



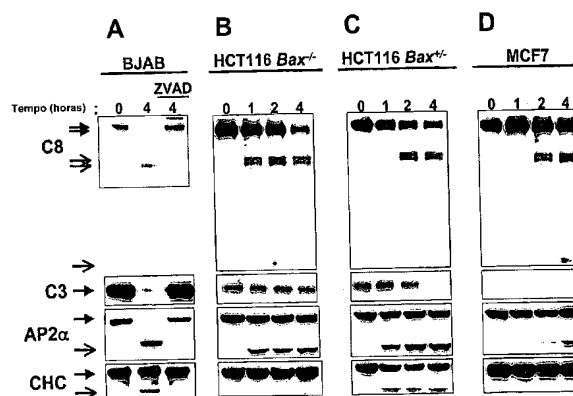
(22) Data de Depósito: 20/06/2007
(43) Data da Publicação: 23/10/2012
(RPI 2181)



(51) Int.Cl.:
G01N 33/50

(87) Publicação Internacional: WO 2007/149486de
27/12/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA A DETECÇÃO DA APOPTOSE, MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UMA CÉLULA DE CÂNCER HUMANO E KIT PARA OBSERVAR A APOPTOSE. A invenção fornece materiais e métodos para observação de fragmentos de proteínas produzidos durante a apoptose a fim de observar esse processo em células de mamíferos. Exemplos de realizações da presente invenção podem ser utilizados, por exemplo, para observar apoptose a fim de examinar a sensibilidade de uma célula de câncer de mamífero a agentes indutores da apoptose.



“MÉTODO PARA A DETECÇÃO DA APOPTOSE, MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UMA CÉLULA DE CÂNCER HUMANO E KIT PARA OBSERVAR A APOPTOSE”

PEDIDOS RELACIONADOS

5 O presente pedido reivindica prioridade do Pedido de Patente Provisório US 60/814.955, depositado em 20 de junho de 2006, cujo teor é integralmente incorporado ao presente pelas referências.

CAMPO DA INVENÇÃO

10 A presente invenção esta relacionada de maneira geral aos métodos de observação da apoptose em células de mamíferos, como células de câncer humanas expostas a um agente que induz a apoptose.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O controle do número de células em mamíferos é determinado, em parte, pelo balanço entre a proliferação celular e a morte celular. Uma forma de morte celular, muitas vezes referida como morte celular necrótica, é tipicamente caracterizada como uma forma patológica de morte celular resultante de algum trauma ou lesão celular. Em contraste, existe outra forma “fisiológica” de morte celular que prossegue geralmente de uma forma ordenada ou controlada. Esta forma ordenada ou controlada de morte celular é freqüentemente referida como “apoptose” (vide, por exemplo, Barr *et al.*, *Bio/Technology*, 12:487-493 (1994); Steller *et al.*, *Science*, 267:1445-1449 (1995)). A morte celular apoptótica ocorre naturalmente em muitos processos fisiológicos, incluindo o desenvolvimento embrionário humano e a seleção clonal no sistema imune (Itoh *et al.*, *Cell*, 66:233-243 (1991)).

25 Varias moléculas como, por exemplo, o fator de necrose tumoral- α (“TNF- α ”), fator de necrose tumoral- β (“TNF- β ” ou “limfotoxina- α ”), limfotoxina- β (“LT- β ”), ligante de CD30, ligante de CD27, ligante de CD40, ligante de OX-40, ligante de 4-1BB, ligante de Apo-1 (também referido como Fas ligante ou CD95

ligante), ligante de Apo-2(também referido como Apo2L ou TRAIL), ligante de Apo-3 (também referido como TWEAK), APRIL, ligante de OPG (também referido como ligante RANK, ODF, ou TRANCE), e TALL-1 (também referido como BlyS, BAFF ou THANK) têm sido identificadas como citocinas membros da família do

5 fator de necrose tumoral ("TNF") [vide, por exemplo, Gruss e Dower, *Blood*, 85:3378-3404 (1995); Schmid *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:1881 (1986); Dealtry *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 17:689 (1987); Pitti *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996); Wiley *et al.*, *Immunity*, 3:673-682 (1995); Browning *et al.*, *Cell*, 72:847-856 (1993); Armitage *et al.* *Nature*, 357:80-82 (1992), documento WO 97/01633

10 publicado em 16 de janeiro de 1997; documento WO 97/25428 publicado em 17 de julho de 1997; Harsters *et al.*, *Curr. Biol.*, 8:525-528 (1998); Simonet *et al.*, *Cell*, 8_9:309-319 (1997); Chicheportiche *et al.*, *Biol. Chem.*, 272:32401-32410 (1997); Hahne *et al.*, *J. Exp. Med.*, 188:1185-1190 (1998); WO98/28426 publicado em 2 de julho de 1998; WO98/46751 publicado em 22 de outubro de 1998; WO98/18921

15 publicado em 7 de maio de 1998; Moore *et al.*, *Science*, 285:260-263 (1999); Shu *et al.*, *J. Leukocyte Biol.*, 65:680 (1999); Schneider *et al.*, *J. Exp. Med.*, 189:1747-1756 (1999); Mukhopadhyay *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:15978-15981 (1999)]. Entre estas moléculas, o TNF- α , TNF- β , ligante de CD30, ligante de 4-1BB, ligante de Apo-1, ligante de Apo-2 (Apo2L/TRAIL) e ligante de Apo-3 (TWEAK), têm sido

20 reportados como estando envolvidos na morte celular apoptótica. Tanto TNF- α quanto TNF- β foram descritos por induzir a morte apoptótica em células tumorais suscetíveis (Schmid *et al.*, *Proc. Natl. Acad.*, 8_3: 1881 (1986); Dealtry *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 17: 689 (1987)).

Moléculas adicionais acreditadas como pertencentes à família das

25 citocinas TNF são descritas por estarem envolvidas com o processo da apoptose. Por exemplo, em Pitti *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996), é descrita uma molécula designada como Apo-2 ligante. Vide também, documento WO 97/25428 publicado em 17 de julho de 1997. A ligante de Apo-2 humana de

comprimento total é descrita como sendo um polipeptídeo de 281 aminoácidos que induz a apoptose em diferentes células de mamíferos. Outros pesquisadores descreveram polipeptídios relacionados referidos como TRAIL (Wiley *et al.*, *Immunity*, 3:673-682 (1995); documento WO 97/01633 publicado em 16 de janeiro de 1997) e AGP-1 (documento WO 97/46686 publicado em 11 de dezembro de 1997).

Várias moléculas na família de TNF também assumiram papel(éis) na função ou desenvolvimento do sistema imunológico (Gruss *et al.*, *Blood*, 85: 3378 (1995)). Zheng *et al.*, relataram que TNF está envolvida na apoptose pós-estímulo de células T CD8-positivas (Zheng *et al.*, *Nature*, 377: 348-351 (1995)). Outros pesquisadores relataram que o ligante CD30 pode estar envolvido na deleção de células T auto-reativas no timo (Amakawa *et al.*, *Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Programmed Cell Death*, Abstr. n° 10 (1995)). O ligante CD40 ativa muitas funções das células B, que incluem a proliferação, secreção de imunoglobulinas e sobrevivência (Renshaw *et al.*, *J. Exp. Med.*, 180: 1889 (1994)). Outra citocina da família do TNF recentemente identificada, TALL-1 (BlyS), foi relatada por induz, sob certas condições, a proliferação de células B e a secreção de imunoglobulina (Moore *et al.*, *supra*; Schneider *et al.*, *supra*; Mackay *et al.*, *J. Exp. Med.*, 190: 1697 (1999)).

Mutações no receptor Fas/Apo-1 de camundongo ou genes ligantes (denominados *lpr* e *gld*, respectivamente) foram associadas a algumas disfunções auto-imunes, o que indica que o ligante Apo-1 pode desempenhar um papel na regulação da deleção clonal de linfócitos periféricos auto-reativos (Krammer *et al.*, *Curr. Op. Immunol.*, 6: 279-289 (1994); Nagata *et al.*, *Science*, 267: 1449-1456 (1995)). Também se relatou que o ligante Apo-1 induz a apoptose pós-estímulo em linfócitos T CD4-positivos e em linfócitos B, e pode estar envolvido na eliminação de linfócitos ativados quando a sua função não for mais necessária (Krammer *et al.*, *supra*; Nagata *et al.*, *supra*). Foram

relatados anticorpos monoclonais de camundongos agonistas que se ligam especificamente ao receptor Apo-1 que exibem atividade matadora de células que é comparável ou similar à do TNF- α (Yonehara *et al.*, *J. Exp. Med.*, 169: 1747-1756 (1989)).

A indução de diversas respostas celulares mediadas pelo TNF, tais como ligantes da família do TNF são tipicamente ativados por sua ligação a receptores específicos nas células. Alguns, mas não todos, ligantes da família do TNF se ligam e induzem as diversas atividades biológicas através da superfície celular ou "receptores de morte" para ativar as caspases, ou enzimas que realizam a morte celular ou a via da apoptose (Salvesen *et al.*, *Cell*, 91: 443-446 (1997). incluído entre os membros da superfamília dos receptores de TNF identificadas até o momento são TNFR1, TNFR2, TACI, GITR, CD27, OX-40, CD30, CD40, HVEM, Fas (também denominado Apo-1 ou CD95), DR4 (também denominado como TRAIL-R1), DR5 (também denominado como Apo-2 ou TRAIL-R2), DcR1, DcR2, osteoprotegerina (OPG), RANK e Apo-3 (também denominado DR3 ou TRAMP); (vide, por exemplo, Ashkenazi, *Nature Reviews*, 2:420-430 (2002); Ashkenazi e Dixit, *Science*, 281:1305-1308 (1998); Ashkenazi e Dixit, *Curr. Opin. Cell Biol*, 11:255-260 (2000); Golstein, *Curr. Biol.*, 7:750-753 (1997) Wallach, *Cytokine Reference*, Academic Press, 2000, páginas 377-411; Locksley *et al.*, *Cell*, 104:487-501 (2001); Gruss e Dower, *Blood*, 85:3378-3404 (1995); HohMan *et al.*, *J.Biol. Chem.*, 264:14927-14934 (1989); Brockhaus *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87: 3127-3131 (1990); EP 417,563, publicado em 20 de março de 1991; Loetscher *et al.*, *Cell*, 61:351 (1990); Schall *et al.*, *Cell*, 61:361 (1990); Smith *et al* *Science*, 248:1019-1023 (1990); Lewis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 2830-2834 (1991); Goodwin *et al.*, *Cell. Biol.*, 11:3020-3026 (1991); Stamenkovic *et al.*, *EMBO J.*, 8:1403-1410 (1989); Mall *et al.*, *EMBO J.*, 9:1063-1068 (1990); Anderson

et al., *Nature*, 390:175-179 " (1997); Chicheportiche et al. , *J. Biol. Chem.*, 272:32401-32410 (1997); Pan al.. *Science*, 276:111-113 (1997); Pan et al., *Science*, 277:815-818 (1997); Sheridan et al., *Science* 277: 818-821 (1997); Degli-Esposti et al., *J. Exp. Med.*, 186:1165-1170 (1997); Marsters et al., *Curr. Biol.*, 7:1003-1006 (1997); Tsuda et al., *BBRC*, 234: 137-142 (1997); Nocentini et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:6216-6221 (1997); vonBulow et al., *Science*, 278:138-141 (1997)).

A maior parte desses membros da família de receptores de TNF partilha a estrutura típica de receptores da superfície celular, incluindo regiões extracelular, intracelular e transmembrana, enquanto outros são encontrados naturalmente como proteínas solúveis sem o domínio intracelular e transmembrana. A porção extracelular dos TNFRs contém uma sequência repetitiva padrão de aminoácidos dos quatro domínios ricos em cisteína (CDRs), partindo do NH₂-terminal.

O ligante denominado Apo2L ou TRAIL foi identificado muitos anos atrás como uma citocina membro da família do TNF. (vide, por exemplo, Wiley et al., *Immunity*, 3:673-682 (1995); Pitti et al., *J. Biol. Chem.*, 271:12697-12690 (1996); documento WO 97/01633; documento WO 97/25428; Patente US 5.763.223 publicada em 9 de junho de 1998;patente US 6.284.236 publicada em 4 de setembro de 2001). A sequência polipeptídica nativa completa do Apo2L/TRAIL humano é uma sequência de 281 aminoácidos da proteína transmembrana Tipo II. Algumas células podem produzir uma forma solúvel natural de polipeptídeo, pela clivagem enzimática da região extracelular dos polipeptídeos (Mariani et al., *J. Cell. Biol.*, 137:221-229 (1997)).

Estudos por cristalografia de formas solúveis de Apo2L/TRAIL revelam uma estrutura homotrimérica similar às estruturas do TNF e outras proteínas relacionadas (Hymowitz et al., *Molec. Cell*, 4:563-571 (1999); Hymowitz et al., *Biochemistry*, 39:633-644 (2000)). Cha et al.. *Immunity*,

11:253-261 (1999); Mongkolsapaya *et al.*, *Nature Structural Biology*, 6:1048 (1999); Hymowitz *et al.*, *Biochemistry*, 39:633-644 (2000)). Apo2L/TRAIL, diferentemente de outros membros da família do TNF, possui uma característica estrutural única em que três resíduos de cisteína (na posição 230 de cada subunidade no homotrímero) coordenam juntos um átomo de zinco, e que o zinco ligado é importante para a estabilidade do trímero e atividade biológica. (Hymowitz *et al.*, *supra*; Bodmer *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 275:20632-20637 (2000)).

Tem sido relatado na literatura que a Apo2L/TRAIL pode ter um papel importante na modulação do sistema imune, incluindo doenças autoimunes como, por exemplo, a artrite reumatóide. Vide, por exemplo, Thomas *et al.*, *J. Immunol.*, 161:2195-2200 (1998); Johnsen *et al.*, *Cytokine*, 11:664-672 (1999); Griffith *et al.*, *J. Exp. Med.*, 189:1343-1353 (1999); Song *et al.*, *J. Exp. Med.*, 191:1095-1103 (2000)).

Formas solúveis de Apo2L/TRAIL também foram relatadas como indutores de apoptose em uma variedade de células cancerosas *in vitro*, incluindo de tumores de cólon, pulmão, mama, próstata, bexiga, rim, ovário e cérebro, bem como, melanoma, leucemia e mieloma múltiplo (vide, por exemplo, Wiley *et al.*, *supra*; Pitti *et al.*, *supra*; Patente US 6.030.945 publicado em 29 de fevereiro de 2000; Patente US 6.746.668 publicado em 8 de junho de 2004; Rieger *et al.*, *FEBS Letters*, 427:124-128 (1998); Ashkenazi *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 104:155-162 (1999); Walczak *et al.*, *Nature Med.*, 5:157-163 (1999); Keane *et al.*, *Cancer Research*, 59:734-741 (1999); Mizutani *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:2605-2612 (1999); Gazitt, *Leukemia*, 13:1817-1824 (1999); Yu *et al.*, *Cancer Res.*, 60:2384-2389 (2000); Chinnaiyan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:1754-1759 (2000)). Estudos *in vivo* em modelos de tumores murinos sugerem que a Apo2L/TRAIL, sozinha ou em combinação com quimioterapia ou radioterapia, pode exercer um efeito anti-tumor substancial. (vide, por

exemplo, Ashkenazi *et al.*, *supra*; Walzcak *et al.*, *supra*; Gliniak *et al.*, *Cancer Res.*, 59:6153-6158 (1999); Chinnaiyan *et al.*, *supra*; Roth *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 265:1999 (1999); pedido PCT US/00/15512; pedido PCT US/01/23691). Em contraste a muitos tipos de células cancerosas, a maioria das células humanas normais parece ser resistente a indução da apoptose por certas formas recombinantes de Apo2L/TRAIL (Ashkenazi *et al.*, *supra*; Walzcak *et al.*, *supra*). Jo *et al.* Relatou que uma forma solúvel da Apo2L/TRAIL poli-histidina marcada induz a apoptose *in vitro* em hepatócitos humanos normais isolados, mas não em hepatócitos não humanos normais. (Jo *et al.*, *Nature Med.*, 6:564-567 (2000); vide também, Nagata, *Nature Med.*, 6:502-503 (2000)). Acredita-se que determinadas preparações de Apo2L/TRAIL recombinante podem variar em termos de propriedades bioquímicas e de atividades biológica em células doentes *versus* células normais, dependendo, por exemplo, da presença ou da ausência de uma molécula marcada, presença de zinco e % do conteúdo de trímeros (vide, Lawrence *et al.*, *Nature Med.*, *Letter to the Editor*, 7:383-385 (2001); Qin *et al.*, *Nature Med.*, *Letter to the Editor*, 7:385-386 (2001)).

A Apo2L/TRAIL foi encontrada por se ligar com pelo menos cinco diferentes receptores. Pelo menos dois dos receptores ao qual a Apo2L/TRAIL se liga contem um domínio de morte citoplasmático funcional. Um destes receptores é denominado "DR4" (e alternativamente denominado como TR4 ou TRAIL-R1) (Pan *et al.*, *Science* 276:111-113 (1997); vide também, documento W098/32856 publicado em 30 de julho de 1998; documento W099/37684 publicado em 29 de julho de 1999; documento WO 00/73349 publicado em 7 de dezembro de 2000; Patente US 003/0036168 publicado em 20 de fevereiro de 2003; patente US 6.433.147 publicado em 13 de agosto de 2002; Patente US 6.461.823 publicado em de outubro de 2002, e Patente US 6.342.383 publicado em 29 de janeiro de 2002).

Outra molécula é descrita como sendo um receptor para a Apo2L/TRAIL, denominada também como DR5 (e alternativamente denominado como Apo-2, TRAIL-R ou TRAIL-R2, TR6 Tango-63, hAPO8, TRICK2 ou KILLER (vide por exemplo, Sheridan *et al.*, *Science*, 277:818-821 (1997), Pan *et al.*, *Science*, 277:815-818(1997), W098/51793 publicado em 19 de novembro de 1998; W098/41629 publicado em 24 de setembro de 1998; Scream *et al.*, *Curr. Biol.*, 7:693-696 (1997); Walczak *et al.*, *EMBO J* 16:5386-5387 (1997); Wu *et al.*, *Nature Genetics*, 17:141-143 (1997), W098/35986 publicado em 20 de agosto de 1998; EP870,827 publicado em 14 de outubro de 1998; W098/46643 publicado em 22 de outubro de 1998; W099/02653 publicado em 21 de janeiro de 1999; W099/09165 publicado em 25 de Fevereiro de 1999; W099/11791 publicado em 11 de março de 1999; WO 03/042367 publicado em 22 de maio de 2003; WO 02/097033 publicado em 5 de dezembro de 2002; WO 03/038043 publicado em 8 de maio de 2003; Patente US 2002/0072091 publicado em 13 de agosto de 2002; Patente US 2002/0098550 publicado em 7 de dezembro de 2001; Patente US 6,313,269 publicado em 6 de dezembro de 2001; Patente US 2001/0010924 publicado em 2 de agosto de 2001; Patente US 2003/01255540 publicado em 3 de julho de 2003; Patente US 2002/0160446 publicado em 31 de outubro de 2002; Patente US 2002/0048785 publicado em 25 de abril de 2002; Patente US 2004/0141952 publicado em 21 de julho de 2004; Patente US 2005/0129699 publicado em 16 de junho de 2005; Patente US 2005/0129616 publicado em 16 de junho de 2005; Patente US 6.342.369 publicado em Fevereiro de 2002; Patente US 6.569.642 publicado em 27 de maio de 2003, Patente US 6.072.047 publicado em 6 de junho de 2000, Patente US 6.642.358 publicado em 4 de novembro de 2003; Patente US 6.743.625 publicado em 1º de junho de 2004). Como DR4, DR5 é reportado por conter um domínio de morte citoplasmática e ou ser capaz de sinalizar a apoptose após a ligação do ligante. A estrutura de cristal do complexo formado entre a Apo-2L/TRAIL e a DR5 é descrita em Hymowitz *et al.*, *Molecular*

Cell, 4:563-571 (1999). Outro receptor contendo um domínio de morte foi identificado e denominado como DR6 (Pan *et al.*, *FEBS Letters*, 431: 351-356 (1998)).

Sobre a ligação ao ligante, DR4 e DR5 podem provocar o apoptose independentemente pelo recrutamento e ativação do iniciador da apoptose, caspase-8, através da molécula contendo o adaptador do domínio de morte referida como FADD/Mort1. (Kischkel *et al.*, *Immunity*, 12:611-620 (2000); Sprick *et al.*, *Immunity*, 12:599-609 (2000); Bodmer *et al.*, *Nature Cell Biol.*, 2:241-243 (2000)).

Foi descrito que Apo2L/TRAIL também se liga a receptores denominados DcR1, DcR2 e OPG, os quais se acreditava funcionar como inibidores, em vez de transdutores de sinais (vide, por exemplo, DCR1 (também referido como TRID, LIT ou TRAIL-R3) (Pan *et al.*, *Science*, 276:111-113 (1997); Sheridan *et al.*, *Science*, 277:818-821 (1997); McFarlane *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:25417-25420 (1997); Schneider *et al.*, *FEBS Letters*, 416:329-334 (1997); Degli-Esposti *et al.*, *J. Exp. Med.*, 186:1165-1170 (1997); e Mongkolsapaya *et al.*, *J. Immunol.*, 160:3-6 (1998)) e DCR2 (também denominado TRUNDD ou TRAIL-R4) (Marsters *et al.*, *Curr. Biol.*, 7:1003-1006 (1997); Pan *et al.*, *FEBS Letters*, 424:41-45 (1998); Degli-Esposti *et al.*, *Immunity*, 7:813-820 (1997)) OPG (Simonet *et al.*, *supra*). Em contraste ao DR4 e DR5, os receptores DcR1 e DcR2 não sinalizam a apoptose.

Certos anticorpos que se ligam a receptores DR4, DR5 e/ou Fas são descritos na literatura. Por exemplo, anticorpos anti-DR4 dirigidos ao receptor DR4 e possuindo atividade agonística ou apoptótica em determinadas células de mamíferos são descritos em, por exemplo, documento WO 99/37684 publicado em 29 de julho de 1999; documento WO 00/73349 publicado em 12 de julho de 2000; documento WO 03/066661 publicado em 14 de agosto de 2003. Vide, também, por exemplo, Griffith *et al.*, *J Immunol* 162:2597-2605

(1999); Chuntharapai *et al.*, *J. Immunol.* , 166:4891-4898 (2001); documento WO 02/097033 publicado em 2 de dezembro de 2002; documento WO 03/042367 publicado em 22 de maio de 2003; documento WO 03/038043 publicado em 8 de maio de 2003; documento WO 03/037913 publicado em 8 de maio de 2003; US 2003/0073187 publicado em 17 de abril de 2003; US 2003/0108516 publicado em 12 de junho de 2003. Certos anticorpos anti-DR5 também foram descritas, vide, por exemplo, documento WO 98/51793 publicado em 8 de novembro de 1998; Griffith *et al.*, *J Immunol.*, 162:2597-2605 (1999); Ichikawa *et al.*, *Nature Med.* , 7:954-960 (2001); Hylander *et al.*

10 "An Antibody to DR5 (TRAIL-Receptor 2) Suppresses the Growth of Patient Derived Gastrointestinal Tumors Grown in SCID mice", Resumo, 2º Congresso Internacional de Anticorpos Monoclonais em Cânceres, 29 de Agosto – 1 de Setembro de 2002, Banff, Alberta, Canadá; documento WO 03/038043 publicado em 8 de maio de 2003; documento WO 03/037913 publicado em 8 de maio de 2003; US 2003/0180296 publicado em 25 de setembro de 2003;.

15 Além disso, alguns anticorpos que possuem reatividade cruzada para ambos receptores DR4 e DR5 foram descritos (vide, por exemplo, Patente US 6252050 publicada em 26 de junho de 2001). Anticorpos anti-Fas agonistas que induzem a apoptose nas células alvo que expressam Fas, incluem, mas

20 não estão limitadas a, MAbs M2 e M3 (IgG; Alderson *et al.*, 1995, *J. Exp. Med.* 181:71-77); anti Fas-MAb (IgM; Yonehara *et al.*, 1989, *J. Exp. Med.* 169:1747-1756); MAb CH11 (IgM; Alderson *et al.*, 1994, *Int. Immunol.* 6:1799-806); e anti-APO-1-(IgG; Dhein *et al.* de 1992, *J. Immunol.*, 149:3166-3173).

A apoptose desempenha um papel crucial no desenvolvimento e

25 na homeostase dos organismos multicelulares (vide, por exemplo, Danial, N.N. *et al.*, *Cell* 116:205-19 (2004)). Dois dos principais mecanismos de sinalização, a via celular intrínseca e extrínseca, controla a indução da apoptose (vide, por exemplo, Strasser, A., *et al.*, *Annu Rev Biochem* 69, 217-45 (2000)). Estas vias

• ativam proteases de cisteína, denominadas de caspases, que clivam diferentes
 proteínas celulares que são essenciais para a integridade da célula. As
 caspases reconhecem seqüências tetrapeptídicas específicas contendo
 aspartato e clivam o peptídeo adjacente ligado (vide, por exemplo, Thornberry,
 5 N.A. et. al., *Science* 281, 1312-6 (1998)). Ativação da via extrínseca celular
 ocorre em resposta a ligantes como, por exemplo, ligante de Fas (FasL) e
 ligante de Apo2 / ligante indutor de apoptose relacionado com TNF
 (Apo2L/TRAIL), por intermédio dos seus respectivos “receptores de morte” Fas
 na superfície celular (Apo1/CD95) e DR4 ou DR5 (vide, por exemplo, Nagata,
 10 S. *Cell* 288:355-65 (1997) e LeBlanc, H.N. et. al., *Cell Death Differ* 10:66-75
 (2003)). O acoplamento do ligante ativa o recrutamento do adaptador FADD
 (domínio de morte associada a Fas) para um domínio de morte na cauda do
 receptor citoplasmático. O FADD recruta a protease iniciadora da caspase-8
 para formar o “complexo de sinalização de indução de morte” (DISC) (vide, por
 15 exemplo, Kischkel, F.C. et al. *EMBO J* 14:5579-88 (1995)). Moléculas próximas
 a caspase-8 no DISC estimulam a atividade enzimática, resultando no auto-
 processamento (vide, por exemplo, Boatright, K.M. et al. *Mol Cell* 11:529-41
 (2003)). A caspase-8 clivada é então liberada do DISC para o citoplasma e
 ativa proteoliticamente as caspases efetoras, tais como a caspase-3 e
 20 caspase-7. Em certos tipos de células a estimulação DR gera forte atividade da
 caspase-8, que ativa fortemente as caspases efetoras levando a célula à
 apoptose (vide, por exemplo, Scaffidi, C, et. al., *J Biol Chem* 274:1541-8
 (1999)). Outros tipos celulares exigem amplificação de sinal pela via intrínseca:
 a caspase-8 cliva apenas a proteína Bid (BH3) domínio 3 de homologia à Bcl-2,
 25 que acopla a via intrínseca através do domínio multi-BH das proteínas Bax e
 Bak, reforçando a ativação da caspase efetora e da apoptose (vide, por
 exemplo, Danial, N.N. et. al., *Cell* 116:205-19 (2004) e Strasser, A., et. al.,
Annu Rev Biochem 69:217-45 (2000)).

Apoptose é comumente caracterizada pela condensação e, marginalização da cromatina nuclear, fragmentação da estrutura nuclear formando os chamados corpos apoptóticos. Estes aspectos morfológicos da apoptose podem ser observados através de colorações convencionais, corantes que se acumulam seletivamente nos núcleos, tais como iodeto de propídio ou Hoechst 33258, ou podem ser observados também por microscopia eletrônica. A fragmentação internucleossomal do DNA, que está freqüentemente ligado, mas não é diagnóstica, a morte celular por apoptose é também utilizada para identificar e quantificar apoptose.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

Os requerentes identificaram fragmentos de proteínas geradas em células sofrendo o processo de apoptose, que podem ser utilizados como biomarcadores de morte celular por apoptose. Exemplos de realização da presente invenção fornecem métodos e materiais para a observação destes fragmentos protéicos, a fim de, por exemplo, observar a morte de células apoptóticas em células de mamíferos expostas a um ou mais agentes indutores de apoptose. Em um exemplo de realização ilustrativo da presente invenção, estes biomarcadores de apoptose são observados em células de câncer humano com o intuito de avaliar a eficácia de uma terapia que inclui a administração de um agente, como o indutor de apoptose Apo2L/TRAIL, Fas-L ou um agonista de Apo2L/TRAIL ou FasL.

Os requerentes da invenção possuem uma série de exemplos de realizações. Um exemplo de realização da presente invenção é um método para a detecção da apoptose em células de mamíferos, caracterizado pela exposição de um dos componentes da célula com um anticorpo que se liga a um fragmento de proteína produzida durante o processo da apoptose, de modo que o anticorpo se liga a um fragmento de proteína da AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina

(SEQ ID NO: 4); determinando a quantidade de anticorpo que se ligou ao fragmento de proteína produzido durante a apoptose, e comparando a quantidade de anticorpos ligados nesta etapa com a quantidade de anticorpos que se ligou a fragmento de proteína em uma célula de mamífero que não está sofrendo apoptose, caracterizado pelo fato de que se esta quantidade for superior a quantidade encontrada nas células livres de apoptose, então a apoptose é detectada. Opcionalmente, as células de mamíferos examinados por este método são células humanas de câncer de cólon, colorretal, pulmão, mama, próstata, bexiga, rim, ovário, cérebro, melanoma, leucemia ou mieloma.

Conforme descrito em detalhes abaixo, os métodos da invenção podem ser utilizados para observar a apoptose iniciada por uma série de diferentes receptores celulares. Em alguns exemplos de realização deste método, a apoptose nas células é desencadeada pelo receptor de morte 4 (SEQ ID NO: 5) ou receptor de morte 5 (SEQ ID NO: 6), por exemplo, pela exposição da célula com Apo2L/TRAIL (SEQ ID NO: 7) ou com um anticorpo que se liga ao receptor de morte 4 (SEQ ID NO: 5) ou receptor de morte 5 (SEQ ID NO: 6). Em outros exemplos de realização da presente invenção, a apoptose de células é iniciada pelo Fas (SEQ ID NO: 8), por exemplo, expondo a célula com FasL (SEQ ID NO: 9) ou com um anticorpo que se liga a Fas.

Os métodos da invenção podem ainda ser adaptados para serem utilizados em diversos contextos. Por exemplo, este método de observação da apoptose pode ser utilizado para avaliar a sensibilidade de uma célula à Apo2L/TRAIL (SEQ ID NO: 7) ou com um anticorpo que se liga ao receptor de morte 4 (SEQ ID NO: 5) ou receptor de morte 5 (SEQ ID NO: 6). Em um exemplo específico da presente invenção, estes métodos podem ser usados para avaliar a eficácia da terapia que compreende a administração de Apo2L/TRAIL (SEQ ID NO: 7) ou com um anticorpo que se liga ao receptor de morte 4 (SEQ ID NO: 5) ou receptor de morte 5 (SEQ ID NO: 6). Do mesmo

modo, outros exemplos de realização da presente invenção podem ser utilizados para analisar a sensibilidade das células ao FasL (SEQ ID NO: 9) ou com um anticorpo que se liga a Fas, por exemplo para avaliar a eficácia de uma terapia que compreende a administração de FasL (SEQ ID NO: 9) ou um anticorpo que se liga a Fas.

Como discutido em detalhe abaixo, os métodos da invenção podem observar a fragmentação apoptótica de uma série de proteínas diferentes dentro de uma célula usando qualquer uma de uma variedade de técnicas conhecidas no estado da arte, como imunoensaios utilizando anticorpos direcionados a um ou mais destes fragmentos apoptóticos. Por exemplo, certas realizações da presente invenção o anticorpo se liga a um fragmento de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), por exemplo, um fragmento de cerca de 64 kDa ou 33 kDa. Em alguns exemplos de realização da presente invenção, o fragmento de proteína AP2- α ligada pelo anticorpo compreende DVFD da SEQ ID NO: 1 ou GPAA da SEQ ID NO: 1. Outros exemplos de realização da presente invenção podem utilizar um anticorpo que se liga a um fragmento de cadeia pesada da proteína clatrina (SEQ ID NO: 2). Outros exemplos de realização da presente invenção podem utilizar um anticorpo que se liga a um fragmento de proteína AP1/2 β (SEQ ID NO: 3). Outros exemplos de realização da presente invenção podem utilizar um anticorpo que se liga a um fragmento de proteína dinamina (SEQ ID NO: 4).

Certos exemplos de realização da presente invenção são adequados para analisar um tipo específico de atividade apoptótica e/ou apoptose em um contexto fisiológico específico. Por exemplo, exemplos de realização da presente invenção podem ser utilizados para observar a apoptose em células de mamíferos mediada pelo receptor de morte 4 (SEQ ID NO: 5), receptor de morte 5 ou Fas (SEQ ID NO: 8). Tipicamente, esses métodos incluem a exposição de célula a um receptor de morte 4 (SEQ ID NO:

5), receptor de morte 5 (SEQ ID NO: 6) ou ligante de Fas; avaliando as células expostas ao ligante pela presença de fragmentos da proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4), comparando a quantidade de fragmento de proteínas na célula com a quantidade de fragmento de proteínas em células controle não expostas ao ligante; onde a apoptose é observada quando a quantidade de fragmentos de proteínas presentes na célula exposta ao ligante é maior do que a quantidade de fragmentos de proteína na célula controle não exposta ao ligante. Normalmente, nestes métodos, o ligante do receptor de morte 4, 5 ou Fas é o Apo2L/TRAIL (SEQ ID NO: 7), um anticorpo que se liga ao receptor de morte 4, 5 ou FasL (SEQ ID NO: 9) ou um anticorpo que se liga a Fas.

Outro exemplo de realização da presente invenção inclui a observação da sensibilidade de uma célula de mamífero à Apo2L/TRAIL (SEQ ID NO: 7) ou FasL (SEQ ID NO: 8) na apoptose induzida pela Apo2L/TRAIL ou FasL; examinando a presença de fragmentos de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4) nas células expostas a Apo2L/TRAIL ou FasL, comparando a quantidade de fragmento de proteínas nas células expostas ao Apo2L/TRAIL ou FasL com a quantidade de fragmento de proteínas em células controle não expostas ao Apo2L/TRAIL ou FasL; onde a apoptose é observada quando a quantidade de fragmentos de proteínas presentes na célula exposta ao Apo2L/TRAIL ou FasL é maior do que a quantidade de fragmentos de proteína na célula controle não exposta ao Apo2L/TRAIL ou FasL.

Exemplos de realizações da presente invenção também fornecem artigos de manufatura e *kits* que incluem anticorpos que se ligam um fragmento de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4). Um exemplo de

realização ilustrativo é um kit para caracterizar uma célula de mamíferos, o kit é composto por: um primeiro anticorpo que se liga a proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4). Um exemplo de realização ilustrativo é um kit para caracterizar uma célula de mamíferos, o kit é composto por: um primeiro anticorpo que se liga a um fragmento de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4), um segundo anticorpo que se liga a um fragmento de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4), no qual o primeiro e o segundo anticorpo não se ligam ao mesmo epítipo (e opcionalmente não se ligam a mesma proteína), um recipiente para (a) e (b) e instruções para o uso do kit.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 demonstra que a Apo2L/TRAIL induz a clivagem seletiva da maquinaria endocítica dependente de clatrina. (a) as células foram tratadas a 37 °C tanto com Apo2L/TRAIL trimérica (Colo205, HTC8) ou anticorpo reticulado, marcado com Apo2L/TRAIL (BJAB, HeLa-M) e os lisados celulares foram analisados por *imunoblot* para a clivagem de caspase-8 (C8), caspase-3 (C3), adaptina (AP)2 α , AP1/2 β (o anticorpo não distingue as isoformas 1 e 2 da AP), cadeia pesada de clatrina (CHC), ou receptor Tf (TfR). (b) Células Colo205 foram tratadas como em (a) e analisadas por *imunoblot* para o processamento de componentes específicos de diversos tipos de transporte endocítico associado a clatrina.

A Figura 2 demonstra o envolvimento de diferentes caspases na clivagem de AP2 α e CHC. (a) células BJAB foram tratadas com o inibidor pan-caspase zVAD-fmk (20 μ M, 30 min) seguido pela reticulação com Apo2L/TRAIL (1 μ g/mL) e analisadas por *imunoblot* para o processamento da caspase-8, caspase-3, AP2 α e CHC. Setas abertas indicam o produto da

clivagem e as setas fechadas indicam proteínas de comprimento total. (b-d) Células HCT116 *Bax*^{-/-} ou *Bax*^{+/-} ou células MCF-7 deficiente de caspase-3 foram tratadas com Apo2/TRAIL e analisadas da mesma forma que em (a).

A Figura 3 demonstra que o pré-tratamento com Apo2L/TRAIL inibe a endocitose *Tf*. (a,b) Células BJAB (a) ou Células Colo205 (b) foram pré-tratadas a 37 °C com (a) ou sem (b) reticulação ao Apo2/TRAIL para os tempos indicados e resfriado em gelo. As células foram então mantidas no gelo por 30 min. com Alexa-647 conjugado com *Tf* (TF⁶⁴⁷) e a captação a 37°C foi mensurada por citometria de fluxo. Cada valor de endocitose foi obtido a partir da curva da fase linear inicial de um gráfico da cinética de captação de 4 min (a, detalhe). As taxas foram normalizadas para que o observado na ausência de Apo2L/TRAIL (círculos brancos), fosse comparável à observada quando ligante foi excluído na etapa de pré-incubação, mas presente durante a incubação da fase *Tf* no ensaio (diamantes negros, 0 min). (c) Células BJAB foram pré-expostas ao veículo DMSO ou zVAD-fmk por 30 minutos, e então tratadas por 4 horas com Apo2L/TRAIL reticulado, mantidas no gelo e analisadas pela taxa de endocitose de TF⁶⁴⁷ em a e b. As Taxas foram normalizadas para a amostra tratada com DMSO (±EPM).

A Figura 4 apresenta uma caracterização da endocitose DRS. (a, b) células Colo205 com mAb 5C7⁶⁴⁷ ligada a suas superfícies foram incubadas em gelo por 30 minutos na ausência (diamantes) ou a presença (quadrados) de 10 µg/ml de trimérico ou reticulado com Apo2L/TRAIL, em seguida a temperatura foi modificada depois para 37 °C pelo tempo indicado e rapidamente resfriado com gelo. A fluorescência da superfície foi removida por meio da remoção com ácido “*stripping*” e a captação de DR5 foi quantificada por citometria de fluxo. Os valores médios foram plotados (± EPM, em b). (c) Células HeLa-m foram incubadas a 37 °C com 5 µg/ml 5C7⁶⁴⁷ e 5 µg/ml de Apo2L/TRAIL reticulado, em seguida processados para microscopia de

imunofluorescência (Bar: 20 μ M). (d) Células Colo205 foram pré-equilibradas a 37 °C com MAb 5C7 não marcado por 30 min para a ligação à superfície e recuperação da um *pool* de DR5. As incubações foram mantidas com ou sem 10 μ g/ml de Apo2L/TRAIL e, em seguida, as células foram rapidamente refrigeradas em gelo. A superfície celular exposta ao MAb 5C7 foi sondada com anticorpo CY5 anti-IgG de camundongo, quantificados por citometria de fluxo e as médias foram colocadas na planilha ($\pm$ EPM). (e) Células Colo205 foram pré-tratadas a 37°C com 10 μ g/ml de Apo2L/TRAIL, e em seguida rapidamente refrigerada em gelo e realizada a análise para endocitose em (5C7⁶⁴⁷) Figura 3b e (Tf⁶⁴⁷). A taxa de endocitose foi normalizada pelo valor da célula sem tratamento prévio com Apo2L/TRAIL ($\pm$ EPM). Resultados semelhantes foram observados quando as células foram preparadas como em (c) e o ensaio de endocitose com Fab anti-CY5 de camundongo ligado a superfície. (f-h) Células Colo205 com MAb 5C7 ligadas à superfície foram incubadas em gelo com Apo2L/TRAIL, e elevada a 37 °C por 5 min e fixada. Cortes ultrafinos foram marcados com anticorpo de coelho anti-IgG de camundongo e Proteína A ouro (10 nm). O revestimento de clatrina tipicamente eletrodensos é indicado por setas. P = membrana plasmática. Escala das barras, 200 nm.

