



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 037**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05788528 .7**
96 Fecha de presentación : **03.08.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1774037**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2007**

54 Título: **Ensayos y métodos usando biomarcadores.**

30 Prioridad: **06.08.2004 US 599393 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.09.2011

73 Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 Dna Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72 Inventor/es: **Wagner, Klaus W. y**
Ashkenazi, Avi J.

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

DESCRIPCIÓN

Ensayos y métodos usando biomarcadores

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La invención descrita en este documento se refiere a procedimientos y ensayos para detectar biomarcadores predictivos de sensibilidad de células de mamífero a Apo2L/TRAIL y/o anticuerpos agonistas de receptores de muerte.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] En la materia se han identificado diversos ligandos y receptores que pertenecen a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). Entre tales ligandos están incluidos factor de necrosis tumoral-alfa ("TNF-alfa"), factor de necrosis tumoral-beta ("TNF-beta" o "linfotóxina-alfa"), linfotóxina-beta ("LT-beta"), ligando CD30, ligando CD27, ligando CD40, ligando OX-40, ligando 4-18B, LIGHT, ligando Apo-1 (también denominado en lo sucesivo ligando Fas o ligando CD95), ligando Apo-2 (también denominado en lo sucesivo Apo2L o TRAIL), ligando Apo-3 (también denominado en lo sucesivo TWEAK), APRIL, ligando OPG (también denominado en lo sucesivo ligando RANK, ODF o TRANCE) y TALL-1 (también denominado en lo sucesivo BlyS, BAFF o THANK) (véanse, por ejemplo, Ashkenazi, Nature Review, 2:420-430 (2002); Ashkenazi y Dixit, Science, 281:1305-1308 (1998); Ashkenazi y Dixit, Curr. Opin. Cell Biol., 11:255-260 (2000); Golstein, Curr. Biol., 7:750-753 (1997) Wallach, Cytokine Reference, Academic Press, 2000, páginas 377-411; Locksley y col., Cell, 104:487-501 (2001); Gruss y Dower, Blood, 85:3378-3404 (1995); Schmid y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 83:1881 (1986); Dealtry y col., Eur. J. Immunol., 17:689 (1987); Pitti y col., J. Biol. Chem., 271:12687-12690 (1996); Wiley y col., Immunity, 3:673-682 (1995); Browning y col., Cell, 72:847-856 (1993); Armitage y col. Nature, 357:80-82 (1992); documento WO 97/01633 publicado el 16 de enero de 1997; documento WO 97/25428 publicado el 17 julio de 1997; Marsters y col., Curr. Biol., 8:525-528 (1998); Chicheportiche y col., Biol. Chem., 272:32401-32410 (1997); Hahne y col., J. Exp. Med., 188:1185-1190 (1998); documento WO98/28426 publicado el 2 de julio de 1998; documento WO98/46751 publicado el 22 de octubre de 1998; documento WO/98/18921 publicado el 7 de mayo de 1998; Moore y col., Science, 285:260-263 (1999) : Shu y col., J. Leukocyte Biol., 65:680 (1999) : Schneider y col., J. Exp. Med., 189:1747-1756 (1999); Mukhopadhyay y col., J. Biol. Chem., 274:15978-15981 (1999)).

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

[0004] La mayoría de estos miembros de la familia de receptores de TNF comparten la estructura típica de los receptores de la superficie celular que incluyen las regiones extracelular, transmembranaria e intracelular, mientras que los otros se encuentran naturalmente como proteínas solubles que carecen de un dominio transmembranario e intracelular. La porción extracelular de los TNFR típicos contiene un patrón repetitivo de secuencias de aminoácidos de múltiples dominios ricos en cisteína (CRD) a partir del extremo NH₂.

[0005] El ligando denominado en lo sucesivo Apo-2L o TRAIL se identificó hace varios años como un miembro de la familia de TNF de citocinas. (véanse, por ejemplo, Wiley y col., *Immunity*, 3:673-682 (1995); Pitti y col., *J. Biol. Chem.*, 271:12697-12690 (1996); documento WO 97/01633; documento WO 97/25428; patente de EE.UU. 5.763.223 concedida el 9 de junio de 1998; patente de EE.UU. 6.284.236 concedida el 4 de septiembre de 2001). El polipéptido Apo2L/TRAIL humano de secuencia nativa de longitud completa tiene 281 aminoácidos de longitud, proteína transmembranaria tipo II. Algunas células pueden producir una forma soluble natural del polipéptido mediante escisión enzimática de la región extracelular del polipéptido (Mariani y col., *J. Cell. Biol.*, 137:221-229 (1997)). Los estudios cristalográficos de formas solubles de Apo2L/TRAIL revelan una estructura homotrimérica similar a las estructuras de TNF y otras proteínas relacionadas (Hymowitz y col., *Molec. Cell*, 4:563-571 (1999); Cha y col., *Immunity*, 11:253-261 (1999); Mongkolsapaya y col., *Nature Structural Biology*, 6:1048 (1999); Hymowitz y col., *Biochemistry*, 39:633-644 (2000)). Sin embargo, se encontró que Apo2L/TRAIL, a diferencia de otros miembros de la familia de TNF, tenía una característica estructural única en la que tres residuos de cisteína (en la posición 230 de cada subunidad en el homotrímero) se coordinan juntos con un átomo de cinc, y que la unión del cinc es importante para la estabilidad y actividad biológica del trímero (Hymowitz y col., arriba; Bodmer y col., *J. Biol. Chem.*, 275:20632-20637 (2000)).

[0006] En la bibliografía se ha informado que Apo2L/TRAIL puede desempeñar una función en la modulación del sistema inmunitario que incluye enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide [véanse, por ejemplo, Thomas y col., *J. Immunol.*, 161:2195-2200 (1998); Johnsen y col., *Cytokine*, 11:664-672 (1999); Griffith y col., *J. Exp. Med.*, 189:1343-1353 (1999); Song y col., *J. Exp. Med.*, 191:1095-1103 (2000)].

[0007] También se ha informado de las formas solubles de Apo2L/TRAIL inducen apoptosis en una variedad de células cancerosas que incluyen tumores de colon, pulmón, mama, próstata, vejiga, riñón, ovario y cerebral, además de melanoma, leucemia y mieloma múltiple (véanse, por ejemplo, Wiley y col., arriba; Pitti y col., arriba; patente de EE.UU. 6.030.945 concedida el 29 de febrero de 2000; patente de EE.UU. 6.746.668 concedida el 8 de junio de 2004; Rieger y col., *FEBS Letters*, 427:124-128 (1998); Ashkenazi y col., *J. Clin. Invest.*, 104:155-162 (1999); Walczak y col., *Nature Med.*, 5:157-163 (1999); Keane y col., *Cancer Research*, 59:734-741 (1999); Mizutani y col., *Clin. Cancer Res.*, 5:2605-2612 (1999); Gazitt, *Leukemia*, 13:1817-1824 (1999); Yu y col., *Cancer Res.*, 60:2384-2389 (2000); Chinnaiyan y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:1754-1759 (2000)). Los estudios *in vivo* en modelos de tumor murino sugieren adicionalmente que Apo2L/TRAIL, solo o en combinación con quimioterapia o radioterapia, puede ejercer efectos antitumorales sustanciales (véase, por ejemplo, Ashkenazi y col., arriba; Walczak y col., arriba; Gliniak y col., *Cancer Res.*, 59:6153-6158 (1999); Chinnaiyan y col., arriba; Roth y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 265:1999 (1999); documento WO 00/75191 (solicitud PCT US/00/15512); documento WO 02/09755 (solicitud PCT US/01/23691)). A diferencia de muchos tipos de células cancerosas, la mayoría de los tipos de células humanas normales parecen ser resistentes a inducción de apoptosis por ciertas formas recombinantes de Apo2L/TRAIL (Ashkenazi y col., arriba; Walczak y col., arriba). Jo y col. han informado que una forma soluble de Apo2L/TRAIL marcada con polihistidina indujo apoptosis *in vitro* en hepatocitos humanos aislados normales, pero no en no humanos (Jo y col., *Nature Med.*, 6:564-567 (2000); véase también Nagata, *Nature Med.*, 6:502-503 (2000)). Se cree que ciertas preparaciones de Apo2L/TRAIL recombinante pueden variar en términos de propiedades bioquímicas y actividades biológicas en células enfermas frente a normales dependiendo, por ejemplo, de la presencia o ausencia de una molécula de marca, contenido de cinc y contenido de trímero en % (véase, Lawrence y col., *Nature Med.*, Letter to the Editor, 7:383-385 (2001); Qin y col., *Nature Med.*, Letter to the Editor, 7:385-386 (2001)).

[0008] Se ha encontrado que Apo2L/TRAIL se une a al menos cinco receptores diferentes. Al menos dos de los receptores que se unen a Apo2L/TRAIL contienen un dominio de muerte citoplásmica funcional. Un receptor tal se ha denominado en lo sucesivo "DR4" (y alternativamente TR4 o TRAIL-R1) (Pan y col., *Science*, 276:111-113 (1997); véanse también el documento WO98/32856 publicado el 30 julio de 1998; el documento WO99/37684 publicado el 29 julio de 1999; el documento WO 00/73349 publicado el 7 de diciembre de 2000; el documento US 6.433.147 concedido el 13 de agosto de 2002; el documento US 6.461.823 concedido el 8 de octubre de 2002 y el documento US 6.342.383 concedido el 29 de enero de 2002).

[0009] Otro receptor tal para Apo2L/TRAIL se ha denominado en lo sucesivo DR5 (también se ha denominado alternativamente en lo sucesivo Apo-2; TRAIL-R o TRAIL-R2, TR6, Tango-63, hAPO8, STRICK2 o KILLER) (véanse, por ejemplo, Sheridan y col., *Science*, 277:818-821 (1997), Pan y col., *Science*, 277:815-818 (1997), el documento WO98/51793 publicado el 19 de noviembre de 1998; el documento WO98/41629 publicado el 24 septiembre de 1998; Screaton y col., *Curr. Biol.*, 7:693-696 (1997); Walczak y col., *EMBO J.*, 16:5386-5387 (1997); Wu y col., *Nature Genetics*, 17:141-143 (1997); el documento WO98/35986 publicado el 20 de agosto de 1998; el documento EP870.827 publicado el 14 de octubre de 1998; el documento WO98/46643 publicado el 22 de octubre de 1998; el

documento WO99/02653 publicado el 21 de enero de 1999; el documento WO99/09165 publicado el 25 de febrero de 1999; el documento WO99/11791 publicado el 11 de marzo de 1999; el documento US 2002/0072091 publicado el 13 de agosto de 2002; el documento US 2002/0098550 publicado el 7 de diciembre de 2001; el documento US 6.313.269 concedido el 6 de diciembre de 2001; el documento US 2001/0010924 publicado el 2 de agosto de 2001; el documento US 2003/01255540 publicado el 3 de julio de 2003; el documento US 2002/0160446 publicado el 31 de octubre de 2002, el documento US 2002/0048785 publicado el 25 de abril de 2002; el documento US 6.342.369 concedido en febrero de 2002; el documento US 6.569.642 concedido el 27 de mayo de 2003, el documento US 6.072.047 concedido el 6 de junio de 2000, el documento US 6.642.358 concedido el 4 de noviembre de 2003; el documento US 6.743.625 concedido el 1 de junio de 2004). Al igual que DR4, se informa que DR5 contiene un dominio de muerte citoplásmica y que puede señalar apoptosis tras la unión al ligando (o tras la unión a una molécula tal como un anticuerpo agonista que imite la actividad del ligando). La estructura cristalina del complejo formado entre Apo-2L/TRAIL y DR5 se describe en Hymowitz y col., *Molecular Cell*, 4:563-571 (1999).

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

[0011] Se ha informado que Apo2L/TRAIL también se une a aquellos receptores denominados en lo sucesivo DcR1, DcR2 y OPG que se cree que funcionan de inhibidores, en vez de transductores de la señalización (véanse, por ejemplo, DCR1 (también denominado en lo sucesivo TRID, LIT o TRAIL-R3) [Pan y col., *Science*, 276:111-113 (1997); Sheridan y col., *Science*, 277:818-821 (1997); McFarlane y col., *J. Biol. Chem.*, 272:25417-25420 (1997); Schneider y col., *FEBS Letters*, 416:329-334 (1997); Degli-Esposti y col., *J. Exp. Med.*, 186:1165-1170 (1997); y Mongkolsapaya y col., *J. Immunol.*, 160:3-6 (1998); DCR2 (también llamado TRUNDD o TRAIL-R4) [Marsters y col., *Curr. Biol.*, 7:1003-1006 (1997); Pan y col., *FEBS Letters*, 424:41-45 (1998); Degli-Esposti y col., *Immunity*, 7:813-820 (1997)] y OPG [Simonet y col., arriba]. A diferencia de DR4 y DR5, los receptores DcR1 y DcR2 no señalizan apoptosis.

[0012] En la bibliografía se ha informado de ciertos anticuerpos que se unen a los receptores DR4 y/o DR5. Por ejemplo, los anticuerpos anti-DR4 dirigidos contra el receptor DR4 y que tienen actividad agonista o apoptótica en ciertas células de mamífero se describen en, por ejemplo, el documento WO 99/37684 publicado el 29 de julio de 1999; el documento WO 00/73349 publicado el 12 de julio de 2000; el documento WO 03/066661 publicado el 14 de agosto de 2003. Véanse también, por ejemplo, Griffith y col., *J. Immunol.*, 162:2597-2605 (1999); Chuntharapai y col., *J. Immunol.*, 166:4891-4898 (2001); el documento WO 02/097033 publicado el 2 de diciembre de 2002; el documento WO 03/042367 publicado el 22 de mayo de 2003; el documento WO 03/038043 publicado el 8 de mayo de 2003; el documento WO 03/037913 publicado el 8 de mayo de 2003. Asimismo se han descrito ciertos anticuerpos anti-DR5, véanse, por ejemplo, el documento WO 98/51793 publicado el 8 de noviembre de 1998; Griffith y col., *J. Immunol.*, 162:2597-2605 (1999); Ichikawa y col., *Nature Med.*, 7:954-960 (2001); Hilander y col., "An Antibody to DR5 (TRAIL-Receptor 2) Suppresses the Growth of Patient Derived Gastrointestinal Tumors Grown in SCID mice", resumen, 2º Congreso internacional de anticuerpos monoclonales en cánceres, 29 de agosto-1 de septiembre de 2002, Banff, Alberta, Canadá; el documento WO 03/038043 publicado el 8 de mayo de 2003; el documento WO 03/037913 publicado el 8 de mayo de 2003. Además, se han descrito ciertos anticuerpos que tienen reactividad cruzada con tanto receptores DR4 como DR5 (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.252.050 concedida el 26 de junio de 2001).

[0013] La transformación neoplásica de algunas células de mamífero se ha asociado en ciertos casos a cambios característicos en la expresión de antígenos Sialyl Lewis A y Sialyl Lewis X. Están presentes cantidades relativamente altas de Sialyl Lewis A/X, por ejemplo, en algunos adenocarcinomas humanos de colon, páncreas y estómago, y se han empleado ensayos usando anticuerpos dirigidos contra las estructuras de hidratos de carbono sobre estos antígenos como medio para detectar cánceres pancreáticos y gastrointestinales (véase, por ejemplo, Ugorski y col., *Acta Biochimica Polonica*, 49:2:303-311 (2002)). El nivel de expresión de estos marcadores tumorales de hidratos de carbono también ha guardado relación con el resultado clínico, los tiempos de supervivencia del paciente y un indicador de enfermedad metastásica.

[0014] Se ha mostrado que tanto Sialyl Lewis A como Sialyl Lewis X se unen a una familia de proteínas de unión a hidratos de carbono que participan en la extravasación de células de la circulación sanguínea llamadas las selectinas. Algunos informes sugieren que Sialyl Lewis A y X son ligandos para E-selectina y pueden ser responsables de la adhesión de células cancerosas humanas al endotelio. Las estructuras de Lewis sialiladas presentes sobre la superficie de células cancerosas son llevadas por las cadenas de hidratos de carbono de

glicoproteínas y glicolípidos y se unen a la E-selectina presente sobre células endoteliales. Por consiguiente, las selectinas y sus ligandos de hidrato de carbono pueden desempeñar una función importante en la recirculación selectiva de células tumorales durante la metástasis.

- 5 **[0015]** Se cree que la biosíntesis de Sialyl Lewis A y X es dependiente de la adición final de fucosa de guanosina-difosfato-fucosa (GDP-Fuc) en el enlace alfa (1,3) y alfa (1,4) a precursores sialilados mediante enzimas específicas del tipo de célula y específicas de la fase de desarrollo, una etapa catalizada por alfa-1,3/1,4-fucosiltransferasas (alfa 1,3/1,4 Fuc-T, FUT).
- 10 **[0016]** Hasta la fecha se han clonado y caracterizado varios genes de fucosiltransferasa humana. La expresión de estos genes (FUT 3-7) y sus productos enzimáticos (Fuc-TIII-VII) parecen ser específica de tejido. Las enzimas codificadas por los cinco genes se llaman FUTIII, FUTIV, FUTV, FUTVI y FUTVII. Los tres genes que codifican FUTIII, FUTV y FUTVI están localizados en posiciones físicas próximas sobre el cromosoma 19p13.3. Los estudios bioquímicos y de clonación molecular sugieren que la expresión específica de linaje del resto de Sialyl
- 15 Lewis A/X se determina por expresión específica de linaje de genes alfa-1,3-fucosiltransferasa cuyos productos enzimáticos operan en precursores de oligosacáridos constitutivamente expresados para dar determinantes de Sialyl Lewis A/X localizados en la superficie. Las fucosiltransferasas humanas responsables de la actividad en tejidos epiteliales son FUT3 y FUT6. Los transcritos de FUT3 [también llamados el gen alfa(1,3/1,4)fucosiltransferasa de Lewis] y FUT6 [el gen alfa(1,3)fucosiltransferasa en plasma] están presentes tanto en tejidos normales como
- 20 transformados. Los transcritos de fucosiltransferasa también son frecuentes en numerosas líneas celulares de adenocarcinoma con expresión notablemente alta de FUT3 y 6 en carcinoma de colon (véanse, por ejemplo, Ugorski y col., Acta Biochimica Polonica, 49:303-311 (2002); Nakamori y col., Dis. Colon Rectum., 40:420-431 (1997); Takada y col., Cancer Res., 53:354-361 (1993); Ichikawa y col., J. Surg. Oncol., 75:98-102 (2000)); Nakagoe y col., J Exp Clin Cancer Res., marzo de 2002; 21(1):107-13; Matsumoto y col., Br J Cancer. 21 de enero de 2002; 86(2):161-
- 25 7; Ito y col., J Gastroenterol. Diciembre de 2001; 36(12):823-9; Nakagoe y col., Cancer Detect Prev. 2001; 25(3):299-308; Kumamoto y col., Cancer Res. 1 de junio de 2001; 61(11):4620-7; Murata y col., Dis Colon Rectum. Abril de 2001; 44(4):A2-A4; Nakagoe y col., J Exp Clin Cancer Res. Marzo de 2001; 20(1):85-90; Nakagoe y col., J Gastroenterol. Marzo de 2001; 36(3):166-72; Nakagoe y col., Tumour Biol. Marzo-Abril de 2001; 22(2):115-22; Nakagoe y col., Can J Gastroenterol. Octubre de 2000; 14 (9):753-60; Izawa y col., Cancer Res. 1 de marzo de
- 30 2000; 60(5):1410-6; Tanaka y col., Hepatogastroenterology. Marzo-Abril de 1999; 46(26):875-82; Matsushita y col., Cancer Lett. 27 de noviembre de 1998; 133(2):151-60; Sato y col., Anticancer Res. Septiembre-Octubre de 1997; 17(5A):3505-11; Yamada y col., Br J Cancer. 1997; 76(5):582-7; Nakamori y col., Dis Colon Rectum. Abril de 1997; 40(4):420-31; Srinivas y col., Scand J Immunol. Septiembre de 1996; 44(3):197-203; Matsushita y col., Lab Invest. Diciembre de 1990; 63(6):780-91; Ashizawa y col., J Exp Clin Cancer Res. Marzo de 2003; 22(1):91-8; Nakagoe y
- 35 col., J Exp Clin Cancer Res. Septiembre de 2002; 21(3):363-9; Nakagoe y col., Anticancer Res. Enero-Febrero de 2002; 22 (1A):451-8; Nakagoe y col., J Clin Gastroenterol. Abril de 2002; 34(4):408-15; Nakagoe y col., Cancer Lett. 25 de enero de 2002; 175(2):213-21; Tatsumi y col., Clin Exp Metastasis. Noviembre de 1998; 16(8):743-50; Ikeda y col., J Surg Oncol. Julio de 1996; 62(3):171-6; Ikeda y col., Eur J Surg Oncol. Abril de 1995; 21(2):168-75; Togayachi y col., Int J Cancer. 24 de septiembre de 1999; 83(1):70-9; Satoh y col., Clin Cancer Res. Abril de 1997; 3(4):495-9;
- 40 Satoh y col., Respiration. 1998; 65(4):295-8; Satoh y col., Anticancer Res. Julio-Agosto de 1998; 18(4B):2865-8; Fukuoka y col., Lung Cancer. Mayo de 1998; 20(2):109-16; Fujiwara y col., Anticancer Res. Marzo-Abril de 1998; 18(2A):1043-6; Ogawa y col., Int J Cancer. 22 de abril de 1997; 74(2):189-92; Ogawa y col., J Thorac Cardiovasc Surg. Agosto de 1994; 108(2):329-36; Asao y col., Cancer. 15 de diciembre de 1989; 64(12):2541-5; Narita y col., Breast Cancer. 29 de marzo de 1996; 3(1):19-23; Yamaguchi y col., Oncology. Julio-Agosto de 1998; 55(4):357-62;
- 45 Sikut y col., Int J Cancer. 29 de mayo de 1996; 66(5):617-23; Saito y col., Anticancer Res. Julio-Agosto de 2003; 23(4):3441-6; Fujii y col., Urol Int. 2000; 64(3):129-33; Idikio y col., Glycoconj J. Noviembre de 1997; 14(7):875-7; Inoue y col., Obstet Gynecol. Marzo de 1992; 79(3):434-40; Yamashita y col., Eur J Cancer. Enero de 2000; 36(1):113-20; Hamaoka y col., Pancreas. Agosto de 1996; 13(2):160-5; Ho y col., Cancer Res. 15 de agosto de 1995; 55(16):3659-63.

50

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

- [0017]** La invención desvelada en este documento proporciona procedimientos y ensayos que examinan la expresión de uno o más biomarcadores en una muestra de tejido o de células de mamífero, siendo la expresión de
- 55 uno o más de tales biomarcadores predictiva de si la muestra de tejido o de células será sensible o no a agentes inductores de apoptosis tales como Apo2L/TRAIL y anticuerpos agonistas anti-DR5. En diversas realizaciones de la invención, los procedimientos y ensayos examinan la expresión de biomarcadores tales como ciertas fucosiltransferasas, en particular fucosiltransferasa 3 (FUT3) y/o fucosiltransferasa 6 (FUT6), además de antígenos Sialyl Lewis A y/o X.

[0018] Como se ha tratado anteriormente, la mayoría de los tipos de células humanas normales parecen ser resistentes a la inducción de apoptosis por ciertas formas recombinantes de Apo2L/TRAIL (Ashkenazi y col., arriba; Walczak y col., arriba). También se ha observado que algunas poblaciones de tipos de células humanas enfermas (tales como ciertas poblaciones de células cancerosas) son resistentes a inducción de apoptosis por ciertas formas recombinantes de Apo2L/TRAIL (Ashkenazi y col., J. Clin. Invest., 1999, arriba; Walczak y col., Nature Med., 1999, arriba). Por consiguiente, examinando una muestra de tejido o de células de mamífero para la expresión de ciertos biomarcadores a modo de ensayo puede obtenerse convenientemente y eficientemente información útil en la evaluación de terapias apropiadas o eficaces para tratar pacientes. Por ejemplo, la información obtenida de un ensayo para detectar la expresión de PUT3 o FUT6 en una muestra de tejido o de células de mamífero puede proporcionar a los médicos datos útiles que pueden usarse para determinar una pauta terapéutica óptima (usando Apo2L/TRAIL o anticuerpos agonistas de receptores de muerte) para pacientes que padecen un trastorno tal como cáncer.

[0019] La invención proporciona procedimientos para predecir la sensibilidad de una muestra de tejido o de células de mamífero (tal como una célula cancerosa) a Apo2L/TRAIL o un anticuerpo agonista de receptores de muerte. En ciertas realizaciones, los procedimientos comprenden obtener una muestra de tejido o de células de mamífero y examinar el tejido o célula para la expresión de fucosiltransferasa 3 o fucosiltransferasa 6. Los procedimientos también pueden comprender examinar el tejido o célula para la expresión de otro biomarcador tal como el (los) antígeno(s) Sialyl Lewis A y/o X. Los procedimientos pueden realizarse en una variedad de formas de ensayo que incluyen ensayos que detectan la expresión de ARNm, ensayos enzimáticos que detectan la presencia de actividad enzimática, ensayos inmunohistoquímicos y otros tratados en este documento. La determinación de la expresión de tales biomarcadores en dichos tejidos o células será predictiva de que tales tejidos o células serán sensibles a la actividad inductora de apoptosis de Apo2L/TRAIL y/o anticuerpo de receptores de muerte. En realizaciones opcionales, los tejidos o células también pueden examinarse para la expresión de receptores DR4, DR5, DcR1 o DcR2.

[0020] Otros procedimientos de la invención incluyen procedimientos de inducción de apoptosis en una muestra de tejido o de células de mamífero que comprende las etapas de obtener una muestra de tejido o de células de mamífero, examinar el tejido o célula para la expresión de uno o más biomarcadores tales como fucosiltransferasa 3, fucosiltransferasa 6, antígeno(s) Sialyl Lewis A y/o X y, tras determinar que dicha muestra de tejido o de células expresa dicho uno o más biomarcadores, exponer dicha muestra de tejido o de células a una cantidad eficaz de Apo2L/TRAIL o anticuerpo agonista de receptores de muerte. Las etapas en los procedimientos para examinar la expresión de uno o más biomarcadores pueden realizarse en una variedad de formas de ensayo que incluyen ensayos que detectan la expresión de ARNm, ensayos enzimáticos que detectan la presencia de actividad enzimática y ensayos inmunohistoquímicos. En realizaciones opcionales, los procedimientos también comprenden examinar la muestra de tejido o de células para la expresión de receptores DR4, DR5, DcR1 o DcR2. Opcionalmente, la muestra de tejido o de células comprende tejido o células de cáncer.

[0021] En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno en un mamífero, comprendiendo el procedimiento de tratamiento:

examinar una muestra de tejido o de células de mamífero para detectar la expresión de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo de fucosiltransferasa 3, fucosiltransferasa 6, antígeno(s) Sialyl Lewis A y/o X, y tras determinar que la expresión de uno o más de los biomarcadores es superior a la observada para una muestra de tejido o de células de control, administrar al mamífero una cantidad eficaz de un anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para así inducir apoptosis y tratar el trastorno.

