



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 547**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00941233 .9**

86 Fecha de presentación : **07.06.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1192185**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **03.04.2002**

54 Título: **Sinergia de antagonista de receptores del ligando Apo-2L y de CPT-11.**

30 Prioridad: **09.06.1999 US 138240 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

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

72 Inventor/es: **Ashkenazi, Avi, J.;**
Benyunes, Mark, C. y
Schwall, Ralph, H.

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

Sinergia de antagonista de receptores del ligando Apo-2L y de CPT-11.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere en general a procedimientos para la inducción de apoptosis en células de mamífero. En particular, se refiere al uso de agonistas del receptor de Apo-2L y del CPT-11 para inducir apoptosis de manera sinérgica en células de mamífero. Entre los diversos agonistas del receptor de Apo-2L que se contemplan en la invención se incluyen el ligando conocido como ligando de Apo-2 o TRAIL, así como anticuerpos con actividad agonista dirigidos a uno o varios receptores de Apo-2L.

Antecedentes de la invención

Se han identificado diversas moléculas, tales como el factor de necrosis tumoral α ("TNF- α "), el factor de necrosis tumoral β ("TNF- β " o "linfotóxina- α "), la linfotóxina- β ("LT- β "), los ligandos de CD30, CD27, CD40, OX-40, 4-1BB, Apo-1 (también denominado ligando de Fas o ligando de CD95), Apo-2 (también denominado TRAIL) y Apo-3 (también denominado TWEAK), la osteoprotegerina (OPG), APRIL, el ligando de RANK (también denominado TRANCE), y TALL-1 (también denominado BlyS, BAFF o THANK) como miembros de la familia de citoquinas del factor de necrosis tumoral ("TNF") [Véase, por ejemplo, Gruss y Dower, *Blood*, 85:3378-3404 (1995); 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), Patente internacional WO 97/01633 publicada el 16 de Enero de 1997; Patente internacional WO 97/25428 publicada el 17 de Julio de 1997; Marsters y col., *Curr. Biol.*, 8:525-528 (1998); Simonet y col., *Cell*, 89:309-319 (1997); Chicheportiche y col., *Biol. Chem.*, 272:32401-32410 (1997); Hahne y col., *J. Exp. Med.*, 188:1185-1190 (1998); Patente internacional WO98/28426 publicada el 2 de Julio de 1998; Patente internacional WO98/46751 publicada el 22 de Octubre de 1998; Patente internacional WO/98/18921 publicada 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)]. Entre estas moléculas, se ha descrito que el TNF α , TNF- β , el ligando de CD30, el ligando de 4-1BB, el ligando de Apo-1, el ligando de Apo-2 (Apo2L/TRAIL) y el ligando de Apo-3 (TWEAK) están implicadas en la muerte celular por apoptosis. Se ha descrito que tanto el TNF α como el TNF β inducen la muerte por apoptosis en células tumorales susceptibles [Schmid y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:1881 (1986); Dealtry y col., *Eur. J. Immunol.*, 17:689 (1987)].

Recientemente, se han identificado nuevas moléculas que se cree que son miembros de la familia de citoquinas del TNF y se describió que están implicadas en la apoptosis. Por ejemplo, en Pitti y col., *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996), se describe una molécula denominada como ligando de Apo-2. Véase también, patente internacional WO97/25428 publicada el 17 de Julio de 1997. Se indica que el ligando de Apo-2 humano de longitud completa es un polipéptido de 281 aminoácidos que induce la apoptosis en diversas células de mamífero. Otros investigadores han descrito polipéptidos relacionados denominados como TRAIL [Wiley y col., *Immunity*, 3:673-682 (1995); patente internacional WO 97/01633 publicada el 16 de Enero de 1997] y como AGP-1 [patente internacional WO 97/46686 publicada el 11 de Diciembre de 1997].