A Figura 5 mostra que a inativação da dinamina inibe a endocitose DRS. (a-d) Células HeLa com transferência de Dyn^{G273D} foram selecionadas com puomicina, a -induzida por doxiciclina, pré-incubadas por 20 minutos na temperatura indicada, em seguida, incubadas por mais 20 min, na presença de Tf (Tf⁴⁸⁸) conjugado com Alexa-488. As células foram então processadas para Microscopia de imunofluorescência utilizando um anticorpo específico para dinamina-1. (e, f) Células BJAB clonais transfectadas com Dyn^{G273D} ou não transfectadas (parentais) com (+ dox) ou sem (no dox) indução com doxiciclina foram testadas pela captação de Tf⁴⁸⁸ ou 5C7⁶⁴⁷, por um

período de 20 minutos a 30 °C (barras brancas) ou 38 °C (barras pretas) por citometria de fluxo e as médias foram tabeladas ($\pm$ DP).

A Figura 6 exibe que a inativação da dinamina aumenta a ativação da caspase mediada por DR e a apoptose. (a) Células BJAB clonais transfectadas com Dyn^{G273D}, com ou sem indução com doxíciclina foram incubadas a 38 °C por 20 min para inativar a dinamina como na figura 5, em seguida, incubadas por mais 4 hs com ou sem Apo2L/TRAIL reticulada e analisadas por imunoblot para avaliar o processamento das proteínas indicadas, (b) Células BJAB transfectadas com Dyn^{G273D}, com ou sem indução com doxíciclina foram incubadas a 30 °C ou 38 °C por 20 min, em seguida, incubadas por mais 2hs com ou sem Apo2L/TRAIL reticulado e foi mensurada a atividade da caspase-3/7. (c) Células BJAB transfectadas com Dyn^{G273D}, com ou sem indução com doxíciclina foram pré-incubadas a 38 °C por 20 min, em seguida, incubadas um adicionalmente por 4 hs com ou sem Apo2L/TRAIL reticulada ou um Apo2L/TRAIL mutado seletivo para DR5 (D5-sel.) e a fragmentação do DNA, foi mensurada ($\pm$ EPM).

A Figura 7 exibe o processamento dos componentes da via da clatrina em linhagens de células de câncer, (a) As linhagens de célula indicadas foram tratadas com Apo2L/TRAIL e a clivagem de AP2 α ou CHC foram analisadas por *imunoblot*. (b) células BJAB foram tratadas com Apo2L/TRAIL ou FasL reticulados e o processamento da AP2 α ou CHC foi analisada por *imunoblot*. (c) Células BJAB foram tratadas com Apo2L/TRAIL reticulada e o processamento da dinamina foi determinado por *imunoblot*.

A Figura 8 mostra a necessidade da Caspase para a clivagem de AP2 α e CHC, (a) Células BJAB foram pré-incubadas com ou sem zVAD-fmk (20 μ M, 30 min) e tratadas com Apo2L/TRAIL reticulado (1 μ g/mL) como indicado por 24 hs. A transformação da caspase-8, caspase-9, caspase-3 e AP2 α nas células foram analisadas por *imunoblot*. (b) As seguintes linhagens

de células T Jurkat: A3 (tipo-selvagem), I9.2, (deficiente de caspase-8) e E1 (deficiente de FADD) foram tratadas com Apo2L/TRAIL ou FasL reticulados pelo tempo indicado, e o processamento dos componentes da endocitose mediada pela via da clatrina foi analisada como na figura 1. (c) Células HT1080 de fibrossarcoma foram transfectadas com siRNA específico da caspase-3 (C3) ou siRNA controle, tratados com Apo2L/TRAIL pelo tempo indicado, e analisadas por *imunoblot* para avaliar a clivagem da AP2 α ou CHC ou a depleção da caspase-3 pelo siRNA.

Figura 9: Determinação do sítio de clivagem da AP2 α ; (a) O fragmento C-terminal da AP2 α clivada foi imuno-precipitada a partir de células BJAB estimuladas por Apo2L/TRAIL e digerida com tripsina e analisada por espectrometria de massa para verificar a sua identidade ou isolada por eletroforese em gel e transferida pelo método *Western* e submetida ao seqüenciamento do N-terminal. Peptídeos trípticos foram identificados por espectrometria de massas *tandem* e alinhados com a seqüência C-terminal de AP2 α . O seqüenciamento N-terminal identifica o sítio de clivagem como um motivo de reconhecimento da caspase DXXD (sublinhado). (b) A mapa do sítio de clivagem para a região de "articulação" do AP2 α , que esta acoplada aos domínios funcionalmente distintos "orelha" e "tronco".

Figura 10: Os mutantes Dyn^{G273D} sensível a temperatura e Dyn^{K44A} dominante-negativo inibem a endocitose do Tf e DR5 em células HeLa-M. (a, b) Duas populações de linhagens clonais derivadas de células HeLa-M transfectadas com retrovírus na fig. 6, ts3 e ts1, com (+ dox) ou sem (no dox) indução por doxíciclina foram avaliadas por citometria de fluxo a capacidade de a captação de Tf⁴⁸⁸ (A) ou 5C7⁶⁴⁷ (b) durante um período de 20 minutos a 30 °C (barras brancas) ou 38 °C (barras pretas), como descrito nos procedimentos experimentais e as médias foram tabeladas ($\pm$ DP). (c) células HeLa-M transfectadas e não transfectadas (parentais) com Dyn^{K44A} com ou

sem indução por doxíciclina foram avaliadas pela taxa da endocitose do Tf⁴⁸⁸ e 5C7⁶⁴⁷ ($\pm$ DP), conforme descrito na Fig. 5d sem normatização.

A figura 11 exibe a montagem de DISC na ausência de endocitose. (a) Células BJAB foram equilibradas com Tf⁶⁴⁷ no gelo, incubadas pelo período de captação indicado, a 37 °C ou em gelo, em seguida, a fluorescência foi quantificada por citometria de fluxo. (b) Células BJAB foram tratadas com Apo2L/TRAIL reticulado (1 µg/mL) a 37 °C ou em gelo durante o período de tempo indicado e o DISC foi imuno-precipitado através do ligante, como descrito em Materiais e Métodos. O FADD e caspase-8 associados ao DISC foram visualizados por *imunoblot*. (c, d) Células BJAB transfectadas com Dyn^{G273D} foram tratadas com tampão (no Dox) ou doxíciclina (Dox) e elevadas à 38 °C por 20 min para inativar a dinamina. As células foram tratadas com Apo2L/TRAIL reticulado pelo período de tempo indicado e o DISC foi imuno-precipitado. O FADD e caspase-8 associados ao DISC foram visualizados por *imunoblot* (c) ou a atividade da caspase-8 associado ao DISC foi mensurada como descrito anteriormente (Sharp *et al. J Biol Chem* 280, 19401-409, 2005).

A Figura 12 demonstra que agentes que causam danos ao DNA induzem a clivagem dos componentes da via da clatrina. Células BJAB ou Colo205 foram tratadas com vinblastina ou adriamicina pelo tempo indicado e analisadas por *imunoblot* como na Fig. 1.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

As técnicas e os procedimentos descritos neste documento ou referenciados são em geral bem compreendidos e comumente empregados utilizando metodologias convencionais pelos técnicos hábeis no estado da arte. Conforme necessário, os procedimentos que envolvem a utilização de reagentes e *kits* disponíveis comercialmente serão realizados de acordo com os protocolos e/ou parâmetros definido pelo fabricante a menos que apontado de outra forma. Salvo quando definido de outra maneira, todos os termos do

estado da arte, anotações e outras terminologias científicas utilizadas no presente invenção são destinados para descrever o sentido e significado aos técnicos conhecedores do estado da técnica ao qual pertence a presente invenção. Em alguns casos, termos com significados comumente entendidos são aqui definidos por motivo de clareza e/ou rápida referência, e a inclusão de tais definições neste documento não devem necessariamente ser interpretadas de forma a representar uma diferença substancial sobre o qual é geralmente entendido no estado da arte. Além disso, certas abreviações são usadas neste documento, incluindo: 488 -: conjugado com Alexa 488; 647 -: conjugado com Alexa -647; Apo2L/TRAIL: ligante de Apo2 / ligante indutor de apoptose relacionado com TNF; BSA: albumina sérica bovina; DR: receptor de morte; PBS: tampão fosfato salina; Tf: transferrina; e zVAD-fmk: N-benziloxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona.

I. DEFINIÇÕES

O termo “apoptose” e “atividade apoptótica” são usados no sentido amplo e refere-se a morte celular ordenada ou controlada em mamíferos que é tipicamente acompanhada por uma ou mais alterações celulares características, incluindo a condensação do citoplasma, perda da microvilosidade da membrana plasmática, segmentação do núcleo, degradação do DNA microssomal ou perda da função mitocondrial. Esta atividade pode ser determinada e mensurada usando técnicas, por exemplo, pelo ensaio de viabilidade celular, análise FACS ou eletroforese de DNA e mais especificamente pela ligação da anexina V, fragmentação do DNA, retração celular, dilatação do retículo endoplasmático, fragmentação celular e/ou formação de vesículas da membrana (chamadas de corpos apoptóticos).

Os termos “ligante de Apo-2”, “Apo-2L”, ou “TRAIL” são utilizados no presente para se referir ao polipeptídeo que inclua os resíduos 95-281, inclusive 114-281, inclusive os resíduos 91-281, inclusive os resíduos 92-281,

• inclusive os resíduos 41-281, inclusive os resíduos 15-281, inclusive os
 resíduos 1-281, inclusive a seqüência de aminoácidos demonstrado na figura
 1A de Pitti *et al.*, J. Biol. Chem., 271:12687-12690 (1996), bem como
 fragmentos biologicamente ativos e variantes deletoriais, insercionais, e
 substitucionais das seqüências acima. Em uma incorporação, a seqüência
 polipeptídica compreende dos resíduos 114-281. Opcionalmente, a seqüência
 polipeptídica tem pelo menos os resíduos 91-281 ou resíduos 92-281. Em outra
 incorporação preferida, os fragmentos biologicamente ativos ou variantes
 tiveram a identidade da seqüência de aminoácidos de pelo menos 80%
 aproximadamente, mais preferencialmente a identidade da seqüência de
 aminoácidos de ao menos 90% aproximadamente e mais preferencialmente
 ainda a identidade da seqüência de aminoácidos de pelo menos 95%, 96%,
 97%, 98% ou 99% com qualquer uma das seqüências acima. A definição
 abrange variantes substitucionais do ligante Apo-2 compreendendo de
 aminoácidos 91-281 da fig. 1A de Pitti *et al.*, J. Biol. Chem., 271:12687-12690
 (1996) em que ao menos um dos aminoácidos nas posições 203, 218 ou 269
 (usando a numeração da seqüência fornecida em Pitti *et al.*) são substituídos
 por resíduos de alanina. A definição abrange o ligante Apo-2 isolado de uma
 fonte de ligante Apo-2, como de tipos de tecidos humanos ou de outra fonte ou
 preparado por métodos sintéticos recombinantes. O termo ligante Apo-2
 também se refere ao polipeptídeo descrito no WO 97/25428, supra, e
 WO97/01633, *supra*.

O "receptor do ligante Apo-2" inclui os receptores referidos no
 estado da técnica como "DR4" e "DR5". Pan *et al.* descreveram o membro da
 família do receptor de TNF referido como "DR4" (Pan *et al.*, *Science*, 276:111-
 113 (1997); vide também o Documento WO98/32856 publicado em 30 de julho
 de 1998). O receptor DR4 foi reportado por conter um domínio citoplasmático
 de morte capaz de acoplar o instrumento do suicídio da célula. Pan *et al.*

divulgaram que o DR4 é acreditado como sendo um receptor para o ligante conhecido como Apo2L/TRAIL. Sheridan *et al.*, *Science*, 277:818-821 (1997) e Pan *et al.*, *Science*, 277:815-818 (1997) descreveram outro receptor para Apo2L/TRAIL (vide também, WO98/51793 publicado em 19 de novembro de 1998; WO98/41629 publicado em 24 de setembro de 1998). Este receptor é referido como DR5 (o receptor foi referido alternativamente também como Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 ou KILLER; Screamton *et al.*, *Curr. Biol.*, 7:693-696 (1997); Walczak *et al.*, *EMBO J.*, 16:5386-5387 (1997); Wu *et al.*, *Nature Genetics*, 17:141-143 (1997); WO98/35986 publicado em 20 de agosto de 1998; EP870,827 publicado em 14 de outubro de 1998; WO98/46643 publicado em 22 de outubro de 1998; WO99/02653 publicado em 21 de janeiro de 1999; WO99/09165 publicado em 25 de fevereiro de 1999; WO99/11791 publicado em 11 de março de 1999). Como DR4, DR5 é reportado por conter um domínio citoplasmático de morte e ser capaz de sinalizar a apoptose. Como descritos acima, outros receptores para Apo-2L incluem DcR1, DcR2, e OPG (vide, Sheridan *et al.*, *supra*; Marsters *et al.*, *supra*; e Simonet *et al.*, *supra*). O termo "receptor Apo-2L" quando usado no presente abrange a sequência nativa e variante do receptor. Estes termos abrangem o receptor de Apo-2L expresso em uma variedade dos mamíferos, incluindo humanos. O receptor de Apo-2L pode ser expresso endogenamente como ocorre naturalmente em uma variedade de linhagem de tecidos humanos, ou pode ser expresso por métodos recombinantes ou sintéticos. Uma "sequência nativa do receptor Apo-2L" compreende de um polipeptídeo que tem a mesma sequência de aminoácido que um receptor de Apo-2L derivado da natureza. Assim, uma sequência nativa do receptor Apo-2L pode ter a sequência de aminoácido do receptor natural de Apo-2L de qualquer mamífero. Tal sequência nativa do receptor Apo-2L pode ser isolada da natureza ou pode ser produzido por métodos recombinantes ou sintéticos. O termo "sequência nativa do receptor Apo-2L" abrange

especificamente truncados derivado da natureza ou forma secretadas do receptor (por exemplo, um forma solúvel que contém, por exemplo, uma seqüência do domínio extracelular), formas naturais variantes (por exemplo, formas com *splicing* alternativos) e variantes alélicas naturais. Os receptores variantes podem incluir fragmentos ou deleções mutantes da seqüência nativa do receptor Apo-2L.

O termo "Fas" é utilizado no presente para se referir ao polipeptídeo que inclua os resíduos de aminoácidos 1-319 como mostrado no Nº de Acesso NCBI AAA63174 e descrito em Itoh *et al.*, *Cell* 66 (2):233-243 (1991), bem como fragmentos biologicamente ativos e variantes delecionais, insercionais, e substitucionais das seqüências acima. Este polipeptídeo é denominado como "Apo-1" e "CD95", em certas referências no estado da arte. O termo "ligante de Fas" ou "FasL" é utilizado no presente para referir-se a um polipeptídeo que inclui os resíduos de aminoácidos 1-281 como exibido no Nº de acesso do NCBI NP_000630 e descrito em Suda *et al.*, *Cell* 75 (6):1169-1178 (1993), bem como fragmentos biologicamente ativos e variantes delecionais, insercionais, e substitucionais da seqüência acima. A ligação do FasL ao Fas, ou ligação cruzada do Fas com um anticorpo agonístico de Fas induz a apoptose de células resultando na morte (vide, por exemplo, Nagata, S. *Ann. Rev. Genet.* 33:29, 1999; e Labroille *et al.*, *Cytometry* 39 (3):195-202 (2 000)). A ligação de FasL ao Fas ativa uma cascata de caspases via um adaptador FADD (domínio de morte com proteína associada a Fas), que conduz a uma clivagem de diversos substratos celulares e a fragmentação de DNA.

"Percentual (%) de identidade de seqüências de aminoácidos" com respeito às seqüências de polipeptídeo identificadas no presente é definida como percentual de identidade de seqüências de aminoácidos em uma seqüência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácido em uma seqüência, após o alinhamento das seqüências e introdução dos *gaps*, se

necessário, para conseguir a porcentagem de identidade máxima e não
 considerar todas as substituições conservadoras como a parte da identidade da
 seqüência. O alinhamento para a finalidade de determinar a porcentagem de
 identidade da seqüência de aminoácidos pode ser conseguido de várias
 5 maneiras que estão dentro de habilidades no estado da técnica, por exemplo,
 usando *softwares* de computador públicos disponíveis, como pro exemplo,
 BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 ou Megalign (DNASTAR). Aqueles hábeis
 no estado da técnica podem determinar parâmetros apropriados para o
 alinhamento de medição, incluindo todos os algoritmos necessários para
 10 conseguir o alinhamento máximo sobre toda extensão das seqüências que
 estão sendo comparadas. Opcionalmente, os valores da % da seqüência de
 aminoácidos idênticas são obtidos usando o programa de computador de
 comparação de seqüência ALIGN-2. O programa de computador de
 comparação de seqüência ALIGN-2 foi desenvolvido pela Genentech, Inc. e o
 15 código de fonte foi depositado com a documentação do usuário no Escritório
 Norte Americano de Direitos Autorais, Washington, DC, 20559 Estado Unidos,
 onde está registrado sob o nº de registro de direitos autorais Norte Americano
 TXU510087. O programa ALIGN-2 esta publicamente disponível pela
 Genentech Inc., South San Francisco, Califórnia. O programa ALIGN-2 deve
 20 ser compilado para o uso em um sistema operacional UNIX, preferivelmente o
 UNIX digital V4.0D. Todos os parâmetros da comparação da seqüência são
 ajustados pelo programa ALIGN-2 e não variam. Entretanto, a % da seqüência
 de aminoácidos idêntica pode ser também determinada usando o programa de
 comparação de seqüência NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*
 25 25:3389-3402 (1997)). O programa de comparação de seqüência NCBI-
 BLAST2 pode ser baixado do <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. O NCBI-BLAST2
 usa diversos parâmetros de busca, em que todos os parâmetros de busca são
 ajustados aos valores padrão incluindo, por exemplo, *unmask = yes*, *strand =*

all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0.01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final gapped alignment = 25 e scoring matrix = BLOSUM62.

O termo “anticorpo” é utilizado no presente no sentido mais amplo e incluem especificamente anticorpos monoclonais intactos, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos) formados a partir de pelo menos dois anticorpos intactos, e fragmento de anticorpos. A expressão “anticorpo monoclonal”, da forma como utilizada no presente, designa um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos

substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos e/ou ligam o mesmo epítipo, exceto por possíveis variantes que surgem durante a produção do anticorpo monoclonal, em que tais variantes estão geralmente presentes em quantidades menores. Anticorpos monoclonais são altamente específicos e se ligam diretamente com um único sítio antigênico. Além disso, ao contrário das preparações de anticorpos policlonais que incluem tipicamente diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante sobre o antígeno. Além da sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos pelo fato de poderem ser sintetizados por cultura de hibridoma, não sendo contaminados por outras imunoglobulinas. O adjetivo “monoclonal” indica o caráter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogênea e não deve ser considerado como requerendo a produção do anticorpo por qualquer método específico. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser preparados por meio do método de hibridoma primeiro descrito por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), ou podem ser fabricados por meio de métodos de DNA recombinante (vide, por exemplo, US

- 4.816.567). Os “anticorpos monoclonais” podem também ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpos de fagos, utilizando as técnicas descritas, por exemplo, em Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) e Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991). Anticorpo “que liga” ao antígeno de interesse, é aquele capaz de ligar a tal antígeno com afinidade suficiente para que o anticorpo seja útil como agente terapêutico marcando a célula que expressa o antígeno.

“Anticorpo para receptor de Morte” é geralmente utilizado no presente para designar um anticorpo ou anticorpos direcionados a um receptor pertencente a superfamília do receptor do fator de necrose tumoral que contém uma domínio de morte capaz de sinalização a apoptose, e esses anticorpos incluem anticorpo DR5, anticorpo DR4 e anticorpos anti-Fas.

“Anticorpo para receptor DR5”, “anticorpos DR5” ou “anticorpo anti-DR5” é usado no sentido amplo para se referir a anticorpos que se ligam a pelo menos uma forma do receptor DR5. Opcionalmente o anticorpo DR5 está fundido ou é ligado a uma molécula ou seqüência heteróloga. Preferencialmente a seqüência heteróloga permite ou ajuda o anticorpo a formar complexos de ordem superior ou oligoméricos. Opcionalmente, o anticorpo DR5 se liga a receptores DR5 mas não se liga nem reage cruzadamente com qualquer receptor adicional de Apo-2L (por exemplo, DR4, DcR1, ou DcR2). Opcionalmente o anticorpo é um agonista da atividade de sinalização de DR5 (vide, por exemplo, os pedidos de Patentes US 20040005314 e US 20060188498).

“Anticorpo para receptor DR4”, “anticorpos DR4” ou “anticorpo anti-DR4” é usado no sentido amplo para se referir a anticorpos que se ligam a pelo menos uma forma do receptor DR4. Opcionalmente o anticorpo DR4 está fundido ou é ligado a uma molécula ou seqüência heteróloga. Preferencialmente a seqüência heteróloga permite ou ajuda o anticorpo a formar complexos de ordem superior ou oligoméricos. Opcionalmente, o

- anticorpo DR4 se liga a receptores DR4, mas não se liga nem reage cruzadamente com qualquer receptor adicional de Apo-2L (por exemplo, DR5, DcR1, ou DcR2). Opcionalmente o anticorpo é um agonista da atividade de sinalização de DR4 (vide, por exemplo, os pedidos de Patentes US 5 20040005314 e US 20060188498).

“Anticorpos Fas” ou “anticorpos anti-Fas” são utilizados no presente no sentido amplo para se referir a anticorpos que se ligam a pelo menos uma forma de Fas ou domínio extracelular deste. Opcionalmente o anticorpo Fas está fundido ou é ligado a uma molécula ou seqüência heteróloga. Preferencialmente a seqüência heteróloga permite ou ajuda o anticorpo a formar complexos de ordem superior ou oligoméricos. Opcionalmente, o anticorpo Fas se liga ao receptor Fas, mas não se liga nem reage cruzadamente com qualquer receptor adicional de FasL. Opcionalmente o anticorpo é um agonista da atividade de sinalização de Fas (vide, por exemplo, Nagata, S. *Ann. Rev. Genet.* 33:29, 1999; e Labroille *et al.*, *Cytometry* 15 39 (3):195-202 (2000)).

Os anticorpos monoclonais no presente incluem especificamente anticorpos “quiméricos” (imunoglobulinas), em que uma porção da cadeia leve e/ou pesada é idêntica ou homóloga a seqüências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica, ou pertencentes a uma classe ou subclasse específica de anticorpos, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo a seqüências correspondentes em anticorpos derivados de outras espécies ou pertencentes a outra classe ou subclasse de anticorpos, bem como fragmentos de tais anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada 20 (US 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)).

As formas “humanizadas” de anticorpos não-humanos (por exemplo, murinos) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulinas ou fragmentos destas (como por exemplo, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ ou outros

anticorpos subseqüentes que se ligam ao antígeno) que contêm a seqüência mínima derivada de uma imunoglobulina não humana. Na maior parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) em que os resíduos da região determinada por complementaridade (CDR) do receptor são substituídos por resíduos de um CDR de uma espécie não humana (anticorpo doador) tal como camundongo, rato, coelho tendo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, os resíduos da região estrutural (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não-humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor nem nas seqüências importadas do CDR ou da estrutura. Estas modificações são feitas para refinar e maximizar ainda mais o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos dentre pelo menos um e, tipicamente, dois domínios variáveis, em que todas ou substancialmente todas as regiões CDR correspondam aos de uma imunoglobulina não-humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são as de uma seqüência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado ótimo também compreenderá de pelo menos uma porção de uma região constante (Fc) da imunoglobulina, tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para detalhes adicionais, vide Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). O anticorpo humanizado inclui um anticorpo PRIMATIZED™ em que a região do anticorpo de ligação com o antígeno é derivada de um anticorpo produzido pela imunização de macacos do tipo *macaque* com o antígeno do interesse.

Anticorpos são tipicamente proteínas ou polipeptídeos que apresentam especificidade de ligação a um antígeno específico. Anticorpos nativos são geralmente glicoproteínas heterotetraméricas composta de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Tipicamente,

Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada por uma ligação dissulfeto covalente, enquanto o número de ligações de dissulfeto varia entre as cadeias pesadas de diferentes isótopos de imunoglobulina. Cada cadeia leve e pesada também contém pontes dissulfeto intracadeias regularmente espaçadas. Cada cadeia pesada contém, em uma extremidade, um domínio variável (V_H) seguido por um número de domínios constantes. Cada cadeia leve contém um domínio variável em uma extremidade (V_L) e um domínio constante na sua outra extremidade; o domínio constante da cadeia leve é alinhado ao primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável da cadeia leve é alinhado ao domínio variável da cadeia pesada. Acredita-se que resíduos de aminoácidos específicos formam uma superfície intermediária entre os domínios variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada. (Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 186:651-663 (1985); Novotny e Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:4592-4596 (1985)). As cadeias leves de anticorpos de qualquer espécie de vertebrado podem ser atribuídas a um dentre dois tipos claramente distintos, denominados *kappa* e *lambda*, com base nas seqüências de aminoácidos dos seus domínios constantes. Dependendo da seqüência de aminoácidos do domínio constante das suas cadeias pesadas, anticorpos podem ser atribuídos a classes diferentes. Existem cinco classes principais de anticorpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias delas podem ser adicionalmente divididas em subclasses (isotipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às classes diferentes de anticorpos são denominados alfa, delta, épsilon, gama, e mu, respectivamente.

“Fragmentos de anticorpos” compreendem uma porção de anticorpo intacto, que compreende, preferencialmente, um sítio de ligação de antígenos. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv; diacorpos; anticorpos lineares; moléculas de anticorpos de cadeia única e anticorpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticorpos.

O termo “variável” é utilizado no presente para descrever que certas porções dos domínios variáveis diferem extensamente na sequência entre os anticorpos e são utilizadas na ligação e especificidade de cada anticorpo específico ao seu antígeno específico. Entretanto, a variabilidade não é, entretanto, distribuída regularmente ao longo dos domínios variáveis de anticorpos. É tipicamente concentrado em três segmentos denominados de regiões determinadas por complementaridade (CDRs) ou regiões hipervariáveis nos domínios variáveis da cadeia leve e da cadeia pesada. As porções altamente conservadas dos domínios variáveis são chamadas de região de estrutura (FR). Os domínios variáveis de cadeias leve e pesada nativas compreendem quatro FRs cada um, adotando em grande parte uma configuração folha- β , conectadas por três CDRs, que formam alças que conectam e, em alguns casos, fazem parte da estrutura folha- β . Os CDRs de cada cadeia são mantidas unidas em boa proximidade pelas FRs e, com as CDRs da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação de antígenos de anticorpos (vide, Kabat, E.A. *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987)). Os domínios constantes não estão diretamente envolvidos na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem diversas funções efetoras, tais como a participação do anticorpo em citotoxicidade celular dependente de anticorpos.

Os anticorpos monoclonais no presente incluem os anticorpos quiméricos, híbridos e recombinantes produzidos pelo *splicing* do domínio variável (incluindo hipervariável) de um anticorpo anti-receptor Apo-2L com um domínio constante (por exemplo, anticorpos "humanizados"), ou uma cadeia leve com uma cadeia pesada, ou uma cadeia de uma espécie com uma cadeia de outra espécie, ou de fusões com proteínas heterólogas, não obstante a espécie de origem ou da classe ou da subclasse das imunoglobulinas, bem como fragmentos de anticorpo (por exemplo, Fab, F(ab')₂, e Fv), contanto que eles apresentem a atividade ou as

propriedades biológicas desejadas. Vide, por exemplo, patente US 4.816.567 e Mage *et al.*, em *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.79-97 (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987).

Um "anticorpo humano" é aquele que possui uma seqüência de aminoácidos que corresponda aquela de um anticorpo produzido por um ser humano ou/e seja feita usando algumas das técnicas para fazer anticorpos humanos como divulgado no presente. Esta definição de um anticorpo humano exclui especificamente um anticorpo humanizado que compreende de resíduos não humanos de ligação ao antígeno. Os anticorpos humanos podem ser produzidos usando as várias técnicas conhecidas. Em uma incorporação, o anticorpo humano é selecionado de uma biblioteca de fagos, em que essa biblioteca de fagos expressa anticorpos humanos. (Vaughan *et al. Nature Biotechnology*, 14:309-314 (1996); Sheets *et al. PNAS, (USA)* 95:6157-6162 (1998)); Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al., J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Os anticorpos humanos podem também ser feitos pela introdução do *loci* da imunoglobulina humana em animais transgênicos, por exemplo, camundongos em que os genes das imunoglobulinas endógena estiveram parcialmente ou completamente inativas. Mediante desafio, é observada a produção de anticorpos humanos, que relembra de perto a observada em humanos em todos os aspectos, incluindo a rearranjo gênico, montagem e repertório de anticorpos. Esta abordagem é descrita, por exemplo, nas patentes US 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, e nas seguintes publicações científicas: Marks *et al., Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al., Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368:812-13 (1994); Fishwild *et al., Nature Biotechnology*, 14: 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); Lonberg e Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13:65-93 (1995). Alternativamente, o anticorpo humano pode ser preparado via imortalização de

linfócitos B humanos produzindo um anticorpo direto contra o antígeno alvo (tais linfócitos B podem ser recuperados de um indivíduo ou podem ter sido imunizados *in vitro*). vide, por exemplo, Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991); e patente US 5.750.373.

O termo "região Fc" é usado definir a região do C-terminal de uma cadeia pesada da imunoglobulina que possa ser gerada pela digestão da papaína em um anticorpo intacto. A região de Fc pode ser uma seqüência nativa ou variante da região Fc. Embora os limites da região Fc da cadeia pesada de uma imunoglobulina possam variar, a região Fc da cadeia pesada da IgG humana é normalmente definida como se estendendo a partir de um resíduo de aminoácidos por volta da posição Cys226, ou por volta da posição Pro230, até a região carboxi-terminal da região Fc. (usando no presente o sistema de numeração de acordo com Kabat *et al.*, *supra*). A região de Fc de uma imunoglobulina compreende geralmente dois domínios constantes, um domínio CH2 e um domínio CH3, e compreende opcionalmente um domínio CH4.

"Cadeia da região Fc" no presente significa uma das duas cadeias de polipeptídio da região Fc.

O "domínio CH2" de uma região Fc da IgG humana (também referida como o domínio "C γ 2") estende geralmente de um resíduo de aminoácido aproximadamente na posição 231 a um resíduo do aminoácido perto da posição 340. O domínio CH2 é exclusivo por não parear-se fortemente com outro domínio. Por outro lado, duas cadeias de carboidratos ramificadas N-ligadas são interpostas entre os dois domínios CH2 de uma molécula intacta de IgG nativa. Especula-se que o carboidrato pode fornecer um substituto para o pareamento entre domínios e ajuda estabilizar o domínio CH2. Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985). O domínio CH2 no presente pode ser uma seqüência nativa ou variante do domínio CH2.

O "domínio CH3" compreende a extensão do resíduo C-terminal de um domínio CH2 em uma região Fc (isto é, um resíduo do aminoácido aproximadamente na posição 341 a um resíduo do aminoácido na posição 447 de uma IgG). A região CH3 no presente pode ser uma seqüência nativa ou variante do domínio CH3 (por exemplo, um domínio CH3 com uma "protuberância" introduzida em uma de suas cadeias e uma "cavidade" introduzida na outra cadeia deste, vide a patente US 5.821.333).

"Região de articulação" é definida geralmente como a estendendo-se de cerca de Glu216 ou Cys226 até Pro230 da IgG1 humana (Burton, *Molec. Immunol.*22:161-206 (1985)). As regiões de articulação de outros isotipos de IgG podem ser alinhadas com a seqüência IgG1 colocando o primeiro e os últimos resíduos de cisteína formando uma ligação S-S entre as cadeia pesadas nas mesmas posições. A região de articulação no presente pode ser uma seqüência nativa ou variante da região de articulação. As duas cadeias de polipeptídeos de uma região de articulação variante retêm geralmente pelo menos um resíduo do cisteína por cadeia polipeptídica, de modo que as duas cadeias de polipeptídeos da região de articulação variante possam formar uma ligação de dissulfeto entre as duas cadeias. A região de articulação preferida no presente é uma região de articulação humana de seqüência nativa, por exemplo, uma seqüência nativa da região de articulação da IgG1 humana.

Uma "região Fc funcional " possui pelo menos uma "função efetora" de uma seqüência nativa da região Fc. Exemplos de "função efetora" inclui a ligação do componente C1q; citotoxicidade dependente de complemento (CDC); ligação ao receptor de Fc; citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC); fagocitose; regulação negativa "*down regulation*" dos receptores da superfície celular (por exemplo, receptor de célula B; BCR), etc. Tais funções efetoras requer geralmente que a região Fc seja combinada com

- um domínio de ligação (por exemplo, um domínio variável do anticorpo) e podem ser avaliadas usando os vários ensaios conhecidos no estado da técnica para avaliar tais funções efectoras do anticorpo.

Uma "seqüência nativa da região Fc" compreende de uma seqüência de aminoácido idêntica à seqüência de aminoácido da região Fc encontrada na natureza. Uma "seqüência variante da região Fc" compreende uma seqüência de aminoácidos que difere da seqüência nativa da região Fc pelo mérito de ter pelo menos uma modificação de aminoácido. Preferencialmente, a região Fc variante tem ao menos uma substituição de aminoácido comparada a seqüência da região Fc nativa ou a região Fc de um polipeptídeo parental, por exemplo, de aproximadamente uma a dez substituições de aminoácidos, e preferivelmente de aproximadamente uma a cinco substituições de aminoácidos na seqüência nativa da região Fc ou na região Fc de um polipeptídeo parental. A região Fc variante do presente possuirá preferencialmente pelo menos cerca de 80% de identidade de seqüência com uma região Fc de seqüência nativa e/ou com uma região Fc de um polipeptídeo parental e, de maior preferência, pelo menos cerca de 90% de identidade de seqüência com ele, de maior preferência, pelo menos cerca de 95% de identidade de seqüência com ele.

As expressões "receptor Fc" ou "FcR" são utilizadas para descrever um receptor que se liga à região Fc de um anticorpo. O FcR preferido é um FcR humano de seqüência nativa. Além disso, um FcR preferido é aquele que se liga a um anticorpo IgG (receptor gama) e inclui receptores das subclasses Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII, incluindo variantes alélicas e, alternativamente, formas divididas desses receptores. Os receptores Fc γ RII incluem Fc γ RIIA (um "receptor de ativação") e Fc γ RIIB (um "receptor de inibição"), que possuem seqüências de aminoácidos similares que diferem, principalmente, nos seus domínios citoplasmáticos. O receptor de ativação

• Fc γ RIIA contém uma unidade de ativação imuno-receptora baseada em tirosina
 (ITAM) no seu domínio citoplasmático. O receptor de inibição Fc γ RIIB contém
 uma unidade de inibição imuno-receptora baseada em tirosina (ITIM) no seu
 domínio citoplasmático (revisado em Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234
 5 (1997)). FcRs são revisados em Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-
 92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); e de Haas *et al.*, *J.*
Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). Outras FcRs, incluindo aquelas a serem
 identificadas no futuro, são englobadas pelo termo "FcR" no presente. O termo
 também inclui o receptor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência
 10 de IgGs maternos para o feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) e Kim
et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

Anticorpo "maturado por afinidade" é aquele com uma ou mais
 alterações em uma ou mais de suas CDRs, o que resulta em aumento da
 afinidade do anticorpo para o antígeno, em comparação com anticorpo parental
 15 que não possui essa(s) alteração(ões). Os anticorpos maturados por afinidade
 preferidos possuirão afinidades nanomolares ou até picomolares para o
 antígeno alvo. Os anticorpos maturados por afinidade são produzidos através
 de procedimentos conhecidos na técnica. Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:
 779-783 (1992) descreve a maturação por afinidade através de troca de
 20 domínios VH e VL. A mutagênese aleatória de resíduos de estrutura e/ou CDR
 é descrita por: Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 91: 3809-3813
 (1994); Schier *et al.*, *Gene*, 169: 147-155 (1995); Yelton *et al.*, *J. Immunol.*, 155:
 1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.*, 154 (7): 3310-9 (1995); e
 Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992).

25 O termo "marcador", quando utilizado no presente documento
 refere-se a um composto ou composição, que é acoplado ou fundido direta ou
 indiretamente ao reagente como um anticorpo e facilita a detecção do
 reagentes ao qual o anticorpo está acoplado ou fundido. O marcador pode ser

detectável *per se* (por exemplo, marcador radioisótopo, marcadores fluorescentes) ou, no caso de um marcador enzimático, que pode catalisar a alteração química de uma composição composta de substrato, que é detectável.

O termo “antagonista” é utilizado no sentido amplo da palavra e inclui qualquer molécula que bloqueie, iniba ou neutralize completamente ou parcialmente uma ou mais atividade biológica do Apo2L/TRAIL, DR4 ou DR5, FasL ou Fas *in vitro*, *in situ* ou *in vivo*. Exemplos de tais atividades biológicas do Apo2L/TRAIL, DR4 ou DR5 incluem a ligação do Apo2L/TRAIL ao DR4 ou DR5, indução da apoptose, bem como as novas atividades relatadas na literatura. Exemplos de tais atividades biológicas do FasL e Fas incluem a ligação do FasL ao Fas, indução da apoptose, bem como aquelas adicionalmente relatadas na literatura. Um antagonista pode ter função de forma direta ou indireta. Por exemplo, o antagonista pode ter a função de bloquear parcial ou totalmente, inibir ou neutralizar uma ou mais atividades biológicas de Apo2L/TRAIL, de maneira *in vitro*, *in situ*, ou *in vivo*, como resultado da sua ligação direta ao DR4 ou DR5. O antagonista pode também ter função indireta para bloquear parcial ou totalmente, inibir ou neutralizar uma ou mais atividades biológicas da Apo2L/TRAIL, DR4 ou DR5, *in vitro*, *in situ*, ou *in vivo*, como um resultado, por exemplo, de bloqueio ou inibição outra molécula efetora. A molécula antagonista pode incluir uma atividade antagonista “dupla” no qual a molécula é capaz de bloquear parcial ou totalmente, inibindo ou neutralizando uma atividade biológica da Apo2L/TRAIL, DR4 ou DR5, Fas ou FasL.

O termo “agonista” é utilizado no sentido amplo da palavra e inclui qualquer molécula que melhore, estimule ou ative completamente ou parcialmente uma ou mais atividade biológica Apo2L/TRAIL, DR4 ou DR5, FasL ou Fas, *in vitro*, *in situ* ou *in vivo*. Exemplos de tais atividades biológicas

da ligação ao Apo2L ao DR4 ou DR5, é a apoptose, bem como as novas atividades relatadas na literatura. Exemplos de tais atividades biológicas da ligação do Fas ou FasL é a ligação do FasL ao Fas, inibição da apoptose, bem como as novas atividades relatadas na literatura. Um agonista pode ter função de forma direta ou indireta. Por exemplo, o agonista pode ter a função de melhorar, estimular ou ativar parcial ou totalmente uma ou mais atividades biológicas de DR4 ou DR5, de maneira *in vitro*, *in situ*, ou *in vivo*, como resultado da sua ligação direta à DR4 ou DR5 que causa a ativação do receptor ou transdução de sinal. O agonista pode também ter função indireta para melhorar, estimular ou ativar parcial ou totalmente uma ou mais atividades biológicas de DR4 ou DR5, *in vitro*, *in situ*, ou *in vivo*, por exemplo, estimulando outra molécula efetora que culminará na ativação ou transdução de sinal de DR4 ou DR5. Contempla-se que um agonista pode atuar como um acentuador “*enhancer*” que funciona indiretamente para melhorar ou aumentar a ativação ou atividade de DR4 ou DR5. Por exemplo, um agonista pode melhorar a atividade endógena do Apo-2L em um mamífero. Isto poderia ser obtido, por exemplo, pela pré-complexando DR4 ou DR5 ou estabilizando complexos nativos formado entre Apo-L2 e DR4 ou DR5.

“Isolado” quando utilizado para descrever as várias proteínas descritas no presente, indica a proteína que foi identificada e separada e/ou recuperada de um componente de seu ambiente natural. Os componentes concomitantes de seu ambiente natural são os materiais que poderiam tipicamente interferir com o uso diagnóstico ou terapêutico da proteína, e pode incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteináceos ou não proteináceos. Em incorporações preferidas, a proteína será purificada (1) até um grau suficiente para se obter pelo menos 15 resíduos N-terminal ou a sequência interna do aminoácido pelo uso de um seqüenciador de copo de fiação (*spinning cup*), ou (2) até a homogeneidade por SDS-PAGE sob condições não

reduzidas ou reduzidas utilizando o azul de Coomassie (*Coomassie blue*) ou, preferencialmente, corante prata. A proteína isolada inclui a proteína *in situ* dentro de células recombinantes, desde que pelo menos um componente do ambiente natural da proteína não estará presente. Entretanto, normalmente a proteína isolada será preparada por pelo menos uma etapa de purificação.