[0022] Las etapas en los procedimientos para examinar la expresión de uno o más biomarcadores pueden realizarse en una variedad de formas de ensayo que incluyen ensayos que detectan la expresión de ARNm, ensayos enzimáticos que detectan la presencia de actividad enzimática y ensayos inmunohistoquímicos. En realizaciones opcionales, los procedimientos también comprenden examinar la muestra de tejido o de células para la expresión de receptores DR4, DR5, DcR1 o DcR2. Opcionalmente, los usos comprenden tratar cáncer en un mamífero. Opcionalmente, los usos comprenden, además de administrar una cantidad eficaz de Apo2L/TRAIL y/o anticuerpo agonista de receptores de muerte, administrar agente(s) quimioterapéutico(s) o radioterapia a dicho mamífero.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0023]

La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc del ligando Apo-2 humano (SEQ ID NO:2) y su secuencia de aminoácidos derivada (SEQ ID NO:1). El "N" en la posición de nucleótido 447 se usa para indicar que la base de nucleótidos puede ser "T" o "G".

Las Figuras 2A y 2B muestran la secuencia de nucleótidos de un ADNc (SEQ ID NO:4) para DR4 humano de longitud completa y su secuencia de aminoácidos derivada (SEQ ID NO:3). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos respectivas para DR4 humano también se informan en Pan y col., Science, 276:111 (1997).

La Figura 3A muestra la secuencia de 411 aminoácidos (SEQ ID NO:5) de DR5 humano como se ha publicado en el documento WO 98/51793 el 19 de noviembre de 1998. En la técnica se conoce una variante de corte y empalme de la transcripción de DR5 humano. Esta variante de corte y empalme de DR5 codifica la secuencia de 440 aminoácidos (SEQ ID NO:6) de DR5 humano mostrada en las Figuras 3B y 3C como se ha publicado en el documento WO 98/35986 el 20 de agosto de 1998.

La Figura 3D muestra las secuencias de nucleótidos de ADNc (SEQ ID NO:7) para DcR1 humano de longitud completa y su secuencia de aminoácidos derivada (SEQ ID NO:8). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos respectivas para DcR1 humano (y dominios particulares del mismo) también se muestran y se describen en el documento WO 98/58062.

La Figura 3E muestra las secuencias de nucleótidos de ADNc (SEQ ID NO:9) para DcR2 humano de longitud completa y su secuencia de aminoácidos derivada (SEQ ID NO:10). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos respectivas para DcR2 humano (y dominios particulares del mismo) se muestran en el documento WO 99/10484.

La Figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos de un ADNc (SEQ ID NO:11) para fucosiltransferasa (FUT3) humana de longitud completa (1,3/1,4) y su secuencia de aminoácidos derivada (SEQ ID NO:12). Estas secuencias se corresponden con el número de acceso de GenBank HSU27328 y se describen, por ejemplo, en Kukowska-Latallo y col., Genes Dev. Agosto de 1990; 4(8):1288-303.

La Figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos de un ADNc (SEQ ID NO:13) para alfa (1,3) fucosiltransferasa (FUT6) humana de longitud completa y su secuencia de aminoácidos derivada (SEQ ID NO:14). Estas secuencias se corresponden con el número de acceso de GenBank HSU27333 y se describen, por ejemplo, en Koszdin y Bowen, Biochem Biophys Res Commun. 31 de agosto de 1992; 187(1):152-7.

La Figura 6 proporciona un cuadro resumen de los datos obtenidos en el análisis de 28 líneas de células de cáncer de colon o colorrectal para sensibilidad o resistencia a actividad apoptótica de Apo2L (+ suero bovino fetal al 0,5% "SBF" o SBF al 10%) o anticuerpo monoclonal "mAb" contra DR5, reticulado "XL" o no reticulado, + suero bovino fetal al 0,5% "SBF" o SBF al 10%) y expresión de FUT 3, FUT 6, Sialyl Lewis A y Sialyl Lewis X.

La Figura 7 proporciona una comparación de la sensibilidad de diversas líneas de células de cáncer de colon o colorrectal para el anticuerpo contra DR5 y la expresión de FUT 3, como se mide por PCR cuantitativa.

La Figura 8 proporciona una comparación de diversas líneas de células de cáncer de colon o colorrectal para sensibilidad o resistencia al anticuerpo contra DR5 (más reticulante) y expresión de Sialyl Lewis X o A, como se determina por FACS.

La Figura 9A muestra una prueba de correlación de rangos de Spearman que analiza la sensibilidad o la resistencia de diversas líneas de células de cáncer de colon o colorrectal y la correlación con la expresión de FUT3.

La Figura 9B muestra los resultados de una prueba exacta de Fisher que analiza la sensibilidad ("sens") o la resistencia ("res") de las diversas líneas de células de cáncer de colon o colorrectal y la significancia estadística entre la expresión de FUT 3 y Sialyl Lewis A/X y la sensibilidad de las líneas celulares respectivas a la actividad apoptótica del anticuerpo contra DR5.

La Figura 10 proporciona una comparación de diversas líneas de células de cáncer de colon o colorrectal para la expresión de receptores DcR1 o DcR2 (como se determina por PCR cuantitativa) y el estado (sensible o resistente) de ciertas líneas celulares a Apo2L o anticuerpo contra DR5.

La Figura 11 proporciona una comparación de diversas líneas de células de cáncer de colon o colorrectal para la expresión de receptores DcR1 o DcR2 (como se determina por FACS) y el estado (sensible o resistente) de ciertas líneas celulares a Apo2L o anticuerpo contra DR5.

La Figura 12 muestran tinción inmunohistoquímica para Sialyl Lewis A y X en cuatro líneas de células de cáncer colorrectal, CaCo2, SW 1417, DLD-1 y Colo 205, y su correlación con la expresión de Sialyl Lewis A y X como se mide por FACS y su correlación con la sensibilidad a Apo2L.

La Figura 13 muestra un resumen de experimentos de IHC que demuestran la expresión de Sialyl Lewis A y X en muestras de tejido de mucosa de colon normal, tejido de hígado normal, cáncer de colon primario y metástasis de cáncer de colon.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0024] Las técnicas y procedimientos descritos o citados en este documento son generalmente bien entendidos y comúnmente se emplean usando metodología convencional por aquellos expertos en la materia tal como, por ejemplo, las metodologías de clonación molecular ampliamente utilizadas descritas en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Según corresponda, los procedimientos que implican el uso de kits y reactivos comercialmente disponibles se llevan a cabo generalmente según protocolos y/o parámetros definidos por el fabricante a menos que se indique de otro modo.

[0025] Antes de describir los presentes procedimientos y ensayos debe entenderse que la presente invención no se limita a la metodología particular, protocolos, líneas celulares, especies o géneros animales, construcciones y reactivos descritos ya que tales pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en este documento es con el fin de sólo describir realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que estará limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas.

[0026] Debe observarse que, como se usa en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Por tanto, por ejemplo, referencia a “una alteración genética” incluye una pluralidad de tales alteraciones y referencia a “una sonda” incluye referencia a una o más sondas y equivalentes de las mismas conocidas para aquellos expertos en la materia, etc.

[0027] Las publicaciones citadas en este documento se citan para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a preceder las publicaciones en virtud de una fecha de prioridad anterior o fecha anterior de la invención. Adicionalmente, las fechas de publicación reales pueden ser diferentes de aquellas mostradas y requieren verificación independiente.

I. DEFINICIÓN

[0028] Los términos “Apo2L/TRAIL”, “Apo-2L” y “TRAIL” se usan en este documento para referirse a una secuencia de polipéptidos que incluye los residuos de aminoácidos 114-281, ambos incluidos, 95-281, ambos incluidos, los residuos 92-281, ambos incluidos, los residuos 91-281, ambos incluidos, los residuos 41-281, ambos incluidos, los residuos 15-281, ambos incluidos, o los residuos 1-281, ambos incluidos, de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1, además de fragmentos biológicamente activos, variantes de delección, inserción o sustitución de las secuencias anteriores. En una realización, la secuencia de polipéptidos comprende los residuos 114-281 de la Figura 1) y opcionalmente consiste en los residuos 114-281 de la Figura 1. Opcionalmente, la secuencia de polipéptidos comprende los residuos 92-281 o los residuos 91-281 de la Figura 1. Los polipéptidos Apo-2L pueden estar codificados por la secuencia de nucleótidos nativa mostrada en la Figura 1. Opcionalmente, el codón que codifican el residuo Pro119 (Figura 1) puede ser “CCT” o “CCG”. En otras realizaciones, los fragmentos o las variantes son biológicamente activos y tienen al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencias de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencias, e incluso más preferentemente al menos el 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad de secuencias con una cualquiera de las secuencias de Apo2L/TRAIL anteriormente citadas. Opcionalmente, el polipéptido Apo2L/TRAIL es codificado por una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas con la secuencia de polinucleótidos codificante proporcionada en la Figura 1. La definición engloba variantes de sustitución de Apo2L/TRAIL en las que al menos un aminoácido está sustituido por un residuo de alanina. Variantes de sustitución particulares de Apo2L/TRAIL incluyen aquellas en las que al menos un aminoácido está sustituido por un residuo de alanina. Estas variantes de sustitución incluyen aquellas identificadas, por ejemplo, como “D203A”, “D218A” y “D269A.” Esta nomenclatura se usa para identificar variantes de Apo2L/TRAIL en las que los residuos de ácido aspártico en las posiciones 203, 218 y/o 269 (usando la numeración mostrada en la Figura 1) están sustituidas por residuos de alanina. Opcionalmente, las variantes de Apo2L pueden comprender una o más de las sustituciones de alanina que se citan en la Tabla I de la solicitud PCT publicada WO 01/00832. Las variantes de sustitución incluyen una o más de las sustituciones de residuos identificadas en la Tabla I del documento WO 01/00832 publicado el 4 de enero de 2001. La definición también engloba un Apo2L/TRAIL de secuencia nativa aislado de una fuente de Apo2L/TRAIL o preparado por procedimientos recombinantes o sintéticos. El Apo2L/TRAIL de la invención incluye los polipéptidos denominados en lo sucesivo Apo2L/TRAIL o TRAIL desvelados en las publicaciones PCT nº WO97/01633 y WO97/25428. Los términos “Apo2L/TRAIL” o “Apo2L” se usan para referirse generalmente a formas de Apo2L/TRAIL que incluyen formas monómeras, dímeras o trímeras del polipéptido. Todas las numeraciones de

residuos de aminoácidos citadas en la secuencia de Apo2L usan la numeración según la Figura 1, a menos que se establezca específicamente de otro modo. Por ejemplo, "D203" o "Asp203" se refiere al residuo de ácido aspártico en la posición 203 en la secuencia proporcionada en la Figura 1.

- 5 **[0029]** El término "dominio extracelular de Apo2L/TRAIL" o "DEC de Apo2L/TRAIL" se refiere a una forma de Apo2L/TRAIL que está esencialmente libre de dominios transmembranario y citoplásmico. Generalmente, el DEC tendrá menos del 1% de tales dominios transmembranario y citoplásmico y preferentemente tendrá menos del 0,5% de tales dominios. Se entenderá que cualquier dominio transmembranario identificado para los polipéptidos de la presente invención se identifica con arreglo a criterios rutinariamente empleados en la materia para identificar ese tipo de dominio hidrófobo. Los límites exactos de un dominio transmembranario pueden variar, pero lo más probable es no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio como se ha identificado inicialmente. En realizaciones preferidas, el DEC consistirá en una secuencia de dominio extracelular soluble del polipéptido que está libre de los dominios transmembranario y citoplásmico o intracelular (y no está unido a la membrana). Secuencias particulares del dominio extracelular de Apo-2L/TRAIL se describen en las publicaciones PCT nº WO97/01633 y WO97/25428.

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

- 20 **[0031]** El término "dímero de Apo2L/TRAIL" o "dímero de Apo2L" se refiere a dos monómeros de Apo-2L unidos en un enlace covalente mediante un enlace disulfuro. El término como se usa en este documento incluye dímeros de Apo2L aislados y dímeros de Apo2L que están dentro de formas trímeras de Apo2L (es decir, asociados a otro tercer monómero de Apo2L).

- 25 **[0032]** El término "trímero de Apo2L/TRAIL" o "trímero de Apo2L" se refiere a tres monómeros de Apo2L que están asociados de forma no covalentemente.

- [0033]** El término "agregado de Apo2L/TRAIL" se usa para referirse a formas oligoméricas superiores autoasociadas de Apo2L/TRAIL tales como trímeros de Apo2L/TRAIL que forman, por ejemplo, formas hexaméricas y nanoméricas de Apo2L/TRAIL. La determinación de la presencia y la cantidad de monómero, dímero o trímero de Apo2L/TRAIL (u otros agregados) puede hacerse usando procedimientos y ensayos conocidos en la técnica (y usando materiales comercialmente disponibles) tales como HPLC de exclusión por tamaño nativa ("SEC"), exclusión por tamaño desnaturante usando dodecilsulfato de sodio ("SDS-SEC"), HPLC de fase inversa y electroforesis capilar.

- 35 **[0034]** "Receptor del ligando Apo-2" incluye los receptores denominados en la materia "DR4" y "DR5" cuyas secuencias de polinucleótidos y polipéptidos se muestran en las Figuras 2 y 3 respectivamente. Pan y col. han descrito el miembro de la familia de receptores de TNF denominado en lo sucesivo "DR4" (Pan y col., Science, 276:111-113 (1997); véanse también el documento WO98/32856 publicado el 30 de julio de 1998; el documento WO 99/37684 publicado el 29 de julio de 1999; el documento WO 00/73349 publicado el 7 de diciembre de 2000; el documento US 6.433.147 concedido el 13 de agosto de 2002; el documento US 6.461.823 concedido el 8 de octubre de 2002 y el documento US 6.342.383 concedido el 29 de enero de 2002). Sheridan y col., Science, 277:818-821 (1997) y Pan y col., Science, 277:815-818 (1997) describieron otro receptor para Apo2L/TRAIL (véanse también el documento WO98/51793 publicado el 19 de noviembre de 1998; el documento WO98/41629 publicado el 24 de septiembre de 1998). Este receptor se denomina en lo sucesivo DR5 (el receptor también se ha denominado alternativamente en lo sucesivo Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 o KILLER; Screation y col., Curr. Biol., 7:693-696 (1997); Walczak y col., EMBO J., 16:5386-5387 (1997); Wu y col., Nature Genetics, 17:141-143 (1997); el documento WO98/35986 publicado el 20 de agosto de 1998; el documento EP870.827 publicado el 14 de octubre de 1998; el documento WO98/46643 publicado el 22 octubre de 1998; el documento WO99/02653 publicado el 21 de enero de 1999; el documento WO99/09165 publicado el 25 de febrero de 1999; el documento WO99/11791 publicado el 11 de marzo de 1999; el documento US 2002/0072091 publicado el 13 de agosto de 2002; el documento US 2002/0098550 publicado el 7 de diciembre de 2001; el documento US 6.313.269 concedido el 6 de diciembre de 2001; el documento US 2001/0010924 publicado el 2 de agosto de 2001; el documento US 2003/01255540 publicado el 3 de julio de 2003; el documento US 2002/0160446 publicado el 31 de octubre de 2002, el documento US 2002/0048785 publicado el 25 de abril de 2002; el documento US 6.569.642 concedido el 27 de mayo de 2003, el documento US 6.072.047 concedido el 6 de junio de 2000, el documento US 6.642.358 concedido el 4 de noviembre de 2003). Como se ha descrito anteriormente, otros receptores para Apo-2L incluyen DcR1, DcR2 y OPG (véase, Sheridan y col., arriba; Marsters y col., arriba; y Simonet y col., arriba). El término "receptor para Apo-2L" cuando se usa en este documento engloba el receptor de secuencia nativa y variantes del receptor. Estos

términos engloban el receptor para Apo-2L expresado en una variedad de mamíferos que incluye seres humanos. El receptor para Apo-2L puede expresarse endógenamente cuando se produce naturalmente en una variedad de linajes de tejido humano, o puede expresarse por procedimientos recombinantes o sintéticos. Un "receptor para Apo-2L de secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un receptor para Apo-2L derivado de la naturaleza. Por tanto, un receptor para Apo-2L de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos del receptor para Apo-2L que se produce naturalmente a partir de cualquier mamífero. Tal receptor para Apo-2L de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse por medios recombinantes o sintéticos. El término "receptor para Apo-2L de secuencia nativa" engloba específicamente formas truncadas o secretadas que se producen naturalmente del receptor (por ejemplo, una forma soluble que contiene, por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas variantes que se producen naturalmente (por ejemplo, formas alternativamente cortadas y empalmadas) y variantes alélicas que se producen naturalmente. Las variantes del receptor pueden incluir fragmentos o mutantes de delección del receptor para Apo-2L de secuencia nativa. La Figura 3A muestra la secuencia de 411 aminoácidos de DR5 humano como se ha publicado en el documento WO 98/51793 el 19 de noviembre de 1998. Una variante de corte y empalme de transcripción de DR5 humano se conoce en la técnica. Esta variante de corte y empalme de DR5 codifica la secuencia de 440 aminoácidos de DR5 humano mostrada en las Figuras 3B y 3C como se ha publicado en el documento WO 98/35986 el 20 de agosto de 1998.

[0035] "Anticuerpo de receptores de muerte" se usa en este documento para referirse generalmente a anticuerpo o anticuerpos dirigidos contra un receptor en la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral y que contiene un dominio de muerte que puede señalar apoptosis, y tales anticuerpos incluyen anticuerpo contra DR5 y anticuerpo contra DR4.

[0036] "Anticuerpo del receptor DR5", "anticuerpo contra DR5" o "anticuerpo anti-DR5" se usan en un amplio sentido para referirse a anticuerpos que se unen a al menos una forma de un receptor DR5 o dominio extracelular del mismo. Opcionalmente, el anticuerpo contra DR5 está fusionado o ligado a una secuencia o molécula heteróloga. Preferentemente, la secuencia heteróloga permite o ayuda al anticuerpo a que forme complejos de mayor orden u oligoméricos. Opcionalmente, el anticuerpo contra DR5 se une al receptor DR5, pero no se une ni reacciona de forma cruzada con ningún receptor para Apo-2L adicional (por ejemplo DR4, DcR1 o DcR2). Opcionalmente, el anticuerpo es un agonista de actividad de señalización de DR5.

[0037] Opcionalmente, el anticuerpo contra DR5 de la invención se une a un receptor DR5 en un intervalo de concentración de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 20 mM como se mide en un ensayo de unión BIAcore. Opcionalmente, los anticuerpo contra DR5 de la invención presentan un valor de CI_{50} de aproximadamente 0,6 nM a aproximadamente 18 mM como se mide en un ensayo de unión BIAcore.

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

[0039] Opcionalmente, el anticuerpo contra DR4 de la invención se une a un receptor DR4 en un intervalo de concentración de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 20 mM como se mide en un ensayo de unión BIAcore. Opcionalmente, los anticuerpos contra DR5 de la invención presentan un valor de CI_{50} de aproximadamente 0,6 nM a aproximadamente 18 mM como se mide en un ensayo de unión BIAcore.

[0040] El término "agonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que potencie, estimule o active parcial o completamente una o más actividades biológicas de Apo2L/TRAIL, DR4 o DR5, *in vitro*, *in situ* o *in vivo*. Ejemplos de tales actividades biológicas de unión de Apo2L/TRAIL a DR4 o DR5 incluyen apoptosis, además de aquellas adicionalmente informadas en la bibliografía. Un agonista puede funcionar en un modo directo o indirecto. Por ejemplo, el agonista puede funcionar para potenciar, estimular o activar parcial o completamente una o más actividades biológicas de DR4 o DR5, *in vitro*, *in situ* o *in vivo*, como resultado de su unión directa a DR4 o DR5 que produce la activación del receptor o la transducción de señales. El agonista también puede funcionar indirectamente para potenciar, estimular o activar parcial o completamente una o más actividades biológicas de DR4 o DR5, *in vitro*, *in situ* o *in vivo*, como resultado de, por ejemplo, estimular otra molécula efectora que luego produce la activación de DR4 o DR5 o la transducción de señales. Se contempla que un agonista puede actuar de molécula potenciadora que funciona indirectamente para potenciar o aumentar la activación o actividad de DR4 o DR5. Por

ejemplo, el agonista puede potenciar la actividad de Apo-2L endógeno en un mamífero. Esto podría llevarse a cabo, por ejemplo, complejando previamente DR4 o DR5 o estabilizando complejos del ligando respectivo con el receptor DR4 o DR5 (tal como estabilizando el complejo nativo formado entre Apo-2L y DR4 o DR5).

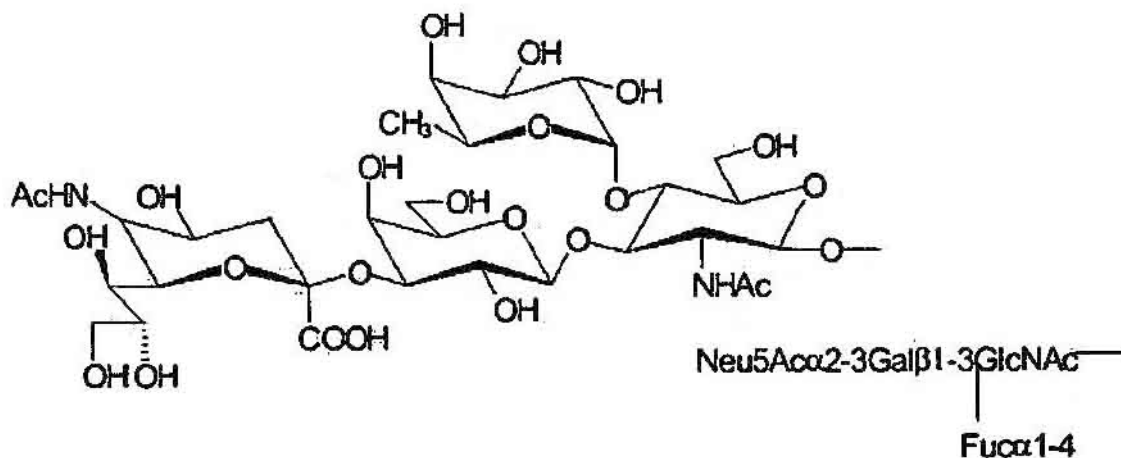
- 5 **[0041]** El término “biomarcador” como se usa en la presente solicitud se refiere generalmente a una molécula que incluye un gen, proteína, estructura de hidrato de carbono o glicolípido cuya expresión en o sobre un tejido o célula de mamífero puede detectarse mediante procedimientos convencionales (o procedimientos desvelados en este documento) y es predictiva de una sensibilidad de células o tejidos de mamífero a Apo2L/TRAIL o anticuerpo de receptores de muerte. Tales biomarcadores contemplados por la presente invención incluyen, pero no se limitan a,
- 10 “(1,3/1,4) fucosiltransferasa” o “FUT3”, “alfa (1,3) fucosiltransferasa” o “FUT6”, “Sialyl Lewis A”, y “Sialyl Lewis X”. Opcionalmente, la expresión de un biomarcador tal se determina que es superior a la observada para una muestra de tejido o de células de control. Opcionalmente, por ejemplo, la expresión de un biomarcador tal se determinará en un ensayo de PCR o FACS que es al menos 50 veces, o preferentemente al menos 100 veces, superior en la muestra de tejido o de células de prueba que la observada para una muestra de tejido o de células de control.
- 15 Opcionalmente, la expresión de un biomarcador tal se determinará en un ensayo de IHC para puntuar al menos 2 o más para la intensidad de tinción.

- [0042]** “(1,3/1,4) fucosiltransferasa” o “FUT3” se usa en este documento para referirse a una molécula que tiene características estructurales como se describen en este documento y opcionalmente que cataliza la transferencia de un residuo de fucosa del sustrato donante, GDP-fucosa, a un sustrato receptor en un enlace α 3- o α 4- para GlcNAc (FUT III-VII y IX). La secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos para FUT3 humana se proporciona en la Figura 4. Estas secuencias se corresponden con el número de acceso de GenBank HSU27328 y se describen, por ejemplo, en Kukowska-Latallo y col., Genes Dev. 1990 Aug; 4(8):1288-303. Las FUT son generalmente glicoproteínas transmembranarias de tipo II que residen en las vacuolas de Golgi y normalmente están
- 20 compuestas por una cola citoplásmica del extremo N, una región que atraviesa la membrana y un dominio catalítico orientado lumenalmente en el aparato de Golgi. Entre la región que atraviesa la membrana y el dominio catalítico está una región llamada el tallo (Paulson y Colley, J. Biol. Chem., 264:17615-17618 (1989)).

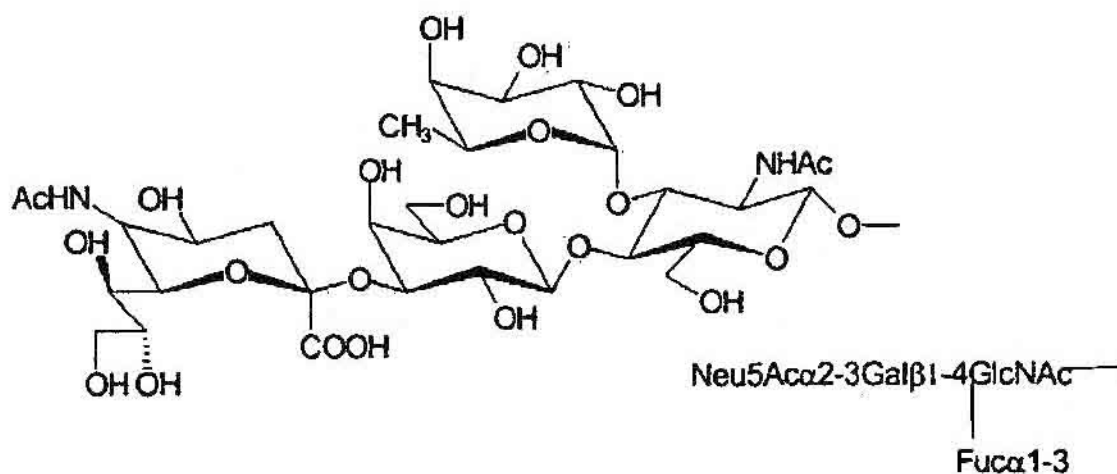
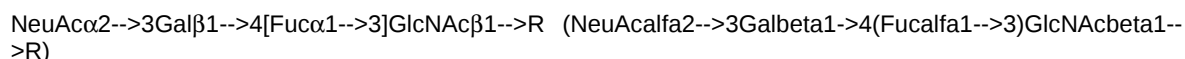
- [0043]** “Alfa (1,3) fucosiltransferasa” o “FUT6” se usa en este documento para referirse a una molécula que estructuralmente se refiere a, por ejemplo, la secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos para FUT6 humana proporcionada en la Figura 5. Estas secuencias se corresponden con el número de acceso de GenBank HSU27333 y se describen, por ejemplo, en Koszdin y Bowen, Biochem Biophys Res Commun. 31 de agosto de 1992; 187(1):152-7. FUT 6 se expresa normalmente en células epiteliales y en tejidos de hígado, riñón y gastrointestinal, específicamente estómago, yeyuno y colon (y normalmente se expresa mínimamente en bazo, pulmón y cuello del
- 30 útero). FUT 6 no se detecta normalmente en cerebro, corteza suprarrenal o leucocitos de sangre periférica.

- [0044]** “Sialyl Lewis A” se usa en este documento para referirse a una estructura o antígeno de hidratos de carbono de tetrasacáridos que tiene la siguiente secuencia o estructura que puede estar unida a la membrana o en forma soluble circulando, por ejemplo, en suero:

- 40 NeuAc α 2-->3Gal β 1-->3[Fuc α 1-->4]GlcNAc β 1-->R (NeuAc α 2-->3Gal β 1-->3(Fuc α 1-->4)GlcNAc β 1-->R)



[0045] "Sialyl Lewis X" se usa en este documento para referirse a una estructura o antígeno de hidratos de carbono de tetrasacáridos que tiene la siguiente secuencia o estructura que puede estar unida a la membrana o en forma soluble circulando, por ejemplo, en suero:



10

[0046] Por "sujeto" o "paciente" se indica cualquier sujeto individual para el que sea deseada terapia que incluye seres humanos, ganado, perros, cobayas, conejos, pollos, insectos, etc. También está previsto incluir como sujeto cualquier sujeto que participe en ensayos de investigación clínica que no muestren ningún síntoma de enfermedad, o sujetos que participan en estudios epidemiológicos, o sujetos usados como controles.

