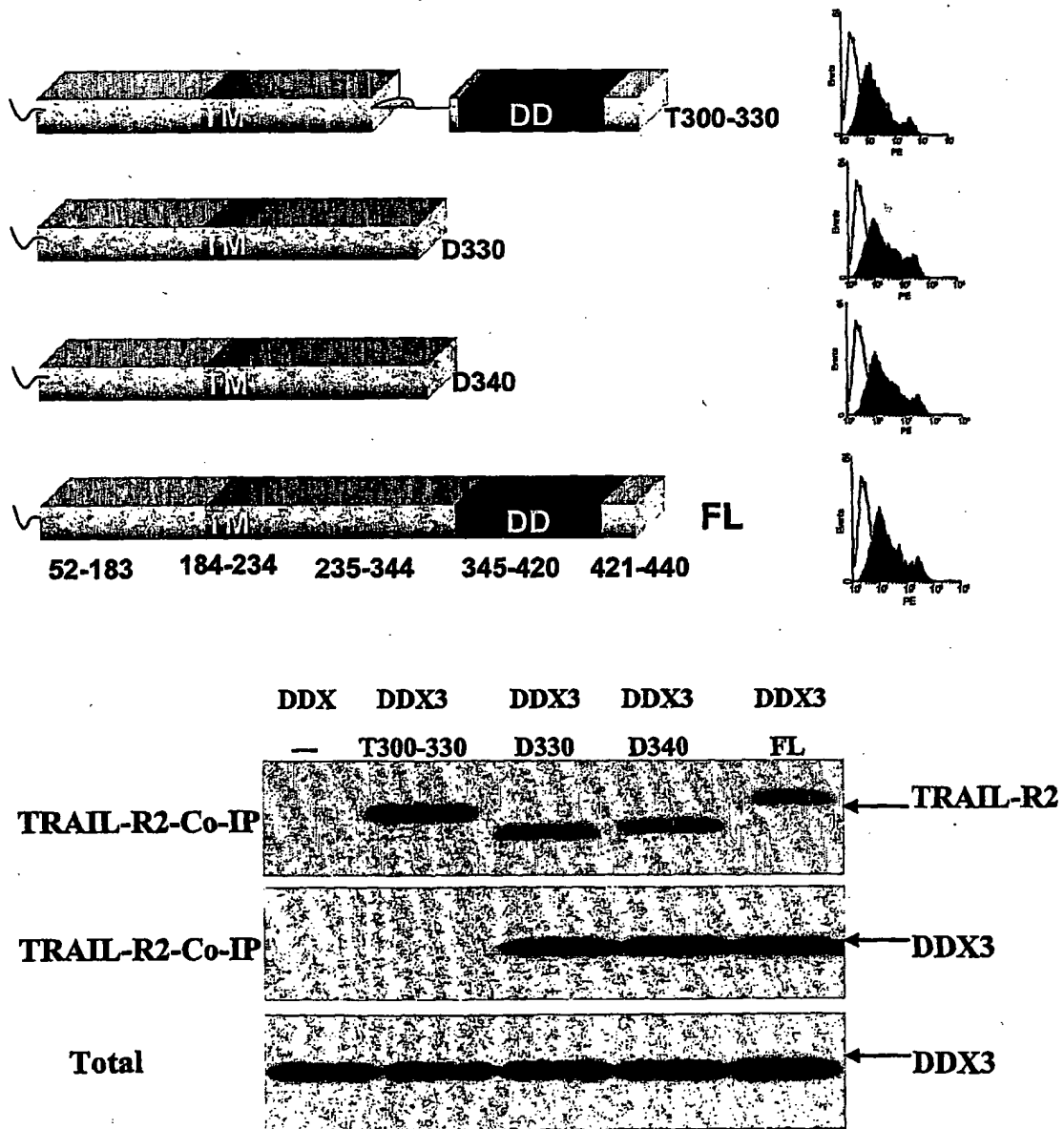


FIG. 8C

DR5: 4 SPGESEHLLLEPAEAERSQRRRLVPAN 30 (SEQ ID NO:43)
 SP E + LLE AEAE QRRRLVP N
 DcR2: 709 SPEEPQRLLEQAAEAGCQRRRLVPVN 735 20/27 (74%) (SEQ ID NO:44)
 SPGE++ LL PAEAE SQRRRLVPAN
 DR4: 330 SPGEAQCLLGPAEAEGSQRRRLVPAN 356 24/27 (88%) (SEQ ID NO:45)