“Atividade biológica” ou “biologicamente ativo” para as finalidades no presente significa que (a) têm a habilidade de induzir ou estimular a apoptose em pelo menos um tipo de célula de mamíferos, tal como uma célula cancerosa ou células infectadas por vírus ou bactérias, *in vivo* ou *ex vivo*; (b) é capaz de aumentar os anticorpos, isto é, imunogênico; ou (c) retendo a atividade de um polipeptídeo nativo ou natural do ligante Apo-2.

Um “agente inibidor de crescimento” quando usado no presente refere-se a um composto ou a uma composição que iniba o crescimento de uma célula *in vitro* e/ou *in vivo*. Assim, o agente inibidor de crescimento pode ser aquele que reduz significativamente a porcentagem de células na fase S. Os exemplos de agentes inibidores do crescimento incluem os agentes que bloqueiam a progressão do ciclo celular (em outra fase com exceção da fase S), como os agentes que induzem à parada do ciclo celular em G1 parada da fase M. Os bloqueadores clássicos da fase M incluem os vincas (vincristina e vimblastina), TAXOL®, e inibidores de topo II, tais como, a doxorubicina, a epirubicina, a daunorubicina, a etoposida, e a bleomicina. Estes agentes que param o ciclo celular em G1 também se difundem para a suspensão da fase S, por exemplo, agentes alquilantes do DNA como o tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracil, e ara-C. Informações adicionais podem ser encontradas em *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, intitulado “*Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs*” por Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente na pg. 13.

O termo “pró-fármaco”, da forma como utilizada no presente pedido, designa uma forma precursora ou derivada de substância farmacologicamente ativa que é menos citotóxica para células cancerosas em comparação com o fármaco parental e é capaz de ser ativada de forma enzimática ou convertida na forma parental mais ativa. Vide, por exemplo, Wilman, *Prodrugs in Cancer Chemotherapy*, *Biochemical Society Transactions*, 14, págs. 375-382, 615ª Reunião de Belfast (1986) e Stella *et al.*, *Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery*, *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, (ed.), págs. 247-267, Humana Press (1985). Os pró-fármacos de acordo com a presente invenção incluem, porém não se limitam a, pró-fármacos que contêm fosfato, pró-fármacos que contêm tiofosfato, pró-fármacos que contêm sulfato, pró-fármacos que contêm peptídeos, pró-fármacos modificados por D-aminoácidos, pró-fármacos glicosilados, pró-fármacos que contêm β -lactama, pró-fármacos que contêm fenoxiacetamida opcionalmente substituídos ou pró-fármacos que contêm fenilacetamida opcionalmente substituídos, 5-fluorocitosina e outros pró-fármacos de 5-fluorouridina que podem ser convertidos no fármaco livre citotóxico mais ativo. Exemplos de fármacos citotóxicos que podem ser derivados em uma forma de pró-fármaco para o uso na presente invenção incluem, mas não se limitam a, agentes quimioterápicos descritos abaixo.

A expressão “agente citotóxico”, da forma como utilizada no presente, indica uma substância que inibe ou evita o funcionamento das células e/ou causa destruição das mesmas. A expressão destina-se a incluir isótopos radioativos (por exemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioativos de Lu), agentes quimioterápicos e toxinas tais como toxinas de moléculas pequenas ou toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal ou seus fragmentos.

“Agente quimioterápico” é um composto químico útil no tratamento

de câncer. Exemplos de agentes quimioterápicos incluem agentes alquilantes, tais como tiotepa e ciclofosfamida (CYTOXANTM); sulfonatos de alquila tais como busulfana, improsulfana e piposulfana; aziridinas tais como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etilenoiminas e metilamelaminas, que incluem altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente, bulatacina e bulatacinona); camptotecina (incluindo seu análogo sintético topotecan); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo seus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina e bizelesina); criptoficinas (particularmente a criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo seus análogos sintéticos, KW-2189 e CBI-TMI), eleuterobina; pancratistatina; sarcodictina; spongistatina; mostardas de nitrogênio tais como clorambucila, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloridrato óxido de mecloretamina, melfalana, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracila; nitrosuréias, tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos como, por exemplo, os antibióticos de enedina (por exemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina (1¹ e caliqueamicina 2¹, vide, por exemplo, Agnew *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33:183-186 (1994); dinemicina, incluindo dinemicina A; uma esperamicina; bem como as neocarzinostatina cromofora e antibióticos cromóforas relacionados com a cromoproteína enedina), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluindo doxorubicina morfolina, doxorubicina-cianomorfolina, 2-doxorubicina-pirrolina e deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina,

• streptonigrina, streptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina;
 anti-metabólitos, tais como metotrexato e 5-fluorouracila (5-FU); análogos de
 ácido fólico, tais como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato;
 análogos de purina, tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina,
 5 tioguanina; análogos de pirimidina, tais como ancitabina, azacitidina, 6-
 azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina,
 floxuridina, 5-FU; andrógenos, tais como calusterona, propionato de
 dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenais, tais
 como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal
 10 como ácido frolínico; aceglatona; glicosídeo de aldofosfamida; ácido
 aminolevulínico; amsacrina; bestrabucila; bisantreno; edatraxato; defofamina;
 demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínio; uma epotilona;
 etoglucida; nitrato de gálio; hidroxiuréia; lentinana; lonidamina; maitansinóides,
 como por exemplo maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona;
 15 mopidamol; nitacrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-
 etilidrazida; procarbazona; PSK[®], razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermânio;
 ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos
 (especialmente a toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano;
 vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano;
 20 gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxóides, tais como
 paclitaxel (TAXOL, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton NJ, Estados
 Unidos) e docetaxel (TAXOTERE[®], Rhône-Poulenc Rorer, Antony, França);
 clorambucila; gencitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos
 de platina tais como cisplatina e carboplatina; vinblastina; platina; etoposida
 25 (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina;
 navelbina; novantrona; teniposida; daunomicina; aminopterina; xeloda;
 ibandronato; CPT-11; inibidor da topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina
 (DMFO); ácido retinóico; capecitabina e os sais, ácidos ou derivados

farmaceuticamente aceitáveis de quaisquer dos acima. Também estão incluídos nesta definição agentes anti-hormonais que agem para regular ou inibir a ação hormonal sobre tumores, tais como anti-estrógenos, incluindo, por exemplo, tamoxifeno, raloxifeno, inibidores da aromatase 4-(5)-imidazóis, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona e toremifeno (Fareston); e anti-andrógenos, tais como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida e goserelina e sais, ácidos ou derivados farmaceuticamente aceitáveis de quaisquer dos acima.

O termo “citocina” é um termo genérico para proteínas liberadas por uma população celular que agem sobre outra célula como mediadores intercelulares. Exemplos dessas citocinas são linfocinas, monocinas e hormônios de polipeptídeos tradicionais. Encontram-se incluídos entre as citocinas hormônios do crescimento, tais como hormônio do crescimento humano, hormônio do crescimento humano N-metionila e hormônio do crescimento bovino; hormônio paratireóide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; pró-relaxina; hormônios de glicoproteínas tais como hormônio folículo-estimulante (FSH), hormônio estimulante da tireóide (TSH) e hormônio luteinizante (LH); fator do crescimento hepático; fator de crescimento dos fibroblastos; prolactina; lactogênio da placenta; fator de necrose tumoral α e β ; substância inibidora mülleriana; peptídeo associado a gonadotropina de camundongos; inibina; activina; fator de crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); fatores de crescimento neural tais como NGF- β ; fator de crescimento das plaquetas, fatores de crescimento de transformação (TGFs) tais como TGF- α e TGF- β ; fator de crescimento similar à insulina I e II; eritropoietina (EPO); fatores osteoindutivos; interferons, tais como interferon- α , β e γ ; fatores estimulantes de colônias (CSFs) tais como de macrófago-CSF (M-CSF); de granulócito-macrófago-CSF (GM-CSF) e granulócito-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs) tais como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-

9, IL-11, IL-12; fator de necrose tumoral tal como TNF- α ou TNF- β ; e outros fatores de polipeptídeos que incluem LIF e ligante de kits (KL). Da forma como utilizada no presente, o termo citocina inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura celular recombinantes e equivalentes biologicamente ativos das citocinas de seqüências nativas.

“Tratamento” ou “terapia” designa um tratamento terapêutico e medidas profiláticas ou preventivas.

A expressão “quantidade eficaz” refere-se uma quantidade de fármaco que é eficaz para tratar uma doença ou desordem em um mamífero.

No caso de câncer, a quantidade terapeuticamente eficaz da droga pode reduzir o número de células cancerígenas; reduzir o tamanho do tumor; inibir (ou seja, reduzir até certo ponto e, preferencialmente, suspender) a infiltração de células cancerígenas em órgãos periféricos; inibir (ou seja, reduzir até certo ponto e, preferencialmente, suspender) a metástase tumoral; inibir, até certo ponto, o crescimento de tumores; e/ou melhorar, até certo ponto, um ou mais dos sintomas associadas a doença. Para extensão a droga pode impedir o crescimento e/ou matar as células cancerígenas existentes, Esta pode ser citostática e/ou citotóxica. Para a terapia do câncer, a eficácia *in vivo* pode, por exemplo, ser medida avaliando a carga tumoral ou o volume, o tempo de progressão da doença (TTP) e/ou determinando a taxa de resposta (RR).

“Mamífero”, para os propósitos de tratamento ou terapia, designa qualquer animal classificado como mamífero, incluindo seres humanos, animais domésticos e de criação e animais de zoológico, esportivos ou de estimação, tais como cães, cavalos, gatos, vacas etc. Preferencialmente, o mamífero é humano.

“Paciente” ou “indivíduo” na presente invenção significa a um único paciente no qual se deseja a terapêutica, incluindo os seres humanos. Também destinado a ser incluído como qualquer indivíduo envolvido na

pesquisa clínica julgamentos não demonstrando qualquer sinal clínico da doença, ou indivíduos envolvidos em estudos epidemiológicos, ou indivíduos utilizados como controle.

Os termos "câncer", "canceroso" e "maligno" designam ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada pelo crescimento celular desregulado. Exemplos de câncer incluem, mas sem limitar-se a, carcinoma, linfoma, blastoma, melanoma, sarcoma e leucemia. Exemplos mais específicos desses cânceres incluem câncer de cólon, câncer colorretal, câncer retal carcinoma de células escamosas, câncer do pulmão de células pequenas, câncer do pulmão de células não-pequenas, linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin, câncer testicular, mieloma, câncer esofágico, câncer gastrointestinal, câncer renal, câncer pancreático, glioblastoma, câncer cervical, câncer ovariano, glioma, câncer hepático, câncer de bexiga, hepatoma, câncer de mama, carcinoma endometrial, carcinoma de glândula salivar, câncer renal, câncer de próstata, câncer da vulva, câncer de tireóide, carcinoma hepático e vários tipos de câncer da cabeça e do pescoço.

O termo "biomarcador", da forma como é utilizado no presente se refere geralmente a uma molécula, incluindo um gene, proteína ou fragmento de proteína, estrutura de carboidrato ou glicolípido, a expressão de que pode ser detectada pelos métodos padrão em ou sobre um tecido mamífero ou célula (métodos divulgados aqui) e é preditivo de sensibilidade a um agente indutor da apoptose de uma célula ou tecido mamífero, tal como Apo2l/TRAIL ou anticorpo de receptor de morte. Tais biomarcadores contemplados na presente invenção incluem, mas não são limitados a, um fragmento de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4) como divulgado no presente (vide, por exemplo, Figs. 1 e 2).

Os termos "amostra de tecido ou célula" entende-se uma coleção de células similares obtidas a partir de um tecido do paciente ou indivíduo. A origem da amostra de tecido ou célula pode ser sólida, a partir de um tecido fresco, congelado e/ou órgão conservado ou amostra de tecido ou biópsia ou aspirado; sangue ou quaisquer constituintes do sangue, fluidos corporais, tais como fluido cérebro-espinhal, líquido amniótico, líquido peritoneal, ou fluido intersticial; células de qualquer período de gestação ou desenvolvimento do indivíduo. A amostra de tecido pode também ser primária ou de linhagens de cultura celulares. Opcionalmente, a amostra de tecido ou célula é obtida a partir de um tumor primário ou metastático. A amostra de tecido pode conter compostos que não são naturalmente misturados com o tecido, como conservantes, anticoagulantes, tampões, fixadores, nutrientes, antibióticos ou similares.

Para os fins do presente "corte" de uma amostra tecidual significa uma única peça ou pedaço de uma amostra de tecido, por exemplo, uma fina fatia de tecido ou célula cortada a partir de uma amostra tecidual. Entende-se que vários cortes de amostras de tecido podem ser coletadas e submetidas à análise de acordo com a presente invenção.

O termo "associado" ou "correlacionado" destina-se a comparação, por qualquer forma, desempenho e/ou resultados da primeira análise ou protocolo com o desempenho e/ou resultado de uma segunda análise ou protocolo. Por exemplo, uma análise ou protocolo pode usar os resultados da primeira análise ou protocolo na realização de uma segunda análise ou protocolo e/ou resultados da primeira análise ou protocolo para determinar se a segunda análise ou protocolo deve ser executada. No que diz respeito aos vários exemplos de realização divulgados no presente, uma análise ou protocolo pode usar os resultados de um ensaio analítico como, por exemplo, um que identifica os fragmentos AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia

pesada clatrina (SEQ ID NO: 2), APL1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4) produzidos durante a apoptose para determinar se um determinado regime terapêutico utilizando um agente indutor de apoptose Apo2L/TRAIL, FasL, anticorpo de receptor de morte ou similar deve ser realizado.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

A. MÉTODOS

Em geral, os materiais e métodos da invenção são usados para detectar e/ou monitorar a apoptose em células de mamíferos, por exemplo, contatando a célula com um anticorpo que se liga a um fragmento de proteína produzida durante a apoptose, no qual o anticorpo se liga a um fragmento de proteína da AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4); determinando a quantidade de anticorpo que se liga ao fragmento de proteína gerado durante a apoptose; e, em seguida, comparando a quantidade de anticorpos ligados nas células de mamíferos com a quantidade de anticorpos que se ligou no fragmento de proteína em uma célula de mamífero livre de apoptose, de modo que se o valor na célula a ser analisada for maior do que a quantidade na célula livre de apoptose, então apoptose é detectada. Como ilustrado nos exemplos fornecido no presente, o contato da célula com o um anticorpo que se liga a um fragmento de proteína produzida durante a apoptose inclui métodos que permitem o contato com componentes celulares das células. Normalmente, a célula é pré-tratada, por exemplo, por extração (por exemplo, no procedimento de *Western Blot* citado no presente aqui) para facilitar o contato do anticorpo com os componentes da célula.

Os métodos e ensaios divulgados no presente podem ser utilizados em diversos contextos. Por exemplo, existem algumas populações de tipos de células humanas doentes (como certas populações de células cancerosas), que são resistentes aos efeitos de morte celular induzida pela

Apo2L/TRAIL ou anticorpo de receptor de morte. Acredita-se deste modo, que os métodos e ensaios divulgados podem fornecer meios cômodos, eficientes e potencialmente rentáveis de se obter dados e informações úteis na avaliação adequada ou terapias eficazes para tratar pacientes. Por exemplo, um paciente com diagnóstico de câncer ou de condição imune relacionada poderia ser submetido a uma biópsia de modo a se obter uma amostra de células ou tecidos, e a amostra pode ser analisada por vários ensaios *in vitro* da presente invenção para determinar se as células do paciente são sensíveis a um agente terapêutico tais como Apo2/TRAIL ou anticorpo de receptor de morte.

Para a preparação das amostras, pode ser utilizada uma amostra de tecido ou célula de um mamífero (normalmente de um paciente humano). Exemplos de amostras incluem, mas não se limitam a, células de câncer, como células de câncer de cólon, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer de estômago, câncer de pâncreas, linfoma e leucemia. Opcionalmente, as amostras incluem células de câncer de pulmão de não pequenas células, câncer pancreático ou células de linfoma não-Hodgkin. A amostra pode ser obtida por uma variedade de procedimentos conhecidos no estado da arte, incluindo, mas não se limitando a, excisão cirúrgica, aspiração ou biópsia.

A invenção divulgada no presente documento possui diversos exemplos de realizações. Por exemplo, certos exemplos de realizações da presente invenção podem ser utilizados para observar a apoptose celular, e condições associadas em um paciente tal como um mamífero e, especificamente, um paciente humano. Em um exemplos de realização ilustrativo, métodos da invenção são utilizados para observar a presença (ou ausência) de apoptose em células de mamíferos, com o intuito de analisar a sensibilidade de uma célula mamífera a um mais agentes indutores de apoptose, como a Apo2/TRAIL ou FasL, para avaliar, por exemplo, a eficácia

de uma terapia que inclui a administração de tais agentes. Os métodos da presente invenção também podem ser usados para determinar a extensão da atividade de um composto candidato na diminuição ou aumento da atividade apoptótica em células de mamíferos, por exemplo, um que module a atividade de um agente que induz a apoptose como, por exemplo, Apo2L/TRAIL (SEQ ID NO: 7), FasL (SEQ ID NO: 9), um anticorpo agonista de Fas, um anticorpo agonista de DR4 ou um anticorpo agonista DR5. Exemplos de realização da presente invenção também são úteis para a identificação de compostos que inibem ou estimulam a morte de células por apoptose, determinando se os compostos que inibem ou estimulam a formação de fragmentos de proteínas gerados na apoptose.

Um exemplo de realização típico é um método de detecção de apoptose em células de mamíferos que é caracterizada pelo contato da célula a um anticorpo que se liga a um fragmento de proteína produzida durante a apoptose, onde o anticorpo se liga a um fragmento de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4); determinando a quantidade de anticorpo que se liga ao fragmento de proteína gerado durante a apoptose; e, em seguida, comparando a quantidade de anticorpos que se ligou nas células de mamíferos com a quantidade de anticorpos que se ligou aos fragmentos de proteína em uma célula livre de apoptose, de modo que, se, a quantidade nas células de mamíferos for maior do que nas células livres de apoptose, então a apoptose é detectada. Uma ampla variedade de células de mamíferos pode ser utilizada nesses métodos. Em certas realizações da presente invenção, a célula é uma célula de câncer humano de cólon, colorretal, de pulmão, de mama, de próstata, de bexiga, de rim, de ovário, de cérebro, de melanoma, leucemia ou mieloma.

Outro exemplo de realização da invenção é um método para a

identificação de uma célula de câncer humano que é susceptível de responder, ou seja, é responsiva a um agente terapêutico que induz a apoptose em células de câncer humano. Este exemplo de realização da invenção inclui as etapas de exposição das células de câncer humano ao agente terapêutico; avaliação das células de câncer expostas ao agente terapêutico pela presença de fragmentos de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4), comparando a quantidade de fragmentos de proteína nas células humanas de câncer com a quantidade de fragmentos de proteína em células controle de câncer humano não expostas ao ligante. Neste exemplo de realização da invenção, a apoptose é observada quando a quantidade de fragmento de proteínas presentes nas células de câncer humano expostas ao agente terapêutico é maior do que a quantidade de fragmentos de proteína nas células controle de câncer humano não expostas ao agente terapêutico, e uma observação da apoptose nas células de câncer humano identifica que as células de câncer humano, são susceptíveis a reagir, ou são responsivas ao agente terapêutico. Em certos exemplos de realização, as células de câncer humano são obtidas de uma paciente diagnosticado com câncer e são então cultivadas *in vitro* em cultura por menos de um mês, normalmente inferior a 2 semanas, ou menos de uma semana. Em realizações alternativas, a célula de câncer humano é uma linhagem imortalizada de células obtidas a partir de uma cultura *in vitro*.

Em exemplos de realizações típicos, a quantidade de anticorpos ligados nas células de mamíferos que está sendo observada pela presença de apoptose, por exemplo, uma célula de mamíferos exposta a um agente indutor de apoptose, é comparada com a quantidade de anticorpos ligados ao fragmento de proteína de células de mamíferos livre de apoptose, por exemplo, uma célula controle que não tenha sido exposta ao agente indutor de apoptose. Aqueles conhecedores da técnica compreenderão que estas células controle

são aquelas selecionadas por serem similares as células experimentais de mamíferos que estão sendo testadas pela presença de apoptose, exceto pela variável a ser testada (por exemplo, a exposição a um agente que induz a apoptose). Em um exemplo de realização da presente invenção, a célula controle é uma célula originada da mesma fonte (por exemplo, de uma amostra de biópsia do local de tumor primário ou metastático) e/ou é uma célula mamífera da mesma linhagem experimental das células que estão sendo testadas pela presença de apoptose exceto pelo fato de que as células controle não são expostas ao agente que inicia sinalização do Receptor de Morte 4 (SEQ ID NO: 5), Receptor de Morte 5 (SEQ ID NO: 6) ou Fas (SEQ ID NO: 8). Em certos exemplos de realização da presente invenção, o padrão de fragmentação da AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4), em tais células controle já foram caracterizados e este padrão de fragmentação caracterizado anteriormente na célula controle são é comparado com o padrão de fragmentação da AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4) em células de mamíferos, que estão sendo observadas pela presença de apoptose. Tais realizações são utilizadas, por exemplo, com a finalidade de eliminar as desnecessárias e redundantes caracterizações dos controles celulares, por exemplo, controles caracterizados como células livres de apoptose.

Realizações da presente invenção podem ser utilizadas para estudar células sofrendo apoptose induzidas por qualquer um de uma grande variedade de fatores conhecidos como iniciadores da morte celular programada, por exemplo, calor, radiação e agentes químicos. Estas realizações normalmente observam a apoptose em células iniciaram a apoptose através de um receptor na superfície celular, por exemplo, Receptor de Morte 4 (SEQ ID NO: 5), Receptor de Morte 5 (SEQ ID NO: 6) ou Fas (SEQ

ID NO: 8). Em certas realizações da presente invenção, a célula é estimulada pelo contato com polipeptídeo, como Apo2L/TRAIL (SEQ ID NO: 7), FasL (SEQ ID NO: 9), um anticorpo agonista de Fas, um anticorpo agonista de DR4 ou um anticorpo agonista de DR5, e os métodos descritos para a detecção da apoptose (que não incluem a detecção da não apoptose) são utilizados, por exemplo, para se obter informações sobre a eficácia de uma terapia que inclui a administração de tais agentes.

Os métodos da invenção também podem ser utilizados para identificar novos agentes indutores da apoptose e/ou moduladores de agentes indutores da apoptose. Exemplos de realizações ilustrativas podem incluir uma etapa de exposição da célula de mamífero a um ou mais agentes a serem testados e, em seguida, utilizando os métodos de presente invenção observar a apoptose, com a detecção da apoptose em células de mamíferos, identificando um ou mais agentes que estão sendo testados como um indutor da apoptose nas células de mamíferos. Os métodos da presente invenção também podem ser combinados com métodos complementares de análise celular, por exemplo, avaliação do perfil genético. Tal realização da presente invenção, inclui uma etapa de análise da expressão de pelo menos um mRNA nas células de mamíferos em que a apoptose é observada.

O método da presente invenção inclui a observação de proteínas celulares que são mostradas no presente por se fragmentarem nas células em apoptose. Estes fragmentos de proteínas, por exemplo, fragmentos de AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4) podem ser observados por qualquer uma, de uma ampla variedade de experimentos conhecido no estado da arte. Tipicamente, tais fragmentos são observados utilizando as técnicas de *immunoblotting*, ensaio imunoadsorvente enzima-associado ou imunohistoquímica. Além disso, os métodos da invenção podem ser utilizados para

analisar uma série de fragmentos de proteínas identificados no presente documento, por exemplo, um fragmento de proteína AP2 α que possui um peso molecular de aproximadamente 64 kDa ou 33 kDa. Em certas realizações da invenção, o fragmento de proteína ligado pelo anticorpo é identificado pela seqüência específica de aminoácidos desse fragmento, por exemplo, a seqüência de aminoácida AP2- α : DVFD SEQ ID NO: 1 ou GPAA SEQ ID NO: 1.

Tal como referido acima, realizações da presente invenção incluem métodos para determinar se um paciente humano com diagnóstico de câncer é susceptível de responder ao tratamento com um ou mais agentes indutores de apoptose, por exemplo, Apo-2/TRAIL. Estes métodos podem ser adaptados para serem utilizados com uma variedade de outros métodos conhecidos no estado da arte que facilitam a determinar se um paciente com diagnóstico de câncer provavelmente responderá ou responde ao tratamento com um(alguns) agente(s) tal como, um agente indutor da apoptose, por exemplo, aqueles métodos que analisam a expressão de pelo menos um gene (por exemplo, a presença ou o nível de mRNA ou proteína codificada por esse RNAm) em um paciente humano com diagnóstico de câncer (por exemplo, em um tumor primário ou metástase). Estes métodos de perfis genéticos são bem conhecidos no estado da arte e descritos, por exemplo, no pedido de Patente US 2006/0015952.

Um desses exemplos de realização da presente invenção pode incluir a etapa de observação de fragmentos gerados durante a apoptose, incluindo fragmentos da proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4) nas células cancerosas obtidas do paciente, em combinação com a etapa de obtenção de um perfil de expressão gênica múltiplos genes e comparando-a com um perfil de expressão gênica de uma mesma linhagem celular não cancerosa e/ou células cancerosas obtidas a partir de um modelo animal que é

sabidamente responsivo (ou, que não reage) ao tratamento com um ou mais agentes indutores da apoptose. Tipicamente, esses métodos podem incluir a etapa de identificar o paciente com mais probabilidade de vir a se beneficiar pelo tratamento com um ou mais agentes indutores da apoptose, por exemplo, se as células cancerosas obtidas do paciente apresentam um perfil de expressão gênica semelhante ao perfil de expressão gênica de células cancerosas obtidas de pacientes (ou modelo animal de câncer), que são sabidas por se beneficiarem pelo tratamento com um ou mais agentes indutores da apoptose.

Para os fins do presente, "semelhante" significa que os perfis de expressão se assemelham ou acompanham mutuamente uma ou mais formas, mostrando os que os padrões de expressão estão dentro de cerca de 80% a 100% de identidade em quantidade ou outro parâmetro de expressão mensurável dependendo da dosagem ou técnica utilizada para avaliar o perfil de expressão gênica, como descrito mais detalhadamente adiante, preferencialmente em cerca de 90 a 100%, e adicionalmente de preferência em 95 a 100% de identidade. Os perfis de expressão gênica a partir de células cancerígenas do paciente e do modelo animal são geralmente obtidos através da mesma técnica ou de ensaios para facilitar a comparação destes.

Os métodos para obtenção do perfil de expressão genética são bem conhecidos na técnica e baseiam-se tipicamente na análise de hibridização de polinucleotídeos ou seqüenciamento de polinucleotídeos. Os métodos mais comumente utilizados conhecidos no estado da arte para a quantificação da expressão de mRNA em amostras incluem *Northern Blot* e hibridização *in situ* (Parker e Barnes, *Methods in Molecular Biology*, 106: 247-283 (1999)); testes de proteção de RNase (Hod, *Biotechniques*, 13: 852-854 (1992)); e reação em cadeia de polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) (Weis *et al*, *Trends in Genetics*, 8: 263-264 (1992)). Alternativamente, podem

ser empregados anticorpos que podem reconhecer *duplexes* específicos, incluindo duplex de DNA, duplex de RNA e duplex híbridos de DNA e RNA e duplex de DNA e proteína. Métodos representativos de análise de expressão gênica baseada no seqüenciamento incluem; Análise Serial da Expressão Genética (SAGE) e análise de expressão genética por meio de seqüenciamento de assinaturas massivamente paralelas (MPSS). Qualquer destes métodos ou outros métodos conhecidos na técnica pode ser utilizado para determinar o perfil de expressão gênica de célula de tumor obtida do paciente, tal como um paciente humano, e um animal que serve de modelo experimental de câncer que é responsivo a um antagonista de TGF- β , tal como modelo de camundongo. No caso de pacientes humanos, a fonte de células de tumor pode ser uma amostra de tecido fresco, congelado ou fixado e emblocado em parafina, do qual o mRNA pode ser extraído e submetido a análise de expressão gênica.

Alternativamente, métodos proteômicos também podem ser utilizados para comparar o perfil de expressão de célula de câncer humano e a célula de referência (como, por exemplo, de camundongo). O perfil proteômico é a representação do padrão de expressão de uma série de proteínas na amostra biológica, tal como o tecido de câncer. O perfil de expressão pode ser representado como um espectro de massa, mas outras representações baseadas em quaisquer propriedades bioquímicas ou físico-químicas das proteínas também estão incluídas. Desta forma, o perfil de expressão pode ser baseado, por exemplo, em diferenças das propriedades eletroforéticas de proteínas, conforme determinado por meio da eletroforese bidimensional em gel, tal como por 2-D PAGE, e pode ser representado, por exemplo, na forma de uma série de pontos no gel de eletroforese bidimensional. Métodos proteômicos são bem conhecidos na estado da arte e descritos, por exemplo, nos livros a seguir: *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*

- (*Principles and Practice*), M. R. Wilkins *et al*, eds., Springer Verlag, 1007; 2-D
- , *Proteome Analysis Protocols*, Andrew L. Link, editor, Humana Press, 1999;
- Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods (Principles and Practice)*, T. Rabilloud editor, Springer Verlag, 2000;
- 5 *Proteome Research: Mass Spectrometry (Principles and Practice)*, P. James editor, Springer Verlag, 2001; *Introduction to Proteomics*, D. C. Liebler editor, Humana Press, 2002; *Proteomics in Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis*, R. Westermeier *et al*, eds., John Wiley & Sons, 2002.

Fragmentos de proteína gerados durante a apoptose, incluindo

10 fragmentos de proteínas AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4); em uma amostra pode ser analisada por uma variedade de meios bem conhecido no estado da arte. Protocolos usuais para avaliação de tais fragmentos de proteínas foram encontrados, por exemplo, em Ausubel *et al*. Ed. 1995, *Current*

15 *Protocols In Molecular Biology*, Unidade 15 (*Immunoblotting*). Imunoensaios, que podem ser utilizados em certos exemplos de realização da presente invenção incluem, mas não estão limitados a: *Western blot*, imunoprecipitação, *slot blot* ou *dot blot*, imunocoloração, RIA, ensaio de cintilação por proximidade, imunoensaio fluorescente utilizando anticorpos conjugados ou antígeno

20 conjugados de substâncias fluorescentes como a fluoresceína ou rodamina, análise por método de dupla difusão de Ouchterlony, ELISA, ELISA baseado em células, ELISA ligado a filtro, inibição de ELISA, e imunoensaios que empreguem um sistema de detecção avidina-biotina ou estreptavidina-biotina.

Em algumas realizações da invenção, um anticorpo utilizado no

25 imunoensaio liga-se tanto a proteínas intactas quanto ao fragmento de proteína, e o fragmento de proteína é reconhecido pelo seu tamanho caracteristicamente menor, por exemplo, em um processo de *Western Blot*. O anticorpo utilizado em uma realização da presente invenção pode ser, por

exemplo, um dos anticorpos exemplares divulgados no presente documento ou um anticorpo que se liga a um epítopo acoplado a um dos anticorpos exemplares divulgados no presente. Em outras realizações da presente invenção, os anticorpos que reconhecem especificamente os fragmentos de proteína gerados na apoptose, mas não podem ser usado em proteínas intactas. Estes anticorpos podem ser preparados por métodos normais de imunização utilizando o fragmento como imunógeno e, em seguida, identificando os anticorpos gerados que se ligam aos fragmentos de proteína produzidos na apoptose, mas não se ligam na proteína intacta.

Em realizações típicas da presente invenção, a análise é realizada em proteínas obtidas a partir de células lisadas que foram separados por meio de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida ("PAGE"). O anticorpo é colocado em contato com as proteínas e a análise é realizada, preferencialmente por imunoensaio, para determinar a presença de fragmentos de proteínas que se ligam aos anticorpos. A comparação pode ser feita com um controle constituído por proteínas semelhantes a partir de células lisadas (por exemplo, células da mesma fonte e/ou linhagem) sabidamente livres de apoptose. Qualquer um dos imunoensaios descritos acima pode ser utilizado para analisar uma amostra de tecido retirada de um indivíduo vivo. Possíveis amostras biológicas para esta análise incluem células do sangue ou amostras de biópsia de tecido ou células, que pode ser obtidas por métodos padrões. O níveis de fragmentos de peptídeos gerados pela apoptose da amostra biológica descrita acima pode ser determinada por qualquer um dos imunoensaios descritos acima que utilizam anticorpos que se ligam especificamente aos fragmentos da proteínas AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4). Os níveis de fragmentos de peptídeos gerados pela apoptose determinado na amostra biológica do indivíduo em análise é comparada com os níveis

encontrados em uma célula de um paciente não afetado, ou um padrão conhecido. Um padrão exemplar pode ser, por exemplo, a presença e/ou concentração de um ou mais fragmentos de proteínas normalmente observados em células que não estão passando pelo processo de apoptose (por exemplo, nas células controle não expostas a um agente indutor de apoptose). Tais realizações podem ser utilizadas, por exemplo, para diagnosticar condições caracterizadas pela apoptose anormal. Em certos exemplos de realizações da presente invenção, um nível de apoptose é observado na célula, com, por exemplo, um aumento de fragmentos de peptídeos gerados pela apoptose em, pelo menos, 10, 20, 30, 40 ou 50 por cento, 100 ou 150 por cento, quando comparado a uma amostra controle, sendo assim considerado como indicativo de um estado patológico. Em outros exemplos de realizações, um nível de apoptose é observada na célula, com, por exemplo, um aumento de fragmentos de peptídeos gerados pela apoptose em, pelo menos 10 vezes, 100 vezes ou 1000 vezes, quando comparado a uma amostra controle, sendo assim considerado como indicativo de um estado patológico.

Exemplos de realizações da presente invenção podem ser adaptadas para utilização em testes imunológicos úteis na detecção e quantificação de fragmentos de proteínas AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4). Esses testes podem incluir um ou mais anticorpos capazes de reconhecer e se ligar a um fragmento de proteína, como apropriado. Estes ensaios são realizados em diversas formas de ensaios imunológicos bem conhecidos no estado da arte, incluindo, mas não limitado a vários tipos de testes de *Western Blot*, radioimunoensaio, ensaio imunoadsorvente enzima-associado (ELISA), ensaio imunoadsorvente fluorescente-associado (ELIFA) e similares.

Nos métodos ilustrativos, a amostra pode ser contactada com um anticorpo específico para um biomarcador, tal como um fragmento de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4); em condições suficientes para a formação de um complexo anticorpo-biomarcador e, em seguida, o dito complexo é detectado. A detecção da presença de um fragmento de proteína biomarcada pode ser obtida de várias maneiras, tais como pela técnica de *Western blotting* (com ou sem um passo de imunoprecipitação) e ensaio de ELISA para avaliar uma vasta variedade de tecidos e amostras, incluindo o plasma ou soro. Uma vasta variedade de técnicas de imunoensaio utilizando tal modelo está disponível, vide, por exemplo, as Patentes US 4.016.043, US 4.424.279 e US 4.018.653. Estas incluem tanto ensaios de sítio único, dois sítios ou do tipo “sanduíche” do tipo não-competitivo, bem como nos ensaios de ligação competitiva tradicionais. Estes ensaios incluem também a ligação direta do anticorpo marcado direcionado ao biomarcador.

Ensaio do tipo “sanduíche” estão entre os ensaios mais úteis e comumente utilizados. Existem uma série de variações nas técnicas de ensaios do tipo “sanduíche”, e todas são englobadas pela presente invenção. Resumidamente, em um ensaio típico futuro, um anticorpo não marcado é imobilizado sobre um substrato sólido, e a amostra a ser testada é colocada em contato com a molécula ligada. Após um período adequado de incubação, por um período de tempo suficiente para permitir a formação do complexo antígeno-anticorpo, um segundo anticorpo específico para o antígeno, marcado com uma molécula repórter capaz de produzir um sinal detectável é então adicionado e incubado, por um tempo suficiente para permitir a formação de outro complexo de anticorpo anti-anticorpo marcado. Qualquer material que não reagiu é retirado por lavagem, e a presença do antígeno é determinada pela observação da molécula sinal produzida pela molécula repórter. Os

- resultados podem ser qualitativos, através de uma simples observação do sinal visível, ou pode ser quantitativos pela comparação com uma amostra controle contendo quantidades conhecidas de biomarcador.

Variações sobre os ensaios seguintes incluem uma análise simultânea, no qual ambas as amostras e anticorpos marcados são adicionados simultaneamente ao anticorpo acoplado. Estas técnicas são bem conhecidas por aqueles conhecedores do estado da arte, incluindo as eventuais variações menores que serão facilmente perceptíveis. Em um ensaio do tipo “sanduíche” típico, um primeiro anticorpo com especificidade para o biomarcador é ligado covalentemente ou acoplado de forma passiva a uma superfície sólida. A superfície sólida é tipicamente de vidro ou de polímero, os polímeros mais comumente utilizados são: celulose, poliacrilamida, náilon, poliestireno, policloreto de vinil ou polipropileno. Os suportes sólidos podem ser na forma de tubos, esferas, discos de microplacas, ou qualquer outra superfície adequada para realizar um imunoensaio. Os processos de ligação são bem conhecidos no estado da técnica e, geralmente consistem da adsorção física ligada covalentemente por ligação cruzada, o complexo anticorpo-polímero é lavado na preparação da amostra para análise. Uma alíquota da amostra para ser testada é então adicionada ao complexo da fase sólida e incubada por um período de tempo suficiente (por exemplo, 2-40 minutos, ou, se conveniente, *overnight*) e em condições adequadas (por exemplo, da temperatura ambiente até 40 °C, como entre 25 °C e 32 °C, inclusive) para permitir a ligação de qualquer subunidade presente no anticorpo. Em seguida, após o período de incubação, a subunidade do anticorpo na fase sólida é lavada, seca e incubada com um segundo anticorpo específico para a fração do biomarcador. O segundo anticorpo é ligada a uma molécula repórter, que é usada para indicar a ligação do segundo anticorpo ao marcador molecular.

Um método alternativo envolve a imobilização de um biomarcador

de interesse na amostra e em seguida, expondo o biomarcador imobilizado ao anticorpo específico, que pode ou não ser marcado para detecção com uma molécula repórter. Dependendo da quantidade de molécula alvo e da intensidade de sinal da molécula repórter, a molécula alvo ligada pode ser detectada pela marcação direta com o anticorpo. Alternativamente, um segundo anticorpo marcado, específico para o primeiro anticorpo é exposto ao primeiro complexo primeiro anticorpo-alvo para formar um complexo terciário segundo anticorpo anti-primeiro anticorpo-alvo. O complexo é detectado pelo sinal emitido pela molécula repórter. "moléculas repórteres" da forma com utilizada na presente especificação refere-se uma molécula que, pela sua natureza química, fornece um sinal analiticamente reconhecível que permite a detecção da ligação antígeno-anticorpo. As moléculas repórteres mais comumente utilizadas neste tipo de ensaio são enzimas, fluoróforos ou moléculas que contêm radionuclídeos (ou seja, radioisótopos) e moléculas quimioluminescentes.

No caso de um ensaio imunoenzimático, uma enzima é conjugada com o segundo anticorpo, em geral por meio de glutaraldeído ou periodato. Como será facilmente reconhecido, no entanto, existe uma grande variedade de diferentes técnicas de conjugação, que são facilmente disponíveis para os técnicos hábeis no assunto. Enzimas comumente utilizadas incluem: enzima peroxidase, glicose oxidase, galactosidase e fosfatase alcalina, entre outras. Os substratos para serem utilizados com as enzimas específicas são geralmente escolhidos pela produção, mediante a hidrólise pela enzima correspondente, de mudança de cor detectável. Os exemplos de enzimas adequadas incluem fosfatase alcalina e peroxidase. Também é possível empregar substratos fluorogênicos, que produzem um produto fluorescente ao invés do substrato cromogênico acima citado. Nos casos típicos, o anticorpo marcado com enzima é adicionado ao complexo primeiro anticorpo-marcador

molecular, permitindo sua ligação e, então, o excesso de reagente é lavado fora. Uma solução contendo o substrato adequado é então adicionada ao complexo do anticorpo-antígeno -anticorpo. O substrato vai reagir com a enzima ligada ao segundo anticorpo, dando um sinal visual qualitativo, que pode ainda ser quantificado espectrofotometricamente, para dar uma indicação da quantidade de biomarcador presente na amostra. Alternativamente, os compostos fluorescentes, como a fluoresceína e rodamina, podem ser acoplados quimicamente aos anticorpos sem alterar ou limitar sua capacidade. Quando ativado pela iluminação com um comprimento de onda específico, o anticorpo marcado com fluorocromo absorve a energia da luz, induzindo um estado de excitabilidade na molécula seguido pela emissão de luz na cor característica visualmente detectável com um microscópio óptico. Tal como no EIA, é permitido que os anticorpos marcados fluorescentes se liguem ao complexo primeiro anticorpo-marcador molecular. Após a lavagem dos reagentes que não acoplados, o complexo terciário remanescente é então exposto à luz em um comprimento de onda adequado, a fluorescência observada indica a presença do marcador molecular de interesse. Técnicas de imunofluorescência e EIA são ambas muito bem estabelecidas no estado da arte. No entanto, outras moléculas repórteres, tais como o radioisótopo, moléculas quimioluminescentes ou bioluminescentes, também podem ser empregadas.