Varias moléculas de la familia del TNF también parecen tener una función o funciones en el funcionamiento o en el desarrollo del sistema inmune [Gruss y col., *Blood*, 85:3378 (1995)]. Zheng y col. han descrito que el TNF α está implicado en la apoptosis posterior a la estimulación de células T CD8 positivas [Zheng y col., *Nature*, 377:348-351 (1995)]. Otros investigadores han descrito que el ligando de CD30 podría estar implicado en la supresión de células T autorreactivas en el timo [Amakawa y col., *Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Programmed Cell Death*, Resumen N° 10, (1995)]. El ligando de CD40 activa muchas funciones de las células B, incluyendo la proliferación, la secreción de inmunoglobulinas, y la supervivencia [Renshaw y col., *J. Exp. Med.*, 180:1889 (1994)]. Se ha descrito que otra citoquina de la familia del TNF identificada recientemente, TALL-1 (BlyS), bajo ciertas condiciones, induce la proliferación de células B y la secreción de inmunoglobulinas. [Moore y col., *supra*; Schneider y col., *supra*; Mackay y col., *J. Exp. Med.*, 190:1697 (1999)].

Se han asociado mutaciones en los genes para el receptor o el ligando de Fas/Apo-1 de ratón (llamados *lpr* y *gld*, respectivamente) con algunos trastornos autoinmunes, lo que indica que el ligando de Apo-1 puede jugar un papel en la regulación de la selección clonal de linfocitos autoreactivos en la periferia [Krammer y col., *Curr. Op. Immunol.*, 6:279-289 (1994); Nagata y col., *Science*, 267:1449-1456 (1995)]. También se indica que el ligando de Apo-1 induce la apoptosis posterior a la estimulación en linfocitos T CD4 positivos y en linfocitos B, y podría estar implicado en la eliminación de linfocitos activados cuando su función ya no es necesaria [Krammer y col., *supra*; Nagata y col., *supra*]. Se ha descrito que anticuerpos monoclonales de ratón con actividad agonista que se unen específicamente al receptor de Apo-1 muestran una actividad citolítica comparable o similar a la del TNF α . [Yonehara y col., *J. Exp. Med.*, 169:1747-1756 (1989)].

Se cree que la inducción de diversas respuestas celulares mediadas por dichas citoquinas de la familia de TNF se inicia mediante su unión a receptores celulares específicos. Previamente, se habían identificado dos receptores distintos para el TNF de aproximadamente 55 kDa (TNFR1) y 75 kDa (TNFR2) [Hohman y col., *J. Biol. Chem.*, 264:14927-14934 (1989); Brockhaus y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:3127-3131 (1990); Patente europea EP 417.563, publicada

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)]. Se observó que dichos TNFRs compartían la estructura típica de los receptores celulares de superficie incluyendo las regiones extracelular, transmembrana e intracelular. Las regiones extracelulares de ambos receptores se encontraron también de forma natural como proteínas solubles de unión al TNF [Nophar, Y. y col., *EMBO J.*, 9:3269 (1990); y Kohno, T. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:8331 (1990); Hale y col., *J. Cell. Biochem. Supplement* 15F, 1991, p. 113 (P424)].

La región extracelular de los TNFRs de tipo 1 y 2 (TNFR1 y TNFR2) contiene un patrón de secuencia aminoacídica repetitivo de cuatro dominios ricos en cisteínas (CDR) designados del 1 al 4, comenzando desde el extremo NH₂-terminal. [Schall y col., *supra*; Loetscher y col., *supra*; Smith y col., *supra*; Nophar y col., *supra*; Kohno y col., *supra*; Banner y col., *Cell*, 73:431-435 (1993)]. Un patrón de CDR repetitivo similar a éste existe en muchas otras proteínas de superficie celular, incluyendo el receptor p75 del factor de crecimiento nervioso (NGFR) [Johnson y col., *Cell*, 47:545 (1986); Radeke y col., *Nature*, 325:593 (1987)], el antígeno de células B CD40 [Stamenkovic y col., *EMBO J.*, 8:1403 (1989)], el antígeno de células T OX40 [Mallet y col., *EMBO J.*, 9:1063 (1990)] y el antígeno Fas [Yonehara y col., *supra* e Itoh y col., *Cell*, 66:233-243 (1991)]. También se encuentran CDR en las proteínas T2 de tipo TNFR soluble (sTNFR) de los poxvirus de Shope y mixoma [Upton y col., *Virology*, 160:20-29 (1987); Smith y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176:335 (1991); Upton y col., *Virology*, 184:370 (1991)]. El alineamiento óptimo de estas secuencias indica que las posiciones de los residuos de cisteína están bien conservadas. Estos receptores se denominan algunas veces colectivamente como miembros de la superfamilia de receptores TNF/NGF.