FIG. 8D

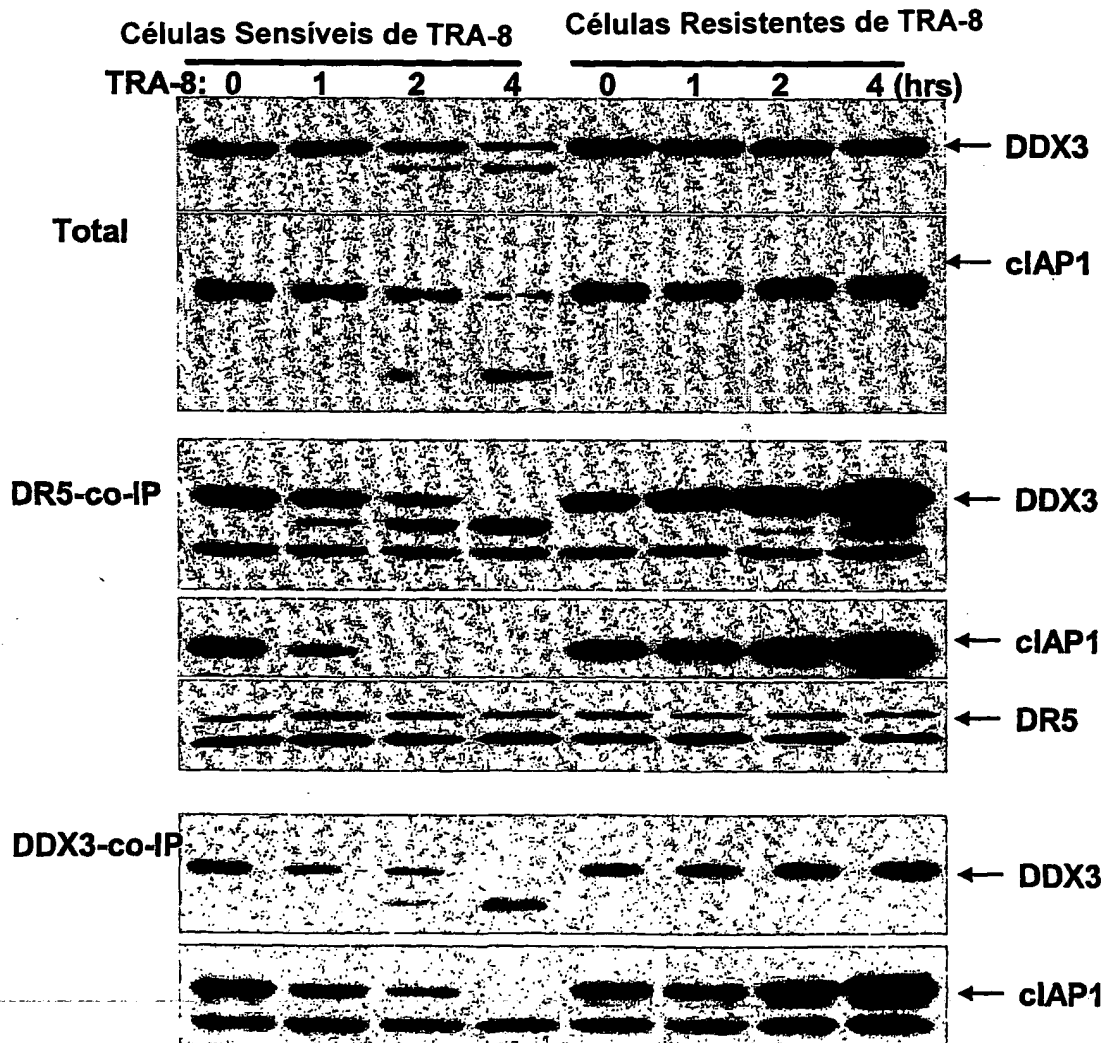


FIG. 8E

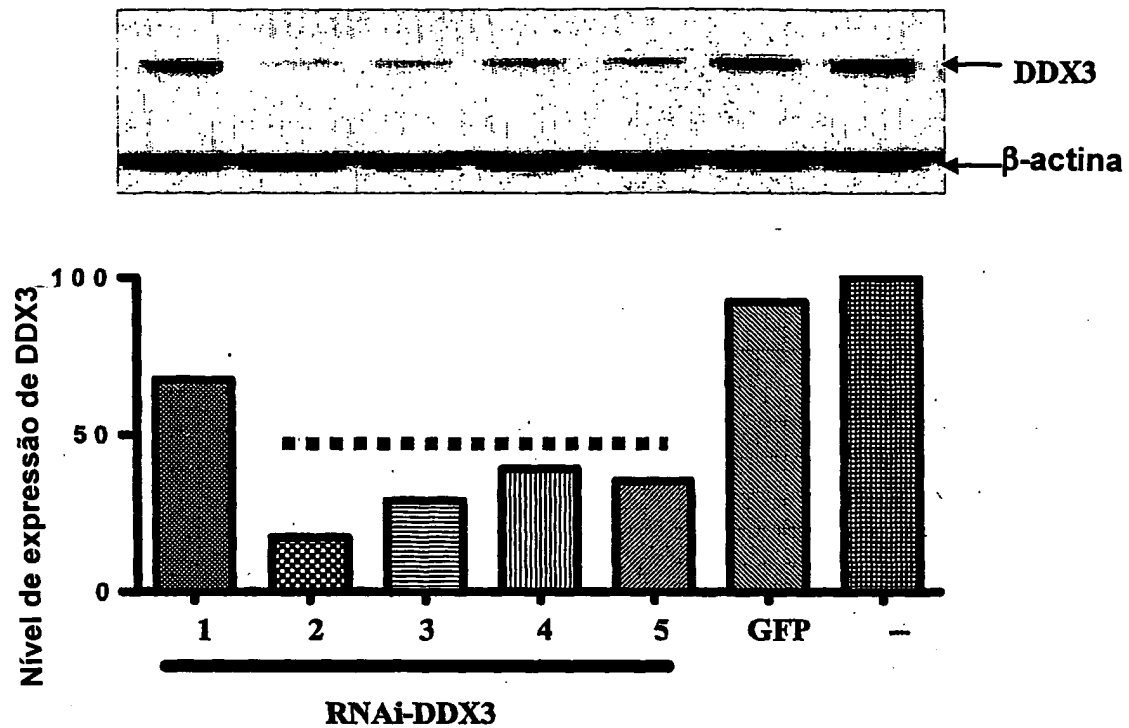


FIG. 9A

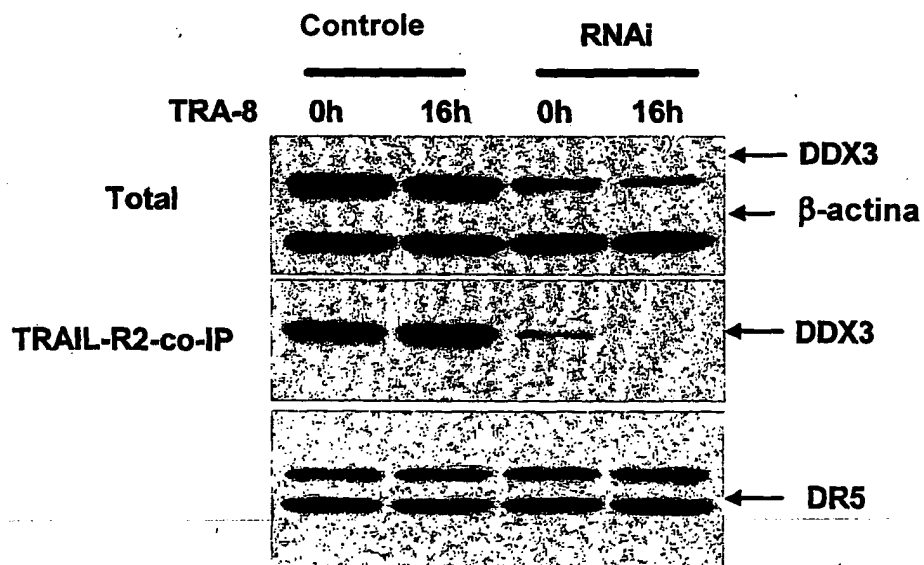


FIG. 9B

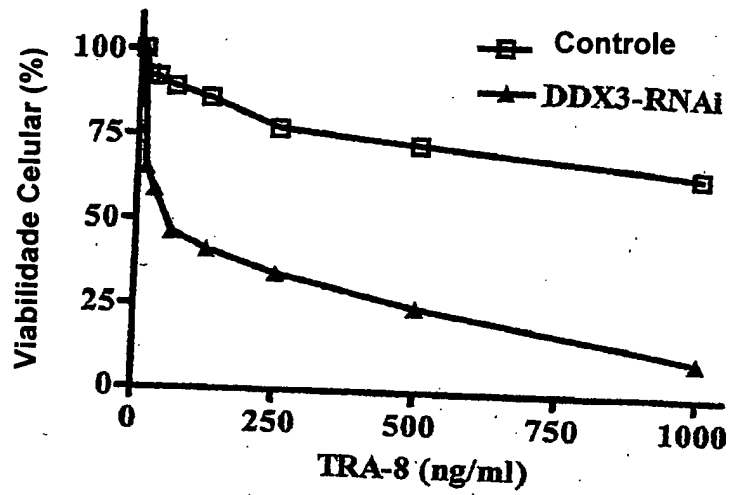


FIG. 9C