Tal como acima citado, exemplos de realização da presente invenção pode usar anticorpos que se ligam a fragmentos de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4), mas não a proteína completa (por exemplo, anticorpos que se ligam a ao epítipo produzido pela clivagem da proteína total). Tais exemplos de realizações podem ser utilizados para examinar os fragmentos de proteína em uma célula por técnicas de imuno-

histoquímica. Nas técnicas de imuno-histoquímica, uma amostra de tecidos pode ser fixado (ou seja, preservado) pelo método convencional (vide, por exemplo, "*Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology*" 3ª edição (1960) Lee G. Luna, HT Editora (ASCP), *The Blakston Division McGraw-Hill Book Company* Company, Nova York; *Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology* (1994) Ulreka V. Mikel, Instituto de Patologia das Forças Armadas, *American Registry of Pathology*, Washington, DC). Os técnicos conhecedores do assunto irão apreciar que a escolha do fixador é determinado pela finalidade pelo qual o tecido será histologicamente corado ou de outra forma analisado. Uma técnico hábil no assunto também irá apreciar o fato de que o tempo de fixação depende do tamanho da amostra de tecido e do fixador utilizado. A título de exemplo, a formalina tamponada neutra, Bouin's ou paraformaldeído, podem ser utilizados para fixar uma amostra de tecido. Após a preparação dos tecidos, um corte de tecido pode ser submetido a uma de uma variedade de técnicas de imuno-histoquímica conhecidas no estado da arte.

B. MATERIAIS

Uma variedade de materiais podem ser utilizados na prática da presente invenção incluindo quaisquer de uma ampla variedade de agentes indutores da apoptose, bem como anticorpos que se ligam a fragmentos de proteínas revelados no presente que são gerados durante a morte de células por apoptose. Exemplo de agentes indutores da apoptose incluem Apo2L, anticorpos agonistas anti-DR4 ou anti-DR5, FasL e anticorpos agonistas anti-Fas. A Apo-2L que pode ser empregada nos métodos inclui os polipeptídeos de Apo-2L descritos em Pitti *et al.*, *supra*, documento WO 97/25428, *supra*, e documento WO97/01633, *supra* (os polipeptídeos estão referidos com TRAIL). Contempla-se que as várias formas de Apo-2L podem ser usadas como, por exemplo, o polipeptídeo completo bem como as formas solúveis de Apo-2L que

contém uma seqüência de domínio extracelular (ECD). Os exemplos de tais seqüências ECD solúveis incluem os polipeptídeos que compreendem da seqüência de aminoácidos 114-281, 95-281, 91-281 ou 92-281 da Apo-2L, mostrada na figura 1A de Pitti et de al., *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996). Acredita-se atualmente que o polipeptídeo que contém os aminoácidos 92-281 é uma forma naturalmente clivada de Apo-2L. Os requerentes expressaram Apo-2L humana em células CHO e encontraram que o polipeptídeo 92-281 é a forma expressa da Apo-2L. As formas modificadas de Apo-2L, tais como as formas modificadas covalentemente descritas em WO 97/25428 estão incluídas. Em particular, a Apo-2L ligada a um polímero não proteináceo tal como o polietileno glicol está incluído para o uso no presente método. O polipeptídeo da Apo-2L pode ser feito de acordo com alguns dos métodos descritos no documento WO 97/25428.

As variantes do ligante de Apo-2 que tem atividade apoptótica e podem ser usada nos métodos incluem, por exemplo, aquelas identificadas pela técnica de varredura da alanina. As variantes substitucionais particulares compreendem os aminoácidos 91-281 da figura 1A de Pitti et de al., *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996) em que pelo menos um dos aminoácidos nas posições 203, 218 ou 269 é substituído por um resíduo da alanina. Opcionalmente, as variantes do ligante Apo-2 podem incluir uma ou mais destas três diferentes substituições locais.

Contempla-se que uma molécula que mimetize a atividade apoptótica da Apo-2L pode alternativamente ser empregada nos métodos divulgados no presente. Os exemplos de tais moléculas incluem os anticorpos agonísticos que podem induzir a apoptose ao menos de maneira comparável ou parecida a Apo-2L. Particularmente, estes anticorpos agonistas poderiam compreender de anticorpos que se ligam a um ou mais receptores para Apo-2L. Preferencialmente, o anticorpo agonista é dirigido a um receptor Apo-2L

que inclui um domínio citoplasmático de morte, tal como DR4 ou DR5. Mais preferivelmente, a ligação do anticorpo agonista a tal receptor pode ser determinada, por exemplo, usando FACS ou ELISA. Anticorpos agonistas direcionados ao receptor denominado DR5 (ou Apo-2) foram preparados usando técnicas de fusão tais como descrito abaixo. Um dos anticorpos agonistas do receptor DR5 ou Apo-2 é referido como 3F11.39.7 e foi depositado no ATCC como depósito nº HB-12456 em 13 de janeiro de 1998. A atividade do anticorpo agonista do receptor Apo-2L pode ser determinada usando vários métodos para avaliar a atividade apoptótica, e opcionalmente, a atividade apoptótica de tal anticorpo pode ser determinada, dosando o anticorpo sozinho ou na forma reticulada usando o Fc da imunoglobulina ou o complemento.

Adicionalmente, anticorpos agonistas direcionados a outro receptor Apo-2L, denominado de DR4, também foram preparados. Um dos anticorpos agonistas de DR4 exemplar é denominado como 4H6.17.8 e foi depositado no ATCC com depósito nº HB-12455 em 13 de janeiro de 1998. A atividade dos anticorpos agonistas do receptor Apo-2L pode ser determinada usando vários métodos de ensaios para avaliar a atividade apoptótica, e opcionalmente, a atividade apoptótica de tal anticorpo pode ser determinada, dosando o anticorpo sozinho ou na forma reticulada usando o Fc da imunoglobulina ou o complemento.

Os anticorpos agonistas contemplados pela invenção incluem os anticorpos que ligam a um único receptor Apo-2L ou a mais de um receptor Apo-2L. Um anticorpo que a liga a mais de um receptor Apo-2L pode ser caracterizado como um anticorpo que "reage cruzadamente" com dois ou mais antígenos diferentes e é capaz de se ligar a cada um dos antígenos, por exemplo, como determinado por ELISA ou por FACS, como no exemplo descrito abaixo. Opcionalmente, um anticorpo que "reage cruzadamente de maneira específica" com dois ou mais antígenos diferentes é aquele que se liga

ao primeiro antígeno e se liga adicionalmente a um segundo antígeno diferente, de modo que a capacidade de ligação do anticorpo ao segundo antígeno a uma concentração de anticorpo de aproximadamente 10 ng/mL é de cerca de 50% a 100% (preferencialmente, cerca de 75% a 100%) da capacidade de ligação do anticorpo ao primeiro antígeno como determinado em uma captura por ELISA (tal como, nos exemplos abaixo). Por exemplo, o anticorpo pode se ligar especificamente a DR5 (o "primeiro antígeno") e ter reação cruzada específica com outro receptor de Apo-2L tal como DR4 (o "segundo antígeno"), em que a extensão da ligação a cerca de 10:ng/mL do anticorpo ao DR4 é de aproximadamente 50% a 100% da capacidade e ligação para o DR5 em uma captura por ELISA. Os vários anticorpos com reatividade cruzada aos receptores Apo-2L são descritos com mais detalhe no pedido de patente internacional número PCT/US99/13197.

Como descritos abaixo, os formas exemplares de tais anticorpos incluem anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, anticorpos humanizados, biespecíficos e heteroconjugados.

1. ANTICORPOS POLICLONAIS

Os anticorpos da invenção podem compreender de anticorpos policlonais. Os métodos de preparação de anticorpos policlonais são bem conhecidos pelos hábeis no assunto. Os anticorpos policlonais podem ser obtidos em um mamífero, por exemplo, por um ou mais injeção de agente imunizantes, e se desejado, de um adjuvante. Tipicamente, o agente imunizante e/ou o adjuvante serão injetados no mamífero por múltiplas injeções subcutâneas ou intraperitoneais. O agente imunizante pode incluir, por exemplo, um polipeptídeo completo ou parcial de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4), ou uma fusão de proteína deste. Pode ser útil conjugar o agente imunizante a uma proteína conhecida por ser imunogênica

no mamífero que é imunizado. Os exemplos de tais proteínas imunogênicas incluem, mas não se limitam a hemocianina (*keyhole limpet hemocyanin*), a albumina do soro, a tiroglobulina bovina e o inibidor do tripsina de soja. Os exemplos dos adjuvantes que podem ser empregados incluem o adjuvante completo de Freund e o adjuvante MPL-TDM (monofosforil lipídio A, dicorinomicolato de trealose sintético). O protocolo de imunização pode ser selecionado por um técnico hábil no assunto. O mamífero pode então ser sangrado, e o título de anticorpo mensurado no soro. Se desejado, o mamífero pode ser estimulado até que o título de anticorpo aumente ou chegue a um platô.

2. ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os anticorpos da invenção podem, alternativamente, ser anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais podem ser fabricados pelo uso do método de hibridoma descrito por Kohler e Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). No método de hibridoma, um camundongo, hamster, ou outro animal hospedeiro apropriado, é tipicamente imunizado com um agente imunizante para gerar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligam de forma específica a proteína utilizada para imunização. Alternativamente, linfócitos podem ser imunizados *in vitro*.

Geralmente, outros linfócitos periféricos do sangue ("PBLs") são usados se as células de desejadas forem origem humana, ou células do baço ou linfonodos são usadas se forem desejadas células de mamíferos não humanos. Os linfócitos são fundidos em seguida com uma linhagem de células imortalizada, utilizando um agente de fusão apropriado, tal como o polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59 a 103 (Academic Press, 1986)). Linhagens de células imortalizadas são geralmente células de mamíferos transformadas, particularmente células de mielomas de roedores, bovinos e de origem humana. Geralmente, são utilizadas linhagens celulares de mieloma de

ratos e camundongos. Normalmente as células de hibridoma podem ser cultivadas em um meio de cultura apropriado que contém, preferencialmente, uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células imortalizadas não-fundidas. Por exemplo, se as células parentais não contêm a enzima hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias que evitam o crescimento de células com deficiência em HGPRT.

Células imortalizadas preferidas são aquelas que se fundem eficientemente, apóiam a produção estável em alto nível de anticorpos pelas células produtoras de anticorpos selecionadas e são sensíveis a um meio tal como meio HAT. As linhagens de células imortalizadas mais preferidas são linhagens de mieloma murino que podem ser obtidas no caso pela *Salk Institute Cell Distribution Center*, San Diego, Califórnia, Estados Unidos, e *American Type Culture Collection*, Manassas, Virginia. Um exemplo de tal linhagem de células de mieloma é P3X63AgU.1. Mieloma humano e heteromieloma humano/camundongo também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); e Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, Estados Unidos, 1987)).

O meio de cultura em que as células de hibridoma são cultivadas pode então ser testado para determinar a presença dos anticorpos monoclonais dirigidos contra o imunógeno desejado. Preferencialmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada através de imunoprecipitação ou ensaio de ligação *in vitro*, tais como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoenzimático (ELISA). Tais técnicas e ensaios são conhecidas no estado da arte. A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode ser determinada, por exemplo, através da análise de

Scatchard descrita em Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Após a identificação de células de hibridoma que produzem anticorpos com especificidade, afinidade e/ou atividade desejadas, os clones podem ser subclonados através da limitação de procedimentos de diluição e cultivados através de métodos padrão (Goding, *supra*). Meios de cultura apropriados para este propósito incluem, por exemplo, o meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (D-MEM) ou RPMI-1640. Alternativamente, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* na forma de tumores de ascite em mamíferos.

Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones podem ser isolados ou purificados do meio de cultura, líquido ascítico por meio de procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulina, tais como, por exemplo, proteína A-Sefarose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia por afinidade.

Os anticorpos monoclonais podem também ser feitos por métodos de DNA recombinante, tais como aqueles descritos na patente US 4.816.567. O DNA codificador dos anticorpos monoclonais da invenção é facilmente isolado e seqüenciado utilizando procedimentos convencionais (utilizando, por exemplo, sondas de oligonucleotídeos que sejam capazes de se ligar, especificamente, a genes codificadores das cadeias pesada e leve de anticorpos murinos). As células de hibridoma da invenção servem como fonte preferida de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são transfectados em seguida para células hospedeiras, tais como células de *E. coli*, células COS de símios, células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células de mieloma que, de outra forma, não produzem a proteína de imunoglobulina, para se obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. O DNA pode também ser modificado, por exemplo, pela substituição das seqüências humanas do domínio constante

das cadeias leve e pesada pelas seqüências murinas homólogas (patente US 4.816.567; e Morrison *et al.*, *supra*) ou por meio de ligação covalente da seqüência codificadora de imunoglobulina, no todo ou em parte, com a seqüência codificadora para um polipeptídeo não-imunoglobulina. Tais polipeptídeos que não são imunoglobulina são substituídos pelos domínios constantes de um anticorpo da invenção ou são substituídos pelos domínios variáveis de um sítio de combinação do antígeno de um anticorpo da invenção para criar um anticorpo bivalente quimérico. Opcionalmente, os anticorpos quiméricos podem ser construídos, o que inclui, pelo menos, um domínio variável ou hipervariável de um anticorpo, como um dos anticorpos divulgados no presente.

Opcionalmente, os anticorpos da presente poderão se ligar ao(s) mesmo(s) epítopo(s) como qualquer um dos anticorpos divulgados no presente. Isso pode ser determinada através de vários testes, tais como os descritos a seguir. Por exemplo, para determinar se um anticorpo monoclonal tem a mesma especificidade como os anticorpos especificamente mencionados no presente, pode-se comparar a sua atividade em um ensaio de apoptose.

Os anticorpos da invenção incluem anticorpos "reticulados". O termo reticulado usado no presente refere-se a ligação de pelo menos duas moléculas de IgG unidas formando uma (ou única) molécula. O anticorpo pode ser reticulado utilizando várias moléculas de ligação, opcionalmente os anticorpos podem ser reticulados usando uma molécula de anti-IgG, complemento, modificada quimicamente ou por engenharia molecular. É apreciado por aqueles hábeis na técnica que o complemento tenha uma afinidade relativamente elevada às moléculas de anticorpo uma vez que o anticorpo estiver ligado à superfície da membrana celular. Acredita-se que o complemento pode ser usado como uma molécula da ligação entre dois ou mais anticorpos ligados à superfície da membrana celular. Entre os vários

isotipos de Ig murino, o IgM, IgG2a e IgG2b são conhecidos por fixar o complemento.

Os anticorpos utilizados na prática da presente invenção podem opcionalmente compreender de anticorpos diméricos, bem como formas multivalentes de anticorpos. Os técnicos no assunto podem construir esses dímeros ou formas multivalentes através de métodos conhecidos no estado da técnica usando o anticorpo anti-receptor Apo-2L do presente.

Os anticorpos utilizados na prática da presente invenção podem também compreender de anticorpos monovalentes. Métodos para a preparação de anticorpos monovalentes são bem conhecidos no estado da arte. Por exemplo, a expressão recombinante de cadeia leve de imunoglobulina e cadeia pesada modificada. A cadeia pesada geralmente é truncada em qualquer ponto da região Fc, de forma a evitar a reticulação da cadeia pesada. Alternativamente, os resíduos de cisteína relevantes são substituídos com outro resíduo de aminoácido ou são deletados, de forma a evitar a reticulação.

Métodos *in vitro* são também apropriados para preparar anticorpos monovalentes. A digestão de anticorpos para produzir fragmentos deste, particularmente, fragmentos Fab, pode ser realizada usando técnicas rotineiras conhecidas. Por exemplo, a digestão pode ser executada usando a papaína. Os exemplos da digestão por papaína estão descritos no documento WO 94/29348 publicado em 22/12/94 e patente US 4.342.566. A digestão dos anticorpos pela papaína produz tipicamente dois fragmentos de ligação ao antígeno idênticos, chamados de fragmentos de Fab, cada qual com um único sítio de ligação de antígenos e um fragmento Fc residual. O tratamento com pepsina gera um fragmento $F(ab')_2$ que tem dois sítios de combinação de antígenos e ainda é capaz de reticular o antígeno.

Os fragmentos Fab produzidos na digestão do anticorpo também contêm os domínios constantes da cadeia leve e o primeiro domínio constante

(CH₁) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab pela adição de alguns resíduos no carboxi-terminal do domínio CH₁ de cadeia pesada, incluindo uma ou mais cisteínas da região de articulação do anticorpo. Fab'-SH é a denominação do presente para Fab', em que o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes contém(êm) um grupo tiol livre. Os fragmentos de anticorpo F(ab')₂ foram originalmente produzidos na forma de pares de fragmentos Fab' que contêm cisteínas articuladas entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpos também são conhecidos.

Fragmentos Fv de cadeia simples podem também ser produzidos, tal como descrito em Iliades *et al.*, *FEBS Letters*, 409: 437-441 (1997). O acoplamento desses fragmentos de cadeia simples utilizando vários ligantes é descrito em Kortt *et al.*, *Protein Engineering*, 10: 423-433 (1997).

Além dos anticorpos descritos acima, é contemplado que anticorpos quiméricos ou híbridos possam também ser preparados *in vitro*, utilizando métodos conhecidos na química de proteínas sintéticas, incluindo aqueles que envolvem agentes reticulantes. Imunotoxinas, por exemplo, podem ser construídas utilizando uma reação de troca de dissulfeto ou através da formação de ligação tioéter. Exemplos de reagentes apropriados para este propósito incluem iminotiolato e metil-4-mercaptobutirimidato.

Os anticorpos utilizados na prática da presente invenção podem adicionalmente constar de anticorpos humanizados ou anticorpos humanos. Formas humanizadas de anticorpos não-humanos (tais como murinos) são imunoglobulinas quiméricas específicas, cadeias de imunoglobulina ou seus fragmentos (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ ou outras subsequências de ligação de antígenos de anticorpos) que contêm sequência mínima derivada de imunoglobulina não-humana. Anticorpos humanizados incluem imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor), nas quais os resíduos de uma região determinante de complementaridade (CDR) do paciente são substituídos

por resíduos de uma CDR de espécie não-humana (anticorpo doador), tal como camundongo, rato ou coelho que possui a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, resíduos da região de estrutura Fv da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não-humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor nem nas seqüências de estrutura ou CDR importadas. Geralmente, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos dentre pelo menos um, tipicamente dois, domínios variáveis nos quais todas ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem às de imunoglobulina não-humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são as de uma seqüência de consenso de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado também compreenderá idealmente de pelo menos uma porção de um domínio ou região constante da imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)).

Métodos de humanização de anticorpos não-humanos são bem descritos no estado da arte. Preferencialmente, um anticorpo humanizado contém um ou mais resíduos de aminoácidos nele introduzidos a partir de uma fonte que não é humana. Esses resíduos de aminoácidos não-humanos são muitas vezes denominados resíduos "importados", que são tipicamente retirados de um domínio variável "importado". A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo-se o método de Winter e colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), por meio de substituição de seqüências de regiões hipervariáveis pelas seqüências correspondentes de anticorpo humano. Conseqüentemente, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente US 4.816.567), em que

substancialmente menos de um domínio variável humano intacto tenha sido substituído pela seqüência correspondente de uma espécie não-humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos, em que alguns resíduos CDR e, possivelmente, alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores.

A escolha de domínios variáveis humanos, tanto leves quanto pesados, a serem utilizados na fabricação dos anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o método denominado "melhor adequação", a seqüência do domínio variável de um anticorpo de roedor é selecionada em comparação com toda a biblioteca de seqüências de domínio variável humano conhecida. A seqüência humana mais próxima da seqüência do roedor é aceita como a região de estrutura humana (FR) para o anticorpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296-2308 (1993); Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)). Outro método utiliza uma região de estrutura específica derivada da seqüência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo específico de regiões variáveis de cadeia leve ou pesada. A mesma estrutura pode ser utilizada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285-4289 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623-2632 (1993)).

É adicionalmente importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção da alta afinidade para o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir este objetivo, de acordo com um método preferido, os anticorpos humanizados são preparados por meio de um processo de análise das seqüências parentais e diversos produtos humanizados conceituais, utilizando modelos tridimensionais das seqüências parentais e humanizadas. Modelos de imunoglobulina tridimensionais são comumente disponíveis e são familiares para os técnicos no assunto. Estão disponíveis programas de computador que ilustram e exibem prováveis

estruturas de conformação tridimensional de possíveis seqüências de imunoglobulina selecionadas. A inspeção dessas exibições permite a análise da provável função dos resíduos no funcionamento da possível seqüência de imunoglobulina, isto é, a análise de resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata de se ligar ao seu antígeno. Desta forma, os resíduos FR podem ser selecionados e combinados a partir das seqüências receptora e importada, de forma que seja atingida a característica desejada, tal como maior afinidade para o(s) antígeno(s) alvo(s). Geralmente, os resíduos CDR estão diretamente e mais substancialmente envolvidos na influência da ligação de antígenos. (Vide, documento WO 94/04679 publicado em 3 de março de 1994).

Anticorpos monoclonais humanos podem ser preparados utilizando uma adaptação do método de hibridoma descritos pela primeira vez por Kohler e Milstein, usando linfócitos B humanos como parceiros da fusão. Os linfócitos B humanos que produzem o anticorpo de interesse podem ser, por exemplo, isolados de um indivíduo humano, após ter sido obtido o consentimento informado. Por exemplo, o indivíduo pode produzir anticorpos contra uma auto antígeno como o que ocorre com determinados doenças, tais como, o lúpus eritematoso sistêmico (Shoenfeld *et al. J. Clin. Invest.*, 70:205 (1982)), trombocitopenia púrpura imuno mediada (ITP) (Nugent *et al. Blood*, 70(1): 16-22 (1987)), ou câncer. Alternativamente ou adicionalmente, linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Por exemplo, a exposição *in vitro* de linfócitos isolados do sangue periférico humano a um agente lisomotrófico (*e.g.* éster de L-leucina-O-metil, éster do ácido dimetil L-glutâmico ou éster de L-leucil-L-leucina-O-metil) (patente US 5.567.610, Borrebaeck *et al.*); e/ou linfócitos de sangue periférico humano com células T depletadas podem ser tratadas *in vitro* com adjuvantes tal como 8-mercaptopguanosina e citocinas (patente US 5.229.275, Goroff *et al.*).

Os linfócitos B recuperados do paciente ou imunizado *in vitro*, é

então geralmente imortalizada a fim de gerar um anticorpo monoclonal humano. As técnicas imortalização do linfócito B incluem, mas não são limitadas a: (a) fusão de linfócitos B humano com células de mielomas humanos, murinos e hetromielomas camindongo-humanos; (b) transformação viral (por exemplo, com um vírus Epstein-Barr; vide, por exemplo, Nugent *et al.*, *supra*); (c) fusão com uma linhagem de células linfoblátóide; ou (d) fusão com células de linfomas.

Os linfócitos podem ser fundidos com células de mieloma usando um agente de fusão apropriado, tal como o polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). As células de hibridoma preparadas desta forma são germinadas e cultivadas em um meio de cultura apropriado que contém, preferencialmente, uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma parentais não-fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma parentais não contêm a enzima hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase (HGPRT ou HPRT) o meio de cultura para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias que evitam o crescimento de células com deficiência em HGPRT. As linhagens celulares apropriadas de mieloma humano e heteromieloma humano/de camundongos também foram descritas (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). O meio de cultura em que são cultivadas células de hibridoma é analisado para determinar a produção de anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno. Preferencialmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada por meio de imunoprecipitação ou de um teste de ligação *in vitro*, tal como o radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoenzimático (ELISA).

Após a identificação de células de hibridoma que produzem anticorpos de especificidade, afinidade e/ou atividade desejadas, os clones podem ser subclonados por meio da limitação de procedimentos de diluição e cultivados por meio de métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Meios de cultura apropriados para este propósito incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido de ascite ou soro por meio de procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulina, tais como, por exemplo, proteína A-Sefarose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia por afinidade.

Anticorpos humanos podem ser produzidos também usando hospedeiros não humanos como, por exemplo, o camundongo, que é capaz de produzir anticorpos humanos. Como citado acima, camundongos transgênicos agora disponíveis são capazes, mediante imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência da produção de imunoglobulina endógena. Foi descrito, por exemplo, que a deleção homozigótica do gene da região de ligação de cadeia pesada de anticorpos (J_H) em camundongos quiméricos e mutantes de linhagem germinativa resulta na inibição completa da produção de anticorpos endógenos. A transferência do conjunto de genes de imunoglobulina da linhagem germinativa humana nesses camundongos com mutação da linhagem germinativa resultará na produção de anticorpos humanos mediante desafio dos antígenos. vide, por exemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); patente US 5.591.669; patente US 5.589.369; e patente US 5.545.807. Anticorpos humanos também podem ser preparados utilizando o camundongo SCID-hu (Duchosal *et al.* *Nature* 355:258-262 (1992)).

Em outro exemplo de realização, o anticorpo humano pode ser selecionado a partir de anticorpos gerados por bibliotecas de fagos. A preparação das bibliotecas de anticorpos ou de fragmentos destes é bem conhecida no estado da arte e alguns dos métodos conhecidos podem ser usados para construir uma família de vetores de transformação que podem ser introduzidos na célula hospedeira. Bibliotecas da cadeia leve e cadeia pesada no fago (Huse *et al.*, *ciência*, 246:1275 (1989)) ou da fusão de proteínas no fago ou fagomídeo podem ser preparadas de acordo com procedimentos conhecidos. Vide, por exemplo, Vaughan *et al.*, *Nature Biotechnology* 14:309-314 (1996); Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88:7978-7982 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992); Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:4457-4461 (1992); Griffiths *et al.*, *EMBO Journal*, 13:3245-3260 (1994); de Kruif *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 248:97-105 (1995); documento WO 98/05344; documento WO 98/15833; documento WO 97/47314; documento WO 97/44491; documento WO 97/35196; documento WO 95/34648; patente US 5.712.089; patente US 5.702.892; patente US 5.427.908; patente US 5.403.484; patente US 5.432.018; patente US 5.270.170; documento WO 92/06176; documento WO 99/06587; Patente US 5.514.548; documento WO97/08320; e patente US 5.702.892. O antígeno do interesse é selecionado de encontro à biblioteca do fago usando os procedimentos conhecidos neste campo para selecionar os anticorpos-fagos que se ligam ao antígeno alvo.

Os anticorpos descritos no presente possuirão opcionalmente uma ou mais atividades ou propriedades biológicas desejadas. Tais anticorpos podem incluir, mas não estão limitados a; anticorpo quimérico, humanizado, humano e anticorpos maturados por afinidade. Como descrito acima, os anticorpos podem ser construídos ou projetado usando várias técnicas para se obter as atividades ou propriedades desejadas. Em uma incorporação, o anticorpo terá afinidade de

ligação de pelo menos 10^5 M^{-1} , preferivelmente pelo menos na escala de 10^6 M^{-1} a 10^7 M^{-1} , mais preferivelmente, pelo menos na escala de 10^8 M^{-1} a 10^{12} M^{-1} e mais preferivelmente ainda, pelo menos na escala de 10^9 M^{-1} a 10^{12} M^{-1} . A afinidade de ligação do anticorpo pode ser determinada sem experimentação excessiva testando o anticorpo de acordo com técnicas conhecidas, incluindo a análise de Scatchard (vide Munson *et al.*, *supra*).

Em outro exemplo de realização, o anticorpo da invenção pode se ligar no mesmo epítipo do qual os anticorpos descritos acima se ligam ou liga a uma epítipo que coincide ou se sobrepõe com epítipo ao qual os anticorpos descritos acima se ligam. A propriedade de ligação do anticorpo ao epítipo da presente invenção pode ser determinada usando técnicas conhecidas. Por exemplo, o anticorpo pode ser testado por ensaio *in vitro*, tal como um ensaio de inibição competitiva, para determinar a habilidade do anticorpo de inibir ou bloquear a interação de ligação conhecida.

3. ANTICORPOS BIESPECÍFICOS

Os anticorpos biespecíficos são anticorpos monoclonais, preferencialmente humanos ou humanizados, que possuem especificidades de ligação para pelo menos dois antígenos diferentes. Os métodos de fabricação de anticorpos biespecíficos são conhecidos no estado da arte. Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos é baseada na co-expressão de dois pares de cadeia leve e cadeia pesada de imunoglobulina, no qual as duas cadeias pesadas possuem especificidades diferentes (Milstein e Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Devido à seleção aleatória de cadeias leve e pesada de imunoglobulina, esses hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de dez moléculas de anticorpos diferentes, dos quais apenas uma possui a estrutura biespecífica correta. A purificação da molécula correta, que normalmente é realizada através de etapas de cromatografia de afinidade. Procedimentos similares são descritos

no documento WO 93/08829, publicado em 13 de maio de 1993 e em Traunecker *et al.*, *EMBO* 10, 3655-2659 (1991).

Domínios variáveis de anticorpos com as especificidades de ligação desejadas (sítios de combinação de antígeno-anticorpo) podem ser fundidos em seqüências de domínios constantes de imunoglobulina. A fusão ocorre preferencialmente com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, que compreende pelo menos parte das regiões de articulação, CH₂ e CH₃. Prefere-se ter a primeira região constante de cadeia pesada (CH₁) contendo o sítio necessário para ligação de cadeia leve presente em pelo menos uma das fusões. Os DNAs que codificam as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados e são co-transfectados em um organismo hospedeiro apropriado. Para detalhes adicionais sobre a geração de anticorpos biespecíficos, vide, por exemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

4. ANTICORPOS HETEROCONJUGADOS

Os anticorpos heteroconjugados também se encontram dentro do escopo da presente invenção. Os anticorpos heteroconjugados são compostos de dois anticorpos ligados covalentemente. Tais anticorpos são propostos, por exemplo, para direcionar células do sistema imune a células indesejadas (patente US 4.676.980) e para o tratamento de infecções por HIV (documento WO 91/00360; documento WO 92/200373; EP 03089). Contempla-se que os anticorpos podem também ser preparados *in vitro*, utilizando métodos conhecidos na química de proteínas sintéticas, incluindo aqueles que envolvem agentes reticulantes. Por exemplo, imunotoxinas podem ser construídas utilizando uma reação de troca de dissulfeto ou através da formação de ligação tioéter. Exemplos de reagentes apropriados para este propósito incluem iminotiolato e metil-4-mercaptobutirimidato e aqueles descritos, por exemplo, na patente US 4.676.980.

5. TRIACORPOS

Triacorpos também se encontram dentro do escopo da presente invenção. Estes anticorpos são descritos, por exemplo, em Iliades *et al.*, *supra*, e Kortt *et al.*, *supra*.

6. OUTRAS MODIFICAÇÕES

Outras modificações do anticorpo são contempladas na presente invenção. Os anticorpos de acordo com a presente invenção podem ser modificados através de conjugação do anticorpo a um agente citotóxico (como uma molécula de toxina) ou uma enzima ativadora de pró-drogas que converte uma pró-droga (por exemplo, um agente quimioterápico de peptidíla, vide documento WO 81/01145) em uma droga anti-câncer ativa. Vide, por exemplo, o documento WO 88/07378 e a Patente US 4.975.278. Esta tecnologia também é denominada “Terapia de Pró-Drogas Mediada por Enzima Dependente de Anticorpos” (ADEPT).

O componente de enzima do imuno-conjugado útil para o ADEPT inclui qualquer enzima capaz de atuar sobre uma pró-droga, de forma a convertê-la na sua forma citotóxica mais ativa. Enzimas que são úteis no método de acordo com a presente invenção incluem, mas sem limitar-se a, fosfatase alcalina útil para a conversão de pró-drogas que contêm fosfato em drogas livres; arilsulfatase útil para a conversão de pró-drogas que contêm sulfato em drogas livres; citosina deaminase útil para a conversão de 5-fluorocitosina não-tóxica na droga anti-câncer, 5-fluorouracil; proteases, tais como serratia protease, termolisina, subtilisina, carboxipeptidases e catepsinas (tais como catepsinas B e L) que são úteis para a conversão de pró-drogas que contêm peptídeos em drogas livres; caspases, tais como caspase-3; D-alanilcarboxipeptidases, úteis para a conversão de pró-drogas que contêm substituintes D-aminoácidos; enzimas que clivam de carboidratos, tais como beta-galactosidase e neuraminidase, úteis para a conversão de pró-drogas

glicosiladas em drogas livres; beta -lactamase útil para a conversão de drogas derivadas com beta-lactamas em drogas livres; e penicilina amidases, tais como penicilina V amidase ou penicilina G amidase, úteis para a conversão de drogas derivadas nos seus nitrogênios amina com grupos fenoxiacetila ou fenilacetila, respectivamente, em drogas livres. Alternativamente, anticorpos com atividade enzimática, também conhecidos na técnica como “abzimas”, podem ser utilizados para converter as pró-drogas de acordo com a presente invenção em drogas ativas livres (vide, por exemplo, Massey, *Nature* 328: 457-458 (1987)). Conjugados de anticorpo e abzima podem ser preparados conforme descrito no presente para fornecimento da abzima a uma população de células tumorais.

As enzimas podem ser ligadas covalentemente aos anticorpos por meio de técnicas bem conhecidas no estado da arte, tais como o uso de reagentes reticulantes heterobifuncionais. Alternativamente, as proteínas de fusão que compreendem pelo menos a região de ligação de antígenos de um anticorpo de acordo com a presente invenção ligada a pelo menos uma parte funcionalmente ativa de uma enzima de acordo com a presente invenção podem ser construídas utilizando métodos de DNA recombinante bem conhecidos no estado da arte (vide, por exemplo, Neuberger *et al.*, *Nature*, 312: 604-608 (1984)).

Como é conhecido no estado da arte, anticorpos, tais como os utilizados nos imunoensaios para a detecção de um fragmento de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4); pode ser conjugado com uma variedade de agentes de formação de imagem diagnóstica. A conjugação pode ser feita diretamente entre os anticorpos e os agentes de formação de imagem diagnóstica ou ligando, ou podem ser fornecidos grupos moleculares intermediadores entre os anticorpos e o agente de formação de imagem. Reticulantes freqüentemente utilizados facilitam a conjugação fornecendo penhora sítios de acoplamento de

cada agrupamento. Reticulantes podem incluir grupos moleculares adicionais que servem como espaçadores para separar cada fração evitando interferências nas atividades entre eles.

A imagem pode ser obtida por muitos processos bem conhecidos pelos técnicos do assunto e agentes de formação de imagem apropriados úteis em tais procedimentos podem ser conjugados com um anticorpo bem por meios bem conhecidos no estado da arte. As imagens podem ser realizadas, por exemplo, visualizando os resultados de um procedimento *Western*, por radio cintigrafia, imagem por ressonância nuclear magnética (MRI) ou tomografia computadorizada (CT scan). Agentes de cintilografia comumente empregados incluem iodo e índio radioativo. Imagens por tomografia computadorizada pode empregar um metal pesado, como quelato de ferro. Varreduras por MRI podem empregar quelatos de manganês ou de gadolínio. Adicionalmente, a Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) é possível utilizar emissores de pósitron de oxigênio, nitrogênio, ferro, carbono ou gálio. Exemplos de radionuclídeos úteis em procedimentos de obtenção de imagens incluem: K^{43} , Fe^{52} , Co^{57} , Cu^{67} , Ga^{67} , Ga^{68} , Br^{77} , Rb^{81} , In^{111} , In^{113} , I^{123} , I^{125} , Cs^{127} , Cs^{129} , I^{131} , I^{132} , Hg^{197} , Pb^{203} e Bi^{206} , Magerstadt, M. (1991) *Antibody Conjugates And Malignant Disease*, CRC Press, Boca Raton, Flórida, e Barchel, PB e Rhodes, BH, (1983) *Radioimaging and Radiotherapy*, Editora Elsevier, NY, cada um dos quais é incorporado ao presente documento pela referência, ensina a conjugação de vários radionuclídeos terapêuticos e diagnóstico para aminoácidos de anticorpos. Estas reações podem ser aplicadas para conjugar radionuclídeos a anticorpos com um ligante adequado. Marcadores adequados incluem, por exemplo, radionuclídeos, enzimas (por exemplo, peroxidase do rábano silvestre), substratos, co-fatores, inibidores, fluoróforos, quimioluminescentes e/ou partículas magnéticas. Vide, por exemplos, patentes que ensinam o uso de tais marcadores, Patentes US 3817837, US 3850752, US 3939350, US 3996345, US 4277437, US 4275149 e US 366241,

todas as quais são incorporadas pela referência.

São contempladas modificações adicionais de anticorpos. Por exemplo, o anticorpo pode estar ligado a um dentre uma variedade de polímeros não-proteináceos, tais como polietilenoglicol, polipropilenoglicol, polioxialquilenos ou copolímeros de polietilenoglicol e polipropilenoglicol. O anticorpo pode também ser acondicionado em microcápsulas preparadas, por exemplo, através de técnicas de aglutinação ou por polimerização interfacial (por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli-(metacrilato de metila), respectivamente), em sistemas de fornecimento de drogas coloidais (por exemplo, lipossomos, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas), ou em macroemulsões. Estas técnicas são descritas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16^a edição, Oslo, A., Ed. (1980). Para aumentar a meia-vida do anticorpo em soro pode-se incorporar um epítipo de ligação de receptores salvos ao anticorpo (especialmente fragmento de anticorpo), conforme descrito, por exemplo, na Patente US 5.739.277. Da forma utilizada no presente, a expressão “epítipo de ligação de receptores salvos” designa um epítipo da região Fc de uma molécula IgG (tal como IgG₁, IgG₂, IgG₃ ou IgG₄) que é responsável pelo aumento da meia-vida em soro *in vivo* da molécula IgG.

7. MÉTODOS RECOMBINANTES

A presente invenção também fornece ácidos nucleicos isolados que codificam anticorpos um polipeptídeo de interesse como, por exemplo, fragmentos de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4) e/ou anticorpos descritos no presente, vetores e células hospedeiras que compreendem o ácido nucleico e técnicas recombinantes para a produção do anticorpo.

Para a produção recombinante do polipeptídeo de interesse, o ácido nucleico que o codifica é isolado e inserido em um vetor replicável para

clonagem adicional (amplificação do DNA) ou para expressão. O DNA codificador do polipeptídeo é facilmente isolado e seqüenciado através da utilização de procedimentos convencionais (utilizando-se, por exemplo, sondas de oligonucleotídeos que são capazes de se ligar especificamente a genes codificadores do polipeptídeo de interesse). Muitos vetores são disponíveis. Os componentes do vetor geralmente incluem, mas não se limitam a, um ou mais dos seguintes componentes: seqüência sinalizadora, origem de replicação, um ou mais genes marcadores, elemento amplificador, promotor e seqüência de término de transcrição.

Os métodos do presente incluem métodos para a produção de anticorpos quiméricos ou recombinantes que se liga a fragmentos de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4) e que compreende as etapas de fornecimento do vetor contendo uma seqüência de DNA que codifica uma cadeia pesada ou cadeia leve de anticorpo (ou ambas, cadeia leve e cadeia pesada), transfecção ou transformação da célula hospedeira com o vetor e a cultura da(s) célula(s) hospedeira(s) sob condições suficientes para produzir o produto recombinante.

(I) COMPONENTE SEQÜÊNCIA SINALIZADORA

O polipeptídeo de interesse de acordo com a presente invenção pode ser produzido de forma recombinante não apenas diretamente, mas também como um polipeptídeo de fusão com um polipeptídeo heterólogo que é, preferencialmente, uma seqüência sinalizadora ou outro polipeptídeo que possui um sítio de clivagem específico no N-terminal do polipeptídeo ou proteína madura. A seqüência sinalizadora heteróloga selecionada é, preferencialmente, aquela que é reconhecida e processada (ou seja, clivada por uma peptidase sinalizadora) pela célula hospedeira. Para células hospedeiras procarióticas que não reconhecem e processam a seqüência sinalizadora de anticorpo nativo, a

seqüência sinalizadora é substituída por uma seqüência sinalizadora procariótica selecionada, por exemplo, a partir do grupo de fosfatase alcalina, penicilinase, *lpp* ou líderes de enterotoxina II estáveis ao calor. Para secreção de leveduras, a seqüência sinalizadora nativa pode ser substituída, por exemplo, pelo líder de invertase de levedura, líder do fator α (que inclui líderes de fatores α de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*) ou líder de fosfatase ácida, o líder de glicoamilase de *C. albicans* ou o sinal descrito no documento WO 90/13646. Na expressão de células de mamíferos, são disponíveis seqüências sinalizadora de mamíferos, bem como líderes de secreção viral, tais como o sinal gD da *herpes simplex*.