[0047] El término "mamífero" como se usa en este documento se refiere a cualquier mamífero clasificado como mamífero que incluye seres humanos, vacas, caballos, perros y gatos. En una realización preferida de la invención el mamífero es un ser humano.

20

[0048] Por "muestra de tejido o de células" se indica una colección de células similares obtenidas de un tejido de un sujeto o paciente. La fuente de la muestra de tejido o de células puede ser tejido sólido como de un órgano fresco, congelado y/o conservado o muestra de tejido o biopsia o aspirado; sangre o cualquier constituyente de la sangre; fluidos corporales tales como líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido

intersticial; células de cualquier tiempo en gestación o desarrollo del sujeto. La muestra de tejido también puede ser células o líneas de células primarias o cultivadas. Opcionalmente, la muestra de tejido o de células se obtiene de un tumor primario o metastásico. La muestra de tejido puede contener compuestos que no están naturalmente entremezclados con el tejido en la naturaleza tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares.

[0049] Con los fines en este documento, una “sección” de una muestra de tejido indica una parte individual o trozo de una muestra de tejido, por ejemplo, una fina rebanada de tejido o células cortada de una muestra de tejido. Se entiende que pueden tomarse múltiples secciones de muestras de tejido y someterse a análisis según la presente invención, siempre que se entienda que la presente invención comprende un procedimiento por el cual la misma sección de muestra de tejido se analiza a niveles tanto morfológicos como moleculares, o se analiza con respecto tanto a proteína como a ácido nucleico.

[0050] Por “guardan relación” o “guardar relación” se indica comparar, de cualquier forma, el rendimiento y/o los resultados de un primer análisis o protocolo con el rendimiento y/o los resultados de un segundo análisis o protocolo. Por ejemplo, los resultados de un primer análisis o protocolo pueden usarse en la realización de un segundo protocolo y/o los resultados de un primer análisis o protocolo pueden usarse para determinar si debería realizarse o no un segundo análisis o protocolo. Con respecto a la realización de análisis o protocolo inmunohistoquímico, los resultados de IHC pueden usarse para determinar si debería realizarse o no una pauta terapéutica específica.

[0051] Por “ácido nucleico” se pretende incluir cualquier ADN o ARN. Por ejemplo, ácido nucleico cromosómico, mitocondrial, vírico y/o bacteriano presente en la muestra de tejido. El término “ácido nucleico” engloba tanto una como ambas cadenas de una molécula de ácido nucleico bicatenaria e incluye cualquier fragmento o porción de una molécula de ácido nucleico intacta.

[0052] Por “gen” se indica cualquier secuencia de ácidos nucleicos o porción de la misma con una función funcional en codificar o transcribir una proteína o regular otra expresión génica. El gen puede consistir en todos los ácidos nucleicos responsables de codificar una proteína funcional o sólo una parte de los ácidos nucleicos responsables de codificar o expresar una proteína. La secuencia de ácidos nucleicos puede contener una anomalía genética dentro de exones, intrones, regiones de iniciación o terminación, secuencias promotoras, otras secuencias reguladoras o regiones adyacentes únicas al gen.

[0053] La palabra “marca” cuando se usa en este documento se refiere a un compuesto o composición que está conjugado o fusionado directamente o indirectamente con un reactivo tal como una sonda de ácido nucleico o un anticuerpo y facilita la detección del reactivo con el que está conjugado o fusionado. La marca puede ser por sí misma detectable (por ejemplo, marcas de radioisótopos o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición del sustrato que es detectable.

[0054] El término “anticuerpo” en este documento se usa en el sentido más amplio y específicamente cubre anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpos mientras que presenten la actividad biológica deseada.

[0055] Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una parte de un anticuerpo intacto que comprende preferentemente la región de unión a antígeno o región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0056] Los “anticuerpos nativos” son normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está ligada a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro entre las cadenas regularmente separados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas.

[0057] El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables se diferencien ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida por todos los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad tanto en los dominios variables de las cadenas ligeras como de las cadenas pesadas. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman las regiones estructurales (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran parte una configuración de hoja β , conectadas por tres regiones hipervariables que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte, de la estructura de hoja β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en una estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos (véase Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras tales como la participación del anticuerpo en citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC).

[0058] La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos llamados fragmentos “Fab”, cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento “Fc” residual cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina da un fragmento $F(ab)_2$ que tiene dos sitios de unión a antígeno y que todavía puede reticular el antígeno.

[0059] “Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras en estrecha asociación no covalente. En esta configuración, las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero de VH-VL. En conjunto, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión del antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que sólo comprende tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse a antígeno, aunque a una menor afinidad que el sitio de unión entero.

[0060] El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio de las cadenas pesadas CH1 que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en este documento para Fab' en el que el (los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes llevan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos $F(ab)_2$ de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0061] Las “cadenas ligeras” de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de los dos tipos claramente distintos llamados kappa (κ) y lambda (λ) basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

[0062] Los anticuerpos pueden asignarse a diferentes clases dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas. Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varios de éstos pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que se corresponden con las diferentes clases de anticuerpos se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas.

[0063] Los fragmentos de anticuerpos “Fv monocatenario” o “scfv” comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L , estando estos dominios presentes en una única cadena de polipéptidos. Preferentemente, el polipéptido de Fv comprende además un ligador de polipéptidos entre los dominios V_H y V_L que permite que scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de scFv véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994).

[0064] El término “diacuerpos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable (V_H) de las cadenas pesadas conectados a un dominio variable (V_L) de las cadenas ligeras en la misma cadena de polipéptidos ($V_H - V_L$). Usando un ligador que es

demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son obligados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

5

[0065] El término “anticuerpo monoclonal” como se usa en este documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicas, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de preparaciones convencionales de anticuerpos (policlonales) que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan por el cultivo de hibridomas, sin contaminar por otras inmunoglobulinas. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden prepararse por el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., Nature, 256:495 (1975), o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando, por ejemplo, las técnicas descritas en Clackson y col., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks y col., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991).

[0066] Los anticuerpos monoclonales en este documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias en anticuerpos correspondientes derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de las cadenas son idénticas a u homólogas a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, además de fragmentos de tales anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. nº 4.816.567; Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en este documento incluyen anticuerpos “privatizados” que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo tal como babuino, mono Rhesus o cinomolgo) y secuencias de la región constante humanas (patente de EE.UU. nº 5.693.780).

[0067] Formas “humanizas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen la mínima secuencia derivada de inmunoglobulina no humana. En general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor son sustituidos por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para perfeccionar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, correspondiéndose todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables con los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles véase Jones y col., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

[0068] El término “región hipervariable” cuando se usa en este documento se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende los residuos de aminoácidos de una “región determinante de la complementariedad” o “CDR” (por ejemplo, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de las cadenas ligeras y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de las cadenas pesadas; Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un “bucle hipervariable” (por ejemplo, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de las cadenas ligeras y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de las cadenas pesadas; Chothia y Lesk J. Mol.

Biol. 196:901-917 (1987)). Los residuos de la "región estructural" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable que se han definido en este documento.

[0069] Un anticuerpo "que une" un antígeno de interés es uno que puede unirse a ese antígeno con suficiente afinidad y/o avidez de forma que el anticuerpo sea útil como agente terapéutico o de diagnóstico para elegir como diana una célula que expresa el antígeno.

[0070] Con los fines en este documento, "inmunoterapia" se referirá a un procedimiento para tratar un mamífero (preferentemente un paciente humano) con un anticuerpo, pudiendo ser el anticuerpo un anticuerpo sin conjugar o "desnudo", o el anticuerpo puede conjugarse o fusionarse con molécula(s) o agente(s) heterólogo(s) tales como uno o más agentes citotóxico, generándose así un "inmunconjugado".

[0071] Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el antagonista o anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95% en peso de anticuerpo como se determina por el procedimiento de Lowry, y lo más preferentemente a más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos del extremo N o internos usando un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o preferentemente tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, generalmente, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

[0072] La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un agente (por ejemplo, Apo2L/TRAIL, anticuerpo anti-DR4 o DR5, etc.) que es eficaz para prevenir, mejorar o tratar la enfermedad o afección en cuestión.

[0073] Los términos "tratar", "tratamiento" y "terapia" como se usan en este documento se refieren a terapia curativa, terapia profiláctica y terapia preventiva. Tratamiento o administración consecutiva se refiere a tratamiento al menos una vez al día sin interrupción en el tratamiento por uno o más días. Tratamiento o administración intermitente, o tratamiento o administración de un modo intermitente, se refiere a tratamiento que no es consecutivo, sino que es de naturaleza cíclica.

[0074] El término "citocina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen la hormona de crecimiento tal como la hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana de N-metionilo y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante tiroidea (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral α y β ; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón α , β y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17; y otros factores de polipéptidos que incluyen LSI y el ligando kit (KL). Como se usa en este documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

[0075] El término "agente citotóxico" como se usa en este documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o produce la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, I^{131} , I^{125} , Y^{90} y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

[0076] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); alquilsulfonatos tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carbocadona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina,

trietilfosforamida, trietilfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan); briostatina; callistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; 5 pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como el antibiótico enediína (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina γ_1^1 y caliqueamicina θ^1 , véase, por ejemplo, Agnew Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994); dinemicina, que incluye dinemicina A; bifosfonatos tales como clodronato; una esperamicina; además del cromóforo neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enediína de cromoproteínas relacionadas), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (AdriamycinTM) (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolinodoxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxi-doxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; 20 análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxiluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reparadores de ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; glucósido aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxana; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazonico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; 30 gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (TAXOTERE[®], Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GemzarTM); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (NavelbineTM); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; 35 inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. En esta definición también están incluidos agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de hormonas sobre tumores tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERM) que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NolvadexTM), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, 40 keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (FarestonTM); e inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (MegaceTM), exemestano, formestano, fadrozol, vorozol (RivisorTM), letrozol (FemaraTM) y anastrozol (ArimidaxTM); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los 45 anteriores.

[0077] Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en este documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente célula cancerosa que expresa en exceso cualquiera de los genes identificados en este documento, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor 50 del crecimiento es uno que reduce significativamente el porcentaje de células que sobreexpresan tales genes en fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un sitio distinto de la fase S) tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueadores clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxol e inhibidores de topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 55 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse más información en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" de Murakami y col. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la pág. 13.

[0078] Los términos “apoptosis” y “actividad apoptótica” se usan en un amplio sentido y se refieren a la forma ordenada o controlada de muerte celular en mamíferos que normalmente va acompañada de uno o más cambios celulares característicos que incluyen condensación del citoplasma, pérdida de microvellosidades de la membrana plasmática, segmentación del núcleo, degradación de ADN cromosómico o pérdida de función mitocondrial. Esta actividad puede determinarse y medirse, por ejemplo, por ensayos de viabilidad celular (tales como ensayos con azul Alamar o ensayos de MTT), análisis por FACS, activación de caspasas, fragmentación de ADN (véase, por ejemplo, Nicoletti y col., J. Immunol. Methods, 139:271-279 (1991), y poli-ADP-ribosa-polimerasa, “PARP”, ensayos de escisión conocidos en la técnica.

10

[0079] Como se usa en este documento, el término “trastorno” se refiere en general a cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con las composiciones descritas en este documento que incluye cualquier enfermedad o trastorno que pueda tratarse por cantidades eficaces de Apo2L/TRAIL, un anticuerpo anti-DR4 y/o un anticuerpo anti-DR5. Éste incluye trastornos crónicos y agudos, además de aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos que van a tratarse en este documento incluyen cánceres benignos y malignos; trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, trastornos autoinmunitarios, artritis (incluyendo artritis reumatoide), esclerosis múltiple y VIH/SIDA.

[0080] Los términos “cáncer”, “canceroso” o “maligno” se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por crecimiento celular sin regular. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, leucemia, blastoma y sarcoma. Más ejemplos particulares de tales cánceres incluyen carcinoma de células escamosas, mieloma, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, cáncer (del tracto) gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer pancreático, glioblastoma multiforme, cáncer del cuello del útero, cáncer cerebral, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello.

[0081] El término “enfermedad relacionada con la inmunidad” significa una enfermedad en la que un componente del sistema inmunitario de un mamífero produce, media o contribuye de otro modo a la morbilidad en el mamífero. También están incluidas enfermedades en las que la estimulación o la intervención de la respuesta inmunitaria tiene un efecto paliativo sobre la progresión de la enfermedad. Incluido dentro de este término están enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias mediadas por inmunidad, enfermedades inflamatorias no mediadas por inmunidad, enfermedades infecciosas y enfermedades de inmunodeficiencia. Ejemplos de enfermedades relacionadas con la inmunidad e inflamatorias, algunas de las cuales son inmunitarias o están mediadas por linfocitos T, que pueden tratarse según la invención incluyen lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (esclerodermia), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmunitaria (pancitopenia inmunitaria, hemoglobinuria paroxística nocturna), trombocitopenia autoinmunitaria (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada por inmunidad), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediadas por inmunidad (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes de los sistemas nervioso central y periférico tales como esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis activa crónica autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa y colangitis esclerosante, enfermedades inflamatorias y pulmonares fibróticas tales como enfermedad inflamatoria del intestino (colitis ulcerosa: enfermedad de Crohn), enteropatía sensible al gluten y enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunitarias o mediadas por inmunidad que incluyen enfermedades de piel ampollosa, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a alimentos y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón tales como neumonías eosinófilas, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplante que incluyen rechazo de injerto y enfermedades de injerto frente a huésped. Las enfermedades infecciosas incluyen SIDA (infección por el VIH), hepatitis A, B, C, D y E, infecciones bacterianas, infecciones fúngicas, infecciones protozoicas e infecciones parasitarias.

55

[0082] “Enfermedad autoinmunitaria” se usa en este documento en un amplio sentido general para referirse a trastornos o afecciones en mamíferos en los que la destrucción de tejido normal o sano se produce a partir de respuestas inmunitarias humorales o celulares del mamífero individual a sus propios constituyentes de tejido. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, lupus eritematoso, tiroiditis, artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple,

diabetes autoinmunitaria y enfermedad inflamatoria del intestino (EII).

[0083] El término “marcado” cuando se usa en este documento se refiere a una molécula química que comprende un anticuerpo o polipéptido fusionado con un “polipéptido de marca”. El polipéptido de marca tiene suficientes residuos para proporcionar un epítope contra el que un anticuerpo puede prepararse o para proporcionar alguna otra función tal como la capacidad para oligomerizar (por ejemplo, como se produce con péptidos que tienen dominios de cremallera de leucina), todavía es suficientemente corto de forma que generalmente no interfiere con la actividad del anticuerpo o polipéptido. El polipéptido de marca también es casi preferentemente único de manera que un anticuerpo específico de marca no reacciona sustancialmente de forma cruzada con otros epítopes. Los polipéptidos de marca adecuados tienen generalmente al menos seis residuos de aminoácidos y normalmente entre aproximadamente 8 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos (preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 residuos).

[0084] El término “ión metálico divalente” se refiere a un ión metálico que tiene dos cargas positivas. Ejemplos de iones metálicos divalentes incluyen, pero no se limitan a, cinc, cobalto, níquel, cadmio, magnesio y manganeso. Formas particulares de tales metales que pueden emplearse incluyen formas de sal (por ejemplo, formas de sal farmacéuticamente aceptable) tales como formas de cloruro, acetato, carbonato, citrato y sulfato de los iones metálicos divalentes anteriormente mencionados. Opcionalmente, un ión metálico divalente para uso en la presente invención es cinc y preferentemente la forma de sal, sulfato de cinc o cloruro de cinc.

[0085] “Aislado” cuando se usa para describir los diversos péptidos o proteínas desvelados en este documento significa péptido o proteína que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que normalmente podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos para el péptido o proteína, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el péptido o proteína se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos del extremo N o internos usando un secuenciador de taza giratoria, o (2) hasta homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata, o (3) hasta homogeneidad por técnicas de espectroscopía de masa o de mapeo de péptidos. El material aislado incluye péptido o proteína *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente de su entorno natural no estará presente. Generalmente, sin embargo, el péptido o proteína aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

[0086] “Identidad de secuencias de aminoácidos en porcentaje (%)” con respecto a las secuencias identificadas en este documento se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr la identidad de secuencias en porcentaje máxima, y sin considerar sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencias. El alineamiento para determinar la identidad de secuencias de aminoácidos en porcentaje puede lograrse de diversas formas que están dentro de la habilidad en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento que incluye asignar algoritmos necesarios para lograr el máximo alineamiento con respecto a las secuencias de longitud completa que se comparan. Para los fines en este documento, los valores de identidad de aminoácidos en porcentaje pueden obtenerse usando el programa informático de comparación de secuencias, ALIGN-2, que fue escrito por Genentech, Inc. y el código fuente que ha sido presentado con documentación de usuario en la oficina de derechos de autor de EE.UU., Washington, DC, 20559, registrado bajo el nº de registro de derechos de autor de EE.UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible por Genentech, Inc., South San Francisco, CA. Todos los parámetros de comparación de secuencias están fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

[0087] La “rigurosidad” de reacciones de hibridación puede ser fácilmente determinada por un experto en la materia, y generalmente es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, temperatura de lavado y concentración de sales. En general, sondas más largas requieren mayores temperaturas para la hibridación apropiada, mientras que sondas más cortas necesitan menores temperaturas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para la re-hibridación cuando las cadenas complementarias están presentes en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de identidad deseado entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, de esto resulta que temperaturas relativas mayores tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que temperaturas menores menos. Para detalles adicionales y la explicación de la rigurosidad de reacciones de hibridación véase Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

- [0088]** “Condiciones de alta rigurosidad”, como se define en este documento, se identifican por aquellas que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado; cloruro sódico 0,015 M / citrato de sodio 0,0015 M / dodecilsulfato de sodio al 0,1% a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturizante; 50% (v/v) de formamida con albúmina de suero bovino al 0,1% / Ficoll al 0,1% / polivinilpirrolidona al 0,1% de / tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C; o (3) emplean formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1%, 5 x disolución Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato de sodio) y formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.
- [0089]** “Condiciones moderadamente rigurosas” pueden identificarse como se describe por Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen incubación durante la noche a 37°C en una disolución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x disolución Denhardt, sulfato de dextrano al 10% y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturizado, seguido de lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc., según sea necesario para adaptar factores tales como la longitud de la sonda y similares.
- [0090]** El término “cebador” o “cebadores” se refiere a secuencias de oligonucleótidos que se hibridan con un polinucleótido diana de ARN o ADN complementario y sirven de puntos de partida para la síntesis escalonada de un polinucleótido a partir de mononucleótidos por la acción de una nucleotidiltransferasa como se produce, por ejemplo, en una reacción en cadena de la polimerasa.
- [0091]** El término “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operativamente ligada en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. La células eucariotas son conocidas por utilizar promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.
- [0092]** El ácido nucleico está “operativamente ligado” cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está operativamente ligado a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente ligado a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está operativamente ligado a una secuencia codificante si está posicionado de forma que facilite la traducción. Generalmente, “operativamente ligado” significa que las secuencias de ADN que están ligadas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La ligación se lleva a cabo por ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, los adaptadores o ligadores de oligonucleótidos sintéticos se usan según la práctica convencional.
- [0093]** La “citotoxicidad celular mediada por anticuerpos” y “ADCC” se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos espontáneos (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente producen lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar ADCC, los linfocitos NK, sólo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las patentes de EE.UU. nº 5.500.362 ó 5.821.337. Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre de periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos espontáneos (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes y col. PNAS (USA), 95:652-656 (1998).
- [0094]** Las “células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células mononucleares de sangre de periférica (PBMC), linfocitos citolíticos espontáneos (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; prefiriéndose PBMC y linfocitos NK.
- [0095]** Los términos “receptor Fc” y “FcR” se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, que incluyen

variantes alélicas y alternativamente formas cortadas y empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activador”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”) que tienen secuencias de aminoácidos similares que se diferencian principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosina (ITAM) en su dominio
 5 citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición de inmunorreceptores basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase Daëron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991); Capel y col., Immunomethods, 4:25-34 (1994); y de Haas y col., J. Lab. Clin. Med., 126:330-41 (1995). Otros FcR que incluyen aquellos que van a identificarse en el futuro
 10 están englobados por el término “FcR” en este documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y col., J. Immunol., 117:587 (1976); y Kim y col., J. Immunol., 24:249 (1994)). Los FcR en este documento incluyen polimorfismos tales como el dimorfismo genético en el gen que codifica FcγRIIIa produciendo tanto una fenilalanina (F) como una valina (V) en la posición de aminoácido 158, localizada en la región del receptor que se une a IgG1. Se ha mostrado que la valina homocigótica FcγRIIIa (FcγRIIIa-158V) tiene una mayor afinidad por IgG1 humana y median en el aumento de ADCC *in vitro* con
 15 respecto a la fenilalanina homocigótica FcγRIIIa (FcγRIIIa-158F) o receptores heterocigóticos (FcγRIIIa-158F/V).

[0096] La “citotoxicidad dependiente de complemento” o “CDC” se refiere a la capacidad de una molécula de lisar una diana en presencia de complemento. La ruta de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) complejoado con
 20 un antígeno consanguíneo. Para evaluar la activación del complemento puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996).

II. PROCEDIMIENTOS TÍPICOS Y MATERIALES DE LA INVENCION

[0097] Los procedimientos y ensayos desvelados en este documento están dirigidos al examen de la expresión de uno o más biomarcadores en una muestra de tejido o de células de mamífero, siendo la determinación de esa expresión de uno o más biomarcadores tales predictiva o indicativa de si la muestra de tejido o de células será sensible o no a agentes inductores de apoptosis tales como Apo2L/TRAIL y anticuerpos agonistas anti-DR5. Los procedimientos y ensayos incluyen aquellos que examinan la expresión de biomarcadores tales como ciertas
 30 fucosiltransferasas, en particular fucosiltransferasa 3 (FUT3) y/o fucosiltransferasa 6 (FUT6), además de los antígenos Sialyl Lewis A y/o X.

[0098] Como se ha tratado anteriormente, hay algunas poblaciones de tipos de células humanas enfermas (tales como ciertas poblaciones de células cancerosas) que son resistentes a la inducción de apoptosis. Por tanto,
 35 se cree que los procedimientos y ensayos desvelados pueden proporcionar medios convenientes, eficientes y posiblemente rentables para obtener datos e información útil en la evaluación de terapias apropiadas o eficaces para tratar pacientes. Por ejemplo, en un paciente que ha sido diagnosticado con cáncer o una afección relacionada con la inmunidad podría realizarse una biopsia para obtener una muestra de tejido o de células, y la muestra podría examinarse a modo de diversos ensayos *in vitro* para determinar si las células del paciente serían sensibles o no a
 40 un agente terapéutico tal como Apo2L/TRAIL o anticuerpo de receptores de muerte.

[0099] La invención proporciona procedimientos para predecir la sensibilidad de una muestra de tejido o de células de mamífero (tal como una célula cancerosa) a Apo2L/TRAIL o un anticuerpo agonista de receptores de muerte. En los procedimientos se obtiene una muestra de tejido o de células de mamífero y se examina para la
 45 expresión de uno o más biomarcadores. Los procedimientos pueden realizarse en una variedad de formas de ensayo que incluyen ensayos que detectan la expresión de ARNm, ensayos enzimáticos que detectan la presencia de actividad enzimática y ensayos inmunohistoquímicos. La determinación de la expresión de biomarcadores tales en dichos tejidos o células será predictiva de que tales tejidos o células serán sensibles a la actividad inductora de apoptosis de Apo2L/TRAIL y/o anticuerpo de receptores de muerte. Los solicitantes encontraron sorprendentemente
 50 que la expresión de tales biomarcadores particulares establece una correlación con la sensibilidad de tales tejidos y células a agentes inductores de apoptosis tales como Apo2L/TRAIL y anticuerpos agonistas de receptores de muerte.

[0100] Como se trata más adelante, la expresión de diversos biomarcadores en una muestra puede
 55 analizarse por varias metodologías, muchas de las cuales se conocen en la técnica y son entendidas por el experto que incluyen, pero no se limitan a, análisis inmunohistoquímico y/o Western, ensayos cuantitativos basados en sangre (como, por ejemplo, ELISA en suero) (para examinar, por ejemplo, niveles de expresión de proteínas), ensayos enzimáticos de actividad bioquímica, hibridación *in situ*, análisis Northern y/o análisis por PCR de ARNm y análisis de Southern genómico (para examinar, por ejemplo, la delección o amplificación de genes), además de uno

cualquiera de la amplia variedad de ensayos que pueden realizarse por análisis de matrices de genes y/o tejidos. Los protocolos típicos para evaluar el estado de genes y productos génicos se encuentran, por ejemplo, en Ausubel y col. eds., 1995, *Current Protocols In Molecular Biology*, Unidades 2 (transferencia Northern), 4 (transferencia Southern), 15 (inmunotransferencia) y 18 (análisis por PCR).

5

[0101] Los protocolos más adelante que se refieren a la detección de biomarcadores particulares, tales como fucosiltransferasa 3 (FUT3), fucosiltransferasa 6 (FUT6), Sialyl Lewis A, y Sialyl Lewis X, en una muestra se proporcionan más adelante para fines ilustrativos.

10 **[0102]** Los procedimientos opcionales de la invención incluyen protocolos que examinan o prueban la presencia de proteínas Sialyl Lewis A y/o Sialyl Lewis X en una muestra de tejido o de células de mamífero. Puede emplearse una variedad de procedimientos para detectar proteínas relacionadas con Sialyl Lewis A y/o Sialyl Lewis X e incluyen, por ejemplo, análisis inmunohistoquímico, inmunoprecipitación, análisis de transferencia Western, ensayos de unión molecular, ELISA, ELIFA, citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS) y similares. Por
15 ejemplo, un procedimiento opcional de detección de la expresión de proteína relacionada con Sialyl Lewis A y/o Sialyl Lewis X en un tejido o muestra comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo de Sialyl Lewis A y/o Sialyl Lewis X, un fragmento reactivo con Sialyl Lewis A y/o Sialyl Lewis X del mismo o una proteína recombinante que contiene una región de unión a antígeno de un anticuerpo de Sialyl Lewis A y/o Sialyl Lewis X; y luego detectar la unión de la proteína relacionada con Sialyl Lewis A y/o Sialyl Lewis X en la muestra.

20

[0103] En realizaciones particulares de la invención, la expresión de proteínas de Sialyl Lewis A y/o Sialyl Lewis X en una muestra se examina usando protocolos de inmunohistoquímica y tinción. Se ha mostrado que la tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido es un procedimiento fidedigno de evaluación o detección de la presencia de proteínas en una muestra. Las técnicas de inmunohistoquímica ("IHC") utilizan un anticuerpo para la
25 sonda y visualizan antígenos celulares *in situ*, generalmente por procedimientos cromogénicos o fluorescentes.