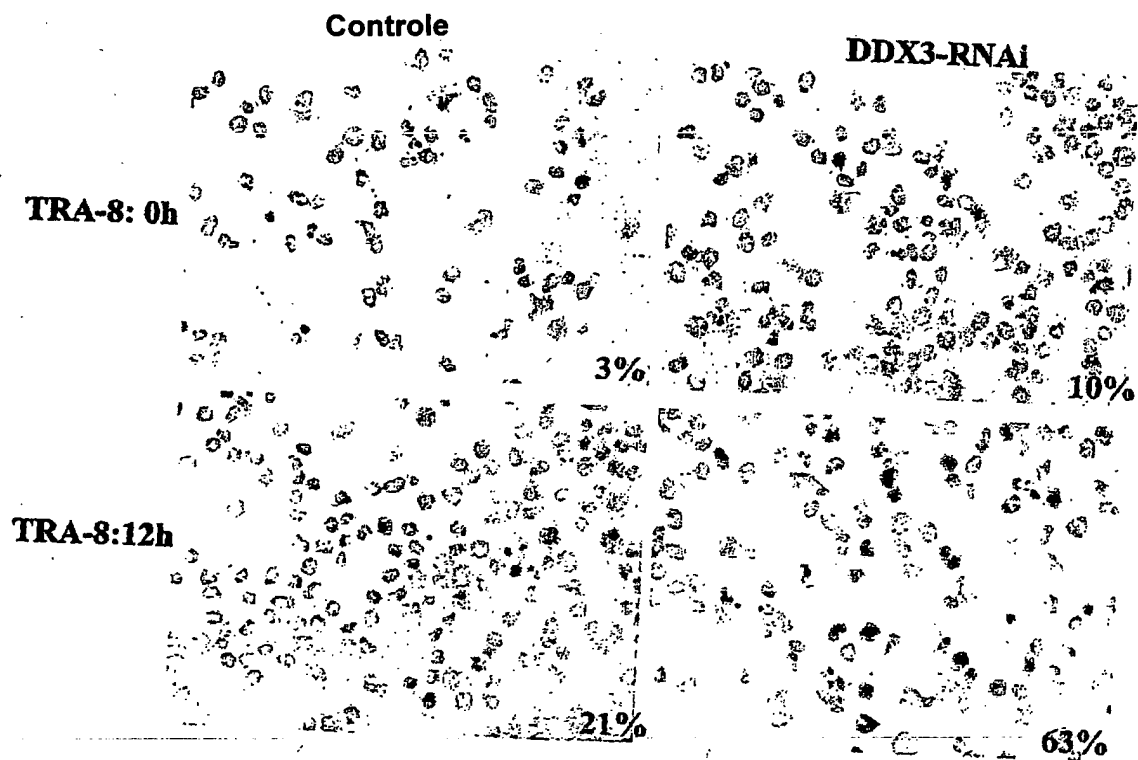


FIG. 9D

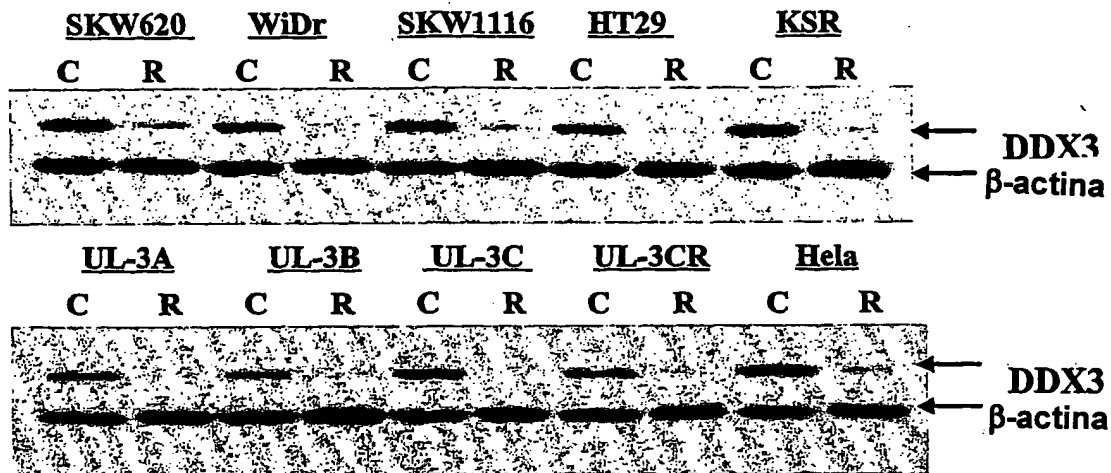


FIG. 9E

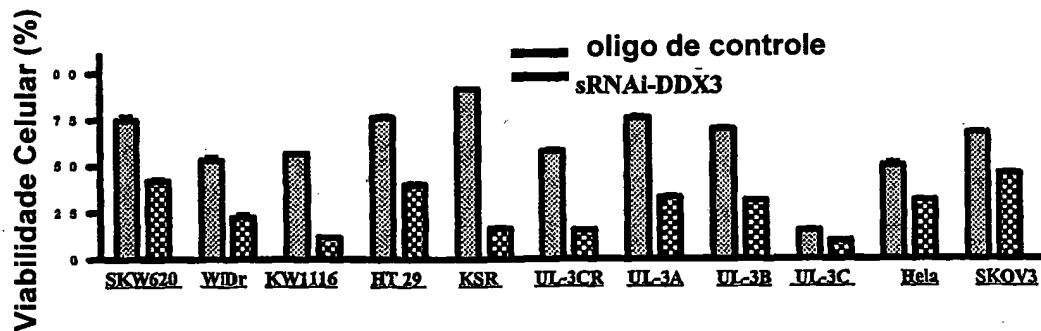
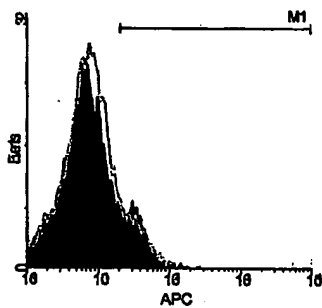


FIG. 9F