O DNA para essa região precursora é ligado na matriz de leitura ao DNA codificador do polipeptídeo.

(II) COMPONENTE ORIGEM DE REPLICAÇÃO

Tanto os vetores de expressão como de clonagem contêm uma seqüência de ácido nucléico que permite que o vetor replique em uma ou mais células hospedeiras selecionadas. Geralmente, em vetores de clonagem, esta seqüência é aquela que permite que o vetor replique independentemente do DNA cromossômico hospedeiro e inclui origens de replicação ou seqüências de replicação autônoma. Estas seqüências são bem conhecidas para uma série de bactérias, leveduras e vírus. A origem de replicação do plasmídeo *pBR322* é apropriada para a maior parte das bactérias gram-negativas, a origem de plasmídeo 2μ é apropriada para levedura e várias origens virais (SV40, polioma, adenovírus, VSV ou BPV) são úteis para a clonagem de vetores em células de mamíferos. Geralmente, a origem do componente de replicação não é necessária para vetores de expressão de mamíferos (a origem SV40 pode ser tipicamente utilizada somente porque contém o promotor inicial).

(III) COMPONENTE GENE DE SELEÇÃO

Os vetores de clonagem e de expressão podem conter um gene

de seleção, também denominado marcador selecionável. Os genes de seleção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, tais como ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina; (b) complementam deficiências auxotróficas ou (c) fornecem nutrientes importantes não-disponíveis a partir de meios complexos, tais como o gene codificador de D-alanino racemase para *Bacilli*.

Um exemplo de seleção que utiliza uma droga para interromper o crescimento de uma célula hospedeira. As células que são transformadas com sucesso por um gene heterólogo que produz uma proteína que confere resistência a drogas e, desta forma, sobrevivem ao regime de seleção. Exemplos desta seleção dominante utilizam as drogas neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Outro exemplo de marcadores selecionáveis apropriados para células de mamíferos são aqueles que permitem a identificação de células competentes para absorver o ácido nucléico, tal como DHFR, timidino quinase, metalotioneína I e II, preferencialmente, genes da metalotioneína de primatas, adenosina deaminase, ornitina decarboxilase etc.

Células transformadas pelo gene de seleção DHFR são, por exemplo, identificadas em primeiro lugar pela cultura de todos os transformantes em um meio de cultura que contenha metotrexato (Mtx), um antagonista competitivo de DHFR. Uma célula hospedeira apropriada quando é utilizado o gene DHFR do tipo selvagem é a linhagem celular de ovário de hamster chinês (CHO) com deficiência na atividade DHFR.

Alternativamente, as células hospedeiras (particularmente, hospedeiras do tipo selvagem que contêm DHFR endógeno) transformadas ou cotransformadas com seqüências de DNA que codificam o polipeptídeo de interesse, proteína DHFR do tipo selvagem e outro marcador selecionável tal como aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase (APH) podem ser selecionadas

através do crescimento celular em um meio que contém um agente de seleção para o marcador selecionável tal como antibiótico aminoglicosídico, por exemplo canamicina, neomicina ou G418. Vide a Patente US 4.965.199.

Um gene de seleção apropriado para uso em levedura é o gene *trp1* presente no plasmídeo de levedura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282: 39 (1979)). O gene *trp1* fornece um marcador de seleção para uma linhagem mutante de levedura que não possui a capacidade de crescer em triptofano, tal como ATCC N° 44076 ou PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977). A presença da lesão *trp1* no genoma de célula hospedeira de levedura fornece então um ambiente eficaz para detectar a transformação através de crescimento na ausência de triptofano. De forma similar, linhagens de levedura com deficiência de *Leu2* (ATCC 20.622 ou 38.626) são complementadas por plasmídeos conhecidos que contêm o gene *Leu2*.

Além disso, vetores derivados do plasmídeo circular pKD1 podem ser utilizados para a transformação de leveduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, um sistema de expressão para a produção em larga escala de quimosina de bezerro recombinante foi descrita para a *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). Também foram descritos vetores de expressão de múltiplas cópias estáveis para secreção de albumina de soro humano recombinante madura por linhagens industriais de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991).

(IV) COMPONENTE PROMOTOR

Os vetores de expressão e clonagem normalmente contêm um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e é operacionalmente ligado ao ácido nucléico. Os promotores apropriados para utilização com hospedeiros procarióticos incluem o promotor *phoA*, sistemas promotores de lactose e β -lactamase, fosfatase alcalina, um sistema promotor de triptofano (*trp*) e promotores híbridos, tais como o promotor *tac*. Entretanto, são

apropriados outros promotores bacterianos conhecidos. Os promotores para uso em sistemas bacterianos também conterão uma sequência Shine-Dalgarno (S. D.) operacionalmente ligada ao DNA que codifica o polipeptídeo de interesse.

5 São conhecidas seqüências promotoras para eucariontes. Virtualmente todos os genes eucarióticos contêm uma região rica em AT localizada a cerca de 25 a 30 bases à montante (*uspstream*) do sítio onde é iniciada a transcrição. Outra seqüência localizada a 70 a 80 bases à montante (*uspstream*) do início da transcrição de muitos genes é uma região CNCAAT
10 onde N pode ser qualquer nucleotídeo. Na extremidade 3' da maior parte dos genes eucarióticos, encontra-se uma seqüência AATAAA que pode ser o sinal para adição da calda poli-A na extremidade 3' da seqüência de codificação. Todas estas seqüências são inseridas de maneira adequada em vetores de expressão eucarióticos.

15 Exemplos de seqüências promotoras apropriadas para uso com hospedeiros de leveduras incluem os promotores para 3-fosfoglicerato quinase ou outras enzimas glicolíticas, tais como enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, hexoquinase, piruvato decarboxilase, fosfofrutoquinase, glicose-6-fosfato isomerase, 3-fosfoglicerato mutase, piruvato quinase,
20 triosefosfato isomerase, fosfoglicose isomerase e glicoquinase.

Outros promotores de levedura, que são promotores induzíveis que possuem a vantagem adicional da transcrição controlada pelas condições do crescimento, são as regiões promotoras para álcool desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase ácida, enzimas degradantes associadas ao
25 metabolismo de nitrogênio, metalotioneína, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose. Os vetores apropriados e promotores para uso na expressão de levedura encontram-se adicionalmente descritos na Patente EP 73.657.

Amplificadores de leveduras também são utilizados vantajosamente com promotores de leveduras.

A transcrição de vetores em células hospedeiras de mamíferos é controlada, por exemplo, por promotores obtidos a partir dos genomas de vírus tais como vírus de políoma, vírus da catapora, adenovírus (tal como adenovírus 2), vírus de papiloma bovino, vírus do sarcoma aviário, citomegalovírus, retrovírus, vírus da hepatite B e, de maior preferência, Vírus Símio 40 (SV40), a partir de promotores de mamíferos heterólogos, tais como o promotor de actina ou um promotor de imunoglobulina, de promotores de choque térmico, desde que esses promotores sejam compatíveis com os sistemas de células hospedeiras.

Os promotores inicial e final do vírus SV40 são obtidos convenientemente na forma de fragmento de restrição SV40 que também contém a origem viral SV40 de replicação. O promotor inicial imediato do citomegalovírus humano é obtido convenientemente na forma de fragmento de restrição *HindIII* E. Um sistema de expressão de DNA em hospedeiros mamíferos utilizando o vírus de papiloma bovino como vetor é descrito na Patente US 4.119.446. Uma modificação deste sistema é descrita na Patente US 4.601.978. Vide também Reyes *et al.*, Nature 297: 598-601 (1982) sobre a expressão de cDNA de interferon- γ humano em células de camundongos sob o controle de um promotor timidina quinase de vírus da herpes simplex. Alternativamente, a repetição terminal longa de vírus do sarcoma de Rous pode ser utilizada como promotor.

(V) COMPONENTE ELEMENTO AMPLIFICADOR

A transcrição de um DNA que codifica um polipeptídeo de interesse de acordo com a presente invenção por eucariontes superiores é freqüentemente aumentada através da inserção de uma sequência amplificadora no vetor. Muitas seqüências amplificadoras são agora

conhecidas de genes de mamíferos (globina, elastase, albumina, α -fetoproteína e insulina). Tipicamente, entretanto, será utilizado um amplificador de um vírus de célula eucariótica. Exemplos incluem o amplificador SV40 sobre o lado oposto da origem de replicação (100-270 bp), o amplificador promotor inicial de citomegalovírus, o amplificador de poliovírus na extremidade co-lateral da origem de replicação e amplificadores de adenovírus. Vide também Yaniv, *Nature* 297: 17-18 (1982) sobre elementos de promoção para a ativação de promotores eucarióticos. O amplificador pode também sofrer *splicing* no vetor em posição 5' ou 3' para a sequência codificadora de anticorpo, mas encontra-se localizado, preferencialmente, em um sítio a 5' do promotor.

(VI) COMPONENTE TÉRMINO DE TRANSCRIÇÃO

Os vetores de expressão utilizados em células hospedeiras eucarióticas (leveduras, fungos, insetos, plantas, animais, seres humanos ou células nucleadas de outros organismos multicelulares) também conterão sequências necessárias para o término de transcrição e para a estabilização do mRNA. Estas sequências são comumente disponíveis a partir das regiões não-traduzidas 5' e, ocasionalmente, 3' de cDNAs ou DNAs virais ou eucarióticos. Estas regiões contêm segmentos de nucleotídeos transcritos na forma de fragmentos poliadenilados na porção não-traduzida do mRNA codificador do anticorpo multivalente. Um componente de término de transcrição útil é a região de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino. Vide o documento WO 94/11026 e o vetor de expressão nele descrito.

(VII) SELEÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS

As células hospedeiras apropriadas para clonagem ou expressão do DNA nos vetores do presente são as células de procariontes, leveduras ou eucariontes superiores descritas acima. Os procariontes apropriados para este propósito incluem eubactérias, tais como organismos gram-negativos ou gram-positivos, por exemplo, enterobactérias tais como *Escherichia*, por exemplo, *E.*

coli, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por exemplo *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por exemplo, *Serratia marcescans*, e *Shigella*, bem como *Bacilli* tais como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (por exemplo, *B. licheniformis* 41P descrito na Patente DD 266.710, publicada em 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tais como *P. aeruginosa* e *Streptomyces*. Um hospedeiro de clonagem de *E. coli* preferido é *E. coli* 294 (ATCC 31.446), embora outras linhagens tais como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) e *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) sejam apropriadas. Estes exemplos são ilustrativos e não-limitadores.

Além de procariontes, micróbios eucarióticos tais como fungos filamentosos ou leveduras são hospedeiros de expressão ou clonagem apropriados para vetores. *Saccharomyces cerevisiae*, ou levedura comum de padaria, é o mais comumente utilizado entre microorganismos hospedeiros eucarióticos inferiores. Entretanto, uma série de outros gêneros, espécies e linhagens estão comumente disponíveis e são úteis no presente, como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedeiros *Kluyveromyces*, tais como *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilarum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* e *K. marxianus*; *yarrowia* (Patente EP 402.226); *Pichia pastoris* (Patente EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (Patente EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis*; e fungos filamentosos, tais como *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* e hospedeiros *Aspergillus*, tais como *A. nidulans* e *A. niger*.

As células hospedeiras apropriadas para a expressão do polipeptídeo de interesse são derivadas de organismos multicelulares. Exemplos de células de invertebrados incluem células vegetais e de insetos. Foram identificadas numerosas variantes e linhagens bacilovirais e células hospedeiras de insetos permissivas correspondentes de hospedeiros tais como

Spodoptera frugiperda (lagarta), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca das frutas) e *Bombyx mori*. Uma série de linhagens virais para transfecção está disponível ao público, tais como a variante L-1 de *Autographa californica* NPV e a linhagem Bm-5 de *Bombyx mori* NPV e esses vírus podem ser utilizados como o vírus do presente de acordo com a presente invenção, particularmente, para a transfecção de células de *Spodoptera frugiperda*.

Culturas de células vegetais de algodão, milho, batata, soja, petúnia, tomate e fumo podem também ser utilizadas como hospedeiros.

Entretanto, tem aumentado o interesse sobre células de vertebrados e a propagação destas células de vertebrados em cultura (cultura de tecidos), que tornou-se um procedimento de rotina. Exemplos de linhagens de células hospedeiras de mamíferos úteis são a linhagem CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linhagem de rim embriônico humano (293 ou células 293 subclonadas para crescimento em cultura de suspensão, Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.* 36: 59 (1977)); células de rim de filhote de hamster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 4216 (1980)); células sertoli de camundongo (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de *buffalo rat* (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); células de tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; linhagem de hepatoma humano (Hep G2); e células de mieloma ou linfoma (tais como células Y0, J558L, P3 e NS0) (vide

Patente US 5.807.715).

As células hospedeiras são transformadas com os vetores de clonagem ou expressão descritos acima para a produção do polipeptídeo de interesse e cultivadas em meios nutrientes convencionais modificados conforme apropriado para a indução de promotores, seleção de transformantes ou amplificando os genes codificadores das seqüências desejadas.

(VIII) CULTURA DAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS

As células hospedeiras utilizadas para a produção do polipeptídeo de interesse de acordo com a presente invenção podem ser cultivadas em uma variedade de meios de cultura. Meios comercialmente disponíveis tais como F10 de Ham (Sigma), Meio Mínimo Essencial (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) e Meio de Eagle Modificado da Dulbecco (DMEM, Sigma) são apropriados para a cultura de células hospedeiras. Além disso, qualquer um dos meios descritos em Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102: 255 (1980), Patentes US 4.767.704, US 4.657.866, US 4.927.762, US 4.560.655 ou US 5.122.469; Documento WO 90/03430; Documento WO 87/00195; ou Patente US 30.985 podem ser utilizados como meio de cultura para as células hospedeiras. Qualquer destes meios pode ser suplementado conforme necessário com hormônios e/ou outros fatores do crescimento (tais como insulina, transferrina ou fator de crescimento epidérmico), sais (tais como cloreto de sódio, cálcio, magnésio e fosfato), tampões (tais como HEPES), nucleotídeos (tais como adenosina e timidina), antibióticos (tais como droga GENTAMYCIN[™]), elementos de traço (definidos como compostos inorgânicos normalmente presentes em concentrações finais na faixa micromolar) e glicose ou uma fonte de energia equivalente. Qualquer outro suplemento necessário pode também ser incluído em concentrações apropriadas conhecidas dos técnicos no assunto. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e similares, são as utilizadas anteriormente com a célula

hospedeira selecionada para expressão e serão evidentes para os técnicos no assunto.

(IX) PURIFICAÇÃO

Quando técnicas recombinantes são utilizadas, o polipeptídeo de interesse pode ser produzido de forma intracelular, no espaço periplásmico ou secretado diretamente no meio. Caso o anticorpo seja produzido de forma intracelular, como primeira etapa, os fragmentos particulados, sejam células hospedeiras ou fragmentos lisados, são removidos, por exemplo, através de centrifugação ou ultrafiltração. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) descrevem um procedimento de isolamento de anticorpos que são secretados para o espaço periplásmico da *E. coli*. Resumidamente, a pasta celular é descongelada na presença de acetato de sódio (pH 3,5), EDTA e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) durante cerca de 30 minutos. Restos celulares podem ser removidos através de centrifugação. Quando o interesse for secretado para o meio sobrenadante desses sistemas de expressão, eles são, primeiramente concentrados em utilizando-se um filtro de concentração de proteínas disponível comercialmente, tal como unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Um inibidor de protease tal como PMSF pode ser incluído em qualquer uma das etapas anteriores para inibir a proteólise e antibióticos podem ser incluídos para evitar o crescimento de eventuais contaminantes.

A composição preparada a partir das células pode ser purificada utilizando-se, por exemplo, cromatografia de hidroxapatita, eletroforese em gel, diálise e cromatografia por afinidade, sendo a cromatografia por afinidade a técnica de purificação preferida. A adequação da proteína A como ligante de afinidade depende da espécie e do isotipo de qualquer região Fc de imunoglobulina que se encontra presente no anticorpo. A Proteína A pode ser utilizada para purificar anticorpos que são baseados em cadeias pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$, ou $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)). A

proteína G é recomendada para todos os isotipos de camundongos e para $\gamma 3$ humano (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5: 1567-1575 (1986)). A matriz à qual o ligante de afinidade é acoplado, freqüentemente é agarose, mas outras matrizes são disponíveis. Matrizes mecanicamente estáveis, tais como vidro de poros controlados ou poli-(estirenodivinil)-benzeno, permitem velocidades de fluxo maiores e tempos de processamento mais curtos do que os que podem ser atingidos com agarose. Quando o anticorpo compreender um domínio C_H3 , a resina Bakerbond ABX[™] (J. T. Baker, Phillipsburg NJ) é útil para purificação. Outras técnicas de purificação de proteínas, tais como fracionamento sobre uma coluna de troca iônica, precipitação em etanol, HPLC de Fase Reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em heparina Sepharose[™], cromatografia em uma resina de troca aniônica ou catiônica (tal como uma coluna de ácido poliaspártico), cromatofocagem, SDS-PAGE e precipitação de sulfato de amônio também são disponíveis, dependendo do anticorpo a ser recuperado.

III. ARTIGOS MANUFATURADOS

Em outro exemplo de realização da presente invenção, é fornecido um artigo manufaturado que contém materiais úteis para a prática das realizações descritas acima. O artigo manufaturado compreende um recipiente e um rótulo. Os recipientes apropriados incluem, por exemplo, garrafas, ampolas, seringas e tubos de ensaio. Os recipientes podem ser formados por uma série de materiais, tais como vidro ou plástico. O recipiente contém uma composição que é eficaz para a observação da apoptose e pode apresentar um orifício de acesso estéril (o recipiente pode ser, por exemplo, uma ampola ou saco de solução intravenosa que contém uma tampa perfurável por agulha de injeção hipodérmica). Os agentes na composição podem incluir um ou mais anticorpos que se liga a um fragmento de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4). O rótulo sobre o recipiente ou associado a ele indica

que a composição é utilizada para a observação da apoptose. O artigo
manufaturado pode compreender adicionalmente um segundo recipiente que
compreende um tampão farmacêuticamente aceitável, tal como uma solução
salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Ele
5 pode incluir ainda outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e de
um usuário, que incluem outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e
bulas com instruções de uso.

Em um desses exemplos de realização, a presente invenção
fornece *kits* que podem ser usados na detecção da apoptose celular e no
10 diagnóstico de doenças a ela relacionadas. Um destes kits inclui: (1) um
anticorpo primário capaz de se ligar a um fragmento de proteína produzido
durante a apoptose, (2) um anticorpo secundário conjugado com um marcador
que produz um sinal detectável, sendo que o anticorpo secundário se liga ao
anticorpo primário, e (3) um reagente produtor de sinal terciário capaz de
15 reconhecer o anticorpo secundário marcado. Outro kit que é útil para a
detecção de fragmentos de proteína gerados nas apoptose de acordo com a
presente invenção inclui (1) um primeiro anticorpo capaz de se ligar ao
fragmentos de proteína gerados durante a apoptose; e (2) um segundo
anticorpo conjugado com um marcador produtor de sinal, sendo o segundo
20 anticorpo também reativo com os fragmentos de proteína gerado na apoptose,
mas que se liga a um sítio diferente daquele ao qual o primeiro anticorpo se
liga.

Em realizações de kits da presente a invenção, o marcador
produtor de sinal ligado ao anticorpo secundário pode ser, por exemplo, uma
25 enzima, tal como a peroxidase ou fosfatase alcalina. Preferencialmente, tanto a
enzima quanto o substrato são fornecidos no kit. O kit pode também incluir um
suporte não revestido sobre o qual a amostra a ser analisada, ou o primeiro
anticorpo, pode ser imobilizado.

IV. UTILIZANDO OS MÉTODOS E MATERIAIS DA INVENÇÃO PARA EXAMINAR OS

PROCESSOS CELULARES ASSOCIADOS À APOPTOSE

Os métodos e materiais da invenção podem ser usados para examinar uma ampla variedade de processos celulares, tal como a endocitose.

5 Certos exemplos de realização da presente invenção observam, por exemplo, as alterações na taxa de endocitose celular como um indicador de apoptose, com uma inibição na endocitose como evidencia de apoptose. A endocitose é fundamental para diversos aspectos da homeostase celular. A endocitose internaliza proteínas-(PM) associadas à membrana plasmática através de

10 vesículas ligadas a membrana, dando suporte a várias funções celulares, incluindo a absorção de nutriente, sinalizando fatores de crescimento e manutenção da homeostase da membrana (vide, por exemplo, Conner, SD et. al., *Nature* 422, 37-44 (2003)). Uma das vias mais bem caracterizadas da endocitose conta com a proteína clatrina (vide, por exemplo, Bonifacino, JS et.

15 al., *Annu. Rev Biochem* 72,395-447 (2003)). Adaptadores de clatrina, como o proteína adaptadora 2 (AP2), liga a clatrina aos determinantes de carga endocítica durante a formação da invaginação da PM conhecida como cavidades revestidas de clatrina. Adaptadores também desempenham funções de “andaimes” na endocitose, pelo recrutamento de acessórios ou proteínas

20 reguladoras (vide, por exemplo, Owen, DJ, et. al, P.R. *Annu Rev Dev Biol Cell* 20:153-91 (2004)). A hidrólise de GTP pela dinamina direciona a cisão dos poços revestidos profundamente invaginados para a liberação das vesículas de transporte endocíticas da PM. Após perderem o seu revestimento de clatrina, as vesículas se fixam e se fundem com endossomas primários, quando a carga

25 é distribuída a diferentes destinos, por exemplo, membranas túbulo-vesicular endossomal para recompor a PM, ou membranas internas dos endossomas multivesiculares de degradação lisossomal.

Utilizando os materiais é métodos da presente invenção

demonstra-se que receptores de morte pró-apoptóticos (DRs) ativam a destruição seletiva da maquinaria da endocitose dependente de clatrina. A estimulação de DR induz rapidamente, a clivagem mediada pela caspase dos componentes chaves da via da clatrina, parando a captação celular da proteína de transporte clássica transferrina. O iniciador da caspase proximal DR cliva a subunidade do adaptador AP2 α da clatrina entre os diferentes domínios funcionais, enquanto as caspases efetoras processam as cadeias pesadas de clatrina. É demonstrado que DR5 sofre endocitose mediada por clatrina dependente de ligante, dando provas de que a interiorização do complexo de sinalização DR-clatrina facilita a transferência da via da clatrina pelas caspases. Um bloqueador de endocitose, o gene *dinamina-1* sensível à temperatura mutantes atenuados leva a interiorização de DR, amplificando a estimulação das caspases à jusante de DR e aumentando a apoptose. Assim, a atividade da caspase ativada por DR desorganiza a endocitose dependente de clatrina, levando a amplificação da morte celular programada.

Aplicações ilustrativas adicionais dos métodos e materiais da invenção são descritas a seguir.

A ATIVAÇÃO DE DR INDUZ A CLIVAGEM DA MAQUINARIA ENDOCÍTICA DEPENDENTE DE CLATRINA MEDIADA PELA CASPASE

Nos estudos sobre DR5 na endocitose, observou-se que o ligante de DR5 Apo2L/TRAIL desencadeada uma clivagem proteolítica da subunidade da AP2 (AP2 α). A análise de várias linhagens celulares de câncer mostrou que Apo2L/TRAIL promove não só a esperada transformação da caspase-8 e caspase-3, mas também cliva a AP2 α , AP1/2 β e a cadeia pesada de clatrina (CHC) (Fig. 1a). Estes eventos ocorreram no intervalo de 2 horas, e foram restritos às linhagens de células sensíveis à apoptose induzida pela Apo2L/TRAIL, tais como Colo205, BJAB, e HeLa-M, em comparação com linhagens de células resistentes, como a HCT8 (Fig. 1a). Outras linhagens

celulares confirmaram esta observação (Fig. 7a). A clivagem da AP2A estimulada pelo FasL e CHC em células BJAB comparada à Apo2L/TRAIL (Fig. 7b). A Apo2L/TRAIL também induziu a clivagem da dinamina, levando a depleção da proteína de comprimento total que iniciou em 1 hora de estimulação (Fig. 7c). Em um intervalo de tempo semelhante, a Apo2L/TRAIL não induziu a proteólise de adaptadores estruturalmente análogos que medeiam outros tipos de eventos de transporte vesicular dependentes de clatrina (Fig. 1b). Estes incluíram AP1 α , AP3 β e γ , e AP4 ϵ , que dão suporte ao transporte entre as redes de transporte entre o complexo de Golgi e os endossomas, e as subunidades COP-I, β -COP ou a COP-II subunidade Sec23, que medeiam o transporte entre retículo endoplasmático e aparelho de Golgi (vide, por exemplo, Bonifacino, JS et. al., *Ann Rev Biochem* 72:395-447 (2003) e McMahon, HT et. al., *Curr Opin Cell Biol* 16:379-91 (2004)). Portanto, a ativação de DR promove a clivagem rápida e específica de proteínas envolvidas na endocitose dependente de clatrina.

O pré-tratamento com o inibidor da pancaspase N-benziloxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona (zVAD-fmk), na dose que inibiu o processamento da caspase-8 e caspase-3 induzida pelo ligante e impediu a clivagem de AP2 α e CHC (Fig. 2a), bem como da AP2 α em células BJAB (Fig. 8a), indicando uma condição para a atividade da caspase. Além disso, embora Apo2L/TRAIL e FasL induziram a clivagem da AP2 α e CHC em células T Jurkat wt, nenhum dos dois ligantes estimulou o processamento desses alvos nas linhagens de células Jurkat mutantes deficientes de caspase-8 ou deficientes de FADD (Fig. 8b). a clivagem de AP2 α foi rápida e se correlacionou com um tempo de processamento da caspase-8 enquanto que esta precede o processamento da caspase-3 (Fig. 1a). Em contrapartida, a clivagem de CHC foi relativamente mais lenta e se correlacionou melhor com o tempo de processamento da caspase-3. Nas células HCT116, a ativação da caspase-3 e

a indução da apoptose pela Apo2L/TRAIL necessitou de *Bax*, enquanto a estimulação da caspase-8 não (vide, por exemplo, LeBlanc, HN et. al., *Cell Death Differ* 10:66-75 (2003). Como esperado, o estímulo com Apo2L/TRAIL processou ambas as caspase-8 e -3 nas células 'HCT116 *Bax*^{+/-}', mas apenas a caspase-8 nas células HCT116 *Bax*^{-/-} (Fig. 2b, c). A clivagem de AP2α foi independente de Bax, enquanto que a clivagem de CHC exigiu Bax (Fig. 2b, c). Em células MCF7, que são deficientes de caspase-3, a Apo2L/TRAIL induziu um processamento da caspase-8 e AP2α relativamente fraco e lento, mas não estimulou a clivagem de CHC (Fig. 2d) (vide, por exemplo, Kischkel, FC et al., *Immunity* 12, 611-20 (2000)). Além disso, o bloqueio “knockdown” da caspase-3 com siRNA nas células HT1080 bloqueou o processamento da CHC induzida por ligante mas não bloqueou o processamento da AP2α (Fig. 8c). Estes resultados fornecem evidências de que o iniciador das caspases na via do DR cliva a AP2α, enquanto as caspases efetoras processam CHC.

AP2α contém duas grandes partes funcionais, ligadas por uma região de "articulação": o domínio C-terminal “orelha” e domínio N-terminal “tronco” (vide, por exemplo, Owen, DJ, et. al, *Annu Rev Dev Biol Cell* 20:153-91 (2004)). Para definir o sítio primário da clivagem da AP2α, o produto da clivagem de 33 kDa do C-terminal foi imunopurificado de células BJAB e a identidade de seus peptídeos trípticos foram confirmados por espectrometria de massa (Fig. 9a). O seqüenciamento do N-terminal revelou GPAAQPSLGPTPEEAFLS, uma seqüência imediatamente à montante de DVFD (Fig. 9a), uma seqüência tetrapeptídica que se assemelha ao sítio de reconhecimento da caspase bem caracterizado (vide, por exemplo, Stennicke, HR, et. al, *Biochem J* 350 Pt 2, 563 -8 (2000)). O sítio de clivagem possui Asp e Gly nas respectivas posições P1 e P1' flanqueando as ligações cindíveis, e uma Asp na posição P4, que é em tolerada pela caspase-8 (vide, por exemplo, Blanchard, H. et al. *J Mol Biol* 302: 9-16 (2000)). Enquanto esta seqüência do

sítio de clivagem tetrapeptídica está presente na isoforma A do AP2 α , ela está ausente na isoforma C.

Coerente com esta diferença, a Apo2L/TRAIL não induziu a clivagem da isoforma C, que estava muito menos abundante do que a isoforma A, nas células BJAB, Colo205, LS1034 e SW948. Essa sítio de clivagem AP2 α esta presente na região articulada (Fig. 9b), fornecendo evidencias de que a sua hidrólise pode perturbar a função de AP2. Em certas linhagens de células a estimulação pelo ligante por um período maior de tempo, levaram ao processamento adicional da AP2 α em um sítio secundário, que parece estar presente nos fragmentos iniciais de 33 kDa (Fig. 7a e b).

Para avaliar as conseqüências funcionais destes eventos de clivagem mediados pela caspase, a captação da transferrina (Tf) foi estudada. A internalização da Tf acoplada ao receptor ocorre através de vesículas revestidas de clatrina e exige estritamente a AP2 (vide, por exemplo, Bonifacino, JS et. al., *Annu Rev Biochem* 72:395-447 (2003)). Para determinar a taxa de endocitose de Tf marcadas com fluorescentes, as medições foram restritas a fase inicial da captação linear, antes da internalização da proteína sofre reciclagem endocítica para a PM (Fig. 3a, encarte). A Apo2L/TRAIL inibiu a taxa de endocitose da Tf em células BJAB e Colo205 em cerca de 75%-85% (Fig. 3a, b); o tratamento prévio com zVAD-fmk inverteu substancialmente essa inibição (Fig. 3c). Portanto, a ativação do DR leva à interrupção da endocitose mediada pela clatrina dependente de caspase.

A APO2L/TRAIL INDUZ A ENDOCITOSE DE DR5 MEDIADA PELA CLATRINA

A clivagem rápida e seletiva dos componentes da via da clatrina forneceu provas de que a proximidade física dos DRs com as proteínas de revestimento clatrina poderiam facilitar eventos proteolíticos. Desta forma, pergunto-se, se o DR sofre estímulo mediante um ligante da endocitose mediada pela clatrina. Um anticorpo monoclonal (Mab 5C7) que reconhece o

domínio extracelular do receptor sem competição pela ligação com o ligante foi utilizado (vide, por exemplo, Kischkel, FC *et al.*, *Immunity* 12:611-20 (2000)). Incubação com quantidades saturadas de 5C7 a 37°C não afetou os níveis de DR5 na superfície, conforme detectado por outro, Mab que não se sobrepõe ao primeiro, verificando que o 5C7 por si não altera a endocitose de DR5. Foi preparado um conjugado fluorescente de MAb 5C7 (5C7⁶⁴⁷), vinculada a células Colo205 a 0 °C, e sem seguida foi mensurada a cinética da endocitose de DR5 a 37 °C (Fig. 4a). A exposição da Apo2L/TRAIL a formas triméricas ou multiméricas (anticorpo-reticulado) acelerou de forma similar a taxa de endocitose de DR5 em cerca de 2 vezes (Fig. 4a), levando a internalização de ~ 1/3 do receptor durante 2h, principalmente nos 30 min iniciais (Fig. 4b). De modo correspondente, o DR5 na superfície da célula diminuiu durante os primeiros 30 minutos de estimulação, após o qual este *pool* de DR5 se estabilizou (Fig. 4c). Resultados semelhantes foram observados nas células BJAB. Em contraste com os dados obtidos após a breve exposição ao ligante, a 37 °C (Fig. 4a), a exposição estendida por 2 hrs inibiu a endocitose de DR5 concomitantemente com o da Tf, reduzindo a taxa de endocitose em 2,5 ou 5 vezes respectivamente (Fig. 4d). Estes resultados fornecem evidências de que o a via da clatrina auxilia a endocitose de DR5. Além disso, em células Colo205 brevemente tratadas com Apo2L/TRAIL, foi localizada uma pequena fração da 5C7 da superfície celular nas vesículas revestidas de clatrina por microscopia eletrônica (EM), que não foi detectável na superfície de invaginações e cavéolas não-revestidas (Fig. 4f, h).

Em seguida, foi utilizada uma estratégia de intervenção estabelecida, que se baseou na expressão de uma dinamina-1 GTPase sensível a temperatura regulada pela doxíciclina (dyn^{G273D}) em células infectadas com retrovírus. Este mutante inibiu rápida e reversivelmente a endocitose dependente da clatrina após a mudança de uma temperatura

permissiva (30 °C) para uma temperatura não permissiva (38 °C) (vide, por exemplo, Damke, H., *et al.*, *J Cell Biol* 131:69-80 (1995)). As primeiras experiências em células HeLa-M confirmaram que a indução por doxíciclina interrompe a captação da Tf a 38 °C em células expressando dyn^{G273D}, mas não na células próximas que não expressam nem mesmo a 30 °C (Fig. 5a-d, e fig. 10a) . Enquanto a expressão induzível de dyn^{G273D} nas células HeLa-M ou Colo205 não foram suficientemente estáveis, esta expressão manteve-se estável na linhagem de células BJAB transfectadas, com um forte bloqueio na captação da Tf a 38 °C (Fig. 5e). A expressão de dyn^{G273D} estimulada pela doxíciclina também diminuiu a captação de DR5 induzida por ligante em ~25% a 30 °C e ~10% a 38 °C. Em contrapartida, a endocitose foi semelhante em ambas as temperaturas na ausência de doxíciclina (Fig. 5f). Nas células HeLa-M a indução de dyn^{G273D} seguida de modificação da temperatura para 38 °C também atenuou a captação de DR5 induzida por ligante; este efeito foi mais fraco do que nas células BJAB, provavelmente devido à diminuição da expressão de dyn^{G273D} (Fig. 10b). Para excluir a possibilidade pouco provável de que a diminuição da captação do DR5 nestes experimentos de captação de 20 min foi atribuída ao aumento da reciclagem endocítica, em vez de redução na taxa de endocitose melhor mensurada durante um intervalo de 4 min de captação, foi utilizado um mutante de *dinamina* dominante-negativo (*dinamina*^{K44A}) que interrompe incondicionalmente a endocitose dependente da clatrina (vide, por exemplo, Damke, H., *et al.*, *J Cell Biol* 127:915-34 (1994)). A *dinamina*^{K44A} inibiu tanto a endocitose de Tf e quanto a de DR5 induzida em células HeLa-M (Fig. 10c).

Juntamente com os dados da EM, estes resultados indicam que a captação de DR5 induzida pela Apo2L/TRAIL ocorre principalmente através da endocitose dependente de clatrina. Portanto, a proximidade física do DISC nos componentes das vesículas revestidas de clatrina pode facilitar as sua

clivagem. Se verdadeiro, a montagem do DISC e a ativação de iniciadores da caspase não necessitariam da atual internalização das vesículas revestidas. Para testar esta hipótese, células BJAB foram mantidas em gelo para bloquear a endocitose de Tf (Fig. 11a). Apesar do bloqueio, a Apo2L/TRAIL e FasL e
 5 ainda recrutaram FADD e caspase-8 para seus respectivos receptores e processou a caspase-8 (Fig. 11b). Além disso, Apo2L/TRAIL induziu a formação comparável de DISC, processamento da caspase-8, e atividade da caspase-8 no DISC a 38 °C, apesar da inibição da endocitose por dyn^{G273D} (Fig. 11e e d).

10 INIBIÇÃO DA ENDOCITOSE MEDIADA PELA CLATRINA AUMENTA A ATIVAÇÃO DA CASPASE INDUZIDA POR DR E APOPTOSE

A rápida clivagem das proteínas da via da clatrina fornece evidências de que a interrupção da endocitose pode promover a ativação da caspase induzida por ligantes e a apoptose. De fato, o bloqueio da endocitose
 15 mediada pela dyn^{G273D} aumentou evidentemente o processamento induzido por ligante do *pool* celular total de caspase-8, Bid, AP2α e caspases-3 e -7 efectoras do lisado de toda a célula (Fig. 6a), sem alterar significativamente formação ou ativação do DISC (Fig. 11e e d). A análise quantitativa mostrou um aumento substancial na atividade enzimática das caspase-3/7 estimulada por ligante
 20 após a indução com dyn^{G273D} e da mudanças de temperatura para 38 °C em comparação com a temperatura de 30 °C (Fig. 6b). Além disso, esta condição também resultou no aumento da apoptose (Fig. 6c), um efeito observado após o estímulo com seu ligante tipo-selvagem ou uma variante seletiva de DR5 (vide, por exemplo, Kelley, RF *et al.*, *J Biol Chem* 280:2205-12 (2005)).
 25 Sensibilização foi evidente não só pelo desvio a esquerda da curva de dose-resposta, mas também pelas porcentagens maximizadas de células com DNA fragmentado (Fig. 6c). Estes resultados indicam que o bloqueio da endocitose dependente de clatrina amplifica a ativação da caspase à jusante de DISC,

levando a uma maior estimulação da apoptose.

Conforme descrito acima, usando métodos e materiais da presente invenção, foi descoberta uma interação inesperada entre a via extrínseca da apoptose e a maquinaria endocítica dependente de clatrina. Em minutos de ação de DR pró-apoptótico, caspases ativadas começam a clivar proteínas que medeiam a endocitose dependente de clatrina. A cinética relativamente rápida da clivagem de AP2 α , o recrutamento de FADD e caspase-8 para este evento e a independência de Bax e caspase-3 fornecem evidências de que caspases proximais a DR, mais provavelmente caspase-8 e/ou caspase-10, realizam o processamento inicial da AP2 α . De fato, o sítio de clivagem da caspase na articulação da AP2 α se encaixa com seqüências que caspase-8 é capaz de reconhecer (vide, por exemplo, Nicholson, DW, *Cell Death Differ* 6:1028-42 (1999)).

A inibição da endocitose dependente de clatrina pela ativação de DR ocorreu no período de tempo que a estimulação da caspase e foi revertida pelo zVAD-fmk, demonstrando a sua dependência com a atividade da caspase. Foi mapeado o sítio de processamento primário da AP2 α para a região de articulação. A articulação se liga ao domínio “orelha”, que auxilia o recrutamento da proteína acessória, para o domínio “tronco”, que medeia a associação da PM e carga de ligação em conjunto com outras subunidades AP2 (vide, por exemplo, Owen, DJ, et. al, *Annu Rev Cell Biol Dev* 20:153-91 (2004)). A superexpressão do domínio “orelha” da AP2 α nas células COS7 inibe endocitose dependente de clatrina, um efeito abolido por mutações que impedem a ligação de proteínas acessórias (vide, por exemplo, Owen, DJ et al., *Cell* 97:805-15 (1999)). De modo contrário, em estudos com *Drosophila* nos quais algumas células expressam somente que AP2 α sem o domínio “orelha” fornecer evidências que o domínio “orelha” não é necessário em geral para a endocitose (vide, por exemplo, Berdnik, D., et al., *Dev Cell* 3, 221-31 (2002)) .

Desta forma, não está claro se apenas a clivagem da AP2 α pela caspase é suficiente para bloquear a endocitose, ou se o processamento de outros componentes da via da clatrina também contribui com este bloqueio. Independentemente, a ativação da caspase mediada por DR interrompe rapidamente a endocitose dependente de clatrina.

Considerando que caspases ativadas acessam substratos revestidos de clatrina, os dados fornecem evidências que a estimulação com Apo2L/TRAIL, movimenta uma porção substancial de DR5 da superfície para dentro da célula através da endocitose dependente de clatrina. Estudos preliminares com microscopia eletrônica (EM) confirmam que DR5 está associado a vesículas revestidas de clatrina. Trabalhos recentes indicam que o bloqueio “*knockdown*” mediado com RNAi inibi a sinalização apoptótica da clatrina e AP2 através de Fas, a interpretação deste resultado revela que a endocitose requer um receptor de sinalização (vide, por exemplo, Lee, KH *et al.*, *EMBO J* 25:1009-23 (2006)). Em consideração as observações de que a montagem, ativação e apoptose pela Apo2L/TRAIL DISC, pode ainda ocorrer quando a endocitose é inibida pela incubação no gelo ou através da inativação da dinamina, sumariza-se que DR5 pode se ligar a FADD e caspase-8, enquanto permanece na superfície da célula, possivelmente dentro das vesículas revestida de clatrina. Com Isso, o bloqueio da endocitose pela incubação no gelo coma dinamina sensível a temperatura não interfere com a formação de vesículas revestidas e com o recrutamento da carga (vide, por exemplo, Damke, H., *et al.*, *J Cell Biol* 131:69-80 (1995)). A ativação de DR causou a destruição quase completa da AP2 α . Em contrapartida, o processamento da CHC e API/2 β envolveu apenas uma fração das proteínas totais da célula, possivelmente a fração que participou diretamente na endocitose de DR. Assim, a ativação da caspase próxima da internalização de DISC associado ao DR pode levar à destruição local dos componentes

específicos da via da clatrina.