Los ligandos de la familia del TNF identificados hasta ahora, con la excepción de la linfotóxina- α , son proteínas transmembrana de tipo II, cuyo extremo C-terminal es extracelular. Por el contrario, la mayoría de los receptores de la familia del receptor TNF (TNFR) identificados hasta el momento son proteínas transmembrana de tipo I. Sin embargo, tanto en las familias del ligando como en las del receptor del TNF, la homología identificada entre miembros de la familia se ha observado fundamentalmente en el dominio extracelular ("ECD"). Varias citoquinas de la familia del TNF, incluyendo el TNF α , el ligando de Apo-1 y el ligando de CD40 se fragmentan proteolíticamente en la superficie celular; la proteína resultante en cada caso forma típicamente una molécula homotrimérica que funciona como una citoquina soluble. Las proteínas de la familia del receptor del TNF también se fragmentan proteolíticamente de forma habitual para liberar ECDs solubles del receptor que pueden funcionar como inhibidores de las citoquinas cognadas.

Más recientemente, se han identificado otros miembros de la familia de TNFR. En von Bulow y col., *Science*, 278:138-141 (1997), los investigadores describen un receptor de membrana plasmática denominado como un Activador Transmembrana que interacciona con CAML o "TACI". Se ha descrito que el receptor TACI contiene un motivo rico en cisteína característico de la familia de TNFR. En un ensayo *in vitro*, la unión de TACI en la superficie de células Jurkat transfectadas con anticuerpos específicos para TACI lleva consigo la activación de NF- κ B [véase también, patente internacional WO 98/39361 publicada el 18 de Septiembre de 1998].

Laabi y col., *EMBO J.*, 11:3897-3904 (1992) muestran la identificación de un nuevo gen llamado "BCM" cuya expresión coincide con la maduración terminal de células B. La pauta abierta de lectura del ADNc normal de BCM predice un polipéptido de 184 aminoácidos de longitud con un solo dominio transmembrana. Estos investigadores posteriormente denominaron a este gen como "BCMA". [Laabi y col., *Nucleic Acids Res.*, 22:1147-1154 (1994)]. La expresión del ARNm de BCMA se observó que estaba ausente en líneas celulares de células B malignas humanas, lo que representa la fase de pro-linfocito B, y por tanto, se cree que está asociado a la fase de diferenciación de los linfocitos [Gras y col., *Int. Immunology*, 7:1093-1106 (1995)]. En Madry y col., *Int. Immunology*, 10:1693-1702 (1998), se describe la clonación del ADNc del BCMA murino. Se indica que el ADNc de BCMA murino codifica un polipéptido de 185 aminoácidos de longitud que presenta una identidad del 62% con el polipéptido del BCMA humano. El alineamiento de las secuencias proteicas de BCMA humano y murino reveló un motivo conservado de seis cisteínas en la región N-terminal, sugiriendo que la proteína de BCMA pertenece a la superfamilia del TNFR [Madry y col., *supra*].

En Marsters y col., *Curr. Biol.* 6:750 (1996), los investigadores describen un polipéptido humano de secuencia nativa de longitud completa, llamado Apo-3, que muestra similitud con la familia de TNFR en sus repeticiones extracelulares ricas en cisteínas y que se asemeja a TNFR1 y CD95 en que contiene una secuencia de un dominio citoplásmico de muerte [véase también Marsters y col., *Curr. Biol.*, 6:1669 (1996)]. Apo-3 también ha sido denominado por otros investigadores como DR3, wsl-1, TRAMP, y LARD [Chinnaiyan y col., *Science*, 274:990 (1996); Kitson y col., *Nature*, 384:372 (1996); Bodmer y col., *Immunity*, 6:79 (1997); Screaton y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:4615-4619 (1997)].

Pan y colaboradores han descrito otro miembro de la familia del receptor del TNF denominado como "DR4" [Pan y col., *Science*, 276:111-113 (1997); véase también patente internacional WO98/32856 publicada el 30 de Julio de 1998]. Se indicó que el DR4 contenía un dominio citoplásmico de muerte capaz de poner en marcha el aparato de suicidio celular. Pan y colaboradores describen que se cree que DR4 es un receptor para el ligando conocido como Apo2L/TRAIL.