[0104] Para la preparación de muestras puede usarse una muestra de tejido o de células de un mamífero (normalmente un paciente humano). Ejemplos de muestras incluyen, pero no se limitan a, células cancerosas tales como células de cáncer de colon, mama, próstata, ovario, pulmón, estómago, páncreas, linfoma y leucemia. La
30 muestra puede obtenerse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, extirpación quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado. En una realización, la muestra se fija y se incorpora en parafina o similares.

[0105] La muestra de tejido puede fijarse (es decir, conservarse) por metodología convencional (véase, por
35 ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", 3ª edición (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, Nueva York; The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.). Un experto en la materia apreciará que la elección de un fijador se determina por el fin para el que la muestra va a teñirse histológicamente o
40 analizarse de otro modo. Un experto en la materia también apreciará que la duración de la fijación depende del tamaño de la muestra de tejido y el fijador usado. A modo de ejemplo, para fijar una muestra puede usarse formalina tamponada neutra, Bouin o paraformaldehído.

[0106] Generalmente, la muestra se fija primero y luego se deshidrata mediante una serie ascendente de
45 alcoholes, se infiltra y se incorpora en parafina u otros medios de seccionamiento de manera que la muestra de tejido pueda seccionarse. Alternativamente, el tejido puede seccionarse y fijarse las secciones obtenidas. A modo de ejemplo, la muestra de tejido puede incorporarse y procesarse en parafina por metodología convencional (véase por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", arriba). Ejemplos de parafina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, Paraplast, Broid y Tissuemay. Una vez que se
50 incorpora la muestra de tejido, la muestra puede seccionarse por un microtomo o similares (véase por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", arriba). A modo de ejemplo de este procedimiento, las secciones pueden oscilar de aproximadamente tres micrómetros a aproximadamente cinco micrómetros de espesor. Una vez seccionada, las secciones pueden unirse a portaobjetos por varios procedimientos convencionales. Ejemplos de adhesivos a portaobjetos incluyen, pero no se limitan a, silano, gelatina, poli-L-lisina y
55 similares. A modo de ejemplo, las secciones incorporadas en parafina pueden unirse a portaobjetos positivamente cargados y/o portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina.

[0107] Si la parafina se ha usado como material de incorporación, las secciones de tejido se desparafinan generalmente y se rehidratan en agua. Las secciones de tejido pueden desparafinarse por varias metodologías

estándar convencionales. Por ejemplo, pueden usarse xilenos y una serie gradualmente descendente de alcoholes (véase por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", arriba). Alternativamente pueden usarse agentes no orgánicos desparafinantes comercialmente disponibles tales como Hemo-De7 (CMS, Houston, Texas).

5

[0108] Opcionalmente, posterior a la preparación de muestras, una sección de tejido puede analizarse usando IHC. La IHC puede realizarse en combinación con técnicas adicionales tales como tinción morfológica e/o hibridación por fluorescencia *in situ*. Están disponibles dos procedimientos generales de IHC; ensayos directos e indirectos. Según el primer ensayo, la unión de anticuerpo al antígeno diana (por ejemplo, Sialyl Lewis A y/o Sialyl Lewis X) se determina directamente. Este ensayo directo usa un reactivo marcado tal como una marca fluorescente o un anticuerpo primario marcado con enzima que puede visualizarse sin más interacción de anticuerpos. En un ensayo indirecto típico, el anticuerpo primario sin conjugar se une al antígeno y luego un anticuerpo secundario marcado se une al anticuerpo primario. Si el anticuerpo secundario está conjugado con una marca enzimática, se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico para proporcionar la visualización del antígeno. La amplificación de

10

15

[0109] Los anticuerpos primarios y/o secundarios usados para la inmunohistoquímica normalmente se marcarán con un resto detectable. Están disponibles numerosas marcas que pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías:

20

(a) Radioisótopos tales como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I . El anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo usando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, volúmenes 1 y 2, Coligen y col.; Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, Nueva York, Pubs. (1991), por ejemplo, y la radiactividad puede medirse usando

25

recuento por centelleo.

(b) Partículas de oro coloidal.

(c) Marcas fluorescentes que incluyen, pero no se limitan a, quelatos de tierras raras (quelatos de europio), Texas Red, rodamina, fluoresceína, dansilo, Lissamine, umbeliferona, ficoeritrina, ficocianina o fluoróforos comercialmente disponible tales como SPECTRUM ORANGE7 y SPECTRUM GREEN7 y/o derivados de uno cualquiera o más de los anteriores. Las marcas fluorescentes pueden conjugarse con el anticuerpo usando, por ejemplo, las técnicas desveladas en *Current Protocols in Immunology*, arriba. La fluorescencia puede cuantificarse usando un fluorímetro.

30

(d) Están disponibles diversas marcas enzima-sustrato y la patente de EE.UU. nº 4.275.149 proporciona una revisión de algunas de éstas. La enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse usando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato que puede medirse espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se describen anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente por una reacción química y puede entonces emitir luz que puede medirse (usando, por ejemplo, un quimioluminómetro) o dona energía a un aceptor fluorescente. Ejemplos de marcas enzimáticas incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; la patente de EE.UU. nº 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato-deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido-oxidasas (por ejemplo, glucosa-oxidasa, galactosa-oxidasa y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina-oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Las técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos se describen en O'Sullivan y col., *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay* en *Methods in Enzym.* (ed. J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, Nueva York, 73:147-166 (1981).

35

40

45

50 **[0110]**

Ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

(i) Peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrógeno-peroxidasa como sustrato, oxidando la hidrógeno-peroxidasa un precursor de colorante (por ejemplo, ortoifenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB));

55

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenilfosfato como sustrato cromogénico; y

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

[0111]

Están disponibles numerosas otras combinaciones de enzima-sustrato para aquellos expertos en la

materia. Para una revisión general de éstas véanse las patentes de EE.UU. nº 4.275.149 y 4.318.980. Algunas veces, la marca está indirectamente conjugada con el anticuerpo. El experto será consciente de diversas técnicas para lograr esto. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las cuatro amplias categorías de marcas mencionadas anteriormente puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina y, por tanto, la marca puede conjugarse con el anticuerpo de esta manera indirecta. Alternativamente, para lograr la conjugación indirecta de la marca con el anticuerpo, el anticuerpo está conjugado con un hapteno pequeño y uno de los diferentes tipos de marcas mencionados anteriormente está conjugado con un anticuerpo anti-hapteno. Por tanto, puede lograrse la conjugación indirecta de la marca con el anticuerpo.

10 **[0112]** Aparte de los procedimientos de preparación de muestras tratados anteriormente puede desearse otro tratamiento de la sección de tejido antes de, durante o tras la IHC, por ejemplo, pueden llevarse a cabo procedimientos de recuperación de epítopes tales como calentamiento de la muestra de tejido en tampón citrato (véase, por ejemplo, Leong y col. Appl. Immunohistochem. 4(3):201 (1996)).

15 **[0113]** Tras una etapa de bloqueo opcional, la sección de tejido se expone a anticuerpo primario durante un periodo de tiempo suficiente y bajo condiciones adecuadas de forma que el anticuerpo primario se una al antígeno de proteína diana en la muestra de tejido. Condiciones apropiadas para lograr esto pueden determinarse por experimentación rutinaria. El grado de unión del anticuerpo a la muestra se determina usando una cualquiera de las marcas detectables tratadas anteriormente. Preferentemente, la marca es una marca enzimática (por ejemplo, HRPO) que cataliza una alteración química del sustrato cromogénico tal como el cromógeno 3,3'-diaminobencidina. Preferentemente, la marca enzimática está conjugada con anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo primario (por ejemplo, el anticuerpo primario es anticuerpo policlonal de conejo y el anticuerpo secundario es anticuerpo de cabra anti-conejo).

25 **[0114]** Opcionalmente, los anticuerpos empleados en el análisis de IHC para detectar la expresión de Sialyl Lewis A o anti-Sialyl Lewis X son anticuerpos anti-Sialyl Lewis A y anti-Sialyl Lewis X, respectivamente. Opcionalmente, el anticuerpo anti-Sialyl Lewis A y anti-Sialyl Lewis X es un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos Anti-Sialyl Lewis A y anti-Sialyl Lewis X están fácilmente disponibles en la materia, incluyendo a partir de diversas fuentes comerciales.

30 **[0115]** Por tanto, los especímenes preparados pueden montarse y cubrirse con cubreobjetos. Entonces se determina la evaluación del portaobjetos, por ejemplo, usando un microscopio, y pueden emplearse criterios de intensidad de tinción rutinariamente usados en la materia. Si el antígeno es la proteína Sialyl Lewis A y/o Sialyl Lewis X, los criterios de intensidad de tinción pueden evaluarse del siguiente modo:

35

TABLA 1

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

[0116] Normalmente, una puntuación del patrón de tinción de aproximadamente 2+ o superior en un ensayo de IHC tal se cree que es predictiva o indicativa de la sensibilidad de una célula de mamífero (tal como una célula cancerosa de mamífero) a Apo2L/TRAIL o un anticuerpo agonista de receptores de muerte.

[0117] En procedimientos alternativos, la muestra puede ponerse en contacto con un anticuerpo específico para dicho biomarcador en condiciones suficientes para que se forme un complejo anticuerpo-biomarcador y luego detectar dicho complejo. La presencia del biomarcador puede llevarse a cabo de varias formas tales como por procedimientos de transferencia Western y ELISA para ensayar una amplia variedad de tejidos y muestras, que incluye plasma o suero. Está disponible un amplio intervalo de técnicas de inmunoensayo que usan una forma de ensayo tal, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653. Éstas incluyen tanto ensayos de un único sitio y de dos sitios como tipo "sándwich" de los tipos no competitivos, además de en los ensayos de unión competitivos tradicionales. Estos ensayos también incluyen la unión directa de un anticuerpo marcado a un biomarcador diana.

[0118] Los ensayos de tipo sándwich están entre los ensayos más útiles y comúnmente usados. Existen varias variaciones de la técnica de ensayos de tipo sándwich, y todas pretenden estar englobadas por la presente invención. Brevemente, en un ensayo directo típico, un anticuerpo sin marcar se inmoviliza sobre un sustrato sólido,

y la muestra que va a probarse se pone en contacto con la molécula unida. Entonces, después de un periodo de incubación adecuado, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de un inmunocomplejo, se añade un segundo anticuerpo específico para el antígeno, marcado con una molécula indicadora que puede producir una señal detectable, y se incuba, dejando el tiempo suficiente para la formación de otro complejo de anticuerpo-
 5 anticuerpo marcado con antígeno. Cualquier material sin reaccionar se lava, y la presencia del antígeno se determina por la observación de una señal producida por la molécula indicadora. Los resultados pueden ser tanto cualitativos, por simple observación de la señal visible, como pueden cuantificarse comparando con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de biomarcador.

- 10 **[0119]** Las variaciones en el ensayo directo incluyen un ensayo simultáneo en el que tanto la muestra como el anticuerpo marcado se añaden simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son muy conocidas para aquellos expertos en la materia, que incluyen cualquier variación mínima como serán rápidamente evidentes. En un ensayo de tipo sándwich directo típico, un primer anticuerpo que tiene especificidad por el biomarcador está tanto covalentemente como pasivamente unido a una superficie sólida. La superficie sólida es normalmente vidrio o un
 15 polímero, siendo los polímeros más comúnmente usados celulosa, poliácridamida, nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tubos, perlas, discos de microplacas o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son muy conocidos en la técnica y generalmente consisten en reticulación, unión covalente o adsorción física, el complejo polímero-anticuerpo se lava en la preparación para la muestra de prueba. Entonces se añade una alícuota de la muestra que va a probarse al complejo en fase sólida y se incuba durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, 2-40
 20 minutos o durante la noche si es más conveniente) y bajo condiciones adecuadas (por ejemplo, de temperatura ambiente a 40°C tal como entre 25°C y 32°C, ambos incluidos) para permitir la unión de cualquier subunidad presente en el anticuerpo. Tras el periodo de incubación, la fase sólida de la subunidad de anticuerpo se lava y se seca y se incuba con un segundo anticuerpo específico para una parte del biomarcador. El segundo anticuerpo está
 25 ligado a una molécula indicadora que se usa para indicar la unión del segundo anticuerpo al marcador molecular.

- [0120]** Un procedimiento alternativo implica inmovilizar los biomarcadores diana en la muestra y luego exponer la diana inmovilizada a un anticuerpo específico que puede o puede no marcarse con una molécula indicadora. Dependiendo de la cantidad de diana y la intensidad de la señal de la molécula indicadora, una diana
 30 unida puede ser detectable mediante marcado directo con el anticuerpo. Alternativamente, un segundo anticuerpo marcado, específico para el primer anticuerpo, se expone al complejo diana-primer anticuerpo para formar un complejo terciario diana-primer anticuerpo-segundo anticuerpo. El complejo se detecta por la señal emitida por la molécula indicadora. Por "molécula indicadora" como se usa en la presente memoria descriptiva se indica una molécula que, por su naturaleza química, proporciona una señal analíticamente identificable que permite la
 35 detección del anticuerpo unido a antígeno. Las moléculas indicadoras más comúnmente usadas en este tipo de ensayo son tanto enzimas, fluoróforos como moléculas que contienen radionúclidos (es decir, radioisótopos) y moléculas quimioluminiscentes.

- [0121]** En el caso de un inmunoensayo de enzima, una enzima está conjugada con el segundo anticuerpo, generalmente por medio de glutaraldehído o peryodato. Sin embargo, como será fácilmente reconocido, existe una amplia variedad de técnicas de conjugación diferentes que están fácilmente disponibles para el experto. Las enzimas comúnmente usadas incluyen peroxidasa de rábano picante, glucosa-oxidasa, glucosa-galactosidasa y fosfatasa alcalina, entre otras. Los sustratos que van a usarse con las enzimas específicas se eligen generalmente para la producción, tras la hidrólisis por la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Ejemplos de
 45 enzimas adecuadas incluyen fosfatasa alcalina y peroxidasa. También es posible emplear sustratos fluorogénicos que dan un producto fluorescente en vez de los sustratos cromogénicos anotados anteriormente. En todos los casos, el anticuerpo marcado con enzima se añade al primer complejo anticuerpo-marcador molecular que permite que se una, y luego se lava el reactivo en exceso. Entonces, una disolución que contiene el sustrato apropiado se añade al complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo. El sustrato reaccionará con la enzima ligada al segundo
 50 anticuerpo dando una señal visual cualitativa que puede cuantificarse adicionalmente, normalmente espectrofotométricamente, para dar una indicación de la cantidad de biomarcador que estaba presente en la muestra. Alternativamente, los compuestos fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Si se activa por iluminación con luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía de la luz, induciendo un estado de
 55 excitabilidad en la molécula, seguido de emisión de la luz a un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Como en el EIA, se deja que el anticuerpo marcado fluorescente se una al primer complejo anticuerpo-marcador molecular. Después de eliminarse por lavado el reactivo sin unir, el complejo terciario restante se expone entonces a luz de la longitud de onda apropiada, la fluorescencia observada indica la presencia del marcador molecular de interés. Las técnicas de inmunofluorescencia y EIA están ambas muy bien establecidas en la

materia. Sin embargo, también pueden emplearse otras moléculas indicadores tales como moléculas de radioisótopos, quimioluminiscentes o bioluminiscentes.

[0122] Se contempla que las técnicas anteriormente descritas también puedan emplearse para detectar la expresión de polipéptidos de FUT3 o FUT 6.

[0123] Los procedimientos de la invención incluyen adicionalmente protocolos que examinan la presencia y/o expresión de ARNm tales como ARNm de FUT3 y/o FUT6 en una muestra de tejido o de células. Los procedimientos para la evaluación de ARNm en células son muy conocidos e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación usando sondas de ADN complementario (tales como hibridación *in situ* usando ribosondas de FUT3 y/o FUT6 marcadas, transferencia Northern y técnicas relacionadas) y diversos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (tales como RT-PCR usando cebadores complementarios específicos para FUT3 y/o FUT6, y otros procedimientos de detección de tipo amplificación tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares).

[0124] Las muestras de tejido o de células de mamíferos pueden ensayarse convenientemente para, por ejemplo, ARNm de FUT3 y/o FUT6 usando transferencia Northern, puntual o análisis de PCR. Por ejemplo, los ensayos de RT-PCR tales como los ensayos de PCR cuantitativa son muy conocidos en la técnica. En una realización ilustrativa de la invención, un procedimiento para detectar un ARNm de FUT3 y/o FUT6 en una muestra biológica comprende producir ADNc de la muestra por transcripción inversa usando al menos un cebador; amplificar el ADNc así producido usando un polinucleótido de FUT3 y/o FUT6 como cebadores de sentido directo y de sentido contrario para amplificar ADNc de FUT3 y/o FUT6 en él; y detectar la presencia del ADNc de FUT3 y/o FUT6 amplificado. Además, tales procedimientos pueden incluir una o más etapas que permiten determinar los niveles de ARNm de FUT3 y/o FUT6 en una muestra biológica (por ejemplo, examinando simultáneamente los niveles en la secuencia de ARNm de control comparativa de un gen "de mantenimiento" tal como un miembro de la familia de actina). Opcionalmente puede determinarse la secuencia del ADNc de FUT3 y/o FUT6 amplificado.

[0125] Las realizaciones de material de este aspecto de la invención incluyen cebadores de FUT3 y/o FUT6 y pares de cebadores que permiten la amplificación específica de los polinucleótidos de la invención o de cualquier parte específica de los mismos, y sondas que se hibridan selectivamente o específicamente con moléculas de ácidos nucleicos de la invención o con cualquier parte de los mismos. Las sondas pueden marcarse con un marcador detectable tal como, por ejemplo, un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, quelante metálico o enzima. Tales sondas y cebadores pueden usarse para detectar la presencia de polinucleótidos de FUT3 y/o FUT6 en una muestra y como medio para detectar una célula que expresa proteínas de FUT3 y/o FUT6. Como entenderá el experto, pueden prepararse muchísimos cebadores y sondas diferentes basándose en las secuencias proporcionadas en este documento y usadas eficazmente para amplificar, clonar y/o determinar la presencia y/o niveles de ARNm de FUT3 y/o FUT6.

[0126] Procedimientos opcionales de la invención incluyen protocolos que examinan o detectan ARNm tales como FUT3 y FUT6 u otros ARNm de fucosiltransferasa, en una muestra de tejido o de células, por tecnologías de micromatrices. Usando micromatrices de ácido nucleico, muestras de ARNm de prueba y de control de muestras de tejido de prueba y de control se transcriben inversamente y se marcan para generar sondas de ADNc. Las sondas se hibridan entonces con una matriz de ácidos nucleicos inmovilizada sobre un soporte sólido. La matriz está configurada de forma que se conozca la secuencia y posición de cada miembro de la matriz. Por ejemplo, una selección de genes que tiene posibilidad de expresarse en ciertos estados de enfermedad puede disponerse en matriz sobre un soporte sólido. La hibridación de una sonda marcada con un miembro de matriz particular indica que la muestra de la que se derivó la sonda expresa ese gen. El análisis de expresión génica diferencial de tejido de enfermedad puede proporcionar valiosa información. La tecnología de micromatrices utiliza técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y tecnología de computación para evaluar la expresión del perfil de ARNm de miles de genes dentro de un único experimento (véase, por ejemplo, documento WO 01/75166 publicado el 11 de octubre de 2001; véanse, por ejemplo, el documento US 5.700.637, la patente de EE.UU. 5.445.934 y la patente de EE.UU. 5.807.522, Lockart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680 (1996); Cheung, V.G. y col., Nature Genetics 21(Suppl):15-19 (1999) para una discusión de la fabricación de matrices). Las micromatrices de ADN son matrices en miniatura que contienen fragmentos génicos que tanto se sintetizan directamente sobre como se aplican en puntos sobre vidrio u otros sustratos. Miles de genes están normalmente representados en una única matriz. Un experimento de micromatrices típico implica las siguientes etapas: 1. preparación de diana fluorescentemente marcada de ARN aislado de la muestra, 2. hibridación de la diana marcada con la micromatriz, 3. lavado, tinción y barrido de la matriz, 4. análisis de la imagen barrida y 5. generación de perfiles de expresión génica. Actualmente se están usando dos tipos principales de micromatrices de ADN: matrices de oligonucleótidos (normalmente 25 a 70 meros) y matrices de expresión génica que contienen productos de PCR preparados a partir de ADNc. En la formación de una matriz, los

oligonucleótidos pueden ser tanto prefabricados como aplicados por puntos a la superficie o sintetizarse directamente sobre la superficie (*in situ*).

[0127] El sistema Affymetrix GeneChip® es un sistema de micromatrices comercialmente disponible que comprende matrices fabricadas mediante síntesis directa de oligonucleótidos sobre una superficie de vidrio. Matrices de sondas/genes: los oligonucleótidos, normalmente 25 meros, se sintetizan directamente sobre una oblea de vidrio mediante una combinación de fotolitografía basada en semiconductores y tecnologías químicas de síntesis en fase sólida. Cada matriz contiene hasta 400.000 oligonucleótidos diferentes y cada oligonucleótido está presente en millones de copias. Como las sondas de oligonucleótidos se sintetizan en localizaciones conocidas sobre la matriz, los patrones de hibridación y las intensidades de señal pueden interpretarse en términos de identidad génica y niveles relativos de expresión por el software Affymetrix Microarray Suite. Cada gen está representado sobre la matriz por una serie de sondas de oligonucleótidos diferentes. Cada par de sondas consiste en un oligonucleótido de apareamiento perfecto y un oligonucleótido de desapareamiento. La sonda de apareamiento perfecto tiene una secuencia exactamente complementaria al gen particular y, por tanto, mide la expresión del gen. La sonda de desapareamiento se diferencia de la sonda de apareamiento perfecto por una única sustitución de bases en la posición de bases central, perturbando la unión del transcrito del gen diana. Esto ayuda a determinar la hibridación de fondo y no específica que contribuye a la señal medida para el oligonucleótido de apareamiento perfecto. El software Microarray Suite resta las intensidades de hibridación de las sondas de desapareamiento de aquellas de las sondas de apareamiento perfecto para determinar el valor de intensidad absoluto o específico para cada conjunto de sondas. Las sondas se eligen basándose en la actual información de Genbank y otros repositorios de nucleótidos. Se cree que las secuencias reconocen regiones únicas del extremo 3' del gen. Se usa un horno de hibridación de GeneChip (horno "asador") para llevar a cabo la hibridación de hasta 64 matrices a la vez. La estación hidráulica realiza el lavado y la tinción de las matrices de sondas. Está completamente automatizada y contiene cuatro módulos, conteniendo cada módulo una matriz de sondas. Cada módulo está controlado independientemente por el software Microarray Suite usando protocolos hidráulicos previamente programados. El escáner es un escáner de fluorescencia láser confocal que mide la intensidad de fluorescencia emitida por el ARNc marcado unido a las matrices de sondas. El terminal de trabajo informático con el software Microarray Suite controla la estación hidráulica y el escáner. El software Microarray Suite puede controlar hasta ocho estaciones hidráulicas usando protocolos de hibridación previamente programados, de lavado y de tinción para la matriz de sondas. El software adquiere y convierte los datos de intensidad de hibridación en una llamada de presencia/ausencia para cada gen usando algoritmos apropiados. Finalmente, el software detecta cambios en la expresión génica entre experimentos por análisis de comparación y formatea las salidas en archivos .txt que pueden usarse con otros programas informáticos para el análisis de datos adicional.

[0128] La expresión de un biomarcador seleccionado también puede evaluarse examinando la delección génica o amplificación génica. La delección o amplificación génica puede medirse por una cualquiera de una amplia variedad de protocolos conocidos en la técnica, por ejemplo, por transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)), transferencia puntual (análisis de ADN) o hibridación *in situ* (por ejemplo, FISH) usando una sonda apropiadamente marcada, procedimientos citogenéticos o hibridación genómica comparativa (CGH) usando una sonda apropiadamente marcada. A modo de ejemplo, estos procedimientos pueden emplearse para detectar la delección de la amplificación de los genes FUT3 y/o FUT6.

[0129] Adicionalmente puede examinarse el estado de metilación del biomarcador tal como el gen FUT3 y/o FUT6 en una muestra de tejido o de células. La desmetilación y/o hipermetilación aberrante de islas CpG en las regiones reguladoras de 5' del gen producida frecuentemente en células inmortalizadas y transformadas puede producir expresión alterada de diversos genes. Son muy conocidos en la técnica una variedad de ensayos para examinar el estado de metilación de un gen. Por ejemplo, pueden utilizarse, en soluciones de hibridación Southern, enzimas de restricción sensibles a la metilación que no pueden escindir secuencias que contienen sitios CpG metilados para evaluar el estado de metilación de islas CpG. Además, MSP (PCR específica de metilación) puede perfilar rápidamente el estado de metilación de todos los sitios CpG presentes en una isla CpG de un gen dado. Este procedimiento implica la modificación inicial de ADN por bisulfito de sodio (que convertirá todas las citosinas sin metilar en uracilo), seguido de amplificación usando cebadores específicos para ADN metilado frente a sin metilar. Los protocolos que implican la interferencia de metilación también pueden encontrarse, por ejemplo, en Current Protocols In Molecular Biology, unidad 12, Frederick M. Ausubel y col. eds., 1995; De Marzo y col., Am. J. Patol. 155(6): 1985-1992 (1999); Brooks y col., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 1998, 7:531-536; y Lethe y col., Int. J. Cancer 76 (6): 903-908 (1998).

[0130] La expresión de un biomarcador seleccionado en una muestra de tejido o de células también puede

examinarse a modo de ensayos funcionales o basados en actividad. Por ejemplo, si el biomarcador es una enzima, pueden realizarse ensayos conocidos en la técnica para determinar o detectar la presencia de la actividad enzimática dada en la muestra de tejido o de células.

- 5 **[0131]** En los procedimientos de la presente invención se contempla que la muestra de tejido o de células también pueda examinarse para la expresión de Apo2L/TRAIL o receptores en la muestra que se unen a Apo2L/TRAIL o anticuerpo de receptores de muerte. Como se ha descrito anteriormente y en la materia, actualmente se cree que Apo2L/TRAIL se une a al menos cinco receptores diferentes: DR4, DR5, DcR1, DcR2 y OPG. Usando procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen aquellos descritos en este documento, la expresión de
- 10 Apo2L/TRAIL, DR4, DR5, DcR1, DcR2 y/o OPG puede detectarse al nivel de ARNm y al nivel de proteínas. Como se muestra en las Figuras 10 y 11, los datos sugieren que el examinar la muestra de tejido o de células para la expresión de receptores DcR1 y/o DcR2 puede facilitar adicionalmente información de si la muestra de tejido o de células será sensible o no a tanto Apo2L/TRAIL como a anticuerpo de receptores de muerte. A modo de ejemplo, las técnicas de IHC descritas anteriormente pueden emplearse para detectar la presencia de una o más moléculas tales
- 15 en la muestra. Se contempla que en procedimientos en los que un tejido o muestra está siendo examinado no sólo para la presencia de un marcador de antígeno de FUT o Lewis, sino también para la presencia, por ejemplo, de DR4, DR5 o DcR1, puedan prepararse portaobjetos separados a partir del mismo tejido o muestra, y probar cada portaobjetos con un reactivo específico para cada biomarcador o receptor específico. Alternativamente, un único portaobjetos puede prepararse a partir de la muestra de tejido o de células, y los anticuerpos dirigidos contra cada
- 20 biomarcador o receptor pueden usarse a propósito de un protocolo de tinción multicolor para permitir la visualización y detección de los biomarcadores o receptores respectivos.