Uma dedução direta da constatação de que a caspase interrompe a endocitose mediada pela clatrina é que a eliminação deste mecanismo pode representar uma parte não reconhecida anteriormente do programa apoptótico; uma célula que esta sofrendo apoptose já não precisa captar nutrientes, responder a fatores de crescimento, ou manter a homeostase da membrana. Porém é pouco provável que essas clivagens por si só ativem a apoptose, enquanto ambas, clatrina e AP2 foram interrompidas “*knocked down*” eficientemente usando siRNAs por uma variedade de laboratórios diferentes, se nenhum deles relatarem um aumento na apoptose. Notavelmente, drogas citotóxicas que causam danos ao DNA, vinblastina e adriamicina induziram também a clivagem de componentes da maquinaria da clatrina, embora com uma cinética muito mais lenta do que os ligantes de DR (Fig. 12). Por outro lado, o processamento de adaptadores de clatrininas mediada por caspases podem desempenhar um papel importante também na modulação de células não apoptóticas: Nas células dendríticas imaturas, a atividade basal da caspase leva a clivagem de várias subunidades da adaptina, enquanto a inibição deste efeito com zVAD promove a maturação da célula dendrítica (vide, por exemplo, Santambrogio, L. *et al.*, *Nat Immunol* 6:1020-8 (2005)).

Uma segunda dedução, talvez mais surpreendente, da interação entre os DRs e a maquinaria endocítica da clatrina é que essa interação proporciona um ciclo de *feedback* positivo que reforça a ativação da caspase através da via extrínseca. De acordo com este modelo, a endocitose dos DRs ativados se opõe a sinalização apoptótica para preservar a sobrevivência das células se a maquinaria da clatrina permanece intacta, por exemplo, em resposta aos níveis sub-limiar de ligante. Entretanto, se a estimulação de DR gera uma estimulação suficiente na atividade da caspase para perturbar a endocitose, então o sinal persiste, ampliando ainda mais a ativação da caspase

e promovendo a apoptose. É concebível, que a endocitose de DR poderia opor-se a sinalização de DR através da degradação lisossomal, alguma outra forma de terminação de sinal, ou a indução de sinais anti-apoptóticos concorrentes. A endocitose não regula a ativação da caspase durante a associação inicial de DISC. No entanto, a inativação da dinamina melhora o processamento da caspase-8 total da célula, e progressivamente, da caspase-3 e -7, levando a uma maior ativação da apoptose, fornecendo evidências de que a endocitose regula adicionalmente a ativação da caspase à jusante do DISC inicial.

Em resumo, uma relação bidirecional entre a apoptose induzida por DR e a endocitose dependente de clatrina é divulgada no presente: A ativação de DR mediada pela caspase leva a destruição de importantes componentes da maquinaria endocítica da clatrina, parando assim este processo. O interrompimento da endocitose dependente de clatrina aumenta a ativação da caspase à jusante dos DRs e aumenta a apoptose, dando provas de um circuito de *feedback* positivo que amplifica a ativação da caspase e a execução da apoptose.

Os exemplos a seguir são oferecidos como forma de ilustração e não como forma de limitação. As descrições de todas as citações no relatório descritivo são expressamente incorporadas ao presente como referência

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

MATERIAIS E MÉTODOS ILUSTRATIVOS

Identificação do sítio de clivagem da caspase na AP2 α

Células BJAB (5×10^8) foram estimuladas com Apo2L/TRAIL por 30 min, e, em seguida, lisadas, imunoprecipitadas utilizando anti- C-terminal de AP2 α específico (AP6, # MA1-064 da ABR) e coletadas em agarose proteína A/G (Pierce). O fragmento C-terminal foi separado por SDS-PAGE e eluído para clivagem triptica e posterior análise por cromatografia líquida-

espectrometria de massas por ionização por electrospray ou separado em um IP, transferidos para uma membrana PVD para o seqüenciamento N-terminal.

Endocitose, captação e ensaio de infra-regulação da superfície celular

5 Para medições de rotina de Tf, 10^6 células suspensas foram pré-tratadas pelo tempo indicado a 37 °C, com 1-10 µg/ml de Apo2L/TRAIL. Em alguns estudos, as células foram pré-tratadas com DMSO 0,25% ± 50 mM de zVADfmk por 30 min a 37 °C antes de ser acrescentado a Apo2L/TRAIL. Após o estímulo com Apo2L/TRAIL, as células foram mantidas por 30 min no gelo
10 com 5 µg/ml de Tf fluorescente no meio de ligação (DME livre de soro, 3% BSA, Hepes 20 mM, pH 7,2), a temperatura é modificada para 37 °C por 0-5 min, conforme indicado, em seguida, refrigerado rapidamente em gelo para bloquear a endocitose. As células sedimentadas foram resuspensas em 2% de paraformaldeído/PBS gelado e a intensidade média da fluorescência de 10.000
15 células foi quantificada com um citômetro de fluxo *Coulter Epics Elite-ESP* (Hialeah, FL). A taxa de endocitose foi determinada a partir da curva linear da constante de equilíbrio dos valores interno/superfície (vide, por exemplo, Wiley, HS et. al, *J Biol Chem* 257, 4222-9 (1982)). Para os experimentos de mudança de temperatura, incubações de ligação no gelo foram evitadas. Em vez disso,
20 as células foram condicionas por 20 min e mantidos a 30 °C ou 38 °C no meio de ligação, incubando um controle adicional 0 (controle) ou 20 min com Tf⁶⁴⁷, refrigeradas em gelo durante 30 min, e analisado por citometria de fluxo para determinar a relação interna/superfície de Tf⁶⁴⁷.

Para medições de DR5, as células foram saturadas com 5 µg/ml
25 de 5C7⁶⁴⁷ em meio de ligação no gelo, lavados por 3 vezes com médio de ligação gelado, e em seguida, incubadas por 30 min em gelo com ou sem 10 µg/ml de Apo2L/TRAIL. A temperatura das células foi então modificada para 37 °C durante o tempo indicado, e rapidamente refrigeradas, e foi realizada ou não

a remoção com ácido por três vezes com uréia 2M fria, glicina 50 mM, NaCl 150 mM, pH 2,4. As células foram analisadas por citometria de fluxo e a internalização foi calculada de forma semelhante ao método descrito anteriormente com a equação: % de captação = $100 \times [(S_t - S_0)/(N - S_0)]$, onde S_t e S_0 são os valores das amostras com remoção por ácido, incubadas pelo tempo = t e tempo = 0, respectivamente, e N é a fluorescência não removida, que se manteve praticamente inalterada durante o tempo de incubação a 37 °C (vide, por exemplo, Austin, C.D. *et al.*, *Mol Biol Cell* 15, 5268 -- 82 (2004)).

Para mudança de temperatura, as células foram condiciona por 20 min e mantidos a 30 °C ou 38 °C, pré-equilibradas com 5 µg/ml 5C7⁶⁴⁷ por 3 min, tratadas com 10 µg/ml de Apo2L/TRAIL por 0 (controle) ou 20 min, em seguida, refrigeradas em gelo por 30 minutos. A fluorescência nas células foi submetida ou à remoção por ácido e quantificada por citometria de fluxo.

Para o ensaio de infra-modulação de DR5 na superfície, uma suspensão de células foi pré-equilibrada a 37 °C por 30 min com 5C7 não marcado para ligar a superfície e reciclagem do pool de DR5, tratadas pelo tempo indicado, com ou sem 10 µg/ml de Apo2L/TRAIL, e refrigerada sobre o gelo. A 5C7 da superfície foi sondada com CY5 anti-IgG de camundongo e quantificado por citometria de fluxo. Esta técnica foi utilizada para evitar a redução na eficiência de sondagem na superfície atribuída ao agrupamento de receptores induzido pela Apo2L/TRAIL, como pode ser visto mediante sondagem direta com 5C7⁶⁴⁷.

Ensaio da atividade da caspase

O ensaio para caspase-3/ -7 foi realizado utilizando o kit *Apo-One Homogenous Caspase-3/7 Assay* (Promega). As células foram coletadas, contadas, aliquotadas em número igual para cada tratamento e tratados com doses de Apo2L/TRAIL variando em até 4 horas a 30 °C ou 38 °C e, em seguida, lisadas no reagente do kit "*Homogeneous Caspase-3/7 Reagent*" (que

contém o substrato das caspase-3 / -7 Z-DEVD-R110). Os lisados foram incubadas a temperatura ambiente durante 1 hora antes da leitura em um fluorímetro a 485/530 nm.

Ensaio de Apoptose

As células foram coradas com iodeto de propídio após a fixação com etanol e tratamento com RNase e uma quantidade de DNA sub-diplóide foi analisada por citometria de fluxo como descrito anteriormente, utilizando o software Expo32 com um citômetro Epics XL.MCL (Beckman Coulter), (vide, por exemplo, Nicholson , DW, *Cell Death Differ* 6:1028-42 (1999)).

Imunoprecipitação de DISC

Células BJAB (1×10^7 por ponto de tempo) foram tratadas com Flag-Apo2L/TRAIL reticulada por anticorpos anti-FLAG M2, coletadas, lisadas e imunoprecipitadas e então o DISC foi analisado como descrito (vide, por exemplo, Kischkel, FC *et al* ., *Immunity* 12:611-20 (2000)).

Linhagens celulares e reagentes.

Células Colo205 de adenocarcinoma colorretal humano, células B humanas BJAB de linfoma e células Jurkat T humanas de carcinoma do tipo selvagem (clone A3), deficientes de FADD (E1) e deficientes de caspase-8 (19.3) foram cultivadas em meio RPMI 1640 + 10% de fetal soro bovino (FBS) + 2 mM de glutamina + 1000 U/ml de penicilina-estreptomicina (Life Technologies). Células de carcinoma cervical humano HeLa-M e de adenocarcinoma de mama humano MCF7 e adenocarcinoma colorretal HCT15, HCT8, SW948, Colo320, de fibrossarcoma humano HT180 (ATCC), HCT116 Bax (-/-), HCT116 Bax (+/-) foram cultivadas em meio 50: 50 de Meio Eagle Modificado da Dulbecco e F12 + 10% FBS + 1000 U/ml de penicilina-estreptomicina. Clones de cDNA que codifica dinamina sensível a temperatura foram as dinaminas-1 mutantes G273D e a dominante negativa K44A (Dyn^{G273D} e Dyn^{K44A}, respectivamente). A Dyn^{G273D} foi expressa a partir do

pHUSH-Proex, um plasmídeo único retroviral com sistema de expressão induzível por tetraciclina construído na Genentech. O cDNA foi clonado em um primeiro plasmídeo de transferência “*shuttle*” contendo uma sequência amplificadora-promotora CMV com duas cópias do operador *Tet02* da tetraciclina, então transfectado via recombinação *in vitro* baseado em fago lamda, ou tecnologia *Gateway* (Invitrogen, Carlsbad), um vetor baseado no vírus da leucemia murina de Moloney no qual o repressor de *Tet* do tipo selvagem é acionado separadamente por um promotor P-actina e seguido por uma sequência de entrada interna ribossomal e cassete da seleção de puromicina. Dyn^{K44A} foi expressa do sistema de expressão retroviral induzível por tetraciclina partir de 2 vetores, pRevTet-On/pRev-Tre (Clontech), utilizando infecções seriais. Os vetores retrovirais foram transfectados em células acondicionadoras do vírus de leucemia murina amfotrópico Phoenix utilizando Lipofectamina 2000 (Stratagene). As partículas retrovirais foram coletadas e utilizadas nas células HeLa-M e BJAB, como descrito anteriormente (Simpson *et al. J Cell Biol* 137:835-45, 1997). Células tranfectadas com Dyn^{G273D} foram selecionados com puromicina (2-3 µg/ml) por 1-2 semanas e clonada, tanto pela coleta manual das colônias individuais de HeLa M quanto por triagem por FACS das células BJAB resistentes (controlado pela exclusão de iodeto de propídio) e uma única semeadura de células em placas de 96-poços utilizando um EPICS ELITE-ESP equipado com um dispositivo Autoclone (Coulter, Hialeah, FL). Os clones celulares foram selecionados para a uniformidade da expressão da dinamina-1 induzível pela doxíciclina por microscopia de imunofluorescência. As células transfectadas com Dyn^{K44A} foram selecionadas por 1-2 semanas com higromocina B (400 ng/ml) e G418 (1 mg/ml). A indução com doxíciclina (1 µg/ml) foi realizada a 32 °C durante 72 horas como descrito anteriormente (Damke *et al. J Cell Biol* 131, 69-80 1995). Vincristina sulfato (# T-117), Adriamycin.HCL (GR-319) foram comprados da Biomol, tetraciclina

isenta de FBS da Hyclone, Puromicina da Clontech e Doxíciclina da Sigma. zVAD-fmk (ASN-benziloxicarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona) foi obtido pela MD Biosciences (# FK-009).

Proteínas recombinantes, anticorpos e marcadores fluorescentes

5 Apo2L/TRAIL humana solúvel recombinante nas versões não-marcada ou marcada com Flag e FasL foram preparadas conforme descrito (Sharp *et al. J Biol Chem* 280, 19401-409, 2005). Para a análise por *imunoblot* foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-Caspase-8 (1C12, #9746) e anti-Caspase-7 (C7, # 9494) da *Cell Signaling*, anti-Caspase-8 (5F7, #IM3148) da
10 *Immunotech*, anti-FADD (# 610399), anti-AP2 α . (# 610501), anti-AP1/2 α (610381) anti-AP1 γ (# 610385), anti-AP3 δ (#611328), anti-CHC (# 610499), anti - AP4 ϵ (# 612018), anti-Bid (# 550365) e anti-dinamina 1/2 (# 610245) da *Transduction BD*, a anticorpo anti-Caspase-3 (SA-320) da *Biomol*, anti-Caspase 9 (AB2, #AM47) da *Oncogene*, anti-receptor Tf (# 13-6800) da *Zymed*,
15 anti- β cop (M3A5, # G2279) da *Sigma*, o anti-Sec23 (# GTX22913) de *Gentex*, anticorpo monoclonais anti-DR5 (3H3 e 5C7) foram produzidos na Genentech, Inc., e anti-AP3 β como descrito anteriormente (vide , por exemplo, Simpson *et al., J Cell Biol.* Volume 137, No. 4, págs 835-845 (1997)). Como reagentes secundários os seguintes anticorpos conjugados com peroxidase de rábano
20 silvestre (HRP) foram utilizados: anti- IgG1 de camundongo (# 559626) a partir da *BD Bioscience*; e anti-IgG2b de camundongo (# 190-05) da *Southern Biotechnology Associates*, anti-IgG de coelho (# 711-035-152) da *Jackson ImmunoResearch*. Para os experimentos de imunoprecipitação foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-Flag (M2, Sigma) e anti-AP2 α (AC1-M11, # MA3-
25 061) ou (AP6, # Mal-064) da *ABR*. Para a citometria de fluxo, microscopia de imunofluorescência, Tf⁴⁸⁸ (T-13342), Tf⁶⁴⁷ (T-23366), anti- IgG⁵⁹⁴ de coelho (# A-11037), e anti-IgG⁵⁹⁴ de cabra (# A-11058) da *Molecular Probes*. Fragmento anti-IgG de camundongo (# 115-177-003) da *Jackson ImmunoResearch*, anti-

dinamina-1 (# sc-6402) da *Santa Cruz Biotechnology* e anticorpo policlonal anti-Alexa 647 de coelho produzido pela Genentech, Inc. utilizando albumina de soro bovina conjugada com Alexa 647 (*Molecular Probes, Inc.*) como antígeno purificado por afinidade em uma coluna Sepharose Alexa-647 criada para reação (CNBr)- cadaverina Sepharose ativada com Alexa Fluor 647 (*Molecular Probes, Inc.*). Alexa-647 foi conjugada com mAb 5C7 (6475C7) pela reação com Alexa-647 succinimidil éster (*Molecular Probes, Inc.*), seguindo as instruções do fabricante.

Microscopia de imunofluorescência

Para imagens de células que captaram 5C7⁶⁴⁷, estas foram incubadas a 37 °C com 5C7⁶⁴⁷ e reticuladas com Apo2L/TRAIL pelo tempo indicado. As células sensíveis a temperatura para experimentos foram pré-tratadas em meio de ligação por 20 min. a 30 °C vs 38 °C, em seguida, adicionados Tf⁴⁸⁸ e incubado continuamente com a respectiva temperatura pelo tempo indicado. As células foram então fixadas por 20 min com 3% paraformaldeído, 0,4% de permeabilizador saponina, e marcado com anti-IgG de coelho Alexa-647 seguido de anti-IgG⁵⁹⁴ de coelho (captação de 5C7⁶⁴⁷) ou com anticorpo anti-dinamina-1 seguido por anti-IgG⁵⁹⁴ de cabra (experimentos com células sensíveis a temperatura). As imagens foram adquiridas utilizando um microscópio (Axiovert 200; Carl Zeiss Microimaging, Inc.) equipado com uma objetiva *Plan-Apochromat 1.4 NA 63x*, uma câmera CCD (AxioCam; Microimaging Carl Zeiss, Inc.), e um filtro de passagem Quad set (Chroma Technology Corp), todos controlados pelo *software* AxioVison 3.1 (Carl Zeiss Microimaging, Inc.)

Microscopia imunoeletrônica

Células Colo205 suspensas foram incubadas por 30 min em gelo com 10 µg/ml 5C7 em meio de ligação, lavadas, incubadas em gelo por 30 minutos com 10 mg/ml de Apo2L/TRAIL em meio de ligação, e então a

temperatura foi modificada para 37 °C por 5 min e fixadas em paraformaldeído 0.2%/glutaraldeído 2% e processado como descrito anteriormente (Austin *et al. Mol Biol Cell* 15:5268-82, 2004) para imuno-marcação com ouro de criocortes ultrafinos com anticorpo coelho anti-IgG de camundongo (Dako, Glostrup, Dinamarca).

O relatório descritivo acima é considerado suficiente para permitir que os técnicos no assunto pratiquem a presente invenção. A presente invenção não deve ter seu escopo limitado pelo exemplo apresentado no presente. Na realidade, várias modificações da presente invenção, além das exibidas e descritas no presente, tornar-se-ão evidentes para os técnicos no assunto a partir do relatório descritivo acima e se encontrarão dentro do escopo das reivindicações anexas.

TABELAS

TABELA 1

POLYPEPTÍDEOS EXEMPLARES ÚTEIS NA PRÁTICA DA PRESENTE INVENÇÃO

AP2α (SEQ ID NO:1) N° de acesso NCBI: CAB66859

MPAVSKGDGMRGLAVFISDIRNCKSKEAEIKRINKELANIRSKFKGDKALDGYS
 KKKYVCKLLFIFLLGHDIDFGHMEAVNLLSSNKYTEKQIGYLFISVLVNSNSELIR
 LINNAIKNDLASRNPTFMCLALHCIAVGSREMGEAFAADIPRILVAGDSMDSV
 KQSAALCLRLRYKASPDLVPMGEWTARWLLNDQHMGWTA AVSLITCLCKKN
 PDDFKTCVSLAVSRLSRIVSSASTDLQDYTTYFVPAPWLSVKLLRLLQCYPPP
 EDAAVKGRLVECLETVLNKAQEPPKSKKVQHSAKNAILFETISLIHYDSEPNL
 LVRACNQLGQFLQHRETNLRYIJALESMTLASSEFSHEAVKTHIDTVINALKTE
 RDVSWQRAADLLYAMCDRSNAKQIVSEMLRYLETADYAIREEIVLKVAILAEKY
 AVDYSWYVDTILNLIRIAGDWSEEVWYRVLQIVTNRDDVQGYAAKTVFEALQA
 PACHENMVKVGGYILGEFGNLIAGDPRSSPPVQFSLHLSKFLCSVATRALLL
 STYIKFINLFPETKATIQQGVLRAGSQLRNADVQLQRAVEYLTLSVASTDVLAT
 VLEEMPPFPERESSILAKLKRKKGPGAGSALDDGRRDPSSNDINGGMEPTPS

TVSTSPSPSADLIjGIIIRAAPPPAAPPASAGAGNLIiVDVFDGPAAQPSLGPTPEEA
 FLSPGPEDIGPPIPEADELLNKFVCKNNGVLFENQIIiLQIGVKSEFRQNLGRMYL
 FYGNKTSVQFQNFSPTWHPGDLQTQLAVQTKRVAAQVDGGAQVQQVLNIEC
 LRDFLTPPLLSVRFRYGGAPQALTLKLPVTINKFFQPTEMAAQDFFQRWKQLS
 5 LPQQEAQKIFKANHPMDAEVTKAKLLGFGSALLDNVDPNPENFVGAGIIQTKAL
 QVGCLLRLEPNAQAQMYRLTLRTSKEPVSRHLCELLAQQF

Cadeia Pesada da Clatrina (SEQ ID NO: 2), N° de acesso NCBI: NP 004850

MAQILPIRFQEHLQLQNLGINPANIGFSTLTMESDKFICIREKVGEQAQVVIIDM
 NDPSNPIRRPISADSAIMNPASKVIAIIKAGKTLQIFNIEMKSKMKAHTMTDDVTF
 10 WKWISLNTVAIJVTDNAVYHWSMEGESQPVKMFDHRHSSLAGCQIINYRTDAK
 QKWLLL TGISAQQNRWGAMQLYSVDRKVSQPIEGHAASFAQFKMEGNAEES
 TLFCFAVRGQAGGKLHIIIEVGTPPTGNQPFPPKAVDVFFPPEAQNDFPVAMQI
 SEKHDVFLITKYGYIHLYDLETGTCIYMNRISGETIFVTAPHEATAGIIGVNRKG
 QVLSVCVEEENIIPYITNVIIQNPDLALRMAVRNNLAGAEELFARKFNALFAQGN
 15 YSEAAKVAANAPKGILRTPDTIRRFQSVPAQPGQTSPLLQYFGILLDQGQLNKY
 ESLELCRPVLQQGRKQLLEKWLKEDKLECSEELGDLVKSVDPRTLALSVYLRAN
 VPNKVIQCFAETGQVQKIVLYAKKVGYPDWIFLLRNVMRISPDQQGQQAQML
 VQDEEPLADITQIVDVFMENLIQQCTAFIIILDAIIKNNRPSEGPLQTRLLEMNLM
 HAPQVADAILGNQMFTHYDRAHIAQLCEKAGLLQRALEHFTDLYDIKRAWHTH
 20 LLNPEWLNVNYFGSLSVEDSLECLRAMLSANIRQNLQICVQVASKYHEQLSTQS
 LIELFESFKSFEGLFYFLGSIVNFSQDPDVHFKYIQAACKTGQIKEVERICRESN
 CYDPERVKNFLKEAKLTDQLPLIIVCDRFDVHDLVLYLYRNNLQKYIEIYVQKV
 NPSRLPIGGLLDVCSEDVIKNLILVVRGQFSTDELVAEVEKRNRLKLLLPWLE
 ARIHEGCEEPATHNALAKIYIDSNNNPERFLRENPPYYDSRWGKYCEKRDPHLA
 25 CVAYERGQCDLELIINVCNENSIIFKSLSRYLVRRKDPELWGSVLLESNPYRRP
 LIDQWQTAIiSETQDPEEVSVTVKAFMTADLPNELIELLEKIVLDNSVFSEHRNL
 QNI.LIIiTAIKADRTRVMEYINRLDNYDAPDIANIAISNELFEEAFAIFRKFDVNTSA
 VQVLIEHIGNLDRAYEFAERCNEPAVWSQLAKAQLQKGMVKEAIDSYIKADDP

SSYMEWQAANTSGNWEELVKYLQMARKKARESYVETELIFAIiAKTNRLAELE
 EFINGPNNNAHIQQVGDRCYDEKMYDAAKLLYNNVSNFGRLASTLVHLGEYQA
 AVDGARKANSTRTWKEVCFACVDGKEFRLAQMCGLHIWHADELEELINYYQD
 RGYFEELITMLEAALGLERAHMGMFTELAILYSKFKPQKMREHLELFWSRVNIP
 5 KVLRAAEQAHLWAELVFLYDKYEEYDNAITMMNHPTDAWKEGQFKDIITKVA
 NVELYYRAIQFYLEFKPLLLNDLLMVLSPLRDHTRAVNYFSKVKQLPLVKPYLR
 SVQNHNNKSVNESLNNLFITEEDYQALRTSIDAYDNFDNISLAQRLEKHELIEF
 RRIAAYLFKGNNRWKQSVELCKKDSLYKDAMQYASESKDTELAEEELLQWFLQ
 EEKRECFGACLFTCYDLLRPDWLETAWRHNIMDFAMPYFIQVMKEYLTKVVK
 10 LDASESLRKEEEQATETQPIVYGQPQLMLTAGPSVAVPPQAPFGYGYTAPPY
 GQPQPGFGYSM

AP1/2β (SEQ ID NO: 3), Nº de acesso NCBI: P63010

MTDSKYFTTNKKGEIFELKAELNNEKKEKRKEAVKKVIAAMTVGKDVSSLFPD
 VVNCMQTDNLELKKLVYLYLMNYAKSQPDMAIMAVNSFVKDCEDPNPLIRALA
 15 VRTMGCIRVDKITEYLCEPLRKCLKDEDPYVRKTAAVCVAKLHDINAQMVEDQ
 GFLDSLRLDIADSNPMVVANAVAALSEISESHPNNSNLLDLNPQNINKLLTALNE
 CTEWGQIFILDCLSNYNPKDDREAQSICERVTPRLSHANSVAVLSAVKVLKMF
 LELLPKDSDYNNMLLKKLAPPLVTLLSGEPEVQYVALRNINLIVQKRPEILKQEIK
 VFFVKYNDPIYVKLEKLDIMIRLASQANIAQVLAELKEYATEVDVDFVRKAVRAI
 20 GRCAIKVEQSAERCVSTLLDLIQTKVNYVQEAIVVIRDIFRKYPNKYESIIATLC
 ENLDSLDEPDARAAMIWIVGEYAERIDNADELLESFLEGFHDESTQVQLTLLTA
 IVKLFLKKPSETQELVQQVLSLATQDSDNPDLRDRGYIYWRLLSTDPVTAKEVV
 LSEKPLISEETDLIEPTLLDELICHIGSLASVYHKPPNAFVEGSHGIHRKHLPIHH
 GSTDAGDSPVGTTTATNLEQPQVIPSQGDLLGDLLNLDLGPPVNVQVSSMQ
 25 MGAVDLLGGGLDSL VGQS FIPSSVPATFAPSPTPAVVSSGLNDFELSTGIGM
 APGGYVAPKAWWLPVAVKAKGLEISGTFTHRQGHYMEMNFTNKALQHMTDFAI
 QFNKNSFGVIPSTPLAIHTPLMPNQSIDVSLPLNTLGPVMKMEPLNNLQVAVKN
 NIDVFYFSCLIPLNVLFVEDGKMERQVFLATWKDIPNENELQFQIKECHLNADT

VSSKLQNNNVYTIKRNVEGQDMLYQSLKLTNGIWILAE LRIQPGNP NYT LSLK
CRAPEVSQYIYQVYDSILKN

Dinamina (SEQ ID NO: 4), N° de acesso NCBI: NP 001005336

MGNRGMEDLIPLVNRLQDAFSAIGQNADLDLPQIAVVGGQSAGKSSVLENFV
5 GRDFLPRGSGIVTRRPLVLQLVNATTEYAEFLHCKGKKFTDFEEVRLEIEAETD
RVTGTNKGISPVPINLRVYSPHVLNLTLDLPGMTKVPVGDQPPDIEFQIRDML
MQFVTKENCLILAVSPANSDLANS DALKIAKEVDSQGQRTIGVITKLDLMDEGT
DARDVLENKLLPLRRGYIGV VNR SQKDIDGKKDITAALAAERKFFLSHPSYRHL
ADRMGTPYLQKVLNQQLTNHIRD TLPGLRNKLQS QLLSIEKEVEEYKNFRPDD
10 PARKTKALLQMVQQFAVD FEKRIEGSGDQIDTYELSGGARINRIFHERFPFELV
KMEFDEKELRKEISYAIKNIHGIRTGLFTPDM AFETIVKKQVKKIREPCLKCVD M
VISELISTVRQCTKKLQQYPRLREEMERIVTTHIREREGRTKEQVMLLIDIELAY
MNTNHEDFIGFANAQQRSNQM NKKKASGNQDEILVIRKGWLTINNIGIMKGGS
KEYWFLTAENLSWYKDDEEKEKKYMLSVDNLKLRDVEKGFMSSKHIFALFN
15 TEQRNVYKDYRQLELACETQEEVDSWKASFLRAGVYPERVGDKEKASETEE
NGSDNFMHSMDPQLERQVETIRNLVDSYMAIVNKTVRDLMPKTIMHLMINNTK
EFIFSELLANLYSCWDQNTLMEE SAEQEQRREDAALVTPPLKEGFGIIGRHQ
NDHMSARQC PPWGGAHLFLPCPLL PVARRSPTSSPTPQRRAPAVPPARPG
SRGPAPGPPPAGSALGGAPPVPSRPGASDPFGPPPQVPSRPNRAPPGVPR
20 ITISDP

Receptor de Morte 4 (SEQ ID NO: 5), N° de acesso NCBI: O00220

MAPPPARVHLGAFLAVTPNPGSAASGTEAAAATPSKVWGSSAGRIEPRGGGRG
ALPTSMGQHGPSARARAGRAPGPRPAREASPRLRVHKTFFVWGVLLQVVPSS
AATIKLHDQSIGTQQWEHSPLGELCPPGSHRSEHPGACNRCTEGVGYTNASNNL
25 FACLPCTACKSDEEERSPCTTTRNTACQCKPGTFRNDNSAEMCRKCSRGCPRG
MVKVKDCTPWSDIECVHKESGN GHNIWVILVVTLVVPLLLVAVLIVCCCIGSGCGG
DPKCMDRVCFWRLGLLRGPGAEDNAHNEILSNADSLSTFVSEQQMESQEPADLT
GVTVQSPGEAQCLLGPAEAEGSQRRRLLVPANGADPTETLMLFFDKFANIVPFDS

WDQLMRQLDLTKNEIDVVRAGTAGPGDALYAMLKWWNKTGRNASIHTLLDALE
RMEERHAKEKIQDLLVDSGKFIYLEDGTGSAVSLE

Receptor de Morte 5 (SEQ ID NO: 6), Nº de acesso NCBI: AAB67103

MEQRGQNAPAASGARKRHGPGPREARGARPGLRVPKTLVLVVAVLLLVSA
5 ESALITQQDLAPQQRAAPQQKRSSPSEGLCPPGHHISEDGRDCISCKYQGDY
STHWNDLLFCLRCTRCDSGEVELSPCTTTRNTVCQCEEGTFREEDSPEMCR
KCRTGCPRGMVKVGDCTPWSIDIECVHKESGIIIGVTVAAVVLIVAVFVCKSLLW
KKVLPYLGKICSGGGGDPERVDRSSQRPGAEDNVLNEIVSILQPTQVPEQEM
EVQEPAEPTGVNMLSPGESEHLLPEAEAERSQRRRLLVPANEGDPTETLRQC
10 FDDFADLVPFDSWEPLMRKLGLMDNEIKVAKAEAAGHRDTLYTMLIKWWNKT
GRDASVHTLLDALETGERLAKQKIEDHLLSSGKFMYLEGNADSALS

Apo2L/TRAIL (SEQ ID NO: 7), Nº de acesso NCBI: NP 003801

MAMMEVQGGPSLGQTCVLIVIFTVLLQSLCVAVTYVYFTNELKQMMDKYSSK
GIACFLKEDDSYWDPNDEESMNPCWQVKWQLRQLVRKMILRTSEETISTVQ
15 EKQQNISPLVRERGPQRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESS
RSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIY
KYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLI
DMDHEASFFGAFLVG

Fas (SEQ ID NO: 8), Nº de acesso NCBI: AAA63174

MLGIWTLPLVLTSVARLSSKSVNAQVTDINSKGLELRKTVTTVETQNLEGLHH
20 DGQFCHKPCPPGERKARDCTVNGDEPDCVPCQEGKEYTDKAHFSSKCRRC
RLCDEGHGLEVEINCTRTQNTKCRCKPNFFCNSTVCEHCDPCTKCEHGIIKEC
TLTSNTKCKEEGSRSNLWLCLLLLPIPLIVWVKRKEVQKTCRKHRKENQGSH
ESPTLNPETVAINLSDVDLSKYITTIAGVMTLSQVKGFVRKNGVNEAKIDEIKND
25 NVQDTAEQKVQLLRNWHQLHGKKEAYDTLIKDLKKANLCTLAEKIQTIIKLDITS
DSENSNFRNEIQSLV

Ligantes Fas (SEQ ID NO: 8), Nº de acesso NCBI: NP 000630

MQQPFNYYPYQIYWVDSSASSPWAPPGTVLPCPTSVPRRPGQRRPPPPPPP

PPLPPPPPPPLPPLPLPPLKKRGNHSTGLCLLMFFMVLVALVGLGLGMFQL
FHL.QKELAELESTSQMHTASSLEKQIGHPSPPPEKKELRKVAHLTGKSNSR
SMPLWEDTYGIVLLSGVKYKKGGLVINETGLYFVYSKVYFRGQSCNNLPLSH
KVYMRNSKYPQDLVMMEGKMMSYCTTGQMWARSSYLGAVFNLTSADHLYV
5 NVSELSLVNFEESQTFFGLYKL

LISTAGEM DE SEQUENCIAS

<110> Genentech Inc.
 Cary D. Austin
 David A. Lawrence
 Avi Ashkenazi

<120> MÉTODOS E MATERIAIS PARA OBSERVAÇÃO DA APOPTOSE

<130> 669.29WOU1

<150> 60/814,955

<151> 20-06-2006

<160> 9

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 955

<212> PRT

<213> Polipeptídeos de *Homo sapiens*

<400> 1

Met	Pro	Ala	Val	Ser	Lys	Gly	Asp	Gly	Met	Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Phe
1				5					10					15	

Ile	Ser	Asp	Ile	Arg	Asn	Cys	Lys	Ser	Lys	Glu	Ala	Glu	Ile	Lys	Arg
			20					25					30		

Ile	Asn	Lys	Glu	Leu	Ala	Asn	Ile	Arg	Ser	Lys	Phe	Lys	Gly	Asp	Lys
		35					40					45			

Ala	Leu	Asp	Gly	Tyr	Ser	Lys	Lys	Lys	Tyr	Val	Cys	Lys	Leu	Leu	Phe
	50					55					60				

Ile	Phe	Leu	Leu	Gly	His	Asp	Ile	Asp	Phe	Gly	His	Met	Glu	Ala	Val
65					70					75					80

Asn	Leu	Leu	Ser	Ser	Asn	Lys	Tyr	Thr	Glu	Lys	Gln	Ile	Gly	Tyr	Leu
				85					90					95	

Phe	Ile	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Ser	Asn	Ser	Glu	Leu	Ile	Arg	Leu	Ile
			100					105					110		

Asn	Asn	Ala	Ile	Lys	Asn	Asp	Leu	Ala	Ser	Arg	Asn	Pro	Thr	Phe	Met
		115					120					125			

Cys	Leu	Ala	Leu	His	Cys	Ile	Ala	Asn	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Met	Gly
	130					135					140				

Glu	Ala	Phe	Ala	Ala	Asp	Ile	Pro	Arg	Ile	Leu	Val	Ala	Gly	Asp	Ser
145					150					155					160

Met	Asp	Ser	Val	Lys	Gln	Ser	Ala	Ala	Leu	Cys	Leu	Leu	Arg	Leu	Tyr
				165					170					175	

Lys	Ala	Ser	Pro	Asp	Leu	Val	Pro	Met	Gly	Glu	Trp	Thr	Ala	Arg	Val
			180					185					190		

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

Val	Lys	Val	Gly	Gly	Tyr	Ile	Leu	Gly	Glu	Phe	Gly	Asn	Leu	Ile	Ala	
			500					505					510			
Gly	Asp	Pro	Arg	Ser	Ser	Pro	Pro	Val	Gln	Phe	Ser	Leu	Leu	His	Ser	
		515					520					525				
Lys	Phe	His	Leu	Cys	Ser	Val	Ala	Thr	Arg	Ala	Leu	Leu	Leu	Ser	Thr	
	530					535					540					
Tyr	Ile	Lys	Phe	Ile	Asn	Leu	Phe	Pro	Glu	Thr	Lys	Ala	Thr	Ile	Gln	
545					550					555					560	
Gly	Val	Leu	Arg	Ala	Gly	Ser	Gln	Leu	Arg	Asn	Ala	Asp	Val	Glu	Leu	
				565					570					575		
Gln	Gln	Arg	Ala	Val	Glu	Tyr	Leu	Thr	Leu	Ser	Ser	Val	Ala	Ser	Thr	
			580					585					590			
Asp	Val	Leu	Ala	Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Met	Pro	Pro	Phe	Pro	Glu	Arg	
		595					600					605				
Glu	Ser	Ser	Ile	Leu	Ala	Lys	Leu	Lys	Arg	Lys	Lys	Gly	Pro	Gly	Ala	
	610					615					620					
Gly	Ser	Ala	Leu	Asp	Asp	Gly	Arg	Arg	Asp	Pro	Ser	Ser	Asn	Asp	Ile	
625					630					635					640	
Asn	Gly	Gly	Met	Glu	Pro	Thr	Pro	Ser	Thr	Val	Ser	Thr	Pro	Ser	Pro	
				645					650					655		
Ser	Ala	Asp	Leu	Leu	Gly	Leu	Arg	Ala	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Pro	
			660					665					670			
Pro	Ala	Ser	Ala	Gly	Ala	Gly	Asn	Leu	Leu	Val	Asp	Val	Phe	Asp	Gly	
		675					680					685				
Pro	Ala	Ala	Gln	Pro	Ser	Leu	Gly	Pro	Thr	Pro	Glu	Glu	Ala	Phe	Leu	
	690					695					700					
Ser	Pro	Gly	Pro	Glu	Asp	Ile	Gly	Pro	Pro	Ile	Pro	Glu	Ala	Asp	Glu	
705					710					715					720	
Leu	Leu	Asn	Lys	Phe	Val	Cys	Lys	Asn	Asn	Gly	Val	Leu	Phe	Glu	Asn	
				725					730					735		
Gln	Leu	Leu	Gln	Ile	Gly	Val	Lys	Ser	Glu	Phe	Arg	Gln	Asn	Leu	Gly	
			740					745					750			
Arg	Met	Tyr	Leu	Phe	Tyr	Gly	Asn	Lys	Thr	Ser	Val	Gln	Phe	Gln	Asn	
		755					760					765				
Phe	Ser	Pro	Thr	Val	Val	His	Pro	Gly	Asp	Leu	Gln	Thr	Gln	Leu	Ala	
	770					775					780					
Val	Gln	Thr	Lys	Arg	Val	Ala	Ala	Gln	Val	Asp	Gly	Gly	Ala	Gln	Val	
785					790					795					800	