En Sheridan y col., *Science*, 227:818-821 (1997) y Pan y col., *Science*, 277:815-818 (1997), se describe otra molécula que se cree que es un receptor para Apo2L/TRAIL [véase también, patente internacional WO98/51793 publicada el 19 de Noviembre de 1998; patente internacional WO98/41629 publicada el 24 de Septiembre de 1998].

Dicha molécula se denomina como DR5 (también se ha llamado alternativamente como Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAP08, TRICK2 o KILLER [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); patente internacional WO98/35986 publicada el 20 de Agosto de 1998; patente europea EP870.827 publicada el 14 de Octubre de 1998; patente internacional WO98/4664 publicada el 22 de Octubre de 1998; patente internacional WO99/02653 publicada el 21 de Enero de 1999; patente internacional WO99/09165 publicada el 25 de Febrero de 1999; patente internacional WO99/1179 publicada el 11 de Marzo de 1999]. Como DR4, se indica que DR5 contiene un dominio citoplasmático de muerte y puede ser capaz de señalar la apoptosis. La estructura cristalina del complejo formado entre Apo-2L/TRAIL y DR5 se describe en Hymowitz y col., Molecular Cell, 4:563-571 (1999).

Recientemente, se ha identificado otro receptor más que contiene un dominio de muerte, DR6, [Pan y col., FEBS Letters, 431:351-356(1998)]. A parte de contener 4 dominios extracelulares putativos ricos en cisteína y un dominio citoplasmático de muerte, se cree que DR6 contiene una secuencia putativa de cremallera de leucinas que se superpone con un motivo rico en prolina en la región citoplasmática. El motivo rico en prolinas se asemeja a secuencias que se unen a dominios de homología src de tipo 3 que se encuentran en muchas moléculas de transducción de señales intracelular.

Un grupo adicional de receptores recientemente identificados que se denominan como "receptores señuelo" se cree que funcionan como inhibidores, en lugar de transductores de señales. Este grupo incluye DCR1 (también denominado como 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)] y DCR2, (también llamado TRUND 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)] ambas moléculas de superficie celular, así como OPG [Simonet y col., *supra*; Emery y col., *infra*] y DCR3 [Pitti y col., Nature, 396:699-703 (1998)] ambas, proteínas secretadas y solubles.

Entre los miembros adicionales de la familia del TNFR recientemente identificados se incluyen: CAR1, HVEM, GITR, ZTNFR-5, NTR-1, y TNFL1 [Brojatsch y col., Cell, 87:845-855 (1996); Montgomery y col., Cell, 87:427-436 (1996); Marsters y col., J. Biol. Chem. 272: 14029-14032 (1997); Nocentini y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 6216-6221 (1997); Emery y col., J. Biol. Chem. 273: 14363-14367 (1998); patente internacional WO99/04001 publicada el 28 de enero de 1999; patente internacional WO99/07738 publicada el 18 de febrero de 1999; patente internacional WO99/3398 publicada el 8 de julio de 1999].

Tal y como Tewari y col. revisaron recientemente, TNFR1, TNFR2 y CD40 modulan la expresión de citoquinas proinflamatorias y coestimuladoras, receptores de citoquinas y moléculas de adhesión celular a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B [Tewari y col., Curr. Op. Genet. Develop., 6:39-44 (1996)]. NF- κ B es el prototipo de una familia de factores de transcripción dimericos cuyas subunidades contienen regiones Rel conservadas [Verma y col., Genes Develop., 9:2723-2735 (1996); Baldwin, Ann. Rev. Immunol., 14: 649-681 (1996)]. En su forma latente, NF- κ B está formando un complejo con miembros de la familia de inhibidores I κ B; tras la inactivación de I κ B en respuesta a ciertos estímulos, el NF- κ B liberado se transloca al núcleo en donde se une a secuencias de ADN específicas y activa la transcripción genética. Tal y como se describe anteriormente, los miembros de TNFR identificados hasta el momento o bien presentan o les falta una región para un dominio intracelular de muerte. Algunas moléculas TNFR que carecen del dominio de muerte, tal como TNFR2, CD40, HVEM, y GITR, son capaces de modular la actividad NF- κ B. [véase, por ejemplo, Lotz y col., J. Leukocyte Biol., 60:1-7 (1996)].

Véase Ashkenazi y Dixit, Science, 281: 1305-1308 (1998); Golstein, Curr. Biol. 7:750-753 (1997); Gruss y Dower, *supra*, y Nagata, Cell, 88:355-365 (1997) para una revisión sobre la familia de citoquinas del TNF y sus receptores.