- [0132]** Posterior a la determinación de que la muestra de tejido o de células expresa uno o más de los biomarcadores que indican que la muestra de tejido o de células será sensible a la actividad de Apo2L/TRAIL o
- 25 anticuerpo de receptores de muerte, se contempla que una cantidad eficaz de Apo2L/TRAIL o anticuerpo de receptores de muerte pueda administrarse al mamífero para tratar un trastorno, tal como cáncer o trastorno relacionado con la inmunidad que está afectando al mamífero. El médico experto puede hacer el diagnóstico en mamíferos de las diversas afecciones patológicas descritas en este documento. Las técnicas de diagnóstico disponibles en la materia permiten, por ejemplo, el diagnóstico o la detección de cáncer o enfermedad relacionada
- 30 con la inmunidad en un mamífero. Por ejemplo, los cánceres pueden identificarse mediante técnicas que incluyen, pero no se limitan a, palpación, análisis de sangre, rayos X, RMN y similares. Las enfermedades relacionadas con la inmunidad también pueden identificarse fácilmente.

- [0133]** Apo2L/TRAIL o el anticuerpo de receptores de muerte puede administrarse según procedimientos
- 35 conocidos tales como administración intravenosa como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalaciones. Opcionalmente, la administración puede realizarse mediante infusión por mini-bombas usando diversos dispositivos comercialmente disponibles.

- 40 **[0134]** Las dosificaciones eficaces y los programas para administrar Apo2L/TRAIL o anticuerpo de receptores de muerte pueden determinarse empíricamente, y el hacer tales determinaciones está dentro de la habilidad en la materia. Pueden emplearse dosificaciones únicas o múltiples. Actualmente se cree que una dosificación o cantidad eficaz de Apo2L/TRAIL usada sola puede oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal o más por día. El escalado entre especies de dosificaciones puede realizarse de un modo conocido en
- 45 la técnica, por ejemplo, como se desvela en Mordenti y col., Pharmaceut. Res., 8:1351 (1991).

- [0135]** Si se emplea administración *in vivo* de Apo2L/TRAIL, las cantidades de dosificación normal pueden variar de aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal del mamífero o más por día, preferentemente de aproximadamente 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, que depende de la vía de administración. La
- 50 orientación de las dosificaciones particulares y los procedimientos de administración se proporciona en la bibliografía; véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Se anticipa que las diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes trastornos, que la administración que elige como diana, por ejemplo, un órgano o tejido puede necesitar la administración de un modo diferente al de otro órgano o tejido.

- 55 **[0136]** Se contempla que terapias todavía adicionales puedan emplearse en los procedimientos. Las una o varias terapias pueden incluir, pero no se limitan a, administración de radioterapia, citocina(s), agente(s) inhibidor(es) del crecimiento, agente(s) quimioterapéutico(s), agente(s) citotóxico(s), inhibidores de tirosina-cinasas, inhibidores de farnesil-transferasa ras, inhibidores de la angiogénesis e inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas que se

conocen en la técnica y se definen adicionalmente con particularidad anteriormente. Se contempla que tales otras terapias puedan emplearse como un agente separado de Apo2L/TRAIL o anticuerpo de receptores de muerte. Además, terapias basadas en anticuerpos terapéuticos que eligen como diana antígenos tumorales tales como Rituxan™ o Herceptin™, además de anticuerpos antiangiogénicos tales como anti-VEGF.

5

[0137] La preparación y los programas de dosificación de agentes quimioterapéuticos pueden usarse según las instrucciones del fabricante o como se determina empíricamente por el médico experto. La preparación y los programas de dosificación para tal quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder o seguir a la administración de Apo2L/TRAIL o anticuerpo de receptores de muerte, o puede administrarse simultáneamente con el mismo.

10

[0138] También puede desearse administrar anticuerpos contra otros antígenos tales como anticuerpos que se unen a CD20, CD11a, CD18, CD40, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, factor endotelial vascular (VEGF), u otros miembros de la familia de TNFR (tales como OPG, TNFR1, TNFR2, GITR, Apo-3, TACI, BCMA, BR3).

15

Alternativamente, o además, dos o más anticuerpos que se unen al mismo antígeno o a dos o más antígenos diferentes desvelados en este documento pueden coadministrarse al paciente. Algunas veces también puede ser beneficioso administrar una o más citocinas al paciente. Tras la administración pueden analizarse las células tratadas *in vitro*. Si ha habido tratamiento *in vivo*, un mamífero tratado puede monitorizarse de diversas formas muy conocidas para el médico experto. Por ejemplo, las células tumorales pueden examinarse patológicamente para ensayar necrosis o el suero puede analizarse para respuestas del sistema inmunitario.

20

[0139] Para uso en las aplicaciones descritas o sugeridas anteriormente pueden usarse kits o artículos de fabricación. Tales kits pueden comprender un medio de vehículo que está compartimentalizado para recibir en confinamiento cerrado uno o más medios de recipiente tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada medio de recipiente uno de los elementos separados que van a usarse en el procedimiento. Por ejemplo, uno de los medios de recipiente puede comprender una sonda que está marcada detectablemente o que puede marcarse detectablemente. Tal sonda puede ser un anticuerpo o polinucleótido específico para una proteína FUT3 y/o FUT6 o un gen FUT3 y/o FUT6 o mensajero, respectivamente. Si el kit utiliza hibridación de ácidos nucleicos para detectar el ácido nucleico diana, el kit también puede tener recipientes que contienen nucleótido(s) para la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana y/o un recipiente que comprende un medio indicador tal como una proteína de unión a biotina tal como avidina o estreptavidina unida a una molécula indicadora tal como una marca enzimática, fluorescente o de radioisótopo.

25

30

[0140] El kit comprenderá normalmente el recipiente descrito anteriormente y uno o varios recipientes que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario que incluyen tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas y prospectos con instrucciones para uso. Una etiqueta puede estar presente en el recipiente para indicar que la composición se usa para una terapia específica o aplicación no terapéutica, y también puede indicar indicaciones para uso tanto *in vivo* como *in vitro* tales como aquellas descritas anteriormente.

35

[0141] Los kits pueden incluir varios otros componentes, por ejemplo, un recipiente, una etiqueta en dicho recipiente y una composición contenida dentro de dicho recipiente; incluyendo la composición un anticuerpo primario que se une a una secuencia de polipéptidos de FUT3 y/o FUT6, indicando la etiqueta en dicho recipiente que la composición puede usarse para evaluar la presencia de proteínas FUT3 y/o FUT6 en al menos un tipo de célula de mamífero, e instrucciones para usar el anticuerpo de FUT3 y/o FUT6 para evaluar la presencia de proteínas FUT3 y/o FUT6 en al menos un tipo de célula de mamífero. El kit puede comprender adicionalmente un conjunto de instrucciones y materiales para preparar una muestra de tejido y aplicar anticuerpo y sonda a la misma sección de una muestra de tejido. El kit puede incluir tanto un anticuerpo primario como secundario, estando el anticuerpo secundario conjugado con una marca, por ejemplo, una marca enzimática.

40

45

[0142] Alternativamente, un kit puede comprender un recipiente, una etiqueta en dicho recipiente y una composición contenida dentro de dicho recipiente; incluyendo la composición un polinucleótido que se hibrida con un complemento de polinucleótido de FUT3 y/o FUT6 bajo condiciones rigurosas, indicando la etiqueta en dicho recipiente que la composición puede usarse para evaluar la presencia de FUT3 y/o FUT6 en al menos un tipo de célula de mamífero, e instrucciones para usar el polinucleótido de FUT3 y/o FUT6 para evaluar la presencia de ARN o ADN de FUT3 y/o FUT6 en al menos un tipo de célula de mamífero.

50

55

[0143] Otros componentes opcionales en el kit incluyen uno o más tampones (por ejemplo, tampón de bloqueo, tampón de lavado, tampón de sustrato, etc.), otros reactivos tales como sustrato (por ejemplo, cromógeno) que está químicamente alterado por una marca enzimática, disolución de recuperación de epitopes, muestras de

control (controles positivos y/o negativos), portaobjeto(s) de control, etc.

EJEMPLOS

- 5 **[0144]** Adicionalmente se describen y se ilustran diversos aspectos de la invención a modo de los siguientes ejemplos, ninguno de ellos pretende limitar el alcance de la invención.

PROCEDIMIENTOS Y MATERIALES:

10 Cultivo celular y líneas celulares

- [0145]** Las siguientes líneas de células de adenocarcinoma colorrectal humano: HCT-8, COLO 205, HCT 116, SW403, LoVo, SW948, Caco-2, COLO 201, SW1417, DLD-1, CX-1, HCT-15, LS 180, RKO, RKO-AS4S-1, SK-CO-1, SW480, SW620, SW837, CL-40, COLO-206F, COLO 320DM, COLO 320HSR, COLO-678, HT-29, KM12, LS1034, 15 SW1116 se obtuvieron del depósito ATCC (Manassas, Virginia), DSMZ (Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares), JCRB (banco japonés de recursos celulares) o ECACC (Colección europea de cultivos celulares) y se cultivaron en medio RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10%, L-glutamina 2 mM y HEPES 10 mM.

20 Ensayos de citotoxicidad

- [0146]** Se usó el ensayo de MTT (ensayo de proliferación celular no radiactivo CellTiter 96[®] de Promega), que es un ensayo colorimétrico basado en la capacidad de células viables para reducir una sal de tetrazolio amarilla soluble (MTT) a cristales de formazano azules, para determinar la cantidad de células viables después del 25 tratamiento con Apo2L/TRAIL o anticuerpo contra DR5. El ensayo de MTT se realizó mediante la adición de una disolución de colorante optimizada previamente mezclada a pocillos de cultivo de una placa de 96 pocillos que contenía diversas concentraciones (0 a 1000 ng/ml) de Apo2L/TRAIL o anticuerpo contra DR5. Durante una incubación de 4 horas, las células vivas convierten el componente de tetrazolio de la disolución de colorante en un de producto de formazano. Entonces, la disolución de solubilización/parada se añadió a los pocillos de cultivo para 30 solubilizar el producto de formazano, y la absorbancia se registró a 570 nm usando un lector de placas de 96 pocillos (SpectraMax). La lectura de absorbancia a 570 nm es directamente proporcional al número de células normalmente usadas en los ensayos de proliferación. Aunque la absorbancia máxima para el producto de formazano es 570 nm y las disoluciones puras aparecen azules, el color al final del ensayo puede no ser azul y depende de la cantidad de formazano presente con respecto a otros componentes (incluyendo suero, rojo fenol acidificado y MTT sin reducir) 35 en el medio de cultivo.

- [0147]** Los números de células se optimizaron realizando una valoración de células para producir una señal de ensayo próxima al extremo superior del intervalo lineal del ensayo. Como diferentes tipos de células tienen diferentes niveles de actividad metabólica, esto se hizo para cada línea celular por separado. Para la mayoría de las 40 células tumorales examinadas se usaron 5.000 células por pocillo a 20.000 células por pocillo.

- [0148]** Lo siguiente es una descripción etapa por etapa de los ensayos empleados:

1. Las células usadas para el bioensayo fueron de cultivos madre.
- 45 2. Determinación del número de células y viabilidad con azul de tripano, y suspensión de las células a un número final de 5.000 a 20.000 células por pocillo.
3. Dispensión de 50 µl de la suspensión de células a placa de 96 pocillos.
4. Incubación de las placas a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ durante la noche.
- 50 5. Adición de 50 µl de medio de cultivo que contiene diversas concentraciones que oscilan de 0 a 1000 ng/ml de Apo2L/TRAIL o anticuerpo contra DR5 a muestras de la placa de 96 pocillos. Los controles fueron 50 µl de medio de cultivo (sin Apo2L/TRAIL o anticuerpo contra DR5) y 100 µl de medio de cultivo (sin células). Cada experimento se realizó en un conjunto por triplicado de pocillos y en tres días independientes. El volumen total de los pocillos fue 100 µl/pocillo.
6. Incubación de las placas a 37°C durante 72 horas en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂.
- 55 7. Adición de 15 µl de disolución de colorante a cada pocillo.
8. Incubación de las placas a 37°C durante hasta 4 horas en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂.
9. Adición de 100 µl de la disolución de solubilización/parada a cada pocillo.
10. Incubación de las placas durante la noche a 37°C durante la noche.
11. Registro de la absorbancia a 570 nm de longitud de onda usando un lector de placas de 96 pocillos. Se usó

una longitud de onda de referencia de 750 nm para reducir el fondo contribuido por los residuos de células, huellas y otra absorbancia no específica.

12. El promedio de los valores de absorbancia para el control negativo se usó como valor blanco y se restó de todas las otras lecturas. El promedio de los valores de absorbancia para cada concentración de Apo2L/TRAIL o anticuerpo contra DR5 se dividió entre el promedio de los valores de absorbancia del control positivo (100% de células viables – sin tratar) para calcular la cantidad de células viables (en %).

13. Se representó el porcentaje de células viables (eje Y) frente a una concentración de Apo2L/TRAIL o anticuerpo contra DR5 (eje X, escala logarítmica) y el valor de CI_{50} se determinó localizando el valor del eje X (ng/ml) correspondiente al 50% de células viables.

Protocolo de marcado de Affymetrix

[0149] Se tomó una lectura de DO 260/280 para todas las muestras, y las muestras se ejecutaron en el BioAnalyzer. Se usaron 5 µg de ARN total de alta calidad.

A. Síntesis de la primera cadena de ADNc:

1. Hibridación de cebadores

[0150]

DEPC-H ₂ O	x µl	Mezclar con vórtex. Centrifugar rápido.
ARN (5 ug)	y µl	Incubar a 70°C durante 10 minutos.
Adición (dilución 1:4 de mezcla madre para 5 ug)	1 µl	Centrifugar rápido y poner sobre hielo
Cebador T7-(dT) ₂₄	1 µl	
Volumen	12 µl	

2. Ajuste de temperatura

[0151]

5X-tampón de 1ª cadena de ADNc	4 µl	
Añadir 7 µl (de la mezcla que queda) a cada muestra.		
DTT 0,1 M	2 µl	Mezclar con vórtex. Centrifugar rápido.
Mezcla de dNTP 10 mM	1 µl	Incubar a 42°C durante 2 minutos.
Volumen	7 µl	

3. Síntesis de la primera cadena

[0152]

Añadir 1 µl de SSII RT a cada muestra.		
SSII RT	1 µl	Mezclar pipeteando arriba y abajo -O- con vórtex ligeramente.
Centrifugar rápido.		
Volumen total	20 µl	Incubar a 42°C durante 1 hora.

B. Síntesis de la segunda cadena de ADNc

[0153]

1. Colocar la reacción de la primera cadena sobre hielo. Centrifugar brevemente para rebajar la condensación en los lados del tubo.
2. Preparar la siguiente mezcla madre de la segunda cadena.

H ₂ O tratada con DEPC	91 µl	
5X-tampón de reacción de la 2ª cadena	30 µl	
Mezcla de dNTP 10 mM	3 µl	
10 U/µl de ADN ligasa	1 µl	

10 U/μl de ADN-polimerasa I 4 μl
 2 U/μl de RNasa H 1 μl
 Volumen total 130 μl

- 5 3. Añadir 130 μl de la mezcla madre de la segunda cadena a los 20 μl de ADNc de la primera cadena (volumen final = 150 μl)
 4. Mezclar pipeteando arriba y abajo -O- con vórtex ligeramente. Centrifugar rápido.
 5. Incubar a 16°C durante 2 horas en un baño de agua de refrigeración.
 10 6. Añadir 2 μl [10 U] de ADN-polimerasa T4. Mezclar pipeteando arriba y abajo -O- con vórtex ligeramente. Centrifugar rápido.
 7. Incubar durante 5 minutos a 16°C.
 8. Añadir 10 μl de EDTA 0,5 M. Agitar ligeramente con vórtex. Centrifugar rápido.
 9. Avanzar al procedimiento de purificación para ADNc -O- guardar a -20°C para uso posterior.

15 **[0154]** Purificación del ADNc bicatenario (módulo de purificación de muestras GeneChip)

1. Añadir luego 600 μl de tampón de unión a ADNc a 162 μl de la preparación de síntesis de ADNc bicatenario final.
 Mezclar con vórtex durante 3 segundos.
 20 2. Comprobar que el color de la mezcla es amarillo (similar al del tampón de unión a ADNc sin la reacción de síntesis de ADNc).
 Si el color de la mezcla es naranja o violeta, añadir 10 μl de acetato sódico 3 M, pH 5,0, y mezclar.
 El color de la mezcla virará a amarillo.
 25 3. Aplicar 500 μl de la muestra a la columna de centrifugación para la purificación del ADNc que se encuentra en un tubo de recogida de 2 ml y centrifugar durante 1 minuto a $\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm). Desechar el flujo continuo como residuo peligroso.
 4. Volver a cargar la columna de centrifugación con el resto de la mezcla (262 μl) y centrifugar como antes. Desechar el flujo continuo como residuo peligroso y desechar el tubo de recogida.
 30 5. Transferir la columna de centrifugación a un nuevo tubo de recogida de 2 ml (suministrado). Pipetear 750 μl de tampón de lavado de ADNc sobre la columna de centrifugación. Centrifugar durante 1 minuto a $\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm). Desechar el flujo continuo.
 6. Abrir la tapa de la columna de centrifugación y centrifugar durante 5 minutos a velocidad máxima ($\leq 25.000 \times g$). Colocar las columnas en la centrífuga usando dos cubos. Posicionar las tapas sobre el cubo contiguo de manera que estén orientadas en la dirección opuesta a la rotación, es decir, si la rotación es en la dirección de las agujas del reloj, orientar las tapas en una dirección contraria a las agujas del reloj. Esto evita dañar las tapas. Desechar el flujo continuo y el tubo de recogida.
 35 7. Transferir la columna de centrifugación a un tubo de recogida de 1,5 ml. Pipetear 10 μl de tampón de elución de ADNc directamente sobre la membrana de la columna de centrifugación. Garantizar que el tampón de elución de ADNc se dispensa directamente sobre la membrana.
 40 Incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar 1 minuto a velocidad máx. ($\leq 25.000 \times g$) para eluir.

Establecimiento y ejecución de la reacción de IVT

45 **[0155]** Enzo: kit de marcado del transcrito de ARN de alto rendimiento de Bioarray (nº de artículo 900182)

1. Usar 10 μl del ADNc bicatenario purificado
 2. Preparar la siguiente mezcla madre de IVT:
 H2O destilada o desionizada 12 μl
 10X tampón de reacción HY 4 μl
 50 10X ribonucleótidos marcados con biotina 4 μl
 10X DTT 4 μl
 10X mezcla inhibidora de RNasa 4 μl
 20X ARN-polimerasa T7 2 μl
 Volumen total: 30 μl
 55 3. Añadir 30 μl de la mezcla madre de IVT a 10 μl de ADNc bicatenario (volumen total = 40 μl)
 4. Mezclar pipeteando arriba y abajo -O- con vórtex ligeramente. Centrifugar rápido.
 5. Colocar inmediatamente el tubo en un baño de agua a 37°C. Incubar durante 5 horas.
 6. Guardar a -20°C si no se purifica inmediatamente el ARN.

[0156] Purificación de ARNc marcado con biotina (módulo de purificación de muestras GeneChip)

- 5 1. Añadir 60 µl de H₂O a la reacción de IVT y mezclar con vórtex durante 3 segundos.
2. Añadir 350 µl de tampón de unión de ARNc de IVT a la muestra, mezclar con vórtex durante 3 segundos.
3. Añadir 250 µl de etanol (96-100%) al lisado y mezclar bien pipeteando. No centrifugar.
4. Aplicar la muestra (700 µl) a la columna de centrifugación para la purificación de ARNc de IVT colocando en un tubo de recogida de 2 ml.
- Centrifugar durante 15 segundos a $\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm).
- 10 5. Pasar el eluato por la columna una vez más.
- Centrifugar durante 15 segundos a $\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm).
- Desechar el flujo continuo como residuo peligroso y desechar el tubo de recogida.
6. Transferir la columna de centrifugación a un nuevo tubo de recogida de 2 ml (suministrado).
7. Añadir 500 µl de tampón de lavado de ARNc de IVT y centrifugar durante 15 segundos a $\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm) para lavar.
- 15 Desechar el flujo continuo.
8. Pipetear 500 µl (v/v) de etanol al 80% sobre la columna de centrifugación y centrifugar durante 15 segundos a $\geq 8.000 \times g$ (≥ 10.000 rpm). Desechar el flujo continuo.
9. Abrir la tapa de la columna de centrifugación y centrifugar durante 5 minutos a la velocidad máx. ($\leq 25.000 \times g$).
- 20 Desechar el flujo continuo y el tubo de recogida.
10. Transferir la columna de centrifugación a un nuevo tubo de recogida de 1,5 ml.
11. Pipetear 11 µl de agua libre de RNasa directamente sobre la membrana de la columna de centrifugación. Dejar reposar durante 1 minuto.
- 25 Centrifugar durante 1 minuto a la velocidad máxima ($\leq 25.000 \times g$) para eluir.
12. Pipetear 10 µl de agua libre de RNasa directamente sobre la membrana de la columna de centrifugación. Dejar reposar durante 1 minuto.
- Centrifugar durante 1 minuto a la velocidad máxima ($\leq 25.000 \times g$) para eluir.

30 **[0157]** Cuantificación del ARNc (producto de IVT)

[0158] Usar análisis espectrofotométrico para determinar el rendimiento de ARN. Aplicar el convenio de que 1 DO a 260 nm es igual a 40 µg/ml de ARN.

35 **[0159]** Comprobar la DO a 260 nm y 280 nm para determinar la concentración y la pureza de la muestra.

[0160] Mantener la relación A₂₆₀/A₂₈₀ próxima a 2,0 para ARN puro (relaciones entre 1,9, y 2,1 son aceptables).

40 **[0161]** Para la cuantificación del ARNc cuando se usa ARN total como material de partida debe calcularse un rendimiento de ARNc ajustado para reflejar el remanente de ARN total marcado. Usando un cálculo estimado del 100% de remanente, usar la siguiente fórmula para determinar el rendimiento de ARNc ajustado:

$$\text{rendimiento de ARNc ajustado} = \text{ARNm} - (\text{ARNi total}) (y)$$

- 45 ARNm = cantidad de ARNc medido después de IVT (µg)
- ARNi total = cantidad de partida de ARN total (µg)
- y = fracción de reacción de ARNc usada en IVT
- Fragmentar el ARNc para la preparación diana

50

[0162] Para la fragmentación, usar la concentración de ARNc ajustada.

1. Añadir 2 µl de 5x tampón de fragmentación para cada 8 µl de ARN más H₂O.

- 55 20 µg de ARNc 1 a 32 µl
- 5X tampón de fragmentación 8 µl
- Agua libre de RNasa a 40 µl
- Volumen total: 40 µl

2. Incubar a 94°C durante 30 minutos. Poner inmediatamente sobre hielo tras la incubación.

[0163] Preparar la diana de hibridación

5

1. Calentar 20X controles de hibridación eucariotas y el oligonucleótido B2 durante 5 minutos a 65°C. Kit de control de hibridación eucariota GeneChip de Affymetrix, art. nº 900362 (para 150 reacciones)
2. Remover ligeramente con vórtex, centrifugar.
3. Mezcla madre (suponiendo que la concentración de ARNc fragmentado es 0,5 µg/µl):

10

Matriz patrón (µl)		Conc. final
ARNc fragmentado 15 µg	30	0,05 µg/µl
Oligonucleótido B2 (3 nM) 5		50 pM
20x adición de control 15		1,5, 5, 25, 100 pM
(Bio B, C, D, Cre)		
ADN de esperma de arenque 3		0,1 mg/ml
BSA acetilada 3		0,5 mg/ml
AND de cot-1 humano (1 mg/ml)	30	0,1 mg/ml
2X tampón de hibridación MES 150		1X
H2O 64		
Volumen final 300		

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

5. Equilibrar las matrices de sondas hasta temperatura ambiente inmediatamente antes de uso.

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

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

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

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

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

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

12. Cerrar el tapón con Tough-Spots.

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

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

25

Materiales de Affymetrix

[0164]

30	Artículo	Proveedor	Nº de catálogo	
	Cebador T7-(dT)24	Biosearch Technologies	Por encargo	
	Adiciones de control	en la empresa	-	
	Superscript II/5X tampón de la primera cadena/DTT 0,1 M	Invitrogen	18064-014	
	5X tampón de la segunda cadena	Invitrogen	10812-014	
35	dNTP 10 mM	Invitrogen	18427-088	
	10 U/ul de ADN-ligasa de E. coli	Invitrogen	18052-019	
	10 U/ul de ADN-polimerasa I de E. coli	Invitrogen	18010-025	
	2 U/ul de RNasa H	Invitrogen	18021-071.	
	10 U/ul de ADN-polimerasa T4	Invitrogen	18005-025	
40	EDTA 0,5 M	Sigma	E-7889	
	Kit de marcado de transcritos de ARN de alto rendimiento ENZO	Affymetrix o ENZO	900182	(ENZO)
	Módulo de purificación de muestras GeneChip	Affymetrix	900371	
	Albúmina de suero bovino acetilada	Invitrogen	15561-020	
	IgG de cabra – calidad de reactivo	Sigma	I-5256	
45	Anticuerpo anti-estreptavidina (cabra), biotinilado	Vector Labs	BA-0500	
	R-Ficoeritrina-estreptavidina	Molecular Probes	S-866	
	20X SSPE	BioWhittaker	51214	
	Kit de control eucariota	Affymetrix	900362	

Agua, calidad para biología molecular	Ambion	9934
ADN de Cot-1 humano	Roche	1-581-074
NaCl 5 M libre de RNasa, libre de ADNsa	Ambion	9760
Antiespumante 0-30	Sigma	A-8082
5 Tween-20 al 10%	Pierce Chemical	28320
Ácido monohidratado libre de MES	Sigma	M5287
Sal sódica de MES	Sigma	M3885
Sal disódica de EDTA, disolución 0,5 M	Sigma	E7889
Tough Spots,	Label Dots USA Scientific	9902
10 Horno de hibridación GeneChip 640	Affymetrix	800139
Escáner GeneChip 3000 con terminal de trabajo	Affymetrix	00-0074
Estación hidráulica	Affymetrix	00-0081
Cargador automático con lector de código de barras externo	Affymetrix	00-0129

15 **PCR cuantitativa**

Síntesis de ADNc:

[0165]

20

Componente	Volumen (ul)
10X tampón RT	10
25X mezcla de dNTP	4
10X cebadores al azar	10
MultiScribe RT (50 U/ul)	5
H2O libre de RNasa	21
ARN (100 ng)	50
Volumen final	100

Condiciones de incubación:

[0166]

25

25° durante 10 minutos
37° durante 2 horas

[0167]

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

30

Componente	Volumen (ul)
PCR TaqMan Universal Mezcla madre (2X)	25
Sonda TaqMan (20X) (Assays-on-Demand™)	2,5
ADNc (100ng)	2
H2O	20,5
Volumen final	50

Condiciones de ciclado térmico:

[0168]

35 95° durante 10 minutos
40 ciclos: 95° durante 15 segundos
60° durante 1 minuto

- Sondas TaqMan: Assays-on-Demand™ (sondas TaqMan® MGB, FAM™ marcada con colorante)
- Amplificación del control endógeno, GAPDH (concentración de sonda 100 nM, concentraciones de cebador directo e inverso 200 nM), se realizó para normalizar la cantidad de ARN de muestra (ADNc) añadido a

cada reacción.