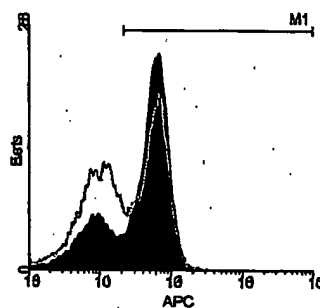
DR5 sem Domínio da Morte

— No TRA-8: 2.72%
 — TRA-8 (1 μ g/ml): 6.28%



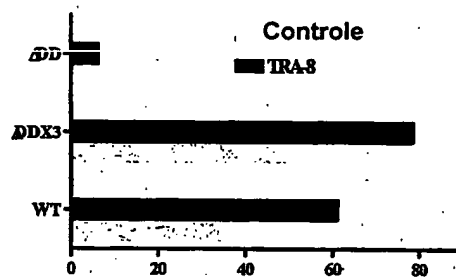
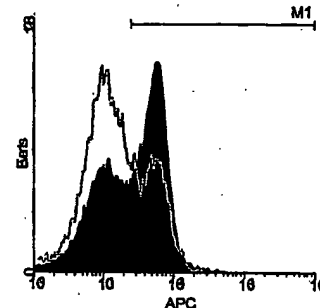
DR5 sem Domínio de Ligação a DDX3