Gln Gln Val Leu Asn Ile Glu Cys Leu Arg Asp Phe Leu Thr Pro Pro
805 810 815

Leu Leu Ser Val Arg Phe Arg Tyr Gly Gly Ala Pro Gln Ala Leu Thr
820 825 830

Leu Lys Leu Pro Val Thr Ile Asn Lys Phe Phe Gln Pro Thr Glu Met
835 840 845

Ala Ala Gln Asp Phe Phe Gln Arg Trp Lys Gln Leu Ser Leu Pro Gln
850 855 860

Gln Glu Ala Gln Lys Ile Phe Lys Ala Asn His Pro Met Asp Ala Glu
865 870 875 880

Val Thr Lys Ala Lys Leu Leu Gly Phe Gly Ser Ala Leu Leu Asp Asn
885 890 895

Val Asp Pro Asn Pro Glu Asn Phe Val Gly Ala Gly Ile Ile Gln Thr
900 905 910

Lys Ala Leu Gln Val Gly Cys Leu Leu Arg Leu Glu Pro Asn Ala Gln
915 920 925

Ala Gln Met Tyr Arg Leu Thr Leu Arg Thr Ser Lys Glu Pro Val Ser
930 935 940

Arg His Leu Cys Glu Leu Leu Ala Gln Gln Phe
945 950 955

<210> 2

<211> 1675

<212> PRT

<213> Polipeptídeos de *Homo sapiens*

<400> 2

Met Ala Gln Ile Leu Pro Ile Arg Phe Gln Glu His Leu Gln Leu Gln
1 5 10 15

Asn Leu Gly Ile Asn Pro Ala Asn Ile Gly Phe Ser Thr Leu Thr Met
20 25 30

Glu Ser Asp Lys Phe Ile Cys Ile Arg Glu Lys Val Gly Glu Gln Ala
35 40 45

Gln Val Val Ile Ile Asp Met Asn Asp Pro Ser Asn Pro Ile Arg Arg
50 55 60

Pro Ile Ser Ala Asp Ser Ala Ile Met Asn Pro Ala Ser Lys Val Ile
65 70 75 80

Ala Leu Lys Ala Gly Lys Thr Leu Gln Ile Phe Asn Ile Glu Met Lys
85 90 95

Ser Lys Met Lys Ala His Thr Met Thr Asp Asp Val Thr Phe Trp Lys
100 105 110

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

```

Tyr Phe Gly Ile Leu Leu Asp Gln Gly Gln Leu Asn Lys Tyr Glu Ser
      420      425      430
.
Leu Glu Leu Cys Arg Pro Val Leu Gln Gln Gly Arg Lys Gln Leu Leu
      435      440      445
.
Glu Lys Trp Leu Lys Glu Asp Lys Leu Glu Cys Ser Glu Glu Leu Gly
      450      455      460
Asp Leu Val Lys Ser Val Asp Pro Thr Leu Ala Leu Ser Val Tyr Leu
      465      470      475      480
Arg Ala Asn Val Pro Asn Lys Val Ile Gln Cys Phe Ala Glu Thr Gly
      485      490      495
Gln Val Gln Lys Ile Val Leu Tyr Ala Lys Lys Val Gly Tyr Thr Pro
      500      505
Asp Trp Ile Phe Leu Leu Arg Asn Val Met Arg Ile Ser Pro Asp Gln
      515      520      525
Gly Gln Gln Phe Ala Gln Met Leu Val Gln Asp Glu Glu Pro Leu Ala
      530      535      540
Asp Ile Thr Gln Ile Val Asp Val Phe Met Glu Tyr Asn Leu Ile Gln
      545      550      555      560
Gln Cys Thr Ala Phe Leu Leu Asp Ala Leu Lys Asn Asn Arg Pro Ser
      565      570      575
Glu Gly Pro Leu Gln Thr Arg Leu Leu Glu Met Asn Leu Met His Ala
      580      585      590
Pro Gln Val Ala Asp Ala Ile Leu Gly Asn Gln Met Phe Thr His Tyr
      595      600      605
Asp Arg Ala His Ile Ala Gln Leu Cys Glu Lys Ala Gly Leu Leu Gln
      610      615      620
Arg Ala Leu Glu His Phe Thr Asp Leu Tyr Asp Ile Lys Arg Ala Val
      625      630      635      640
Val His Thr His Leu Leu Asn Pro Glu Trp Leu Val Asn Tyr Phe Gly
      645      650      655
Ser Leu Ser Val Glu Asp Ser Leu Glu Cys Leu Arg Ala Met Leu Ser
      660      665      670
Ala Asn Ile Arg Gln Asn Leu Gln Ile Cys Val Gln Val Ala Ser Lys
      675      680      685
Tyr His Glu Gln Leu Ser Thr Gln Ser Leu Ile Glu Leu Phe Glu Ser
      690      695      700
Phe Lys Ser Phe Glu Gly Leu Phe Tyr Phe Leu Gly Ser Ile Val Asn
      705      710      715      720

```

Phe	Ser	Gln	Asp	Pro	Asp	Val	His	Phe	Lys	Tyr	Ile	Gln	Ala	Ala	Cys	
				725					730					735		
Lys	Thr	Gly	Gln	Ile	Lys	Glu	Val	Glu	Arg	Ile	Cys	Arg	Glu	Ser	Asn	
			740					745					750			
Cys	Tyr	Asp	Pro	Glu	Arg	Val	Lys	Asn	Phe	Leu	Lys	Glu	Ala	Lys	Leu	
		755					760					765				
Thr	Asp	Gln	Leu	Pro	Leu	Ile	Ile	Val	Cys	Asp	Arg	Phe	Asp	Phe	Val	
	770					775					780					
His	Asp	Leu	Val	Leu	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Asn	Asn	Leu	Gln	Lys	Tyr	Ile	
785					790					795					800	
Glu	Ile	Tyr	Val	Gln	Lys	Val	Asn	Pro	Ser	Arg	Leu	Pro	Val	Val	Ile	
				805					810					815		
Gly	Gly	Leu	Leu	Asp	Val	Asp	Cys	Ser	Glu	Asp	Val	Ile	Lys	Asn	Leu	
			820					825					830			
Ile	Leu	Val	Val	Arg	Gly	Gln	Phe	Ser	Thr	Asp	Glu	Leu	Val	Ala	Glu	
		835					840					845				
Val	Glu	Lys	Arg	Asn	Arg	Leu	Lys	Leu	Leu	Leu	Pro	Trp	Leu	Glu	Ala	
	850					855					860					
Arg	Ile	His	Glu	Gly	Cys	Glu	Glu	Pro	Ala	Thr	His	Asn	Ala	Leu	Ala	
865					870					875					880	
Lys	Ile	Tyr	Ile	Asp	Ser	Asn	Asn	Asn	Pro	Glu	Arg	Phe	Leu	Arg	Glu	
				885					890					895		
Asn	Pro	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Arg	Val	Val	Gly	Lys	Tyr	Cys	Glu	Lys	Arg	
			900					905					910			
Asp	Pro	His	Leu	Ala	Cys	Val	Ala	Tyr	Glu	Arg	Gly	Gln	Cys	Asp	Leu	
		915					920					925				
Glu	Leu	Ile	Asn	Val	Cys	Asn	Glu	Asn	Ser	Leu	Phe	Lys	Ser	Leu	Ser	
	930					935					940					
Arg	Tyr	Leu	Val	Arg	Arg	Lys	Asp	Pro	Glu	Leu	Trp	Gly	Ser	Val	Leu	
945					950					955					960	
Leu	Glu	Ser	Asn	Pro	Tyr	Arg	Arg	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln	Val	Val	Gln	
				965					970					975		
Thr	Ala	Leu	Ser	Glu	Thr	Gln	Asp	Pro	Glu	Glu	Val	Ser	Val	Thr	Val	
			980					985					990			
Lys	Ala	Phe	Met	Thr	Ala	Asp	Leu	Pro	Asn	Glu	Leu	Ile	Glu	Leu	Leu	
		995					1000					1005				
Glu	Lys	Ile	Val	Leu	Asp	Asn	Ser	Val	Phe	Ser	Glu	His	Arg	Asn	Leu	
	1010					1015					1020					

Gln Asn Leu Leu Ile Leu Thr Ala Ile Lys Ala Asp Arg Thr Arg Val
 1025 1030 1035 1040
 Met Glu Tyr Ile Asn Arg Leu Asp Asn Tyr Asp Ala Pro Asp Ile Ala
 1045 1050 1055
 Asn Ile Ala Ile Ser Asn Glu Leu Phe Glu Glu Ala Phe Ala Ile Phe
 1060 1065 1070
 Arg Lys Phe Asp Val Asn Thr Ser Ala Val Gln Val Leu Ile Glu His
 1075 1080 1085
 Ile Gly Asn Leu Asp Arg Ala Tyr Glu Phe Ala Glu Arg Cys Asn Glu
 1090 1095 1100
 Pro Ala Val Trp Ser Gln Leu Ala Lys Ala Gln Leu Gln Lys Gly Met
 1105 1110 1115 1120
 Val Lys Glu Ala Ile Asp Ser Tyr Ile Lys Ala Asp Asp Pro Ser Ser
 1125 1130 1135
 Tyr Met Glu Val Val Gln Ala Ala Asn Thr Ser Gly Asn Trp Glu Glu
 1140 1145 1150
 Leu Val Lys Tyr Leu Gln Met Ala Arg Lys Lys Ala Arg Glu Ser Tyr
 1155 1160 1165
 Val Glu Thr Glu Leu Ile Phe Ala Leu Ala Lys Thr Asn Arg Leu Ala
 1170 1175 1180
 Glu Leu Glu Glu Phe Ile Asn Gly Pro Asn Asn Ala His Ile Gln Gln
 1185 1190 1195 1200
 Val Gly Asp Arg Cys Tyr Asp Glu Lys Met Tyr Asp Ala Ala Lys Leu
 1205 1210 1215
 Leu Tyr Asn Asn Val Ser Asn Phe Gly Arg Leu Ala Ser Thr Leu Val
 1220 1225 1230
 His Leu Gly Glu Tyr Gln Ala Ala Val Asp Gly Ala Arg Lys Ala Asn
 1235 1240 1245
 Ser Thr Arg Thr Trp Lys Glu Val Cys Phe Ala Cys Val Asp Gly Lys
 1250 1255 1260
 Glu Phe Arg Leu Ala Gln Met Cys Gly Leu His Ile Val Val His Ala
 1265 1270 1275 1280
 Asp Glu Leu Glu Glu Leu Ile Asn Tyr Tyr Gln Asp Arg Gly Tyr Phe
 1285 1290 1295
 Glu Glu Leu Ile Thr Met Leu Glu Ala Ala Leu Gly Leu Glu Arg Ala
 1300 1305 1310
 His Met Gly Met Phe Thr Glu Leu Ala Ile Leu Tyr Ser Lys Phe Lys
 1315 1320 1325

Pro	Gln	Lys	Met	Arg	Glu	His	Leu	Glu	Leu	Phe	Trp	Ser	Arg	Val	Asn		
	1330					1335					1340						
Ile	Pro	Lys	Val	Leu	Arg	Ala	Ala	Glu	Gln	Ala	His	Leu	Trp	Ala	Glu		
	1345				1350					1355					1360		
Leu	Val	Phe	Leu	Tyr	Asp	Lys	Tyr	Glu	Glu	Tyr	Asp	Asn	Ala	Ile	Ile		
				1365					1370					1375			
Thr	Met	Met	Asn	His	Pro	Thr	Asp	Ala	Trp	Lys	Glu	Gly	Gln	Phe	Lys		
			1380					1385					1390				
Asp	Ile	Ile	Thr	Lys	Val	Ala	Asn	Val	Glu	Leu	Tyr	Tyr	Arg	Ala	Ile		
		1395					1400						1405				
Gln	Phe	Tyr	Leu	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Leu	Leu	Asn	Asp	Leu	Leu	Met		
	1410					1415					1420						
Val	Leu	Ser	Pro	Arg	Leu	Asp	His	Thr	Arg	Ala	Val	Asn	Tyr	Phe	Ser		
	1425				1430					1435					1440		
Lys	Val	Lys	Gln	Leu	Pro	Leu	Val	Lys	Pro	Tyr	Leu	Arg	Ser	Val	Gln		
				1445					1450					1455			
Asn	His	Asn	Asn	Lys	Ser	Val	Asn	Glu	Ser	Leu	Asn	Asn	Leu	Phe	Ile		
			1460					1465					1470				
Thr	Glu	Glu	Asp	Tyr	Gln	Ala	Leu	Arg	Thr	Ser	Ile	Asp	Ala	Tyr	Asp		
		1475					1480					1485					
Asn	Phe	Asp	Asn	Ile	Ser	Leu	Ala	Gln	Arg	Leu	Glu	Lys	His	Glu	Leu		
	1490					1495					1500						
Ile	Glu	Phe	Arg	Arg	Ile	Ala	Ala	Tyr	Leu	Phe	Lys	Gly	Asn	Asn	Arg		
	1505				1510					1515					1520		
Trp	Lys	Gln	Ser	Val	Glu	Leu	Cys	Lys	Lys	Asp	Ser	Leu	Tyr	Lys	Asp		
				1525					1530					1535			
Ala	Met	Gln	Tyr	Ala	Ser	Glu	Ser	Lys	Asp	Thr	Glu	Leu	Ala	Glu	Glu		
			1540					1545					1550				
Leu	Leu	Gln	Trp	Phe	Leu	Gln	Glu	Glu	Lys	Arg	Glu	Cys	Phe	Gly	Ala		
		1555					1560					1565					
Cys	Leu	Phe	Thr	Cys	Tyr	Asp	Leu	Leu	Arg	Pro	Asp	Val	Val	Leu	Glu		
	1570					1575					1580						
Thr	Ala	Trp	Arg	His	Asn	Ile	Met	Asp	Phe	Ala	Met	Pro	Tyr	Phe	Ile		
	1585				1590					1595					1600		
Gln	Val	Met	Lys	Glu	Tyr	Leu	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Leu	Asp	Ala	Ser		
				1605					1610					1615			
Glu	Ser	Leu	Arg	Lys	Glu	Glu	Glu	Gln	Ala	Thr	Glu	Thr	Gln	Pro	Ile		
			1620					1625					1630				

Val Tyr Gly Gln Pro Gln Leu Met Leu Thr Ala Gly Pro Ser Val Ala
 1635 1640 1645

Val Pro Pro Gln Ala Pro Phe Gly Tyr Gly Tyr Thr Ala Pro Pro Tyr
 1650 1655 1660

Gly Gln Pro Gln Pro Gly Phe Gly Tyr Ser Met
 1665 1670 1675

<210> 3

<211> 937

<212> PRT

<213> Polipeptídeos de *Homo sapiens*

<400> 3

Met Thr Asp Ser Lys Tyr Phe Thr Thr Asn Lys Lys Gly Glu Ile Phe
 1 5 10 15

Glu Leu Lys Ala Glu Leu Asn Asn Glu Lys Lys Glu Lys Arg Lys Glu
 20 25 30

Ala Val Lys Lys Val Ile Ala Ala Met Thr Val Gly Lys Asp Val Ser
 35 40 45

Ser Leu Phe Pro Asp Val Val Asn Cys Met Gln Thr Asp Asn Leu Glu
 50 55 60

Leu Lys Lys Leu Val Tyr Leu Tyr Leu Met Asn Tyr Ala Lys Ser Gln
 65 70 75 80

Pro Asp Met Ala Ile Met Ala Val Asn Ser Phe Val Lys Asp Cys Glu
 85 90 95

Asp Pro Asn Pro Leu Ile Arg Ala Leu Ala Val Arg Thr Met Gly Cys
 100 105 110

Ile Arg Val Asp Lys Ile Thr Glu Tyr Leu Cys Glu Pro Leu Arg Lys
 115 120 125

Cys Leu Lys Asp Glu Asp Pro Tyr Val Arg Lys Thr Ala Ala Val Cys
 130 135 140

Val Ala Lys Leu His Asp Ile Asn Ala Gln Met Val Glu Asp Gln Gly
 145 150 155 160

Phe Leu Asp Ser Leu Arg Asp Leu Ile Ala Asp Ser Asn Pro Met Val
 165 170 175

Val Ala Asn Ala Val Ala Ala Leu Ser Glu Ile Ser Glu Ser His Pro
 180 185 190

Asn Ser Asn Leu Leu Asp Leu Asn Pro Gln Asn Ile Asn Lys Leu Leu
 195 200 205

Thr Ala Leu Asn Glu Cys Thr Glu Trp Gly Gln Ile Phe Ile Leu Asp
 210 215 220

Cys 225	Leu	Ser	Asn	Tyr	Asn 230	Pro	Lys	Asp	Asp	Arg 235	Glu	Ala	Gln	Ser	Ile 240
Cys	Glu	Arg	Val	Thr 245	Pro	Arg	Leu	Ser	His 250	Ala	Asn	Ser	Ala	Val	Val 255
Leu	Ser	Ala	Val 260	Lys	Val	Leu	Met	Lys 265	Phe	Leu	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys 270
Asp	Ser	Asp 275	Tyr	Tyr	Asn	Met	Leu 280	Leu	Lys	Lys	Leu	Ala 285	Pro	Pro	Leu
Val	Thr 290	Leu	Leu	Ser	Gly	Glu 295	Pro	Glu	Val	Gln	Tyr 300	Val	Ala	Leu	Arg
Asn 305	Ile	Asn	Leu	Ile	Val 310	Gln	Lys	Arg	Pro	Glu 315	Ile	Leu	Lys	Gln	Glu 320
Ile	Lys	Val	Phe	Phe 325	Val	Lys	Tyr	Asn	Asp 330	Pro	Ile	Tyr	Val	Lys	Leu 335
Glu	Lys	Leu	Asp 340	Ile	Met	Ile	Arg	Leu	Ala 345	Ser	Gln	Ala	Asn	Ile	Ala 350
Gln	Val	Leu	Ala	Glu	Leu	Lys	Glu 360	Tyr	Ala	Thr	Glu	Val	Asp	Val	Asp 365
Phe 370	Val	Arg	Lys	Ala	Val	Arg 375	Ala	Ile	Gly	Arg	Cys 380	Ala	Ile	Lys	Val
Glu 385	Gln	Ser	Ala	Glu	Arg 390	Cys	Val	Ser	Thr	Leu 395	Leu	Asp	Leu	Ile	Gln 400
Thr	Lys	Val	Asn	Tyr 405	Val	Val	Gln	Glu	Ala 410	Ile	Val	Val	Ile	Arg	Asp 415
Ile	Phe	Arg	Lys 420	Tyr	Pro	Asn	Lys	Tyr 425	Glu	Ser	Ile	Ile	Ala	Thr	Leu 430
Cys	Glu	Asn	Leu	Asp	Ser	Leu	Asp 440	Glu	Pro	Asp	Ala	Arg	Ala	Ala	Met 445
Ile 450	Trp	Ile	Val	Gly	Glu	Tyr 455	Ala	Glu	Arg	Ile	Asp 460	Asn	Ala	Asp	Glu
Leu 465	Leu	Glu	Ser	Phe	Leu 470	Glu	Gly	Phe	His 475	Asp	Glu	Ser	Thr	Gln	Val 480
Gln	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Ala	Ile	Val	Lys 490	Leu	Phe	Leu	Lys	Lys	Pro 495
Ser	Glu	Thr	Gln	Glu	Leu	Val	Gln	Gln 505	Val	Leu	Ser	Leu	Ala	Thr	Gln 510
Asp	Ser	Asp 515	Asn	Pro	Asp	Leu	Arg 520	Asp	Arg	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Trp	Arg 525

Leu	Leu	Ser	Thr	Asp	Pro	Val	Thr	Ala	Lys	Glu	Val	Val	Leu	Ser	Glu
	530					535					540				
Lys	Pro	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Thr	Asp	Leu	Ile	Glu	Pro	Thr	Leu	Leu
545					550					555					560
Asp	Glu	Leu	Ile	Cys	His	Ile	Gly	Ser	Leu	Ala	Ser	Val	Tyr	His	Lys
				565					570					575	
Pro	Pro	Asn	Ala	Phe	Val	Glu	Gly	Ser	His	Gly	Ile	His	Arg	Lys	His
			580					585					590		
Leu	Pro	Ile	His	His	Gly	Ser	Thr	Asp	Ala	Gly	Asp	Ser	Pro	Val	Gly
		595					600					605			
Thr	Thr	Thr	Ala	Thr	Asn	Leu	Glu	Gln	Pro	Gln	Val	Ile	Pro	Ser	Gln
	610					615					620				
Gly	Asp	Leu	Leu	Gly	Asp	Leu	Leu	Asn	Leu	Asp	Leu	Gly	Pro	Pro	Val
625					630					635					640
Asn	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Ser	Met	Gln	Met	Gly	Ala	Val	Asp	Leu	Leu
				645					650					655	
Gly	Gly	Gly	Leu	Asp	Ser	Leu	Val	Gly	Gln	Ser	Phe	Ile	Pro	Ser	Ser
			660					665					670		
Val	Pro	Ala	Thr	Phe	Ala	Pro	Ser	Pro	Thr	Pro	Ala	Val	Val	Ser	Ser
		675					680					685			
Gly	Leu	Asn	Asp	Leu	Phe	Glu	Leu	Ser	Thr	Gly	Ile	Gly	Met	Ala	Pro
	690					695					700				
Gly	Gly	Tyr	Val	Ala	Pro	Lys	Ala	Val	Trp	Leu	Pro	Ala	Val	Lys	Ala
705					710					715					720
Lys	Gly	Leu	Glu	Ile	Ser	Gly	Thr	Phe	Thr	His	Arg	Gln	Gly	His	Ile
				725					730					735	
Tyr	Met	Glu	Met	Asn	Phe	Thr	Asn	Lys	Ala	Leu	Gln	His	Met	Thr	Asp
			740					745					750		
Phe	Ala	Ile	Gln	Phe	Asn	Lys	Asn	Ser	Phe	Gly	Val	Ile	Pro	Ser	Thr
		755					760					765			
Pro	Leu	Ala	Ile	His	Thr	Pro	Leu	Met	Pro	Asn	Gln	Ser	Ile	Asp	Val
		770				775					780				
Ser	Leu	Pro	Leu	Asn	Thr	Leu	Gly	Pro	Val	Met	Lys	Met	Glu	Pro	Leu
785					790					795					800
Asn	Asn	Leu	Gln	Val	Ala	Val	Lys	Asn	Asn	Ile	Asp	Val	Phe	Tyr	Phe
				805					810					815	
Ser	Cys	Leu	Ile	Pro	Leu	Asn	Val	Leu	Phe	Val	Glu	Asp	Gly	Lys	Met
			820					825					830		

Glu Arg Gln Val Phe Leu Ala Thr Trp Lys Asp Ile Pro Asn Glu Asn
835 840 845

Glu Leu Gln Phe Gln Ile Lys Glu Cys His Leu Asn Ala Asp Thr Val
850 855 860

Ser Ser Lys Leu Gln Asn Asn Asn Val Tyr Thr Ile Ala Lys Arg Asn
865 870 875 880

Val Glu Gly Gln Asp Met Leu Tyr Gln Ser Leu Lys Leu Thr Asn Gly
885 890 895

Ile Trp Ile Leu Ala Glu Leu Arg Ile Gln Pro Gly Asn Pro Asn Tyr
900 905 910

Thr Leu Ser Leu Lys Cys Arg Ala Pro Glu Val Ser Gln Tyr Ile Tyr
915 920 925

Gln Val Tyr Asp Ser Ile Leu Lys Asn
930 935

<210> 4

<211> 851

<212> PRT

<213> Polipeptídeos de *Homo sapiens*

<400> 4

Met Gly Asn Arg Gly Met Glu Asp Leu Ile Pro Leu Val Asn Arg Leu
1 5 10 15

Gln Asp Ala Phe Ser Ala Ile Gly Gln Asn Ala Asp Leu Asp Leu Pro
20 25 30

Gln Ile Ala Val Val Gly Gly Gln Ser Ala Gly Lys Ser Ser Val Leu
35 40 45

Glu Asn Phe Val Gly Arg Asp Phe Leu Pro Arg Gly Ser Gly Ile Val
50 55 60

Thr Arg Arg Pro Leu Val Leu Gln Leu Val Asn Ala Thr Thr Glu Tyr
65 70 75 80

Ala Glu Phe Leu His Cys Lys Gly Lys Lys Phe Thr Asp Phe Glu Glu
85 90 95

Val Arg Leu Glu Ile Glu Ala Glu Thr Asp Arg Val Thr Gly Thr Asn
100 105 110

Lys Gly Ile Ser Pro Val Pro Ile Asn Leu Arg Val Tyr Ser Pro His
115 120 125

Val Leu Asn Leu Thr Leu Val Asp Leu Pro Gly Met Thr Lys Val Pro
130 135 140

Val Gly Asp Gln Pro Pro Asp Ile Glu Phe Gln Ile Arg Asp Met Leu
145 150 155 160

Met	Gln	Phe	Val	Thr	Lys	Glu	Asn	Cys	Leu	Ile	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	
				165					170					175		
Ala	Asn	Ser	Asp	Leu	Ala	Asn	Ser	Asp	Ala	Leu	Lys	Val	Ala	Lys	Glu	
			180					185					190			
Val	Asp	Pro	Gln	Gly	Gln	Arg	Thr	Ile	Gly	Val	Ile	Thr	Lys	Leu	Asp	
		195					200					205				
Leu	Met	Asp	Glu	Gly	Thr	Asp	Ala	Arg	Asp	Val	Leu	Glu	Asn	Lys	Leu	
	210					215					220					
Leu	Pro	Leu	Arg	Arg	Gly	Tyr	Ile	Gly	Val	Val	Asn	Arg	Ser	Gln	Lys	
225					230					235					240	
Asp	Ile	Asp	Gly	Lys	Lys	Asp	Ile	Thr	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Glu	Arg	
				245					250					255		
Lys	Phe	Phe	Leu	Ser	His	Pro	Ser	Tyr	Arg	His	Leu	Ala	Asp	Arg	Met	
			260					265					270			
Gly	Thr	Pro	Tyr	Leu	Gln	Lys	Val	Leu	Asn	Gln	Gln	Leu	Thr	Asn	His	
		275					280					285				
Ile	Arg	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Arg	Asn	Lys	Leu	Gln	Ser	Gln	Leu	
	290					295					300					
Leu	Ser	Ile	Glu	Lys	Glu	Val	Glu	Glu	Tyr	Lys	Asn	Phe	Arg	Pro	Asp	
305					310					315					320	
Asp	Pro	Ala	Arg	Lys	Thr	Lys	Ala	Leu	Leu	Gln	Met	Val	Gln	Gln	Phe	
				325					330					335		
Ala	Val	Asp	Phe	Glu	Lys	Arg	Ile	Glu	Gly	Ser	Gly	Asp	Gln	Ile	Asp	
			340					345					350			
Thr	Tyr	Glu	Leu	Ser	Gly	Gly	Ala	Arg	Ile	Asn	Arg	Ile	Phe	His	Glu	
		355					360					365				
Arg	Phe	Pro	Phe	Glu	Leu	Val	Lys	Met	Glu	Phe	Asp	Glu	Lys	Glu	Leu	
	370					375					380					
Arg	Arg	Glu	Ile	Ser	Tyr	Ala	Ile	Lys	Asn	Ile	His	Gly	Ile	Arg	Thr	
385					390					395					400	
Gly	Leu	Phe	Thr	Pro	Asp	Met	Ala	Phe	Glu	Thr	Ile	Val	Lys	Lys	Gln	
				405					410					415		
Val	Lys	Lys	Ile	Arg	Glu	Pro	Cys	Leu	Lys	Cys	Val	Asp	Met	Val	Ile	
			420					425					430			
Ser	Glu	Leu	Ile	Ser	Thr	Val	Arg	Gln	Cys	Thr	Lys	Lys	Leu	Gln	Gln	
		435					440					445				
Tyr	Pro	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Met	Glu	Arg	Ile	Val	Thr	Thr	His	Ile	
	450					455					460					

Arg 465	Glu	Arg	Glu	Gly	Arg 470	Thr	Lys	Glu	Gln	Val 475	Met	Leu	Leu	Ile	Asp 480
Ile	Glu	Leu	Ala	Tyr 485	Met	Asn	Thr	Asn	His 490	Glu	Asp	Phe	Ile	Gly 495	Phe
Ala	Asn	Ala	Gln 500	Gln	Arg	Ser	Asn	Gln 505	Met	Asn	Lys	Lys	Lys 510	Thr	Ser
Gly	Asn	Gln 515	Asp	Glu	Ile	Leu	Val 520	Ile	Arg	Lys	Gly	Trp 525	Leu	Thr	Ile
Asn 530	Asn	Ile	Gly	Ile	Met	Lys 535	Gly	Gly	Ser	Lys	Glu 540	Tyr	Trp	Phe	Val
Leu 545	Thr	Ala	Glu	Asn 550	Leu	Ser	Trp	Tyr	Lys	Asp 555	Asp	Glu	Glu	Lys	Glu 560
Lys	Lys	Tyr	Met	Leu 565	Ser	Val	Asp	Asn	Leu 570	Lys	Leu	Arg	Asp	Val 575	Glu
Lys	Gly	Phe	Met 580	Ser	Ser	Lys	His	Ile 585	Phe	Ala	Leu	Phe	Asn 590	Thr	Glu
Gln	Arg	Asn 595	Val	Tyr	Lys	Asp	Tyr 600	Arg	Gln	Leu	Glu	Leu 605	Ala	Cys	Glu
Thr 610	Gln	Glu	Glu	Val	Asp 615	Ser	Trp	Lys	Ala	Ser	Phe 620	Leu	Arg	Ala	Gly
Val 625	Tyr	Pro	Glu	Arg 630	Val	Gly	Asp	Lys	Glu	Lys 635	Ala	Ser	Glu	Thr	Glu 640
Glu	Asn	Gly	Ser	Asp 645	Ser	Phe	Met	His	Ser 650	Met	Asp	Pro	Gln	Leu 655	Glu
Arg	Gln	Val 660	Glu	Thr	Ile	Arg	Asn	Leu 665	Val	Asp	Ser	Tyr	Met 670	Ala	Ile
Val	Asn 675	Lys	Thr	Val	Arg	Asp	Leu 680	Met	Pro	Lys	Thr	Ile 685	Met	His	Leu
Met 690	Ile	Asn	Asn	Thr	Lys	Glu 695	Phe	Ile	Phe	Ser	Glu 700	Leu	Leu	Ala	Asn
Leu 705	Tyr	Ser	Cys	Gly 710	Asp	Gln	Asn	Thr	Leu	Met 715	Glu	Glu	Ser	Ala	Glu 720
Gln	Ala	Gln	Arg	Arg 725	Asp	Glu	Met	Leu	Arg 730	Met	Tyr	His	Ala	Leu 735	Lys
Glu	Ala	Leu	Ser 740	Ile	Ile	Gly	Asp	Ile 745	Asn	Thr	Thr	Thr	Val 750	Ser	Thr
Pro	Met 755	Pro	Pro	Pro	Val	Asp	Asp 760	Ser	Trp	Leu	Gln	Val 765	Gln	Ser	Val

Pro Ala Gly Arg Arg Ser Pro Thr Ser Ser Pro Thr Pro Gln Arg Arg
 770 775 780

Ala Pro Ala Val Pro Pro Ala Arg Pro Gly Ser Arg Gly Pro Ala Pro
 785 790 795 800

Gly Pro Pro Pro Ala Gly Ser Ala Leu Gly Gly Ala Pro Pro Val Pro
 805 810 815

Ser Arg Pro Gly Ala Ser Pro Asp Pro Phe Gly Pro Pro Pro Gln Val
 820 825 830

Pro Ser Arg Pro Asn Arg Ala Pro Pro Gly Val Pro Arg Ile Thr Ile
 835 840 845

Ser Asp Pro
 850

<210> 5

<211> 468

<212> PRT

<213> Polipeptídeos de *Homo sapiens*

<400> 5

Met Ala Pro Pro Pro Ala Arg Val His Leu Gly Ala Phe Leu Ala Val
 1 5 10 15

Thr Pro Asn Pro Gly Ser Ala Ala Ser Gly Thr Glu Ala Ala Ala Ala
 20 25 30

Thr Pro Ser Lys Val Trp Gly Ser Ser Ala Gly Arg Ile Glu Pro Arg
 35 40 45

Gly Gly Gly Arg Gly Ala Leu Pro Thr Ser Met Gly Gln His Gly Pro
 50 55 60

Ser Ala Arg Ala Arg Ala Gly Arg Ala Pro Gly Pro Arg Pro Ala Arg
 65 70 75 80

Glu Ala Ser Pro Arg Leu Arg Val His Lys Thr Phe Lys Phe Val Val
 85 90 95

Val Gly Val Leu Leu Gln Val Val Pro Ser Ser Ala Ala Thr Ile Lys
 100 105 110

Leu His Asp Gln Ser Ile Gly Thr Gln Gln Trp Glu His Ser Pro Leu
 115 120 125

Gly Glu Leu Cys Pro Pro Gly Ser His Arg Ser Glu His Pro Gly Ala
 130 135 140

Cys Asn Arg Cys Thr Glu Gly Val Gly Tyr Thr Asn Ala Ser Asn Asn
 145 150 155 160

Leu Phe Ala Cys Leu Pro Cys Thr Ala Cys Lys Ser Asp Glu Glu Glu
 165 170 175

Arg	Ser	Pro	Cys	Thr	Thr	Thr	Arg	Asn	Thr	Ala	Cys	Gln	Cys	Lys	Pro	
			180					185					190			
Gly	Thr	Phe	Arg	Asn	Asp	Asn	Ser	Ala	Glu	Met	Cys	Arg	Lys	Cys	Ser	
		195					200					205				
Arg	Gly	Cys	Pro	Arg	Gly	Met	Val	Lys	Val	Lys	Asp	Cys	Thr	Pro	Trp	
	210					215					220					
Ser	Asp	Ile	Glu	Cys	Val	His	Lys	Glu	Ser	Gly	Asn	Gly	His	Asn	Ile	
225					230					235					240	
Trp	Val	Ile	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Val	Val	Pro	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	
				245					250						255	
Val	Leu	Ile	Val	Cys	Cys	Cys	Ile	Gly	Ser	Gly	Cys	Gly	Gly	Asp	Pro	
			260					265					270			
Lys	Cys	Met	Asp	Arg	Val	Cys	Phe	Trp	Arg	Leu	Gly	Leu	Leu	Arg	Gly	
		275					280					285				
Pro	Gly	Ala	Glu	Asp	Asn	Ala	His	Asn	Glu	Ile	Leu	Ser	Asn	Ala	Asp	
	290					295					300					
Ser	Leu	Ser	Thr	Phe	Val	Ser	Glu	Gln	Gln	Met	Glu	Ser	Gln	Glu	Pro	
305					310					315					320	
Ala	Asp	Leu	Thr	Gly	Val	Thr	Val	Gln	Ser	Pro	Gly	Glu	Ala	Gln	Cys	
				325					330					335		
Leu	Leu	Gly	Pro	Ala	Glu	Ala	Glu	Gly	Ser	Gln	Arg	Arg	Arg	Leu	Leu	
			340					345					350			
Val	Pro	Ala	Asn	Gly	Ala	Asp	Pro	Thr	Glu	Thr	Leu	Met	Leu	Phe	Phe	
		355					360					365				
Asp	Lys	Phe	Ala	Asn	Ile	Val	Pro	Phe	Asp	Ser	Trp	Asp	Gln	Leu	Met	
	370					375					380					
Arg	Gln	Leu	Asp	Leu	Thr	Lys	Asn	Glu	Ile	Asp	Val	Val	Arg	Ala	Gly	
385					390					395					400	
Thr	Ala	Gly	Pro	Gly	Asp	Ala	Leu	Tyr	Ala	Met	Leu	Met	Lys	Trp	Val	
				405					410					415		
Asn	Lys	Thr	Gly	Arg	Asn	Ala	Ser	Ile	His	Thr	Leu	Leu	Asp	Ala	Leu	
			420					425					430			
Glu	Arg	Met	Glu	Glu	Arg	His	Ala	Lys	Glu	Lys	Ile	Gln	Asp	Leu	Leu	
		435					440					445				
Val	Asp	Ser	Gly	Lys	Phe	Ile	Tyr	Leu	Glu	Asp	Gly	Thr	Gly	Ser	Ala	
	450					455					460					
Val	Ser	Leu	Glu													
465																

<210> 6

<211> 411
 <212> PRT
 <213> Polipeptídeos de Homo sapiens
 <400> 6

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

Glu Arg Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn Glu Gly Asp
290 295 300

Pro Thr Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val
305 310 315 320

Pro Phe Asp Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp
325 330 335

Asn Glu Ile Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr
340 345 350

Leu Tyr Thr Met Leu Ile Lys Trp Val Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala
355 360 365

Ser Val His Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu
370 375 380

Ala Lys Gln Lys Ile Glu Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met
385 390 395 400

Tyr Leu Glu Gly Asn Ala Asp Ser Ala Leu Ser
405 410

<210> 7

<211> 281

<212> PRT

<213> Polipeptídeos de *Homo sapiens*

<400> 7

Met Ala Met Met Glu Val Gln Gly Gly Pro Ser Leu Gly Gln Thr Cys
1 5 10 15

Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu Cys Val Ala
20 25 30

Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp Lys
35 40 45

Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser Tyr
50 55 60

Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln Val
65 70 75 80

Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr Ser
85 90 95

Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro
100 105 110

Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly
115 120 125

Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
130 135 140

Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
145 150 155 160

His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
165 170 175

His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe
180 185 190

Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
195 200 205

Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
210 215 220

Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
225 230 235 240

Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
245 250 255

Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
260 265 270

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
275 280

<210> 8

<211> 335

<212> PRT

<213> Polipeptídeos de *Homo sapiens*

<400> 8

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

Arg Leu Ser Ser Lys Ser Val Asn Ala Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn
35 40 45

Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys Pro Cys Pro
50 55 60

Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp Glu Pro
65 70 75 80

Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His
85 90 95

Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly
100 105 110

Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg
115 120 125

Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His Cys Asp
 130 135 140
 Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr
 145 150 155 160
 Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Asn Leu Gly Trp
 165 170 175
 Leu Cys Leu Leu Leu Leu Pro Ile Pro Leu Ile Val Trp Val Lys Arg
 180 185 190
 Lys Glu Val Gln Lys Thr Cys Arg Lys His Arg Lys Glu Asn Gln Gly
 195 200 205
 Ser His Glu Ser Pro Thr Leu Asn Pro Glu Thr Val Ala Ile Asn Leu
 210 215 220
 Ser Asp Val Asp Leu Ser Lys Tyr Ile Thr Thr Ile Ala Gly Val Met
 225 230 235 240
 Thr Leu Ser Gln Val Lys Gly Phe Val Arg Lys Asn Gly Val Asn Glu
 245 250 255
 Ala Lys Ile Asp Glu Ile Lys Asn Asp Asn Val Gln Asp Thr Ala Glu
 260 265 270
 Gln Lys Val Gln Leu Leu Arg Asn Trp His Gln Leu His Gly Lys Lys
 275 280 285
 Glu Ala Tyr Asp Thr Leu Ile Lys Asp Leu Lys Lys Ala Asn Leu Cys
 290 295 300
 Thr Leu Ala Glu Lys Ile Gln Thr Ile Ile Leu Lys Asp Ile Thr Ser
 305 310 315 320
 Asp Ser Glu Asn Ser Asn Phe Arg Asn Glu Ile Gln Ser Leu Val
 325 330 335

<210> 9

<211> 281

<212> PRT

<213> Polipeptídeos de *Homo sapiens*

<400> 9

Met Gln Gln Pro Phe Asn Tyr Pro Tyr Pro Gln Ile Tyr Trp Val Asp
 1 5 10 15

Ser Ser Ala Ser Ser Pro Trp Ala Pro Pro Gly Thr Val Leu Pro Cys
 20 25 30

Pro Thr Ser Val Pro Arg Arg Pro Gly Gln Arg Arg Pro Pro Pro Pro
 35 40 45

Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro
 50 55 60

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

REIVINDICAÇÕES

1 MÉTODO PARA A DETECÇÃO DA APOPTOSE, em células de mamíferos, compreendendo:

5 (a) o contato da célula com um anticorpo que se liga a um fragmento de proteína produzida durante o processo da apoptose, onde o anticorpo se liga a um fragmento de proteína da AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4);

10 (b) determinando a quantidade de anticorpo que se ligou ao fragmento de proteína produzido durante a apoptose; e

 (c) comparando a quantidade de anticorpos ligados na etapa (b) com a quantidade de anticorpos que se ligou a fragmento de proteína em uma célula de mamífero que não esta sofrendo apoptose.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, em que a apoptose na célula é iniciada pelo Receptor de Morte 4 (SEQ ID NO: 5), Receptor de Morte 5 (SEQ ID NO: 6) ou Fas (SEQ ID NO: 8).

3 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, em que a apoptose nas células é desencadeada pelo contato da célula com Apo2L/TRAIL (SEQ ID NO: 7), FasL (SEQ ID NO: 9), um anticorpo agonista de Fas, um anticorpo agonista de DR4 ou um anticorpo agonista de DR5.

4 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 3, em que o método compreende adicionalmente da etapa de uso para se obter informações sobre a eficácia de uma terapia que compreende a administração de Apo2L/TRAIL (SEQ ID NO: 7), FasL (SEQ ID NO: 9), um anticorpo agonista de Fas, um anticorpo agonista de DR4 ou um anticorpo agonista de DR5.

5 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo se liga a um fragmento de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1) e o fragmento de proteína AP2- α ligado pelo anticorpo é de 64 kDa ou 33 kDa.

6 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, em que o
fragmento de proteína ligada pelo anticorpo contém DVFD da SEQ ID NO: 1 ou
GPAA da SEQ ID NO: 1.

7 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, em que a
5 célula é de câncer humano de cólon, colorretal, pulmão, mama, próstata,
bexiga, rim, ovário, cérebro, melanoma, leucemia ou mieloma.

8 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, onde os
fragmentos de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ
ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4) são
10 observados utilizando as técnicas de *immunoblotting*, ensaio imunoadsorvente
enzima-associado ou imuno-histoquímica.

9 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, em que
compreende adicionalmente a análise da expressão de pelo menos um mRNA
nas células de mamíferos.