[0169] La cuantificación relativa se realizó usando el procedimiento de la curva patrón. Para la cuantificación normalizada a un control endógeno, las curvas patrón se prepararon para tanto la diana como la referencia endógena. Para cada muestra experimental, la cantidad de diana y de referencia endógena se determinó a partir de la curva patrón apropiada. Entonces, la cantidad de diana se dividió entre la cantidad de referencia endógena para obtener un valor de diana normalizado. Una de las muestras experimentales sirvió de calibrador, o 1x muestra. Cada uno de los vectores diana normalizados se dividió entonces entre el valor de la diana normalizada con el calibrador para generar los niveles de expresión relativos.

10

FACS/Citometría de flujo (protocolo de tinción del 2º anticuerpo):

[0170] Todas las incubaciones y centrifugaciones se realizaron a 4°C y los tubos se mantuvieron sobre hielo mientras que no estuvieron en la nevera.

15 1. Determinar la forma del tubo identificando las líneas celulares que van a usarse, los anticuerpos de interés, y cualquier condición especial o tratamiento.

a. Controles.

i. Sin tñir, 2º anticuerpo, y compensación si los fluoró cromos tienen espectros de emisión que se solapan.

20

b. Ejemplo:

Tubo	Línea celular	Tiempo (min)	1º anticuerpo	2º anticuerpo
1	por ejemplo, COLO-205	0	-	-
2	por ejemplo, COLO-205	0	-	Anti-FITC de ratón
3	por ejemplo, COLO-205	0	Anti-Sialyl Lewis A	Anti-FITC de ratón
4	por ejemplo, COLO-205	0	Anti-CD15s (Sialyl Lewis X)	Anti-FITC de ratón

2. Etiquetar los tubos de FACS.

25

a. BD Falcon 12 x 75 mm redondos de poliestireno. Nº de catálogo: 352052

3. Preparar las células para la tinción.

30

a. Tratar las células adherentes con Accutase o tripsina.

i. Innovative Cell Technologies Inc, Accutase.

ii. Gibco, Tripsina. Nº de catálogo: 25200-106.

b. Proceder con el resto de las etapas si las células están en suspensión.

35 4. Separar en alícuotas las células en tubo cónico de 15 ml o 50 ml.

5. Centrifugar las células durante 5 min, 1200 rpm, 4°C.

6. Aspirar el sobrenadante.

7. Resuspender las células en 5 ml de tampón de FACS.

8. Centrifugar las células durante 5 min, 1200 rpm, 4°C.

40 9. Aspirar el sobrenadante.

10. Resuspender las células en tampón de bloqueo.

a. Determinar el volumen de tampón de bloqueo necesario:

i. Número de tubos por línea celular/tratamiento X 100 µl de tampón de bloqueo por tubo.

45

ii. Se desean 1×10^6 células por 100 µl de tampón de bloqueo.

11. Separar en alícuotas 100 µl de las células en el tubo apropiado.

a. Basándose en la forma de tubo predeterminada.

50

12. Añadir el 1º anticuerpo al tubo apropiado.

a. Lewis A:

- i. Usar 10 µl de 0,2 µg/µl de mezcla madre por tubo.
 1. La concentración final es 2 µg.
 - ii. Chemicon: anti-Sialyl Lewis A. Nº de catálogo: MAB2095.
 - b. Lewis X:
 - i. Usar 5 µl de 0,5 µg/µl de mezcla madre por tubo.
 1. La concentración final es 2,5µg.
 - ii. BD Pharmingen: CD15 (Sialyl Lewis X). Nº de catálogo: 551344.
- 5
13. Incubar durante 30 min a 4°C.
- 10 14. Añadir 1 ml de tampón de FACS a cada tubo.
15. Centrifugar las células durante 5 min, 1200 rpm, 4°C.
16. Aspirar el sobrenadante
17. Sacudir cuidadosamente los tubos para sacar el sedimento.
- 15 a. Ejecución de "sacudida" de tubos a través de la superficie de la gradilla de tubos de 12 x 75 mm.
18. Repetir las etapas 14-17.
19. Añadir 100 µl de tampón de bloqueo a cada tubo.
20. Añadir el 2º anticuerpo al tubo apropiado.
- 20 a. Usar 10 µl por tubo.
- b. Jackson, Cabra anti-FITC de ratón. Nº de catálogo: 115-096-068.
21. Incubar durante 30 min a 4°C.
- 25 22. Repetir las etapas 14-17 dos veces.
23. Resuspender las células en tampón de FACS/PI.
- a. Determinar el volumen necesario:
 - i. Se necesita 1 ml de disolución por tubo.
 - ii. PI= 1 µl por 1 ml de tampón.
- 30 b. Molecular Probes, yoduro de propidio. Nº de catálogo: P3566.
24. Colocar los tubos en un cubo con hielo o gradilla de tubos con hielo.
25. Cubrir con lámina de aluminio y llevar al laboratorio de FACS para que un operario cualificado adquiera y analice las muestras.
- 35
- [0171] 5% de tampón de bloqueo:
 1. SBF al 5% de volumen total.
 2. Tampón de FACS.
 3. Filtrar la disolución mediante un filtro de 0,2 µm.
- 40
- [0172] Tampón de FACS:
 1. 980 ml de PBS.
 2. 8 ml de EDTA 0,25M.
 3. 20 ml de SBF.
 4. Filtrar la disolución mediante un filtro de 0,2 µm.
- 45
- 50 **Procedimiento inmunohistoquímico: Sialyl Lewis A**
- [0173]
- Anticuerpo: Sialyl Lewis A AB-1**
- 55 Clon: 121SLE
- Proveedor: NeoMarkers
- Nº de catálogo MS-279-P
- Especie de Ig: Ratón

- Procedimiento de IHC: Parafina
 Pretratamiento: Ninguno
 Manipulación de IHC: Teñidor automático
 Isotipo: IgM de ratón
 5 Especie del procedimiento: Humana
 Concentración de IgG: 200 ug/ml

Procedimiento normal:

10 **[0174]**

- Desparafinar e hidratar en agua destilada.
 Bloquear biotina endógena con el sistema de bloqueo de avidina-biotina de Vector.
 Aclarar con TBS: 2 cambios, 5 minutos cada vez.
 15 Bloquear con suero de caballo normal al 10% durante 30 minutos a TA.
 Incubar las secciones con el anticuerpo monoclonal de ratón Sialyl Lewis A diluido a 5 ug/ml con suero de caballo normal al 10% durante 60 minutos a TA.
 Usar un isotipo de ratón IgM diluido a 5 ug/ml en suero de caballo normal al 10% para el control negativo.
 Aclarar con TBS: 2 cambios, 5 minutos cada vez.
 20 Incubar las secciones con anticuerpo de caballo biotinilado anti-ratón; diluido 1:200 en suero de caballo normal al 10% durante 30 minutos a TA.
 Aclarar con TBS: 2 cambios, 5 minutos cada vez.
 Incubar las secciones con el sistema diluido Vector ABC Elite durante 30 minutos a TA.
 Aclarar con TBS: 2 cambios, 5 minutos cada vez.
 25 Incubar las secciones con DAB potenciado con metal de Pierce durante 5 minutos.
 Aclarar en agua de grifo corriente durante 5 minutos.
 Contrateñir con hematoxilina de Mayers durante 1 minuto.
 Aclarar en agua de grifo corriente durante 5 minutos.
 Azular con hematoxilina con reactivo de azulado de Richard-Allan durante 1 minuto.
 30 Aclarar en agua de grifo corriente durante 2 minutos.
 Deshidratar, purificar y montar en medios de montaje sintéticos.

Procedimiento inmunohistoquímico: Sialyl Lewis X

35 **[0175]**

- Anticuerpo: anti-Sialyl Lewis X de ratón**
 Clon: KM93
 Proveedor: Chemicon
 40 N° de catálogo: MAB2096
 Especie de Ig: Ratón
 Procedimiento de IHC: Parafina
 Pretratamiento: DAKO Target Retrieval
 Manipulación de IHC: Teñidor automático
 45 Isotipo: IgM de ratón
 Especie del procedimiento: Humana
 Concentración de IgG: 100 µg/ml

Procedimiento normal:

50

[0176]

- Desparafinar e hidratar en agua destilada.
 Extinguir la actividad de peroxidasa endógena con disolución de bloqueo KPL – concentrado diluido 1:10 en dH₂O, TA durante 4 minutos.
 55 Aclarar en agua destilada durante 5 minutos.
 Incubar en DAKO Target Retrieval (S1700) precalentado a 99 grados durante 20 minutos en un baño de agua hirviendo. Sacar del baño hirviendo y dejar enfriar durante 20 minutos.
 Bloquear biotina endógena con el sistema de bloqueo de avidina-biotina de Vector.

Bloquear con suero de caballo normal al 10% durante 30 minutos a TA.

Incubar las secciones con el anticuerpo monoclonal de ratón Sialyl Lewis X diluido a 5 ug/ml con suero de caballo normal al 10% durante 60 minutos a TA.

Usar un isotipo de ratón IgM diluido a 5 µg/ml en suero de caballo normal al 10% para el control negativo.

5 Aclarar con TBS: 2 cambios, 5 minutos cada vez.

Incubar las secciones con anticuerpo de caballo biotinilado anti-ratón de Vector; diluido 1:200 en suero de caballo normal al 10% durante 30 minutos a TA.

Aclarar con TBS: 2 cambios, 5 minutos cada vez.

Incubar las secciones con el sistema diluido Vector ABC Elite durante 30 minutos a TA.

10 Aclarar con TBS: 2 cambios, 5 minutos cada vez.

Incubar las secciones con DAB potenciado con metal de Pierce durante 5 minutos

Aclarar en agua de grifo corriente durante 5 minutos.

Contrateñir con hematoxilina de Mayers durante 1 minuto.

Aclarar en agua de grifo corriente durante 5 minutos.

15 Azular con hematoxilina con reactivo de azulado de Richard-Allan durante 1 minuto.

Aclarar en agua de grifo corriente durante 2 minutos.

Deshidratar, purificar y montar en medios de montaje sintéticos.

Resultados experimentales:

20

[0177]

Los experimentos se realizaron usando los procedimientos y materiales descritos anteriormente. Los resultados de estos experimentos se ilustran en las Figuras 6-13, como se trata más adelante.

25

La Figura 6 proporciona un cuadro resumen de los datos obtenidos en el análisis de 28 líneas de células de cáncer de colon o colorrectal para sensibilidad o resistencia a actividad apoptótica de Apo2L (+ suero bovino fetal al 0,5% "SBF" o SBF al 10%) o anticuerpo monoclonal "mab" contra DR5, reticulado "XL" o no reticulado, + suero bovino fetal al 0,5% "SBF" o SBF al 10%) y expresión de FUT 3, FUT 6, Sialyl Lewis A y Sialyl Lewis X.

30

La Figura 7 proporciona una comparación de la sensibilidad de diversas líneas de células de cáncer de colon o colorrectal para el anticuerpo contra DR5 y la expresión de FUT 3, como se mide por PCR cuantitativa.

La Figura 8 proporciona una comparación de diversas líneas de células de cáncer de colon o colorrectal para sensibilidad o resistencia al anticuerpo contra DR5 (más reticulante) y expresión de Sialyl Lewis X o A, como se determina por FACS.

35

La Figura 9A muestra una prueba de correlación de rangos de Spearman que analiza la sensibilidad o la resistencia de diversas líneas de células de cáncer de colon o colorrectal y la correlación con la expresión de FUT3.

40

La Figura 9B muestra los resultados de una prueba exacta de Fisher que analiza la sensibilidad ("sens") o resistencia ("res") de las diversas líneas de células de cáncer de colon o colorrectal y la significancia estadística entre la expresión de FUT 3 y Sialyl Lewis A/X y la sensibilidad de las líneas celulares respectivas a la actividad apoptótica del anticuerpo contra DR5.

La Figura 10 proporciona una comparación de diversas líneas de células de cáncer de colon o colorrectal para la expresión de receptores DcR1 o DcR2 (como se determina por PCR cuantitativa) y el estado (sensible o resistente) de ciertas líneas celulares a Apo2L o anticuerpo contra DR5.

45

La Figura 11 proporciona una comparación de diversas líneas de células de cáncer de colon o colorrectal para la expresión de receptores DcR1 o DcR2 (como se determina por FACS) y el estado (sensible o resistente) de ciertas líneas celulares a Apo2L o anticuerpo contra DR5.

50

La Figura 12 muestra tinción inmunohistoquímica para Sialyl Lewis A y X en cuatro líneas de células de cáncer colorrectal, CaCo 2 (Colo2), SW 1417, DLD-1 y Colo 205, y su correlación con la expresión de Sialyl Lewis A y X como se mide por FACS y su correlación con la sensibilidad a Apo2L/TRAIL. Las líneas de células de cáncer colorrectal Colo 2 y SW1417 no muestran tinción y muestran una débil tinción, respectivamente, o los antígenos Sialyl Lewis son negativos y débilmente positivos, respectivamente, por FACS y son resistentes a Apo2L/TRAIL. Las células de cáncer colorrectal DLD-1 y Colo 205 muestran tinción moderada y fuerte, respectivamente, para antígenos Sialyl Lewis, son moderadas y fuertemente positivas, respectivamente, por FACS y son sensibles a Apo2L/TRAIL.

55

La Figura 13 muestra un resumen de experimentos de IHC que demuestran la expresión de Sialyl Lewis A y X en muestras de tejido de mucosa de colon normal, tejido de hígado normal, cáncer de colon primario y metástasis de cáncer de colon. Las muestras de tejido de colon normal y cáncer de colon primario dispuestas en matriz en una micromatriz de tejido se probaron en el experimento de IHC, mientras que las muestras de

tejido del hígado normal y cáncer de colon metastásico estuvieron sobre portaobjetos de vidrio individuales. La prevalencia de expresión de Sialyl Lewis A y X y la intensidad de tinción inmunohistoquímica aumenta de tejido de colon normal a cáncer de colon primario a cáncer de colon metastásico. Las células de hígado normal no se tiñeron ni para Sialyl Lewis A ni X.

5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para predecir la sensibilidad de una muestra de tejido o de células de mamífero a un anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5, procedimiento que comprende las etapas de:
 - 5 examinar la muestra de tejido o de células de mamífero para detectar la expresión de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo de fucosiltransferasa 3, fucosiltransferasa 6, antígeno(s) Sialyl Lewis A y/o X, en el que determinar que la expresión de uno o más de los biomarcadores es superior a la observada para una muestra de tejido o de células de control es predictiva de que dicha muestra de tejido o de células es sensible a actividad inductora de apoptosis de uno o más anticuerpos de receptores de muerte.
2. Un procedimiento para inducir apoptosis en una muestra de tejido o de células de mamífero, procedimiento que comprende las etapas de:
 - 15 examinar una muestra de tejido o de células de mamífero para detectar la expresión de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo de fucosiltransferasa 3, fucosiltransferasa 6, antígeno(s) Sialyl Lewis A y/o X, y
 - 20 tras determinar que la expresión de uno o más de los biomarcadores es superior a la observada para una muestra de tejido o de células de control, exponer dicha muestra de tejido o de células a una cantidad eficaz de un anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para así inducir apoptosis en una muestra de tejido o de células de mamífero.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha expresión de uno o más biomarcadores se examina detectando la expresión de ARNm de fucosiltransferasa 3 o fucosiltransferasa 6.
4. El procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha expresión de uno o más biomarcadores se examina por inmunohistoquímica para detectar la expresión del (de los) antígeno(s) Sialyl Lewis A y/o X.
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además la etapa de examinar la expresión de receptores DR4, DR5, DcR1 o DcR2 en dicha muestra de tejido o de células.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha muestra de tejido o de células comprende tejido o células de cáncer.
7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que dichas células cancerosas son células o tejido de cáncer de colon, colorrectal, gastrointestinal o pancreático.
8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho anticuerpo es anticuerpo monoclonal contra DR5.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano que se une a DR5.
10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal quimérico o humanizado que se une a DR5.
11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo contra DR5 que se une a una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 1-411 de la Figura 3A (SEQ ID NO:5).
12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho anticuerpo es anticuerpo monoclonal contra DR4.
13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano que se une a DR4.
14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal quimérico o humanizado que se une a DR4.

15. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo contra DR4 que se une a una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 1-468 de la Figura 2 (SEQ ID NO:3).
- 5 16. Un anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno relacionado con la inmunidad o cáncer en un mamífero, en el que el procedimiento de tratamiento comprende:
- 10 examinar una muestra de tejido o de células de mamífero para detectar la expresión de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo de fucosiltransferasa 3, fucosiltransferasa 6, antígeno(s) Sialyl Lewis A y/o X, y
- 15 tras determinar que la expresión de uno o más de los biomarcadores es superior a la observada para una muestra de tejido o de células de control, administrar al mamífero una cantidad eficaz de un anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para así inducir apoptosis y tratar el trastorno relacionado con la inmunidad o cáncer.
17. El anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para uso en un procedimiento de tratamiento según la reivindicación 16, en el que dicha expresión de uno o más biomarcadores se examina detectando la expresión de ARNm de fucosiltransferasa 3 o fucosiltransferasa 6.
- 20 18. El anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para uso en un procedimiento de tratamiento según la reivindicación 16, en el que dicha expresión de uno o más biomarcadores se examina por inmunohistoquímica para detectar la expresión del (de los) antígeno(s) Sialyl Lewis A y/o X.
- 25 19. El anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para uso en un procedimiento de tratamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 que comprende además la etapa de examinar la expresión de receptores DR4, DR5, DcR1 o DcR2 en dicho tejido o célula.
20. El anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para uso en un procedimiento de
- 30 tratamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que dicha muestra de tejido o de células comprende tejido o células de cáncer.
21. El anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para uso en un procedimiento de tratamiento según la reivindicación 20, en el que dichas células cancerosas o tejido canceroso comprende células o
- 35 tejido de cáncer de colon, colorrectal, gastrointestinal o pancreático.
22. El anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para uso en un procedimiento de tratamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en el que un agente quimioterapéutico o radioterapia también se administra a dicho mamífero.
- 40 23. El anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para uso en un procedimiento de tratamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, en el que una citocina, agente citotóxico o inhibidor del crecimiento también se administra a dicho mamífero.
- 45 24. El anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para uso en un procedimiento de tratamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que dicho anticuerpo es anticuerpo monoclonal contra DR5.
25. El anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para uso en un procedimiento de
- 50 tratamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano que se une a DR5.
26. El anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para uso en un procedimiento de tratamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo
- 55 monoclonal quimérico o humanizado que se une a DR5.
27. El anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para uso en un procedimiento de tratamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo contra DR5 que se une a una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 1-411 de la Figura 3A (SEQ ID

NO: 5)

28. El anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para uso en un procedimiento de tratamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que dicho anticuerpo es anticuerpo monoclonal contra DR4.

29. El anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para uso en un procedimiento de tratamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano que se une a DR4.

30. El anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para uso en un procedimiento de tratamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal quimérico o humanizado que se une a DR4.

31. El anticuerpo agonista de DR4 o anticuerpo agonista de DR5 para uso en un procedimiento de tratamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo contra DR4 que se une a una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 1-468 de la Figura 2 (SEQ ID NO:3).

1 TTTCTCTCACTATAAAAGAAATAGAGAAAGGAAGGGCTTCAAGTGACCGGCTGCCTGGCTGACTTACAGCAGTCAGACTCTGACAGGATC
 1 ATGGCTATGATGGAGGTCACAGGGGGACCCAGCCTGGGACAGACCTGCGTGCATGATCGTGCATCTTACACAGTGCCTGCAGTCTCTCTGT
 1 MetAlaMetMetGluValGlnGlyProSerLeuGlyGlnThrCysValLeuIleValIlePheThrValLeuGlnSerLeuCys
 181 GTGGCTGTAACTTACGTGTACTTTACCAACGAGCTGAAGCAGATGCAGGACAAAGTACTCCAAAAGTGGCATTGCTTGTCTTAAAGAA
 31 ValAlaValThrTyrValTyrPheThrAsnGluLeuLysGlnMetGlnAspLysTyrSerLysSerGlyIleAlaCysPheLeuLysGlu
 271 GATGACAGTTATTGGGACCCCAATGACGAAGAGAGATATGAACAGCCCTGCTGGCAAGTCAAGTGGCAACTCCGTTCAGCTCGTTAGAAAAG
 61 AspAspSerTyrTrpAspProAsnAspGluGluSerMetAsnSerProCysTrpGlnValLysTrpGlnLeuArgGlnLeuValArgLys
 361 ATGATTTTGAGAACCTCTGAGGAAACCATTTCTACAGTTCAAGAAAAGCAACAAATATTTCTCCCCCTAGTGAGAGAAAGAGGTCCNCAG
 91 MetIleLeuArgThrSerGluGluThrIleSerThrValGlnGluLysGlnGlnAsnIleSerProLeuValArgGluArgGlyProGln
 451 AGAGTAGCAGCTCACATAAAGTGGGACCAAGAGGAAGCAACACATTTGCTCTCCAAACTCCAAAGAAATGAAAAGGCTCTGGGCCGCAAA
 121 ArgValAlaAlaHisIleThrGlyThrArgGlyArgSerAsnThrLeuSerSerProAsnSerLysAsnGluLysAlaLeuGlyArgLys
 541 ATAAACTCCTGGGAATCATCAAGGAGTGGGCATTTCATTCCTGAGCAACTTGCACCTTGAGGAATGGTGAACCTGATCCATCCATGAAAAGGG
 151 IleAsnSerTrpGluSerSerArgSerGlyHisSerPheLeuSerAsnLeuHisLeuArgAsnGlyGluLeuValIleHisGluLysGly
 631 TTTTACTACATCTATTCCCAACATACCTTTTCGATTTCAGGAGGAATATAAGAAAACACAAAGAACGACAAACAAATGGTCCCAATATATT
 181 PheTyrTyrIleTyrSerGlnThrTyrPheArgPheGlnGluIleLysGluAsnThrLysAsnAspLysGlnMetValGlnTyrIle
 721 TACAAATACACAAGTTATCCTGACCCCTATATTGTTGATGAAAAGTGTAGAAATAGTTGTTGGTCTAAAGATGCAGAAATATGGACTCTAT
 211 TyrLysTyrThrSerTyrProAspProIleLeuLeuMetLysSerAlaArgAsnSerCysTrpSerLysAspAlaGluTyrGlyLeuTyr
 811 TCCATCTATCAAGGGGAATATTTGAGCTTAAGGAAAATGACAGAAATTTTGTCTGTAAACAAATGAGCCACTTGATACACATGGACCAT
 241 SerIleTyrGlnGlyIlePheGluLeuLysGluAsnAspArgIlePheValSerValThrAsnGluHisLeuIleAspMetAspHis
 901 GAAGCCAGTTTTTTCGGGGCTTTTGTAGTTGGCTAACTGACCTGGAAAGAAAAGCAATAACCTCAAAGTGACTATTTCAGTTTTCAGGAT
 271 GluAlaSerPhePheGlyAlaPheLeuValGlyStp
 991 GATACACTATGAAGATGTTTTTCAAAAAAANTCTGACCAAAAACAAACACAGAAA

FIG. 1

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

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

 101 CCAGCAAAGT GTGGGGCTCT TCCGCGGGGA GGATTGAACC ACGAGGCGGG
 GGTCGTTTCA CACCCCGAGA AGGCGCCCT CTTAACTTGG TGCTCCGCCC
 35 SerLysVa lTrpGlySer SerAlaGlyA rgIleGluPr oArgGlyGly

 151 GGCCGAGGAG CGCTCCCTAC CTCCATGGGA CAGCACGGAC CCAGTGCCCC
 CCGGCTCCTC GCGAGGGATG GAGGTACCTT GTCGTGCCTG GGTCACGGGC
 GlyArgGlyA laLeuProTh rSerMetGly GlnHisGlyP roSerAlaArg

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

 251 CTCGGCTCCG GGTCCACAAG ACCTTCAAGT TTGTCGTCGT CGGGGTCTCT
 GAGCCGAGGC CCAGGTGTTC TGGAA GTTCA AACAGCAGCA GCCCAGGAC
 roArgLeuAr gValHisLys ThrPheLysP heValValVa lGlyValLeu

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

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

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

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

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

 551 GGAACACAGC ATGTCACTGC AAACCAGGAA CTTTCCGGAA TGACAATTCT
 CCTTGTGTCT TACAGTCACG TTTGGTCCTT GAAAGGCCTT ACTGTTAAGA
 rgAsnThrAl aCysGlnCys LysProGlyT hrPheArgAs nAspAsnSer

 601 GCTGAGATGT GCCGGAAGTG CAGCACAGGG TGCCCCAGAG GGATGGTCAA
 CGACTCTACA CGGCCTTCAC GTCGTGTCCC ACGGGGTCTC CCTACCAGTT
 201 AlaGluMetC ysArgLysCy sSerThrGly CysProArgG lyMetVally

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

FIG. 2A

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

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

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

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

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

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

1001 CACAGTGTCT GCTGGGACCG GCAGAAGCTG AAGGGTCTCA GAGGAGGAGG
 GTGTCACAGA CGACCCCTGGC CGTCTTCGAC TTCCAGAGT CTCCTCCTCC
 335 GlnCysLe uLeuGlyPro AlaGluAlaG luGlySerGl nArgArgArg

1051 CTGCTGGTTC CAGCAAATGG TGCTGACCCC ACTGAGACTC TGATGCTGTT
 GACGACCAAG GTCGTTTACC ACGACTGGGG TGA CTCTGAG ACTACGACAA
 LeuLeuValP roAlaAsnGl yAlaAspPro ThrGluThrL euMetLeuPhe

1101 CTTTGACAAAG TTTGCAAACA TCGTGCCCTT TGA CTCTGG GACCAGCTCA
 GAAACTGTTC AAACGTTTGT AGCACGGGAA ACTGAGGACC CTGGTCGAGT
 368 PheAspLys PheAlaAsnI leValProPh eAspSerTrp AspGlnLeuM

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

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

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

1301 GGATGGAAGA GAGACATGCA AAAGAGAAGA TTCAGGACCT CTTGGTGGAC
 CCTACCTTCT CTCTGTACGT TTTCTCTTCT AAGTCCTGGA GAACCACTG
 435 MetGluGl uArgHisAla LysGluLysI leGlnAspLe uLeuValAsp

1351 TCTGGAAAAGT TCATCTACTT AGAAGATGGC ACAGGCTCTG CCGTGTCTTT
 AGACCTTTCA AGTAGATGAA TCTTCTACCG TGTCCGAGAC GGCACAGGAA
 SerGlyLysP heIleTyrLe uGluAspGly ThrGlySera laValSerLeu

1401 GGAGTGA
 CCTCACT
 468 GluOP*

FIG. 2B

1 MEQRGQNA~~P~~AASGARKRHGPGPREARGAR~~P~~GLRV~~P~~KT~~L~~V~~L~~V~~V~~AAV~~L~~L~~L~~VSAESALITQOD
 61 LAPQ~~Q~~RAAPQ~~Q~~K~~R~~SSPSEGLCP~~P~~GH~~H~~ISEDGRDCISCKY~~Q~~DYSTHWNDLL~~F~~CL~~R~~CTRCD
 121 SGEVELSP~~C~~TT~~T~~RNTV~~C~~QCEEGTFREEDSP~~E~~M~~C~~RK~~C~~RTG~~C~~PRGMV~~K~~VGD~~C~~TPWSDIE~~C~~VH
 181 KE~~S~~GIIIGVTVA~~A~~V~~L~~IVAVFVCK~~S~~LL~~W~~KKVL~~P~~Y~~L~~KGICSGGGGDP~~E~~R~~V~~DRSSQ~~R~~PGAED
 241 NVLNEIVSILQPTQVPEQEME~~V~~QEP~~A~~EPTGVN~~M~~LSPGESEHLLEPAEAERSQRRLLVPA
 301 NEGDPTETLRQCFDDFADLV~~P~~FD~~S~~WEPLMRKLGLMDNEIKVAKAEAAGHRDTLYT~~M~~L~~I~~KW
 361 VNKTGRDASVHTLLDALET~~L~~GERLAKQKIEDHLLSSGKFMYLEGNADSALS