— No TRA-8: 52.03%
 — TRA-8 (1 μ g/ml): 78.69%



WT DR5

— No TRA-8: 37.91%
 — TRA-8 (1 μ g/ml): 61.07%



Células apoptóticas (% DR5+ Células)

FIG. 10

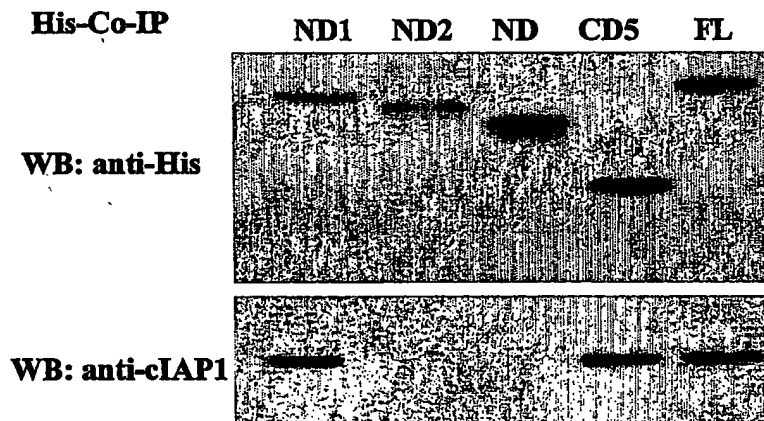
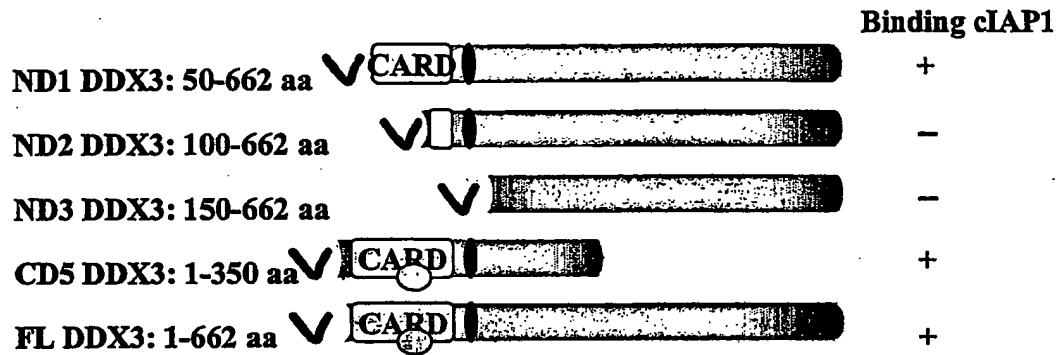