10 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, em que
compreende adicionalmente a exposição da célula de mamífero a um ou mais
agentes testes antes de contatar a célula com um anticorpo de modo que a
detecção da apoptose nas células de mamíferos identifique um ou mais
agentes de teste como um indutor da apoptose nas células de mamíferos.

11 MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UMA CÉLULA DE
CÂNCER HUMANO, que é susceptível de responder, ou é responsiva a um
agente terapêutico que induz a apoptose na célula de câncer humano,
compreendendo:

A exposição das células de câncer humano ao agente
25 terapêutico;

Examinando as células de câncer expostas ao agente
terapêutico pela presença de fragmentos de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1),
cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina

(SEQ ID NO: 4);

Comparando a quantidade de fragmentos de proteína nas células humanas de câncer com a quantidade de fragmentos de proteína em células controle de câncer humano não expostas ao agente terapêutico; e

5 Uma observação da apoptose nas células de câncer humano identifica as células de câncer humano como susceptíveis, ou responsivas ao agente terapêutico.

12 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, onde o agente terapêutico inicia sinalização do Receptor de Morte 4 (SEQ ID NO: 5),
10 Receptor de Morte 5 (SEQ ID NO: 6) ou Fas (SEQ ID NO: 8).

13 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, em que os fragmentos de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4) são observados utilizando as técnicas de *immunoblotting*, ensaio imunoadsorvente
15 enzima-associado ou imuno-histoquímica.

14 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, em que compreende ainda a análise da expressão de pelo menos um mRNA nas células de câncer humano.

15 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, em que
20 compreende ainda a análise da expressão de pelo menos dois mRNA diferentes nas células de câncer humano.

16 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, em que é uma célula de câncer humano de cólon, colorretal, pulmão, mama, próstata, bexiga, rim, ovário, cérebro, melanoma, leucemia ou mieloma.

25 17 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, em que a apoptose na célula de câncer humano é iniciada pelo contato da célula com um Apo2L/TRAIL (SEQ ID NO: 7), FasL (SEQ ID NO: 9), um anticorpo agonista de Fas, um anticorpo agonista de DR4 ou um anticorpo agonista de DR5.

18 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, em que a célula de câncer humano é obtida a partir de uma biópsia e foi cultivada em cultura *in vitro* por menos de um mês.

19 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, em que o
5 fragmento de proteína é um fragmento de proteína da AP2- α contendo a DVFD da SEQ ID NO: 1 ou GPAA da SEQ ID NO: 1.

20 KIT PARA OBSERVAR A APOPTOSE, em uma célula de mamíferos, o kit compreende:

(a) um primeiro anticorpo que se liga a um fragmento de
10 proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4);

(b) um segundo anticorpo que se liga a um fragmento de proteína AP2- α (SEQ ID NO: 1), cadeia pesada de clatrina (SEQ ID NO: 2), AP1/2 β (SEQ ID NO: 3) ou dinamina (SEQ ID NO: 4), em que primeiro e o
15 segundo anticorpo não se ligam a mesma proteína.

(c) um recipiente para (a) e (b); e

(d) instruções para o uso do anticorpo no kit para observar a apoptose em célula de mamíferos.

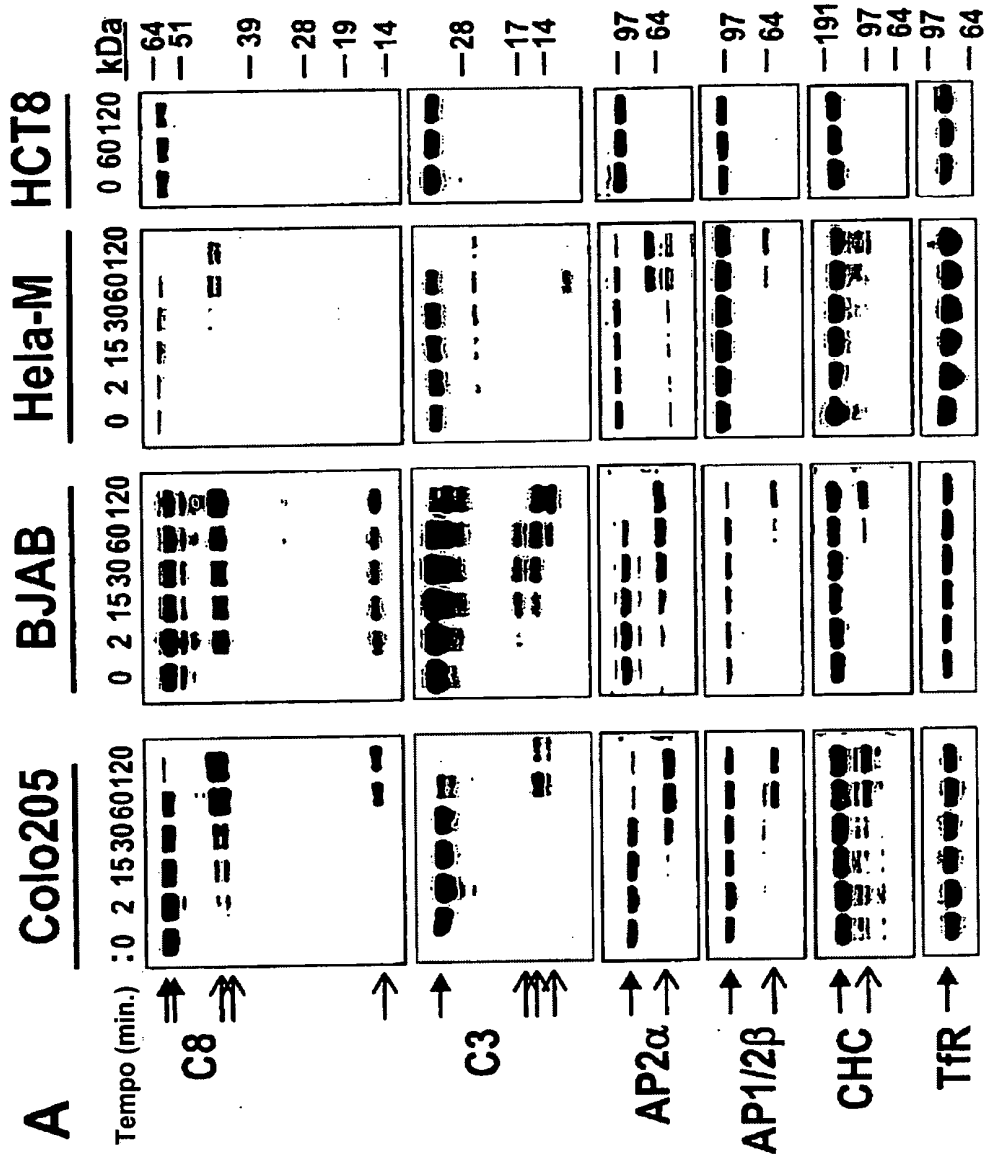


Fig. 1

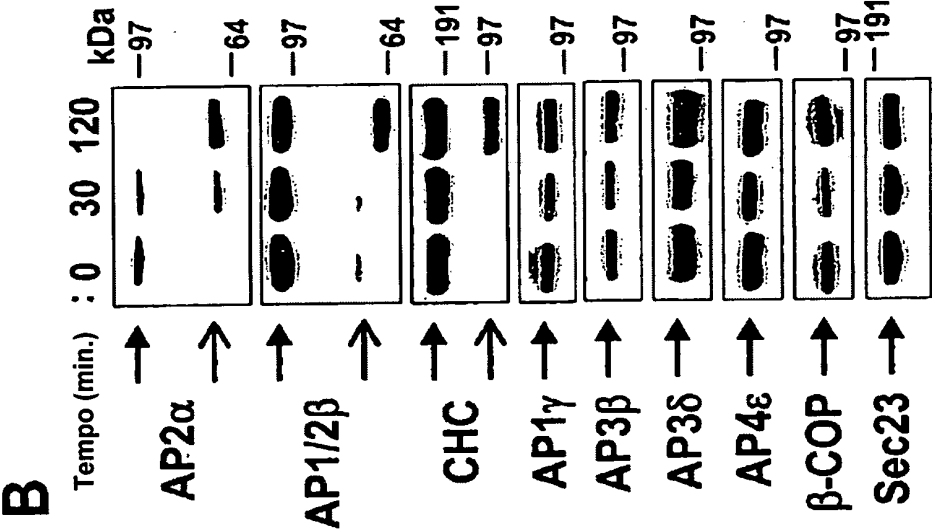


Fig. 1

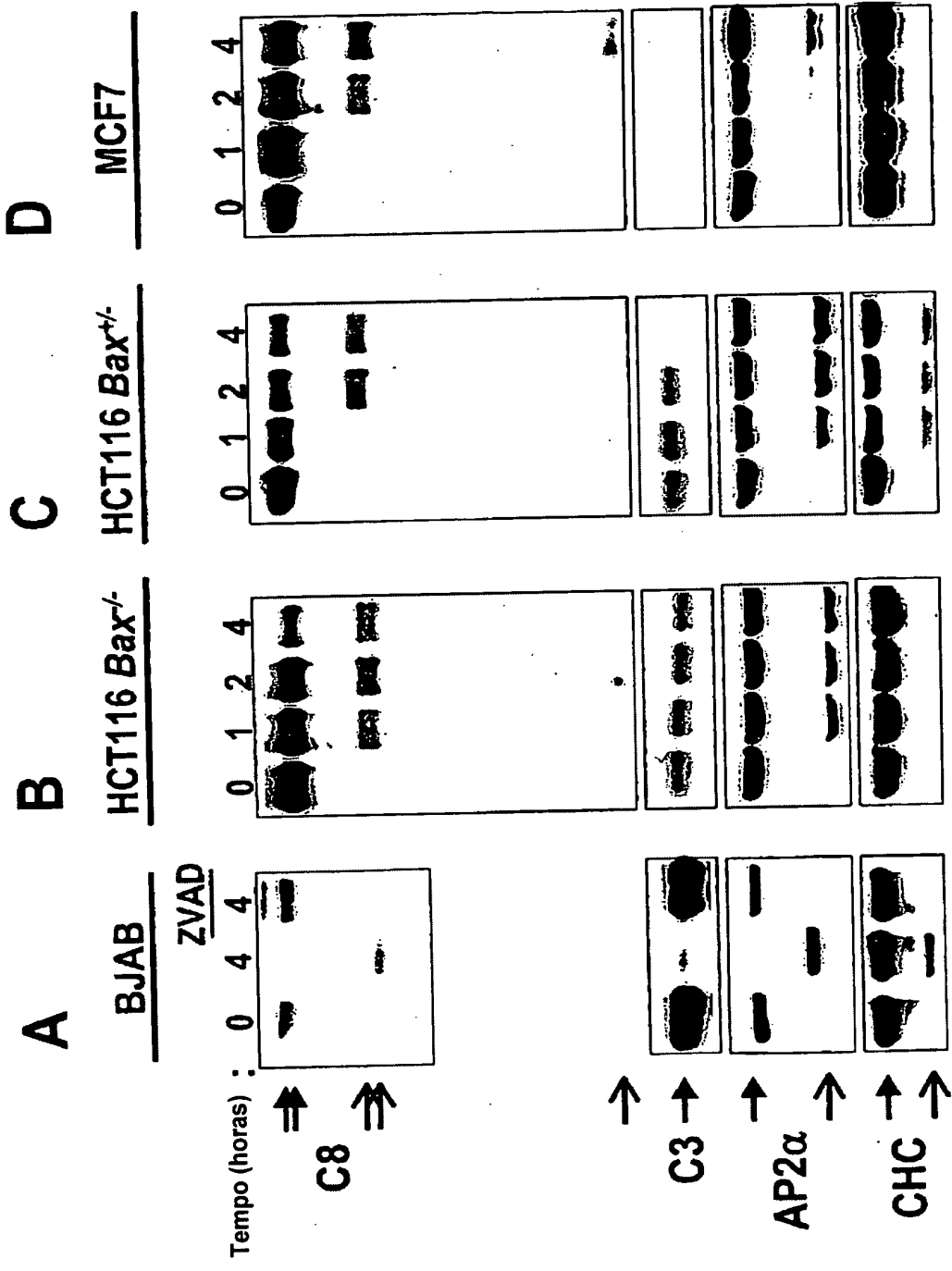
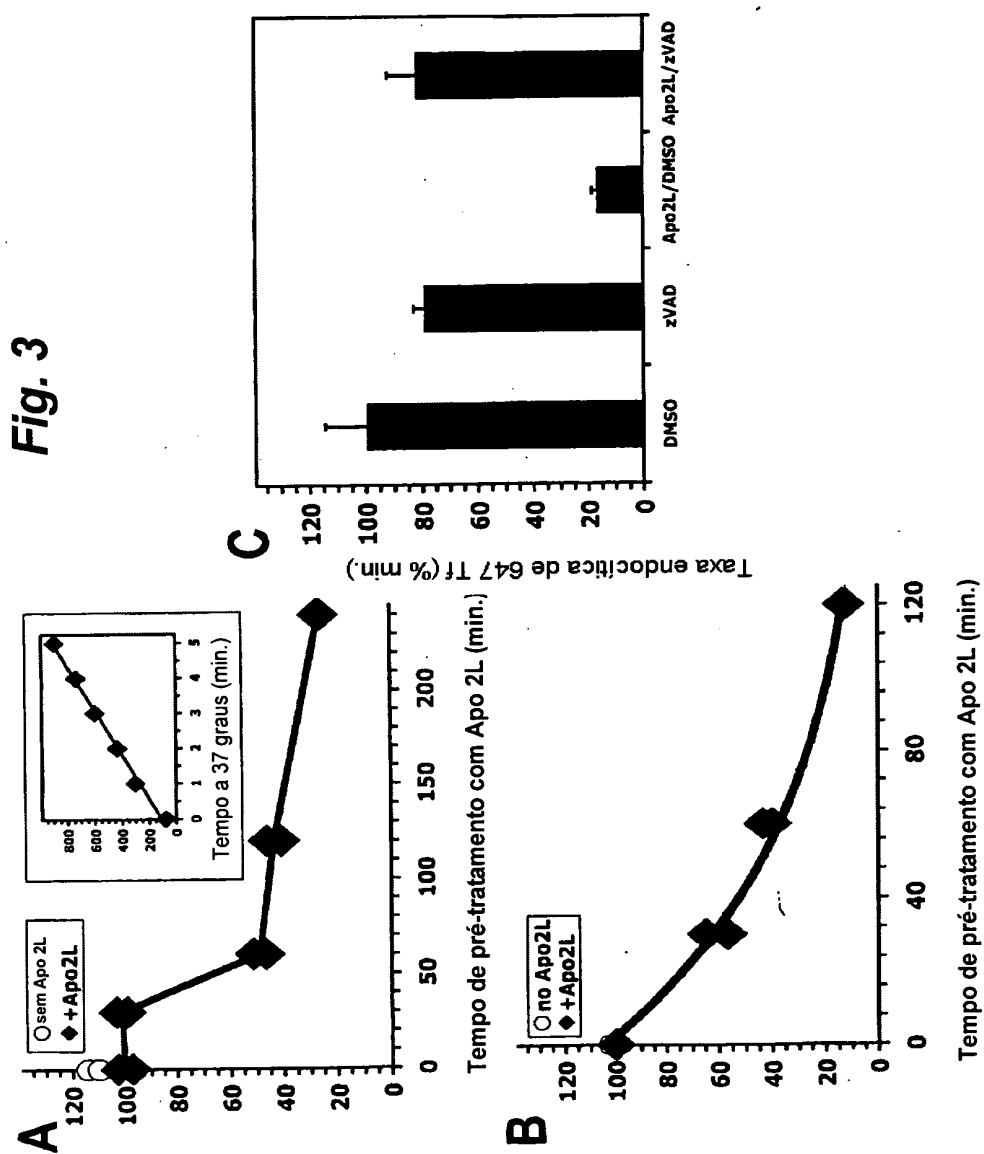
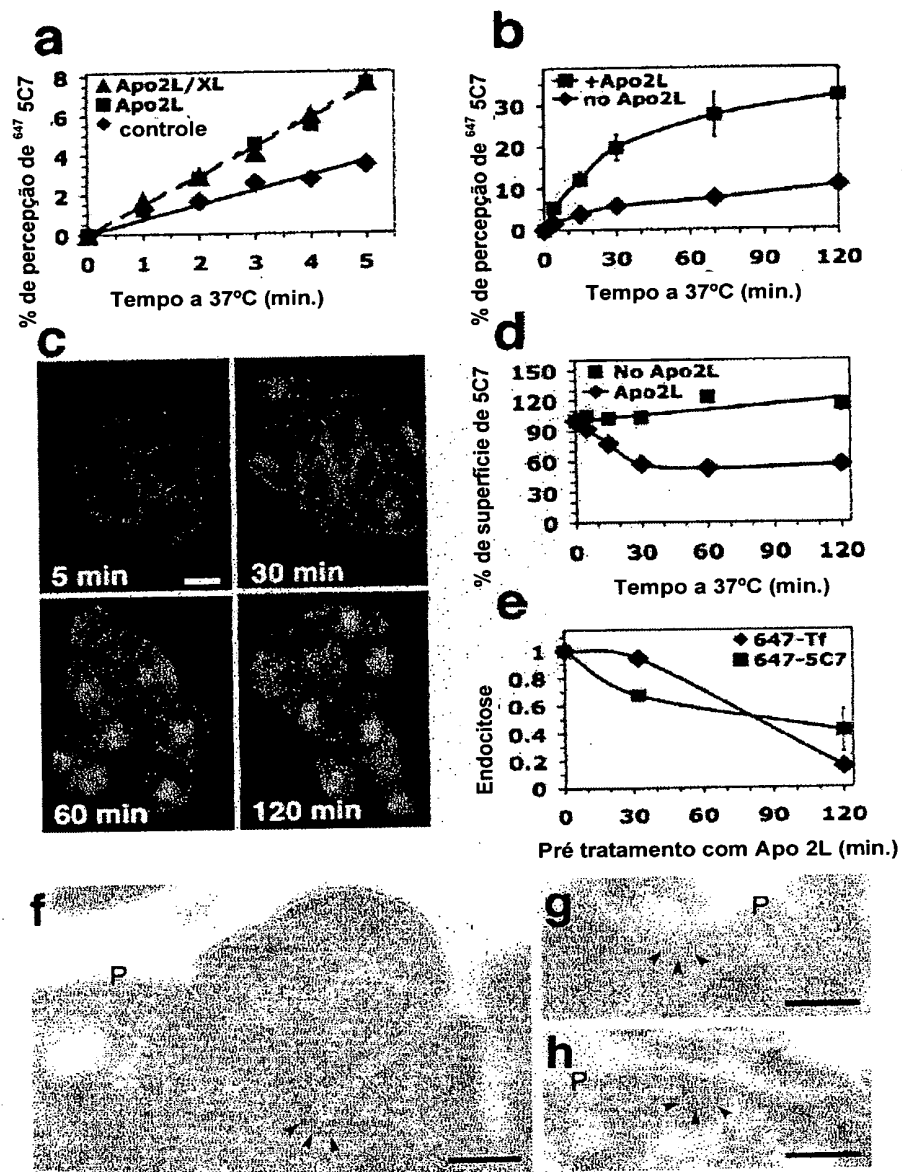


Fig. 2



**Fig. 4**

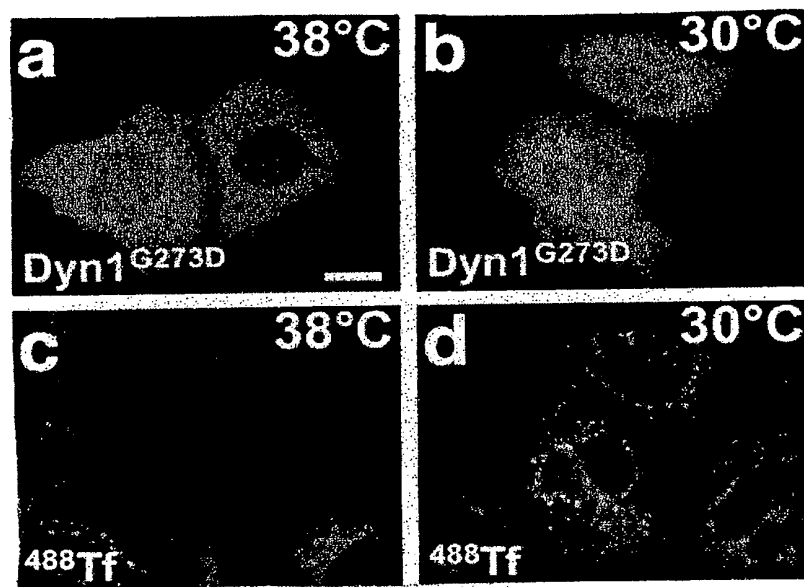
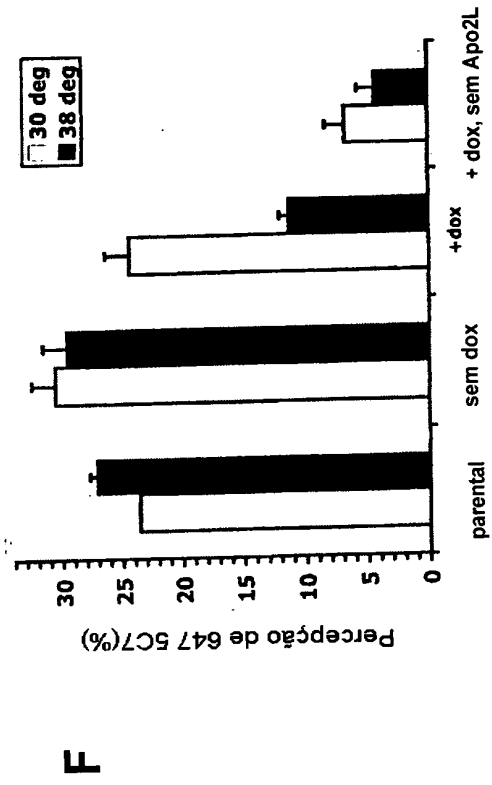
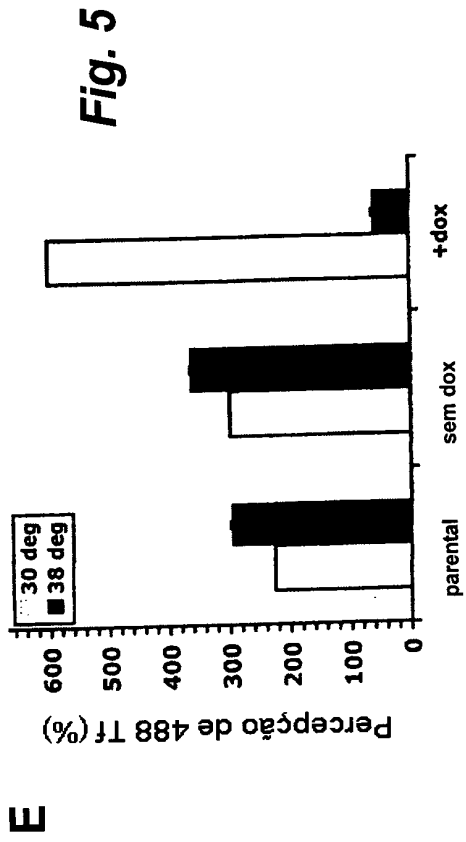


Fig. 5



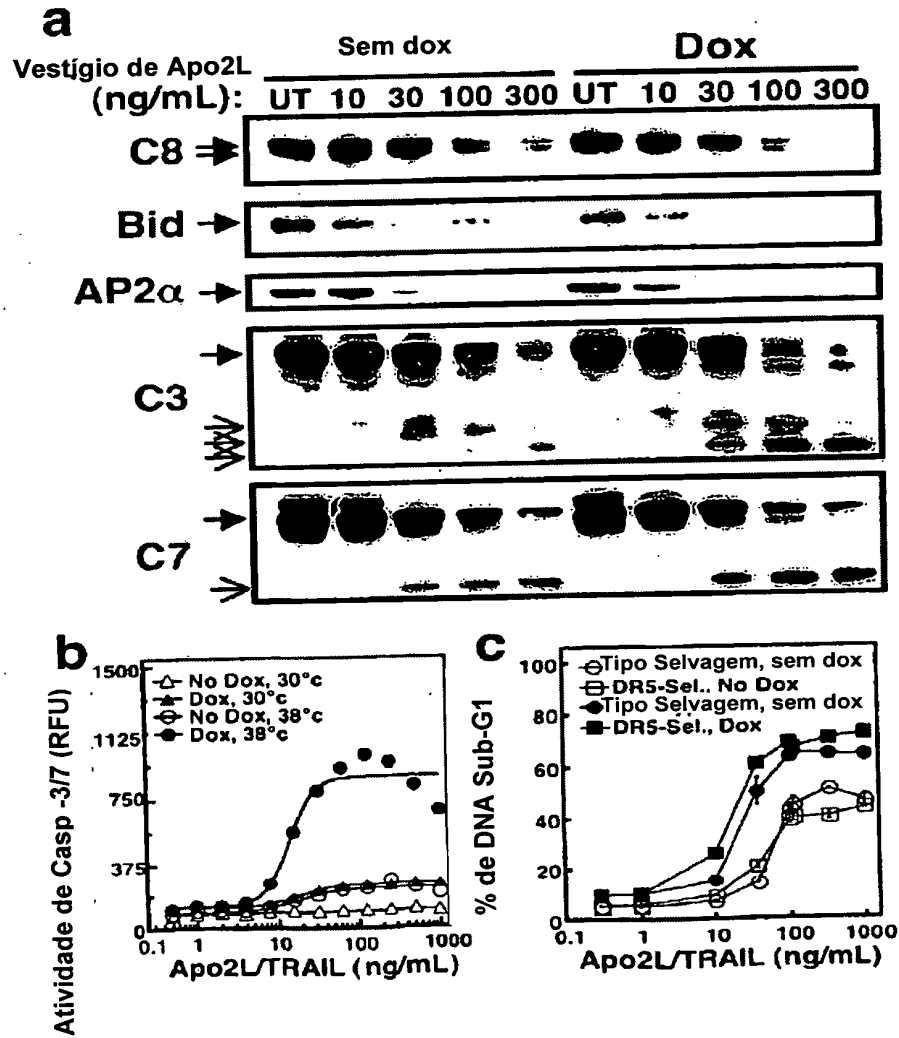
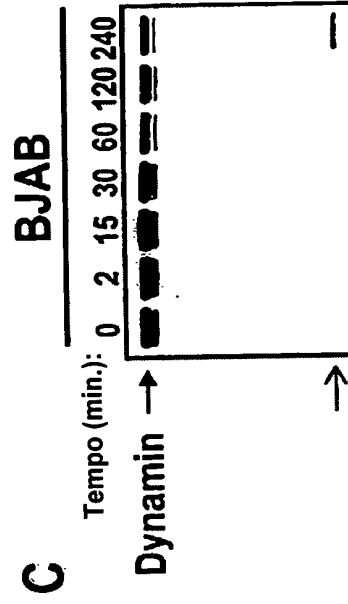


Fig. 6

Fig. 7



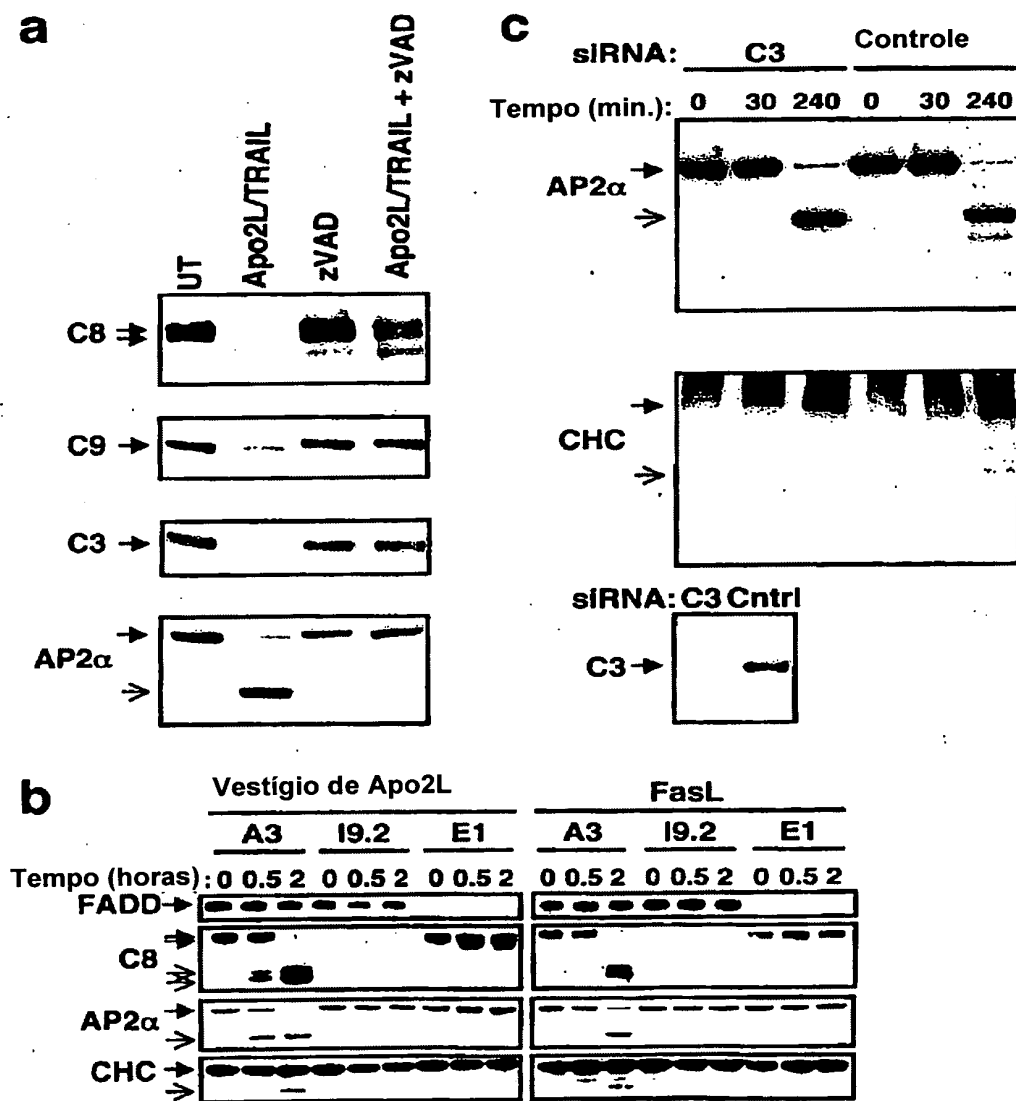


Fig. 8

A Divisão
 ↓
 ...DVEDGPAAQPSLGPTEEAFLSPGEDIGPPIPEADELLNKFVCKNNGVLFENQLLQIGVKSEFRQNLGRMYLF
 YGNKTSVQFQNFSPVWHPGDLQTQLAVQTKRVAQAQVDGGAQVQVQLNIECLRDFTLTPLLSVFRYGGAPQAL
 TLKLPVTINKFFQPTEMAQAQDFFQRWKQLSLPQQAQKIFKANHPMDAEVTKAKLLGFGSALLDNVDPNPNFVG
 AGIIQTKALQVGCLLRLEPNAQAQMYRLTLRTSKEPVSRHLCELLAQQF

11/14

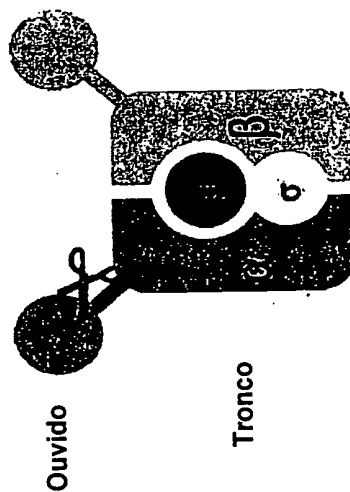


Fig. 9

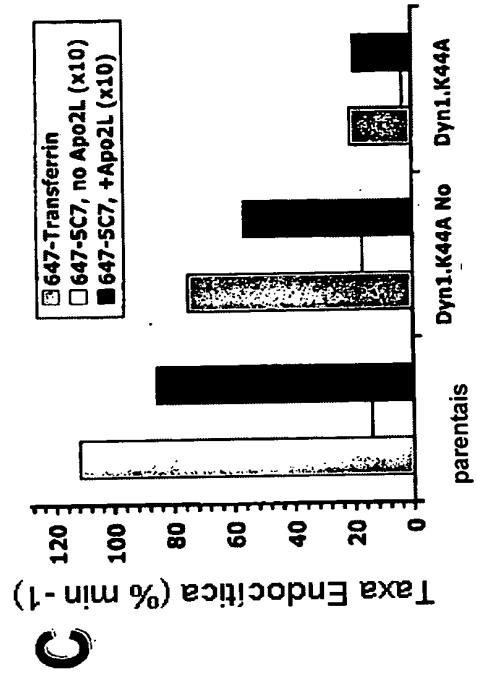
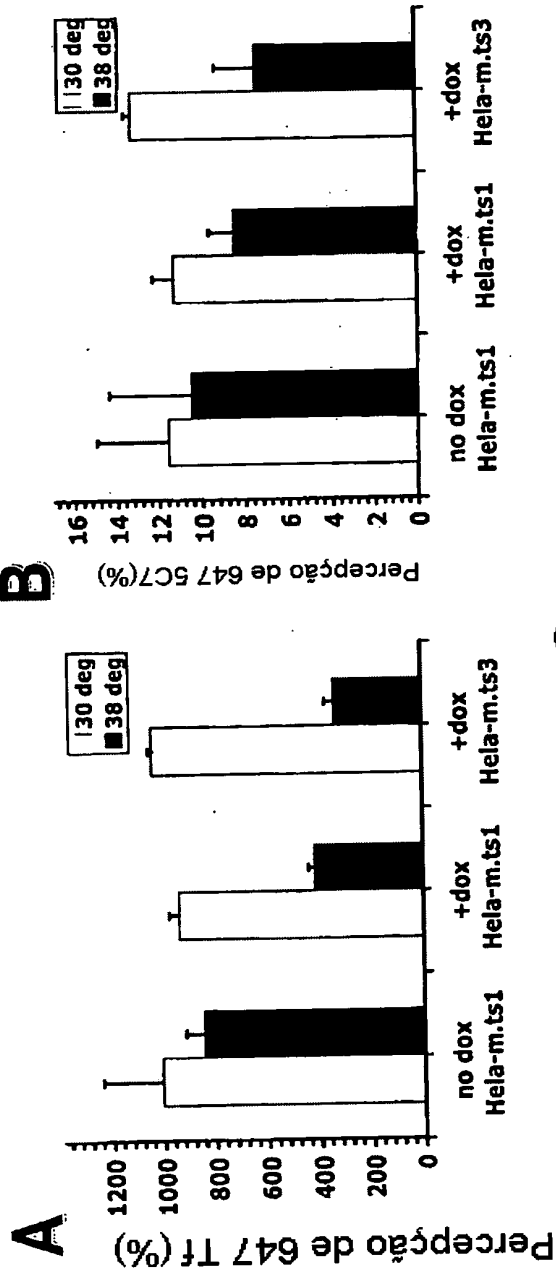


Fig. 10

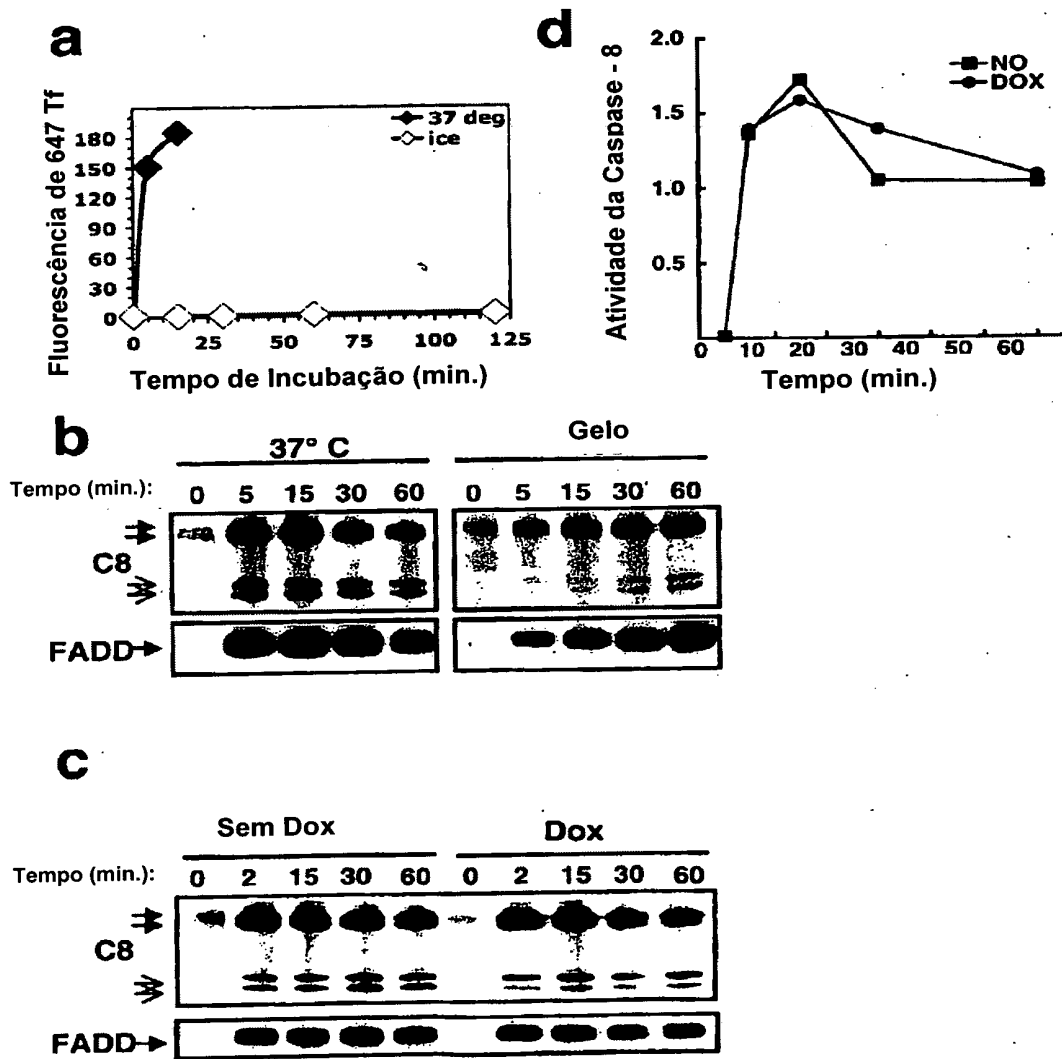


Fig. 11

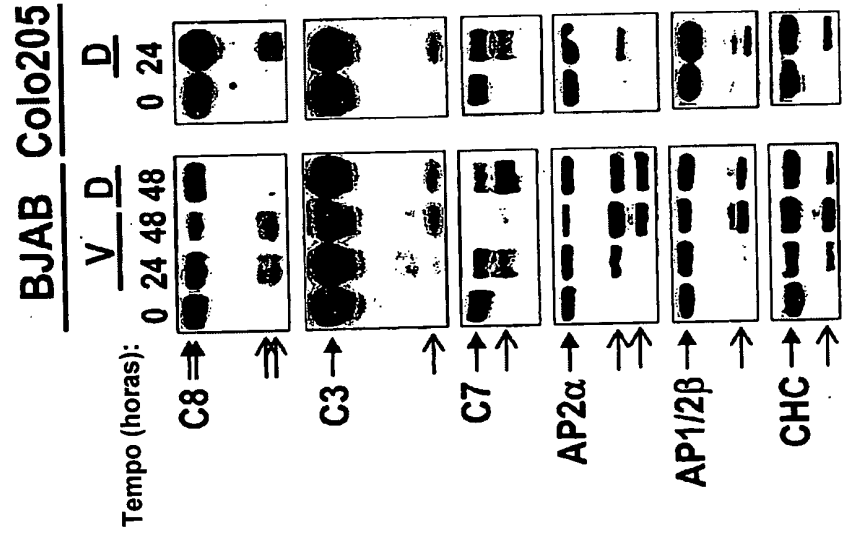


Fig. 12

RESUMO**“MÉTODO PARA A DETECÇÃO DA APOPTOSE, MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UMA CÉLULA DE CÂNCER HUMANO E KIT PARA OBSERVAR A APOPTOSE”**

5 A invenção fornece materiais e métodos para observação de fragmentos de proteínas produzidos durante a apoptose a fim de observar esse processo em células de mamíferos. Exemplos de realizações da presente invenção podem ser utilizados, por exemplo, para observar apoptose a fim de examinar a sensibilidade de uma célula de câncer de mamífero a agentes

10 indutores da apoptose.