FIG. 3A

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

FIG. 3B

49

```

1  GCTGTGGAA CCTCTCCAG CGCAGAACT CAGCCAAAGG ATTTTGGGA GTTGAACCA AGATGCAAGG GGTGAAGGAG CGTTCCTAC
   CGACACCTT GGAGAGGTGC GCGTCTCTGA GTCCGTCTCT AAAGACTATC TAATAACCTT CAACCTCTCC CCACTTCCTC CGAAGGATG

101 CGTTAGGAA CTCGTGGGAC AGAGGGCCCC GGGCGCCTGA TGGCGGAGG AGGGTGGAC CCAGGACCCA GGACGGCGTC GGAACCCATA CCATGCCCGG
   GCAATCCCTT GAGACCCCTG TCTCGGGGG CCGGGGAGT ACCGGTCCG TCCCACGCTG GGTCTGGGT CCTGCCGAG CCCTGGTAT GGTACCGGGC
   1 MetalArg

201 GATCCCCAAG ACCCTAAAGT TCGTCTGCTT CATCTGCGG GTCTGCTGC CAGTCTTACC TTACTCTGCC ACCACTGCC GGCAGGAGGA AGTTCCCCAG
   CTAGGGCTTC TGGGATTTC AGCAGGAGCA GTAGCAGCGC CAGGACGAC GTACGGATCG AATGACACGG TGGTGACGGG CCCTCCTCCT TCAAGGGGTC

4  IleProLys ThrLeuLysP heValValVa lileValAla ValLeuLeuP roValLeuAl aTyrSerAla ThrThrAlaA rgGlnGluG l uValProGln

301 CAGACAGGG CCCACAGCA ACAGAGGCAC AGCTTCAAG GGGAGGAGTG TCCAGCAGGA TCTCATAGAT CAGAACATAC TGCAGCCTGT AACCCGTGCA
   GTCTGTACC GGGGTGCTGT TGTCTCCGTG TCGAAGTTCC CCTCTCTCAC AGTCTGCTCT AGAGTATCTA GTCTGTATG ACCTCGACA TTGGGCACGT

37 GlnThrValA laProGlnG l nGlnArgHis SerPheLysG lyGluGluCy sProAlaGly SerHisArgS erGluHisTh rglyAlaCys AsnProCysThr

401 CAGAGGGGTG GGATTACACC AACGCTTCCA ACRATGAACC TTCTTCTTTC CCATGTACAG TTGTGAAATC AGATCAAAA CATAAAGTT CCTGCACCAT
   GTCTCCACA CCTAATGTGG TTGCGAAGGT TGTACTTGG AAGAACGAAG GTTACATGTC AAACATTIAG TCTAGTTTTT GTATTTTCAA GGACGTGTA

71  GluGlyVa laSPTyrThr AsnAlaSerA snAsnGluPr oSerCysPhe ProCysThrV alcCysLysS e rAspGlnLys HisLysSers erCysThrMet

501 GACCAGAGAC ACAGTGTGTC AGTGTAAAGA AGGCACCTTC CGGAATGAA ACTCCCCAGA GATGTGCCGG AAGTGTAGCA GGTGCCCTAG TGGGGAAGTC
   CTGGTCTCTG TGTACACACG TCACATTCTT TCGGTGGAG GCTTACTTT TCAGGGGTCT CTACAGGGCC TTCACTATGT CCACGGGATC ACCCTTCAG

104 ThrArgasp ThrValCysG lncysLysG l uGlyThrPhe ArgAsnGluA snSerProG l uMetCysArg LysCysSera rgCysProse rglyGluVal

601 CAAGTCAGTA ATTGTACGTC CTGGGATGAT ATCAGTGTG TTGAAGAATT TGGTGCCAAT GCCACTGTGG AAACCCGAGC TGCTGAAGAG ACAATGAACA
   GTTCAGTCAT TAACATGCAC GACCTTACTA TAGTTCACAC AACTCTTAA ACCACGGTAA CCGTGACACC TTGGGGTGG ACCACTTCTC TGTACTTGT

137 GlnValSera snCysThrSe rTrpaspasp IleGlnCysV alGluGluPh eGlyAlaAsn AlaThrValG luThrProAl aAlaGluGlu ThrMetAsnThr

701 CCAGCCCGGG GACTCTCTGC CCAGCTGCTG AAGAGACAAAT GAACACAGC CCAGGGACTC CTGCCCCAGC TGCTGAAGAG ACAATGACCA CCAGCCCGGG
   GGTCGGGGCC CTGAGGACGG GGTGAGCAG TCTCTGTGA CTGTGCTGTC GTCCCTGAG GACGGGTGCG ACGACTTCTC TGTACTTGT GGTGCGGGCC

171 SerProG l yThrProAla ProAlaAlaG luGluThrMe tAsnThrSer ProGlyThrP roAlaProAl aAlaGluGlu ThrMetThrT hrSerProGly

```

FIG. 3D-1

801 GACTCTCTGCC CCAGCTGCTG AAGAGACAAT GACCACACAGC CCGGGGACTC CTGCCCCAGC TGCTGAAGAG ACAATGACCA CCAGCCCCGG GACTCTCTGCC
 CTGAGGACGG CGTCGACCACT TTCTCTGTTA CTGCTGCTCG GGCCTCTGAG GACGGGTGCG ACGACTTCTC TGTTACTGGT GGTGGGGCCC CTGAGGACGG
 204 ThrProAla ProAlaAlaG luGluThrMe tThrThrSer ProGlyThrP roAlaProAl aAlaGluGlu ThrMetThrT hrSerProGl yThrProAla
 901 TCTTCTCATTT ACCTCTCATG CACCATCGTA GGGATCTATG TTCTAATTGT GCTTCGATT GCTTTGTTT GAAGACTTC ACTGTGAAG AAATTCCTTC
 AGAAGAGTAA TGGAGACTAC GTGTAGCAT CCTAGTATC AAGATTAACA CGAAGACTAA CACAACAAA CTTTCGAGG TGACACCTTC TTTAAGGAAG
 237 SerSerHist yrLeuSerCy sThrIleVal GlyIleIleVal lleLeuIleVal ValPheVal
 1001 CTTACCTGAA AGTTTCAGGT AGCGCTGGC TGAGGGCGGG GGGCGCTGGA CACTCTCTGC CCGCCTCTCC TCTGCTGTGT TCCACAGAC AGAAACGCCCT
 GAATGGACTT TCCAACTCCA TCCGGGACCG ACTCCCGCCC CCGCGGACCT GTGAGACACG GCACGGAGGG AGACGACACA AGGCTGTCTG TCTTTGCGGA
 1101 GCGGACGGG GTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT
 1 GCTGTGGGAA CTTCTCCAGG CGCAGGAAC T CAGCCAAACA TTTCTGATAG ATTTTGGCA GTTTCACCAAG ACATGCNAGG GGTGAAGGAG CGCTTCTCTAC
 CGACACCCCTT GGAGAGGTGC GCGTCTTGA GTCGCTTGTG TAAAGACTATC TAAARACCCCT CAAACTGGTC TCTACGTCC CCACTTCTCT CCGAAGGATG
 -40 MetGlnG l yValLysGlu ArgPheLeuPro
 101 CGTTAGGGAA CTCTGGGAC AGAGCGCCCC GCGCGCTCA TGCGCCGAGG AGGTGCGAC CCAGGACCCA GGACGGCTC GCGAACCATTA CCATGGCCCCG
 GCAATCCCTT GAGACCCCTG TCTCGCGGG TCTCGCGGACT ACCGCTCGG TCCACAGCTG GGTCTGGGT CCTGCGGAG CCTTGGTAT GGTACCGGGC
 -30 LeuGlyAs nserGlyAsp ArgAlaProA rgProProAs pGlyArgGly ArgValArgP roArgThrGl nAspGlyVal GlyAsnHist hrMetAlaArg
 201 GATCCCCAAG ACCCTAAGT TCGTCTCGT CATCTCCGG CTCTCTCTGC CAGTCTTACC CAGTCTGCC ACCACTGCC GGCAGGAGGA AGTTCCCCAG
 CTAGGGGTTT TGGGATTCA AGCAGCAGCA GTAGCAGGCC CAGGACGACG GTCAGGATCG AATGAGACGG TGGTACAGGG CCGTCTCTCT TCAAGGGGTC
 4 IleProLys ThrLeuLysP heValValVa lleValAla ValLeuLeuP roValLeuAl aTyrSerAla ThrThrAlaA rgGlnGluG l uValProGln
 301 CAGACAGTGG CCCCACAGCA ACAGAGGCAC AGCTTCAAG GGGAGGAGTG TCCAGCAGCA TCTCATAGAT CAGAACATAC TGGAGCCCTGT AACCCGTCCA
 GTCTCTCACC GGGGTGTGCT TGTCTCCGTG TCGAAGTTCC CCGTCTCACC ACGTCTGCT AGCTATCTA GTCTTGATG ACCTCGGACA TTGGGCACGT
 37 GlnThrVala laProGlnG l nGlnArgHis SerPheLysG lyGluGluCy sProAlaGly SerHisArgS erGluHisTh rGlyAlaCys AsnProCysThr

FIG. 3D-2

```

401 CACAGGGTGT GGATTACACC AACGCTTCCA ACAATGARCC TTCTTGCTTC CCATGTACAG TTGTAAATC AGATCAAAA CATAAAAGTT CCTGCACCAT
   GTCCTCCACA CCTAATGTGG TTGCGAAGGT TCTTACTGG AAGACGAAG GGTACATGTC AAACATTAG TCTAGTTTTC GTATTTTCAA GGACGTGGTA
71  GluGlyVa lAspTyThr AsnAlaSerA sNaSnGluPr oSerCysPhe ProCysThrV alCysLysase rAspGlnLys HisLysSers erCysThrMet

501 GACCAGAGAC ACAGTGTCAG AGTGTAAGA AGCCACCTTC CGGATGAAA ACTCCCCAGA CATGTGCCGG AGTGTTAGCA GGTGCCCTAG TGGGGAGATC
   CTGGTCTCTG TGTACACAG TCACATTCT TCGGTGGAAG GCCTTACTTT TGAGGGTCT CTACACGGCC TTACATCTGT CCACGGGATC ACCCCTTCAG
104 ThrArgasp ThrValCysG lncCysLysG lGlyThrPhe ArgAsnGluA snSerProG l uMetCysArg LysCysSerA rgCysProse rGlyGluVal

601 CAAGTCAGTA ATTGTACGTC CTGGGATGAT ATCCAGTGTG TTGAAGAATT TGGTGCCAAT GCCACTGTGG AARCCCCAGC TGCTGAAGAG ACAATGAACA
   GTTCAGTCAT TAACATGCAG GACCTTACTA TAGGTCACAC AACTCTTAA ACCACGCTTA CCGTGACACC TTTGGGGTGC AGCACTTCTC TGTACTTGT
137 GlnValSerA nCysThrse rTlpAspAsp IleGlnCysV alGluGluPh eGlyAlaAsn AlaThrValG luThrProAl aAlaGluGlu ThrMetAsnThr

701 CCAGCCCGGG GACTCCTGCC CCAGCTGCTG AAGAGACAAT GAACACCAGC CCAGGACTC CTGCCCCAGC TGCTGAAGAG ACAATGACCA CCAGCCCGGG
   GGTCCGGGCC CTGAGGACGG GGTGAGCGAC TTCTCTGTTA CTGTGCTGTA CTGTGCTGTA GACGGGTGC GACGGGTGC TGTACTGTGT GGTCGGGCC
171 SerProG l yThrProAla ProAlaAlaG luGluThrMe tAsnThrSer ProGlyThrP roAlaProAl aAlaGluGlu ThrMetThrT hrSerProGly

801 GACTCCTGCC CCAGCTGCTG AAGAGACAAT GACCACCAGC CCGGGGACTC CTGCCCCAGC TGCTGAAGAG ACAATGACCA CCAGCCCGGG GACTCCTGCC
   CTGAGGACGG GGTGAGCGAC TTCTCTGTTA CTGTGCTGTA GACGGGTGC GACGGGTGC AGCACTTCTC TGTACTGTGT GGTCGGGCC CTGAGGACGG
204 ThrProAla ProAlaAlaG luGluThrMe tThrThrSer ProGlyThrP roAlaProAl aAlaGluGlu ThrMetThrT hrSerProG l yThrProAla

901 TCTTCTCATT ACCTCTCATG CACCATCGTA GGCATCATAG TTCTAATTCT GCTTCTGATT GTCTTCTTTC GAAGACTTC ACTGTGGAAG AAATTCCTTC
   ACAAGAGTAA TCGAGAGTAC GTGGTAGCAT CCTAGTATC AAGATTACA CGAAGACTAA CACAAACAAA CTTTCTGAAG TGACACCTTC TTTAAGGAAG
237 SerSerHisT yrLeuSerCy sThrIleVal GlyIleIleV alLeuIleVal ValPheVal

1001 CTTACCTCAA AGGTTACAGT AGGCGCTGGC TGAGGGCGGG GGGCGCTGGA CACTCTCTGC CTGCTCTGCC TCTGCTGTGT TCCACAGAC AGAAGCGCT
   GAATGGACTT TCCAGTCCA TCCGCGACCG ACTCCCGGCC CCGCGACCT GTGAGAGACG GCACGGAGGG AGACGACACA AGGTGTCTG TCTTTCGCGA

1101 GCGCCTGCC CAIAIAIAIA IAIAIAIAIA IAIAIAIAIA IAIAIAIAIA IAIAIAIAIA IAIAIAIAIA IAIAIAIAIA IAIAIAIAIA IAIAIAIAIA
   CCGGACCGG GTTTTTTTT TTTTTTTTT TTTTTTTTT TTTTTTTTT TTTTTTTTT TTTTTTTTT TTTTTTTTT TTTTTTTTT TTTTTTTTT

```

FIG. 3D-3

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

FIG. 3E-1

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

FIG. 3E-2

FUT3**Estructura de fucosiltransferasa III**

1 ATGGATCCCCTGGGTGCAGCCAAGCCACAATGGCCATGGCGCCGCTGTCTGGCCGCACTG
 METAspProLeuGlyAlaAlaLysProGlnTrpProTrpArgArgCysLeuAlaAlaLeu
 61 CTATTTCAGCTGCTGGTGGCTGTGTGTTTCITCCTACCTGCGTGTGTCCCGAGACGAT
 LeuPheGlnLeuLeuValAlaValCysPhePheSerTyrLeuArgValSerArgAspAsp
 121 GCCACIGGATCCCCTAGGGCTCCAGTGGGTCTCCCGACAGGACACCACTCCCACCCGC
 AlaThrGlySerProArgAlaProSerGlySerSerArgGlnAspThrThrProThrArg
 181 CCCACCTCCTGATCCTGCTATGGACATGGCCTTTCACATCCCTGTGGCTCTGTCCCGC
 ProThrLeuLeuIleLeuLeuTrpThrTrpProPheHisIleProValAlaLeuSerArg
 241 TGTTCAGAGATGGTCCCGGCACAGCCGACTGCCACATCAGTCCGACCGCAAGGIGTAC
 CysSerGluMETValProGlyThrAlaAspCysHisIleThrAlaAspArgLysValTyr
 301 CCACAGGCAGACACGGTCATCGTGCACCACTGGGATATCATGTCCAACCCTAAGTCACGC
 ProGlnAlaAspThrValIleValHisHisTrpAspIleMETSerAsnProLysSerArg
 361 CTCCCACCTTCCCGAGGGCCGACGGGGCAGCGCTGGATCTGGTTCAACTTGCAGCCACCC
 LeuProProSerProArgProGlnGlyGlnArgTrpIleTrpPheAsnLeuGluProPro
 421 CCTAACTGCCAGCACCTGGAAGCCCTGGACAGATACTTCAATCTCACCATGTCTACCGC
 ProAsnCysGlnHisLeuGluAlaLeuAspArgTyrPheAsnLeuThrMETSerTyrArg
 481 AGCGACTCCGACATCTTCACGCCCTACGGCTGGTGGAGCCGTGGTCCGGCCAGCCTGCC
 SerAspSerAspIlePheThrProTyrGlyTrpLeuGluProTrpSerGlyGlnProAla
 541 CACCCACCGCTCAACCTCTCGGCCAAGACCGAGCTGGTGGCCTGGGCGGTGTCCAACCTGG
 HisProProLeuAsnLeuSerAlaLysThrGluLeuValAlaTrpAlaValSerAsnTrp
 601 AAGCCGGACTCAGCCAGGGTGGCTACTACCGAGCGCTGCAGGCTCATCTCAAGGTGGAC
 LysProAspSerAlaArgValArgTyrTyrGlnSerLeuGlnAlaHisLeuLysValAsp
 661 GTGTACGGACGCTCCCAAGGCCCTGCCAAGGGGACCATGATGGAGACGCTGTCCCGG
 ValTyrGlyArgSerHisLysProLeuProLysGlyThrMETMETGluThrLeuSerArg
 721 TACAAGTCTACCTGGCCTTCGAGAACTCCTTGACCCCGACTACATCACCGAGAGCTG
 TyrLysPheTyrLeuAlaPheGluAsnSerLeuHisProAspTyrIleThrGluLysLeu
 781 TGGAGGAACGCCCTGGAGGCCTGGGCGGTGCCCGTGGTGTGGGCCCCAGCAGAAGCAAC
 TrpArgAsnAlaLeuGluAlaTrpAlaValProValValLeuGlyProSerArgSerAsn
 841 TACGAGAGGTTCCTGCCACCCGACGCCTTCATCCACGTGGACGACTTCCAGAGCCCCAAG
 TyrGluArgPheLeuProProAspAlaPheIleHisValAspAspPheGlnSerProLys
 901 GACCTGGCCCGGTACCTGCAGGAGCTGGACAAGGACCACGCCCGCTACCTGAGCTACTTT
 AspLeuAlaArgTyrLeuGlnGluLeuAspLysAspHisAlaArgTyrLeuSerTyrPhe
 961 CGCTGGCGGGAGACGCTGCGGCCTCGCTCCTTCAGCTGGGCACTGGATTTCTCAAGGCC
 ArgTrpArgGluThrLeuArgProArgSerPheSerTrpAlaLeuAspPheCysLysAla
 1021 TGCTGGAAACTGCAGCAGGAATCCAGGTACCAGACGGTGGCAGCATAGCGGCTTGTTT
 CysTrpLysLeuGlnGlnGluSerArgTyrGlnThrValArgSerIleAlaAlaTrpPhe
 1081 ACCTGA
 ThrSTP

FIG. 4

FUT6**Estructura de fucosiltransferasa VI**

1 ATGGATCCCCTGGGCCCCGCCAAGCCACAGTGGTGGTGGCGCTGCTGTCTGACCAAGCTG
 METAspProLeuGlyProAlaLysProGlnTrpSerTrpArgCysCysLeuThrThrLeu
 61 CTGTTTCAGCTGCTGATGGCTGTGTGTTTCTTCTCTATCTGCGTGTGTCTCAAGACGAT
 LeuPheGlnLeuLeuMETAlaValCysPhePheSerTyrLeuArgValSerGlnAspAsp
 121 CCCACTGTGTACCTAATGGGTCCCGCTTCCAGACAGCACAGGGACCCCCGCCCACTCC
 ProThrValTyrProAsnGlySerArgPheProAspSerThrGlyThrProAlaHisSer
 181 ATCCCCCTGATCCTGCTGTGGACGTGGCCTTTTACAAACCCATAGCTCTGCCCGCGCTGC
 IleProLeuIleLeuLeuTrpThrTrpProPheAsnLysProIleAlaLeuProArgCys
 241 TCAGAGATGGTGGCIGGCACGGCTGACTGCAACATCACTGCCGACCGCAAGGIGTATCCA-
 SerGluMETValProGlyThrAlaAspCysAsnIleThrAlaAspArgLysValTyrPro
 301 CAGGCAGACGGGTGCTGCTGACCCACCGAGAGGTGATGTACAACCCAGTGGCCAGCTC
 GlnAlaAspAlaValIleValHisHisArgGluValMETTyrAsnProSerAlaGlnLeu
 361 CCACGCTCCCCGAGGGCGGGCAGGGGCAGCGATGGATCTGGTTCAGCATGGAGTCCCCAAGC
 ProArgSerProArgArgGlnGlyGlnArgTrpIleTrpPheSerMETGluSerProSer
 421 CACTGCTGGCAGCTGAAAGCCATGGACGGATACTTCAATCTCACCATGTCTACCGCAGC
 HisCysTrpGlnLeuLysAlaMETAspGlyTyrPheAsnLeuThrMETSerTyrArgSer
 481 GACTCCGACATCTTCACGCCCTACCGCTGGCTGGAGCCGTGGTCCGGCCAGCCCTGCCAC
 AspSerAspIlePheThrProTyrGlyTrpLeuGluProTrpSerGlyGlnProAlaHis
 541 CCACCGCTCAACCTCTCGGCCAAGACCGAGCTGGTGGCCTGGGCAGTGTCCAAGTGGGGG
 ProProLeuAsnLeuSerAlaLysThrGluLeuValAlaTrpAlaValSerAsnTrpGly
 601 CCAAACTCCGCCAGGGTGGCTACTACAGAGCCCTGCAGGCCCATCTCAAGGTGGACGTG
 ProAsnSerAlaArgValArgTyrTyrGlnSerLeuGlnAlaHisLeuLysValAspVal
 661 TACGGACGCTCCCACAAGCCCCTGCCCCAGGGAACCATGATGGAGACGCTGTCCCGGTAC
 TyrGlyArgSerHisLysProLeuProGlnGlyThrMETMETGluThrLeuSerArgTyr
 721 AAGTTCATCTGGCCTTCGAGAACTCCTTGCACCCCGACTACATCACCAGAGAGCTGTGG
 LysPheTyrLeuAlaPheGluAsnSerLeuHisProAspTyrIleThrGluLysLeuTrp
 781 AGGAACGCCCTGGAGGCCTGGGCCGTGCCCGTGGTGGTGGGCCCCAGCAGAAGCAACTAC
 ArgAsnAlaLeuGluAlaTrpAlaValProValValLeuGlyProSerArgSerAsnTyr
 841 GAGAGGTTCTGCCACCCGACGCCTTCATCCACGTGGACGACTTCCAGAGCCCCAAGGAC
 GluArgPheLeuProProAspAlaPheIleHisValAspAspPheGlnSerProLysAsp
 901 CTGGCCCGGTACCTGCAGGAGCTGGACAAGGACCACGCCCGCTACCTGAGCTACITTCGC
 LeuAlaArgTyrLeuGlnGluLeuAspLysAspHisAlaArgTyrLeuSerTyrPheArg
 961 TGGCGGGAGACGCTGCGGCCTCGCTCCTTCAGCTGGGCACTCGCTTTCTGCAAGGCCTGC
 TrpArgGluThrLeuArgProArgSerPheSerTrpAlaLeuAlaPheCysLysAlaCys
 1021 TGGAAACTGCAGGAGGAATCCAGGTACCAGACACGCGGCATAGCGGCTTGGTTCACCTGA
 TrpLysLeuGlnGluGluSerArgTyrGlnThrArgGlyIleAlaAlaTrpPheThrSTP

FIG. 5

	Cell Line	Apo2L 0.5% FBS			Apo2L 10% FBS			DR5 mAb+XL 0.5% FBS			DR5 mAb+10% FBS						sialyl Le ^x is A	sialyl Le ^x is X
		MTT		STD	MTT		STD	MTT		STD	MTT		STD					
		Mean	STD		Mean	STD		Mean	STD		FUT3	FUT6						
1	COLO 205	10.4	3.3		7.5	0.3		122.0	3.8		140.7			3268.5	53507.2		783.6	326.7
2	COLO 201	125.7	47.5		11.6	3.0		156.2	37.0		108.6			1799.3	1994.9		1261.1	105.7
3	COLO-206F	40.2	4.2		17.9			166.4	0.3		192.2			417.5	195.3		1377.3	9.0
4	SW948	27.6	21.0		19.1	12.7		181.3	102.4		202.5			1256.9	1239.3		13.3	456.9
5	HCT-15	45.9	24.3		510.6	692.0		136.3	12.1		268.5	127.5		90.1	137.7		7.3	10.5
6	DLD-1	105.8	61.6		1000.0			184.7	25.9		320.3			147.2	86.1		460.3	7.0
7	LS1034	97.7	60.6		1000.0			59.1	19.0		338.4			361.4	16799.0		530.0	153.7
8	CL-40	847.8	215.3		1000.0			379.0	74.5		435.8			1275.6	11073.8		506.4	52.1
9	COLO-678	1000.0	0.0		1000.0			107.3	14.7		132.5			50.7	40.7		148.9	14.2
10	SW403	1000.0	0.0		1000.0			201.0	62.2		300.0			2033.9	39360.7		251.2	281.9
11	LS 180	1000.0	0.0		1000.0	0.0		343.7	34.9		376.8	3.7		2076.9	57960.7		26.8	390.4
12	SK-CO-1	814.2	371.6		1000.0	0.0		311.6	103.4		699.9	424.5		443.6	333.2		7.3	17.6
13	HCT 116	347.6	438.2		1000.0	0.0		999.7	0.7		1000.0			42.6	40.7		1.4	2.1
14	RKO-AS45-1	819.2	361.6		1000.0	0.0		552.2	517.1		1000.0	0.0		0.3	3.5		3.3	7.0
15	SW480	569.6	497.0		1000.0	0.0		615.3	392.4		1000.0	0.0		0.3	6.3		6.6	5.1
16	LoVo	1000.0	0.0		1000.0			477.8	356.2		1000.0			4.4	5.8		5.6	6.1
17	SW620	1000.0	0.0		1000.0	0.0		651.5	412.9		1000.0	0.0		0.5	6.5		15.4	6.7
18	RKO	1000.0	0.0		1000.0	0.0		857.2	285.7		1000.0	0.0		0.1	0.6		4.5	4.9
19	CX-1	1000.0	0.0		1000.0	0.0		902.2	195.6		1000.0	0.0		30.7	162.1		18.3	27.4
20	HT-29	1000.0	0.0		1000.0			1000.0	0.0		1000.0			63.8	12.8		5.0	28.8
21	KM12	1000.0	0.0		1000.0			1000.0	0.0		1000.0			13.4	28.3		7.0	6.5
22	COLO 320HSR	1000.0	0.0		1000.0			1000.0	0.0		1000.0			0.9	0.7		3.8	4.1
23	COLO 320DM	1000.0	0.0		1000.0			1000.0	0.0		1000.0			1.1	0.6		5.2	6.4
24	SW1116	1000.0	0.0		1000.0			1000.0	0.0		1000.0			291.9	22176.9		386.0	577.9
25	SW837	1000.0	0.0		1000.0	0.0		1000.0	0.0		1000.0	0.0		65.2	9.1		7.2	12.5
26	Caco-2	1000.0	0.0		1000.0	0.0		1000.0	0.0		1000.0			3.0	149.7		5.4	8.9
27	HCT-8	1000.0	0.0		1000.0	0.0		1000.0	0.0		1000.0			3.2	6.8		1.3	3.9
28	SW1417	1000.0	0.0		1000.0	0.0		1000.0	0.0		1000.0			48.7	233.0		21.2	9.8