FIG. 11A

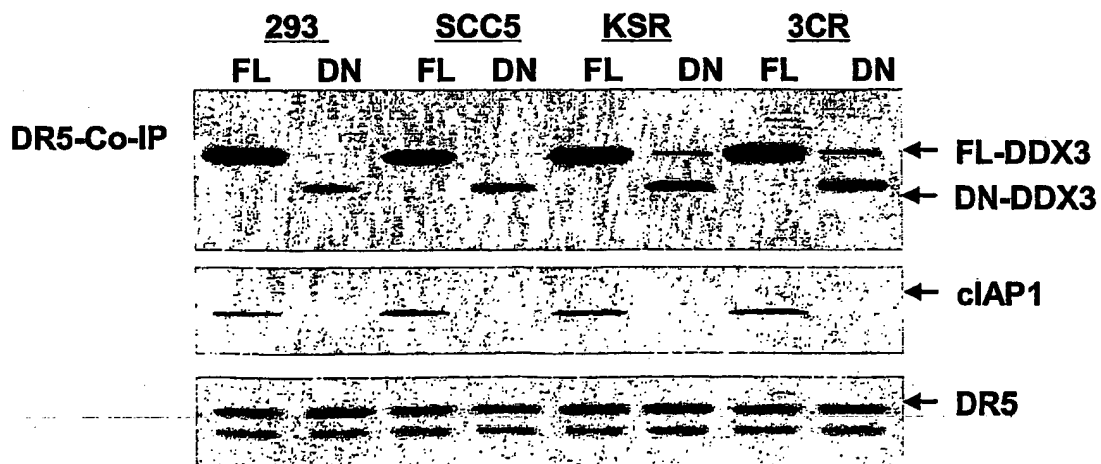


FIG. 11B

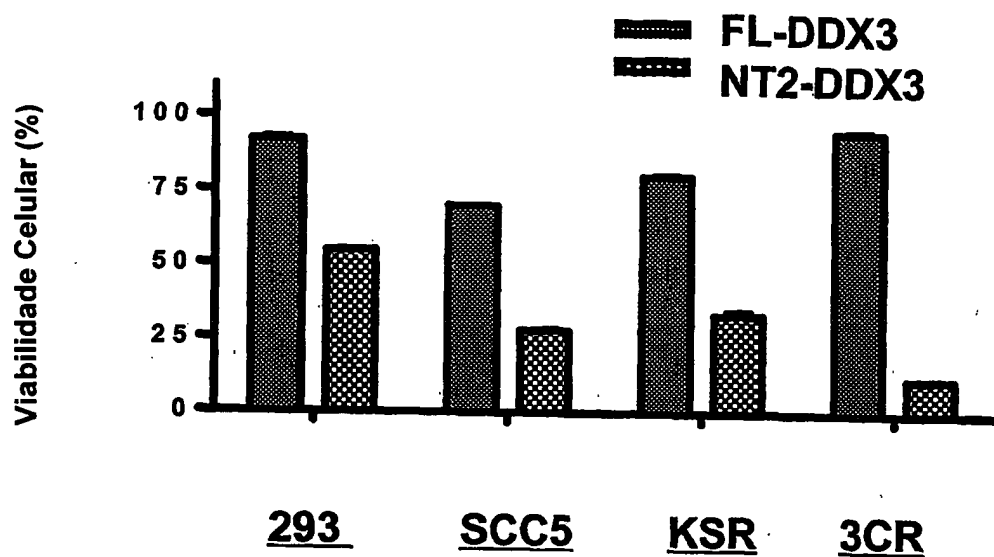


FIG. 11C

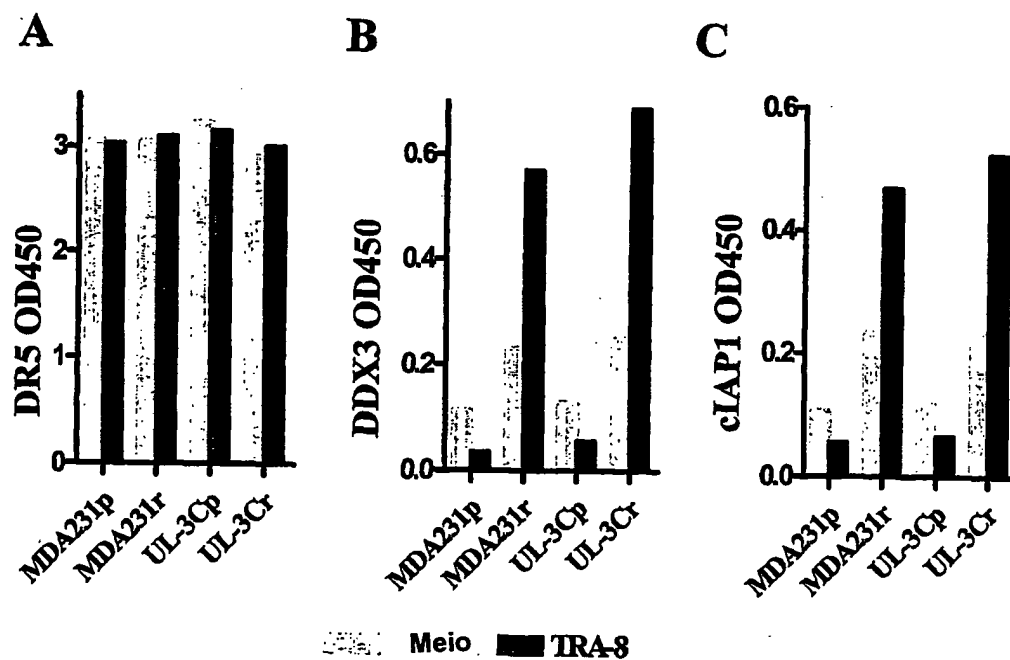


FIG. 12A-C

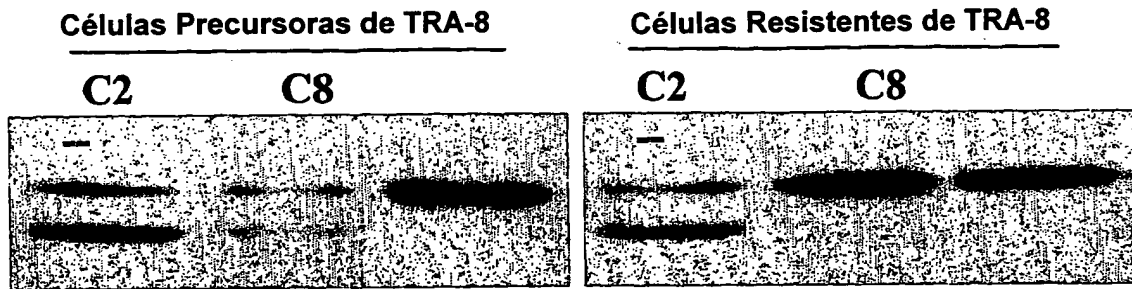


FIG. 12D

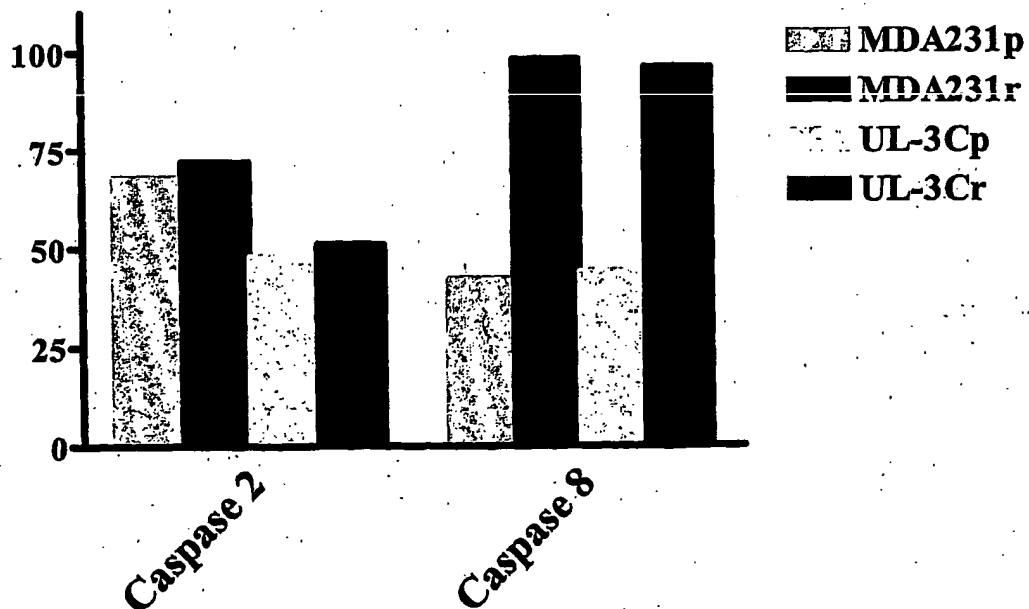


FIG. 12E

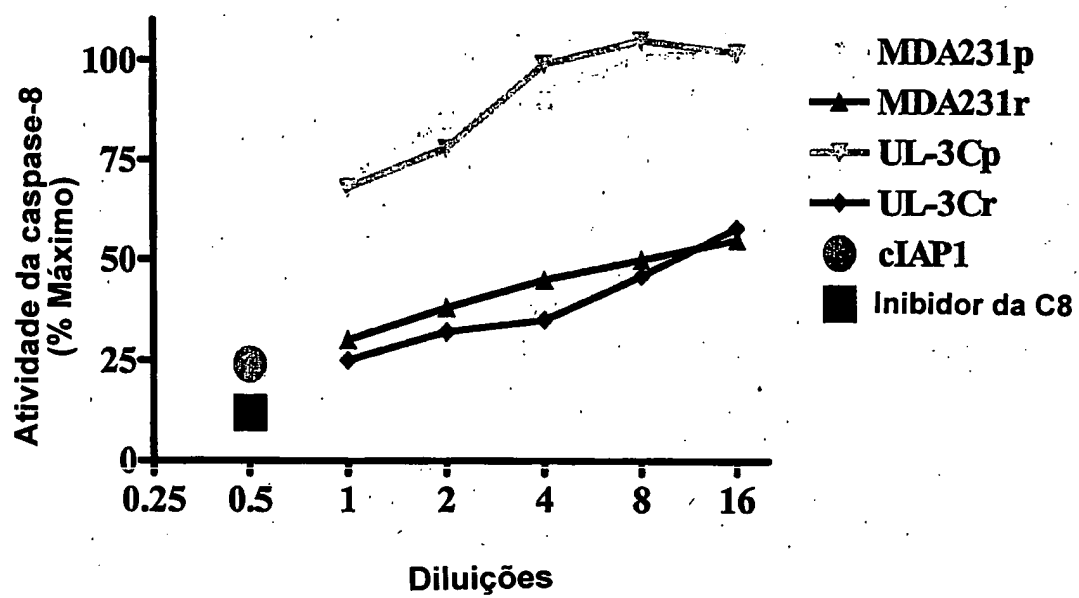


FIG. 12F

SGIHSGATTAPS (SEQ ID NO:18) β -catenina

SVPPSPSGSQASSPQSS (SEQ ID NO:19) glicogênio sintase

SSFGSRSDSRGKSSFFSDRGSS (SEQ ID NO:20) DDX3

FIG. 13A

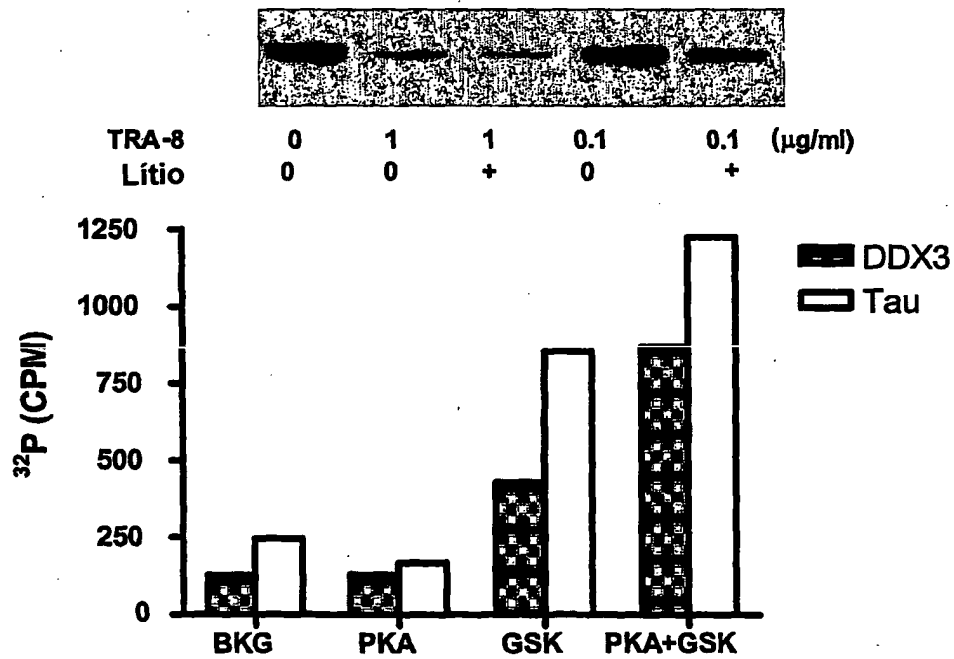


FIG. 13B

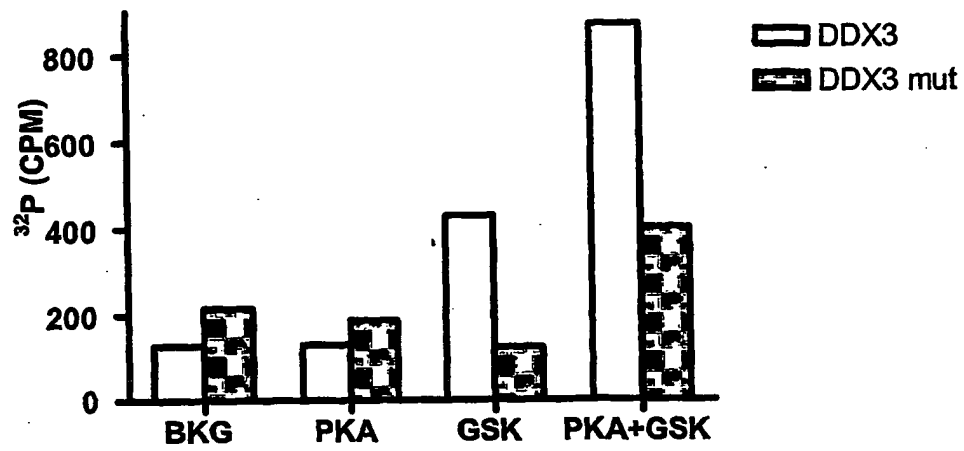


FIG. 13C

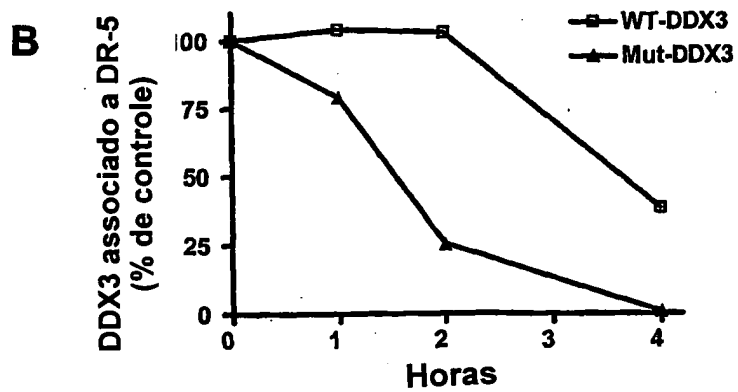
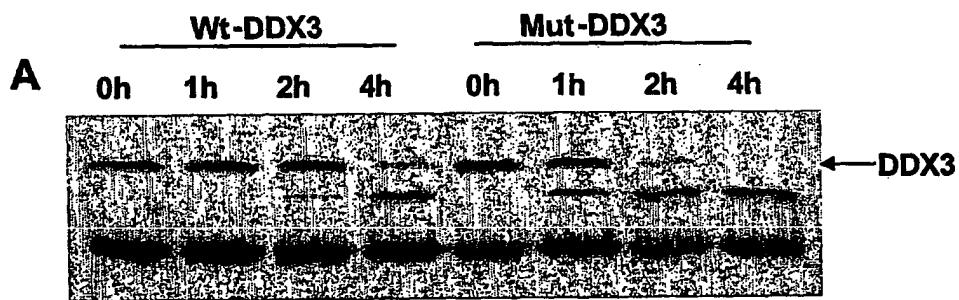


FIG. 13D

RESUMO

“MÉTODOS DE REVERTER OU PREVENIR A RESISTÊNCIA DE UMA CÉLULA A UM AGONISTA DO RECEPTOR DA MORTE, DE TRIAR UMA CÉLULA QUANTO A UM BIOMARCADOR DA RESISTÊNCIA A UM AGONISTA DO RECEPTOR DA MORTE, DE MONITORAR A RESISTÊNCIA A UM AGONISTA DO RECEPTOR DA MORTE EM UM INDIVÍDUO, DE INDUZIR SELETIVAMENTE A APOPTOSE EM UMA CÉLULA ALVO EXPRESSANDO UM RECEPTOR DA MORTE, DE TRATAR DE UM INDIVÍDUO COM CÂNCER, DE TRATAR DE UM INDIVÍDUO COM UMA DOENÇA INFLAMATÓRIA OU AUTOIMUNE, DE BLOQUEAR A LIGAÇÃO DA PROTEÍNA CONTENDO CARD A UM RECEPTOR DA MORTE EM UMA CÉLULA, DE BLOQUEAR A ASSOCIAÇÃO DE UM IAP COM O RECEPTOR DA MORTE E DE TRIAR UM MODULADOR DE UMA PROTEÍNA CONTENDO CARD, COMPOSIÇÃO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR, CÉLULA, E, POLIPEPTÍDEO ISOLADO”

É fornecido neste relatório um método de reverter ou prevenir a resistência de células alvo a um agonista dos receptores da morte. São igualmente fornecidos métodos de triagem quanto à resistência a biomarcadores e de monitorar a resistência dos agonistas dos receptores da morte. Igualmente fornecidos são os métodos de seletivamente induzir a apoptose em uma célula alvo, tratando-se de um indivíduo com câncer, doenças autoimunes ou inflamatórias, compreendendo administrar as composições fornecidas neste relatório. São ainda fornecidas composições compreendendo agentes que modulam as proteínas contendo CARD.