FIG. 6

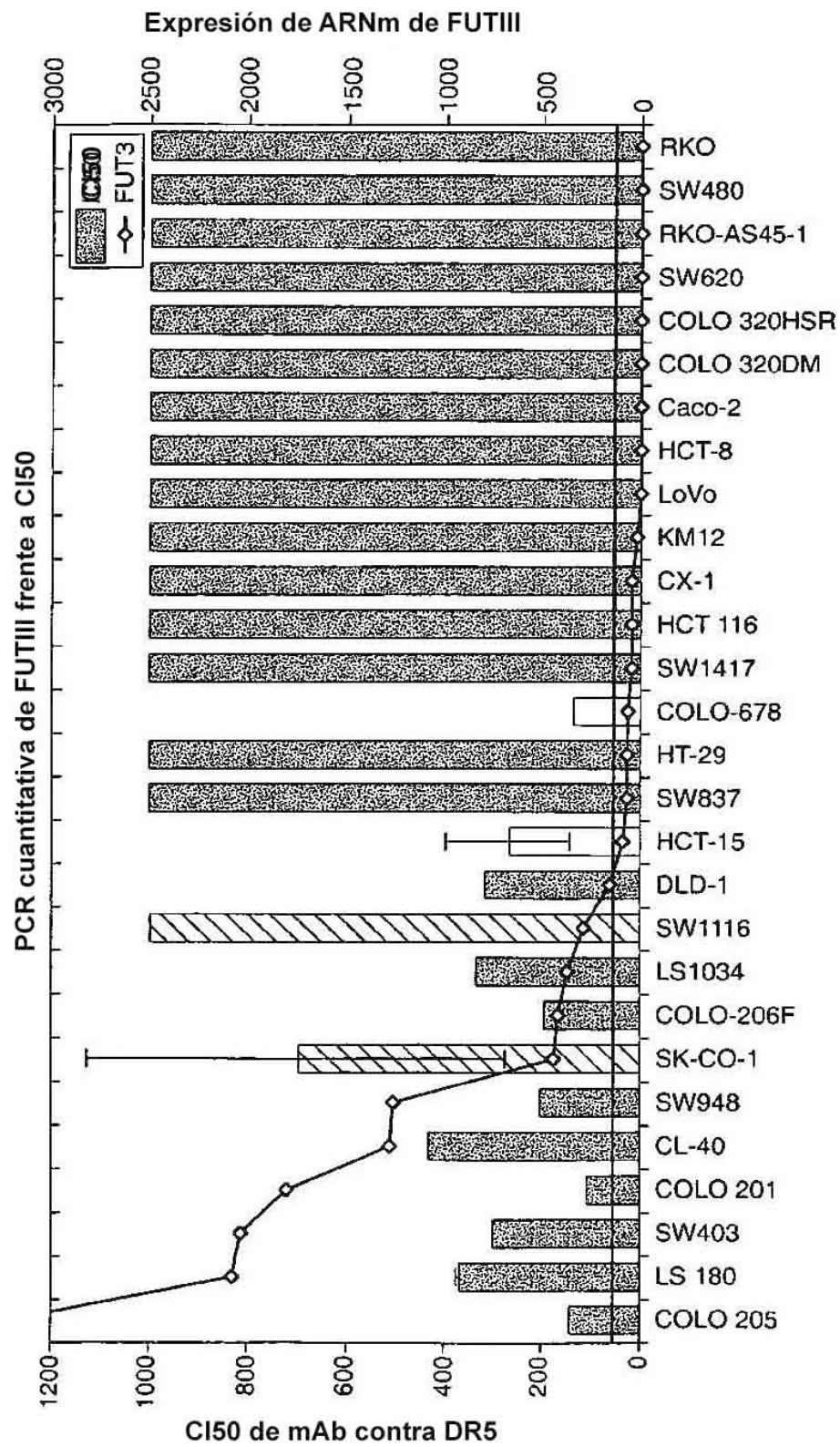


FIG. 7

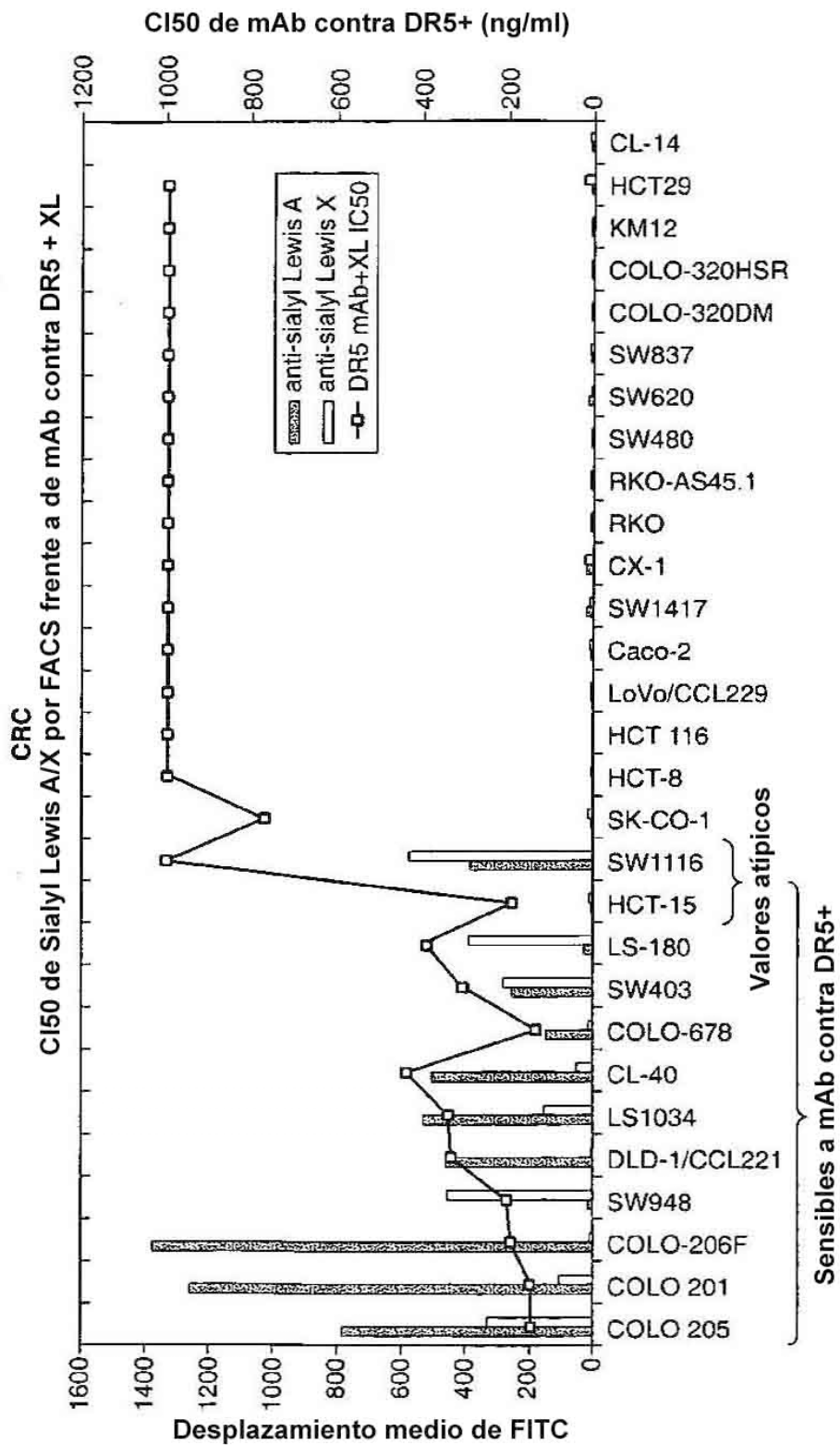


FIG. 8

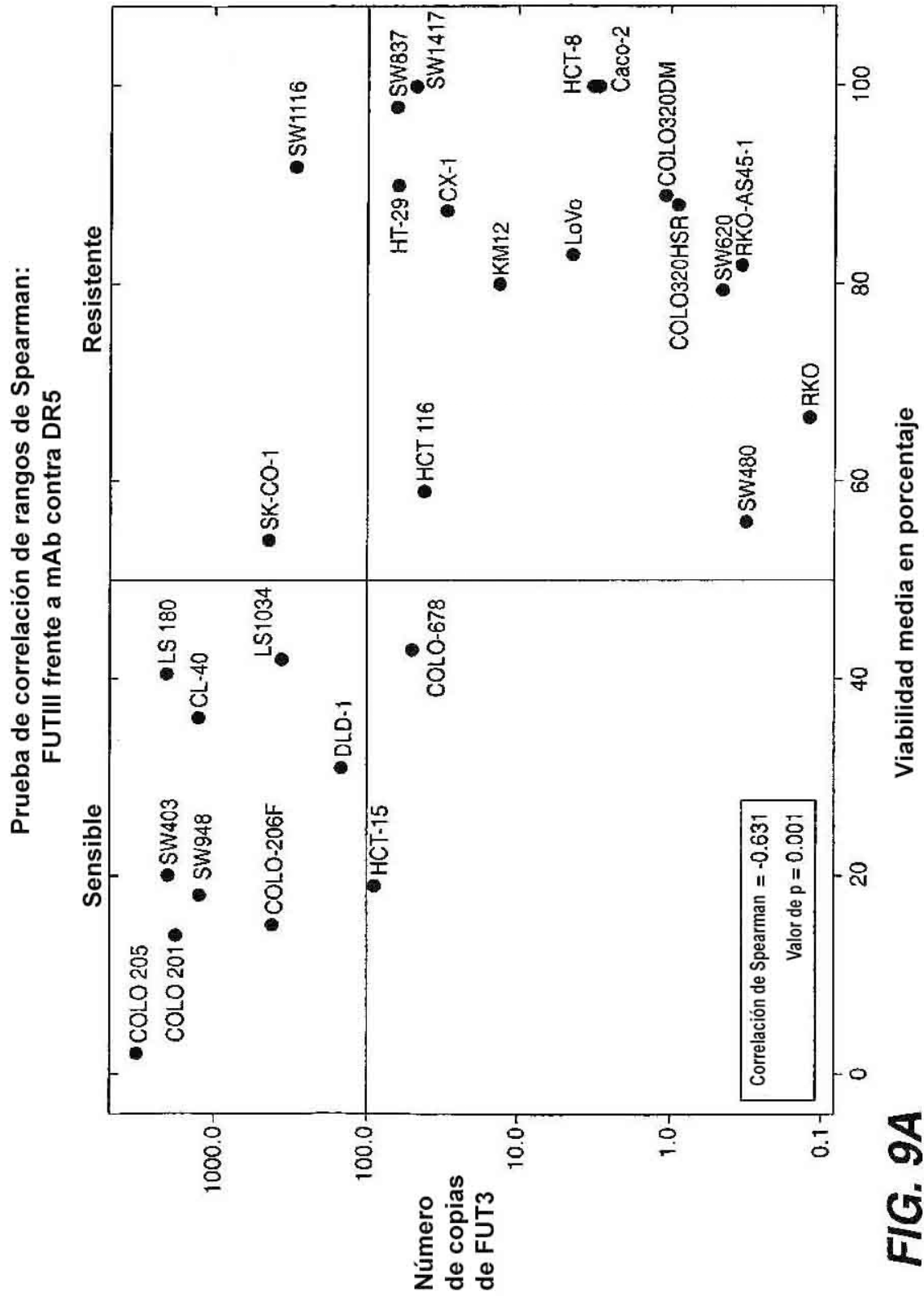


FIG. 9A

Prueba exacta de Fisher
FUTIII/Sialyl-Lewis A/X frente a mAb contra DR5

Prueba exacta de Fisher		FUT3		sLA/X	
		SÍ	NO		
mAb contra DR5	SENS	9	2	10	11
	RES	2	15	1	17
		11	17	11	28

valor de $p = 0,00035707$

valor de $p = 0,00000875$

Asociación estadísticamente significativa entre la expresión de FUTIII y Sialyl Lewis A/X y la sensibilidad de mAb contra DR5

Conjunto de prueba:

Prueba exacta de Fisher		FUT3		sLA/X	
		SÍ	NO		
mAb contra DR5	SENS	4	2	5	6
	RES	2	10	1	18
		6	12	6	18

valor de $p = 0,05726136$

valor de $p = 0,00393234$

FIG. 9B

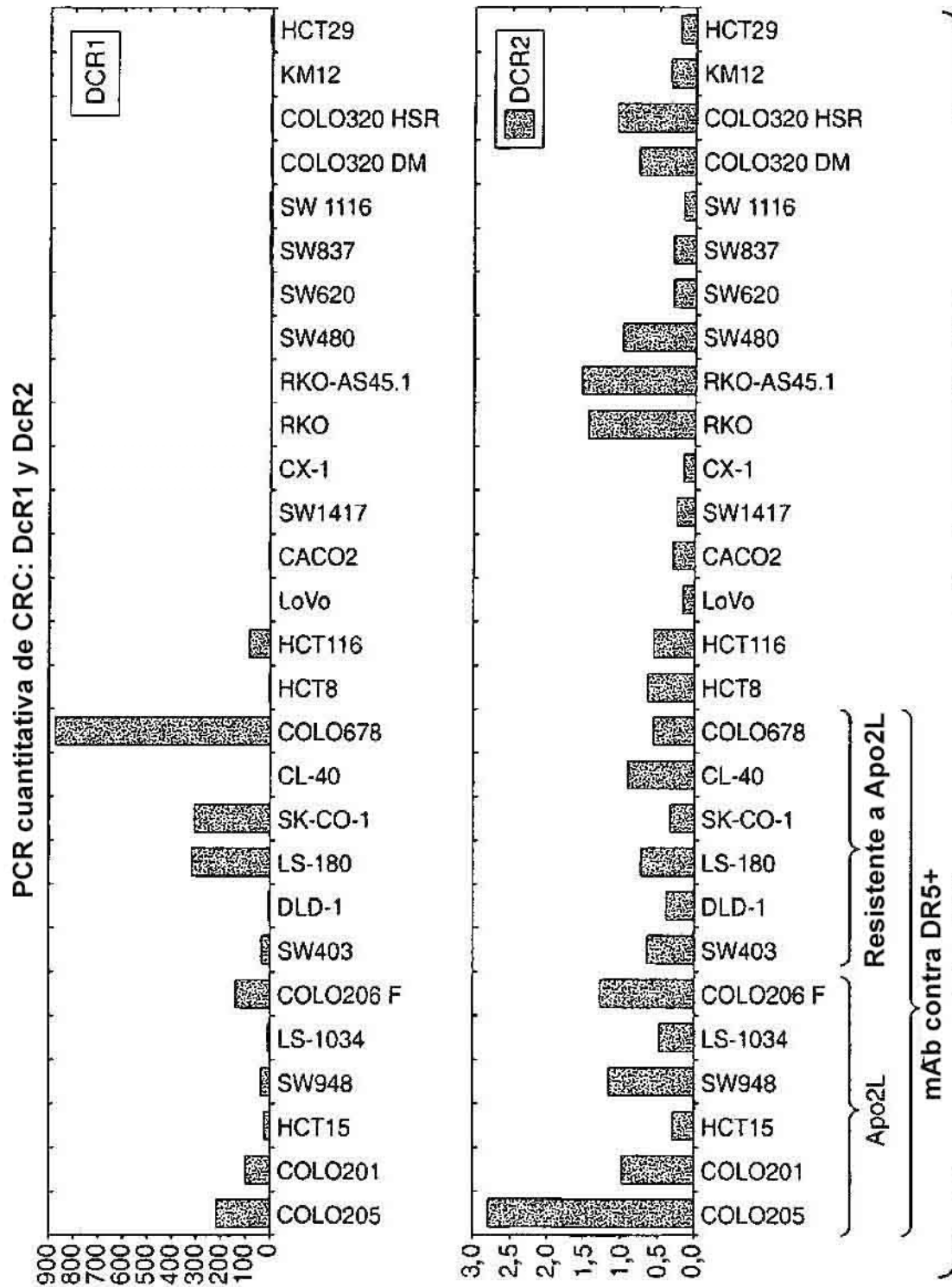
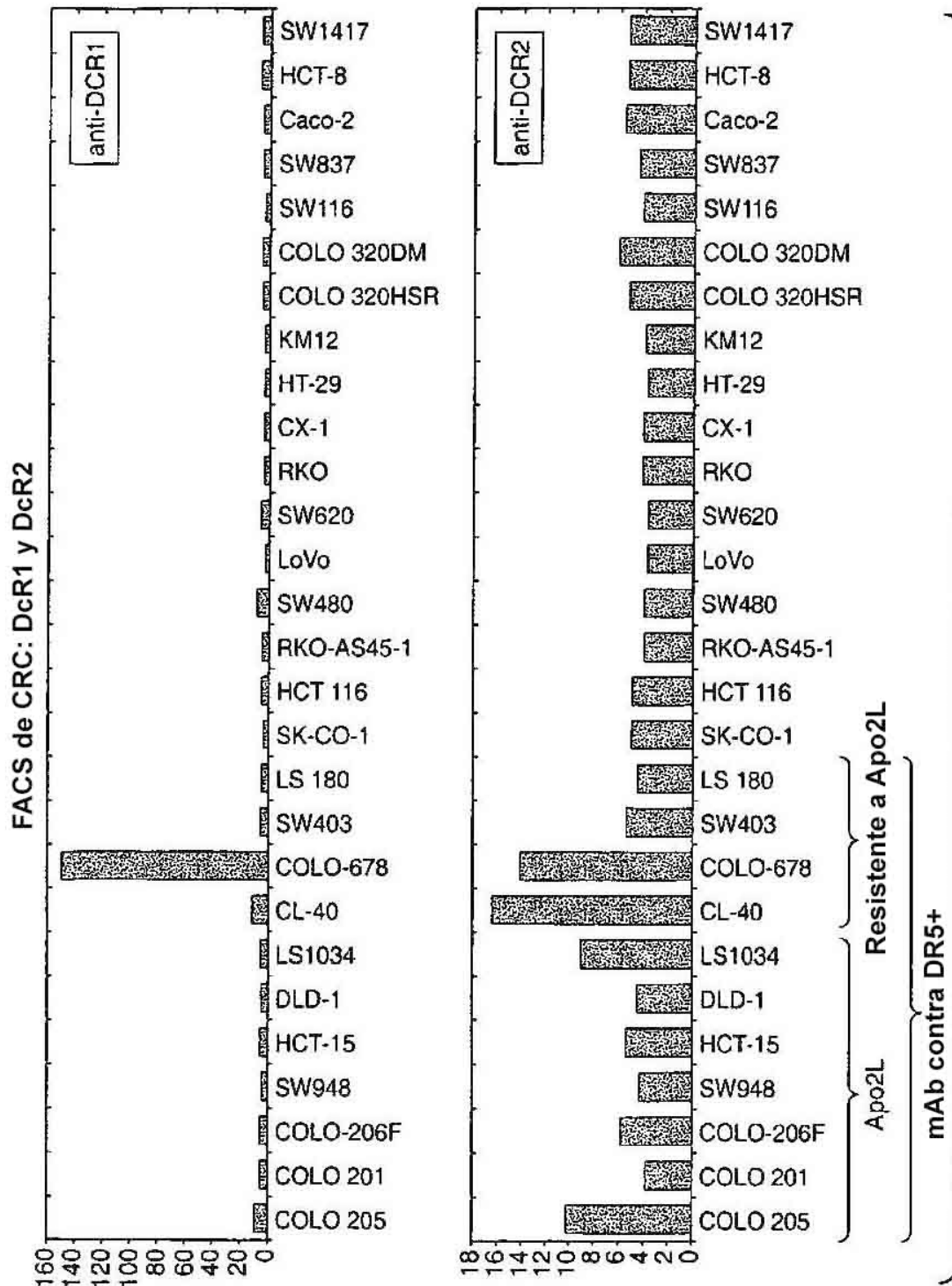


FIG. 10

**FIG. 11**

Datos de IHC en líneas celulares de CRC

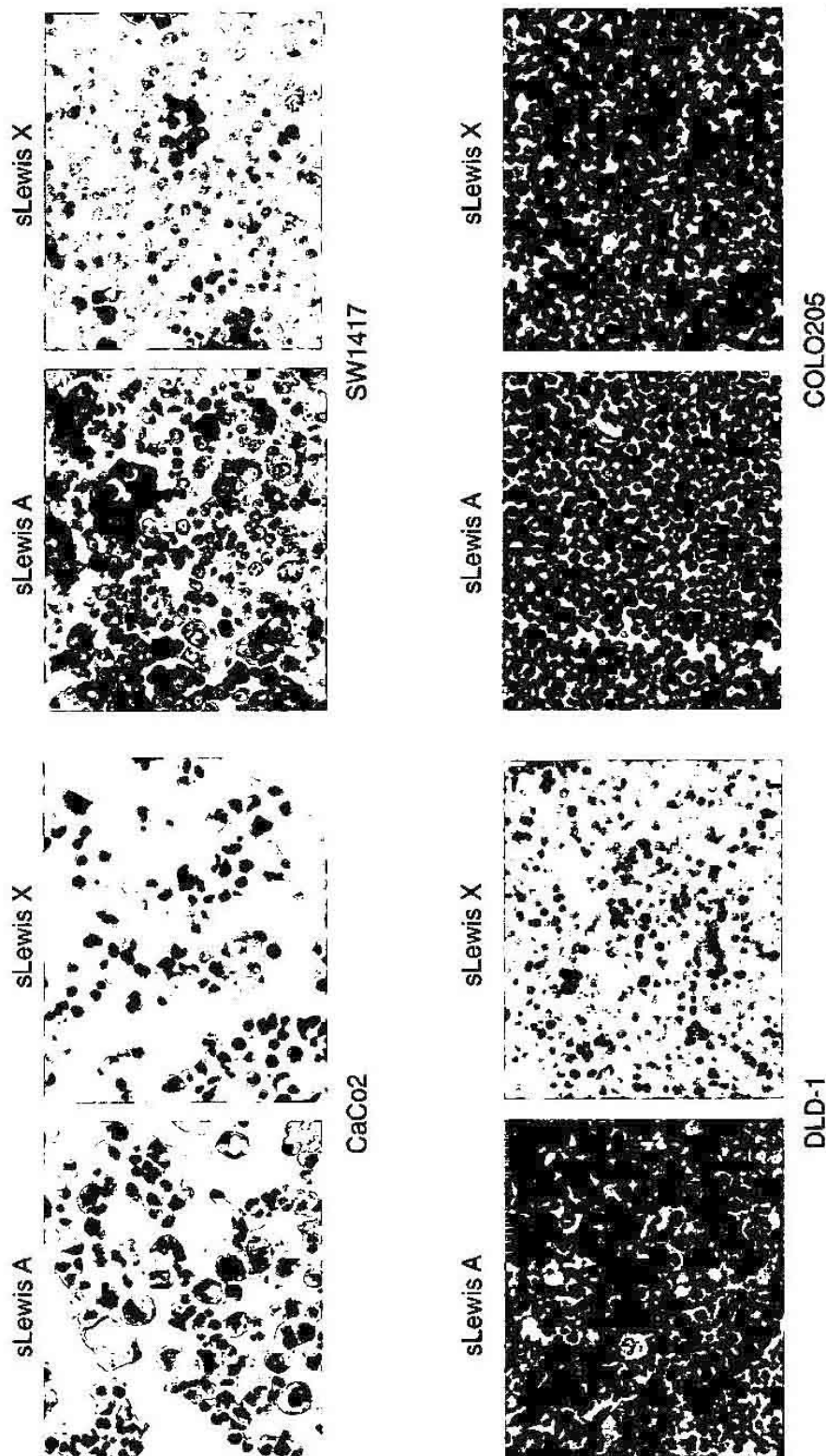
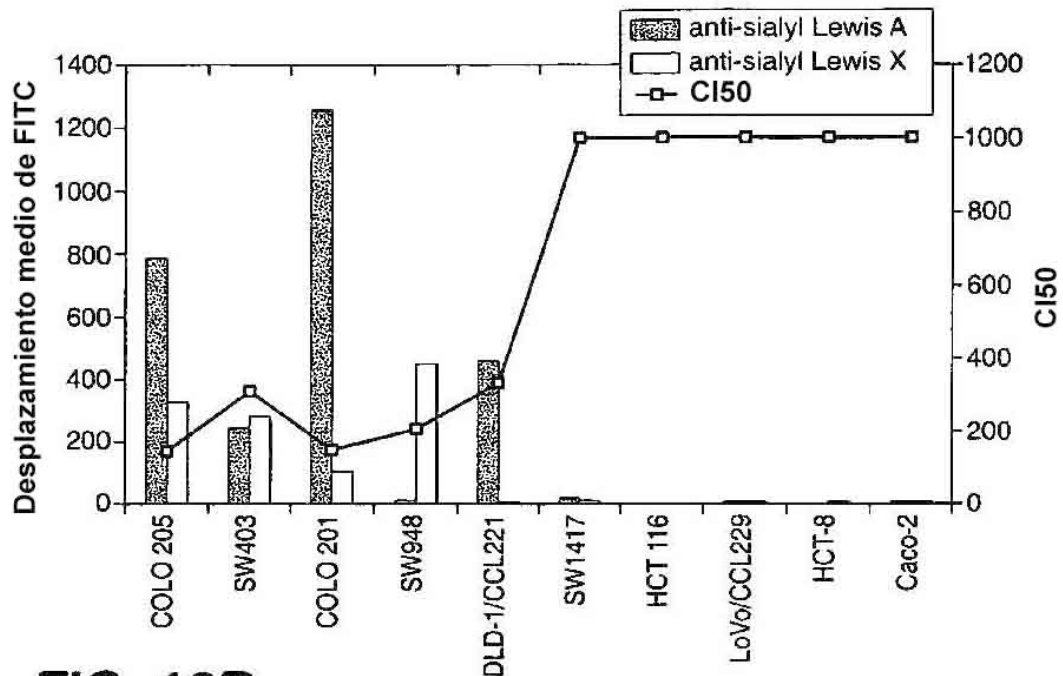


FIG. 12A

**FIG. 12B**

Datos de IHC en muestras de CRC

☐ Tinción de Sialyl-Lewis A de adenocarcinomas colorrectales primarios (TMA colorrectales):

37 de 74 (50%) son positivos; de estos 37 casos

19 son 1+

10 son 2+

8 son 3+ en intensidad de tinción

2 de 33 (6%) casos de mucosa benigna muestran tinción positiva, ambos casos son 1+

☐ Tinción de Sialyl-Lewis X de adenocarcinomas colorrectales primarios (TMA colorrectales):

47 de 75 (63%) son positivos; de estos 47 casos

25 son 1+

19 son 2+

3 son 3+ en intensidad de tinción

21 de 32 (66%) casos de mucosa benigna muestran tinción positiva (19 casos son 1+, 2 casos son 2+)

☐ El tejido de hígado benigno muestra tinción positiva en vías **biliares intrahepáticas** pequeñas e intermedias del revestimiento del epitelio biliar; los **hepatocitos** no muestran tinción positiva.

☐ **8 de 9 (88%) de los adenocarcinomas colorrectales metastásicos** son positivos para Sialyl-Lewis A y X. 7 de los 8 casos positivos muestran una fuerte tinción. Hay una mayor prevalencia de la expresión de Sialyl-Lewis A y X y una reactividad más fuerte en adenocarcinomas colorrectales metastásicos en comparación con primarios.

FIG. 13