Resumen de la invención

Los solicitantes sorprendentemente encontraron que el ligando de Apo-2 u otros agonistas del receptor de Apo-2L y CPT-11 pueden actuar sinérgicamente para inducir apoptosis en células de mamífero, particularmente, en células cancerosas de mamífero.

La invención proporciona varios procedimientos para el uso del ligando de Apo-2 y de CPT-11 para inducir apoptosis en células de mamífero. Por ejemplo, la invención proporciona un procedimiento para inducir apoptosis que comprende la exposición de una célula cancerosa de mamífero (preferentemente una célula de cáncer de colon o colorectal) en cultivo celular o *ex vivo*, al ligando de Apo-2 y a CPT-11 en una cantidad efectiva para inducir sinérgicamente apoptosis. La invención incluye además medicamentos para el tratamiento de un mamífero que sufre de cáncer, los cuales constan de una cantidad efectiva de ligando de Apo-2 y de CPT-11, tal como se describe aquí.

El anticuerpo agonista anti-receptor del ligando Apo-2 puede simular la actividad apoptótica del ligando de Apo-2. En una realización preferente el anticuerpo agonista comprenderá un anticuerpo monoclonal contra el receptor DR4 o DR5.

La invención también proporciona composiciones que constan del ligando de Apo-2 o del anticuerpo agonista para el receptor de Apo-2L y/o CPT-11. Opcionalmente, las composiciones de la invención incluirán vehículos o diluyen-

tes farmacéuticamente aceptables. Preferentemente, las composiciones incluirán el ligando de Apo-2 o el anticuerpo agonista del receptor de Apo-2L y/o CPT-11 en una cantidad que sea efectiva para inducir apoptosis sinérgicamente en células de mamífero.

- 5 La invención también proporciona artículos de fabricación y equipos que incluyen el ligando de Apo-2 o el anticuerpo agonista del receptor de Apo2L y/o CPT-11.

Descripción breve de las figuras

- 10 La Figura 1 muestra el efecto de Apo-2L (triángulos vacíos), CPT-11 (cuadrados vacíos), Apo-2L más CPT-11 (triángulos rellenos), o el vehículo solo (círculos vacíos) sobre el crecimiento de células de carcinoma de colon humano inyectadas subcutáneamente en ratones *nude* atímicos.

- 15 La Figura 2 muestra el efecto de Apo-2L (60 mg/kg) (cuadrados vacíos), CPT-11 (80 mg/Kg) (triángulos rellenos), Apo-2L ("Apo-2L.0") más CPT-11 (cuadrados rellenos), anti-DR4 mAb 4H6 (triángulos vacíos), anti-DR4 mAb más CPT-11 (triángulos rellenos) o el vehículo solo (círculos rellenos) sobre el crecimiento de células de carcinoma de colon humano inyectadas subcutáneamente en ratones *nude* atímicos.

Descripción detallada de la invención

20 I. Definiciones

- Los términos "apoptosis" y "actividad apoptótica" se usan en un sentido amplio y se refieren a la muerte celular ordenada o controlada en mamíferos y que típicamente se acompaña por uno o más cambios celulares característicos, incluyendo la condensación del citoplasma, la pérdida de las microvellosidades de la membrana plasmática, la segmentación del núcleo, la degradación del DNA cromosómico o la pérdida de la función mitocondrial. Esta actividad puede determinarse y cuantificarse usando técnicas conocidas en la materia, por ejemplo, mediante ensayos de viabilidad celular, análisis de separación de células activadas por fluorescencia (FACS) o electroforesis de DNA, y más específicamente mediante la unión de anexina V, la fragmentación del DNA, la pérdida de volumen celular, la dilatación del retículo endoplasmático, la fragmentación celular, y/o la formación de vesículas de membrana (llamados cuerpos apoptóticos).

- Tal y como se usa aquí, el término "sinergia" o "sinergismo" o "sinérgicamente" se refiere a la interacción de dos o más agentes de forma que su efecto combinado es mayor que la suma de sus efectos individuales.

- 35 Los términos "ligando de Apo-2", "Apo-2L", o "TRAIL" se usan aquí para referirse a un polipéptido que incluye los residuos aminoácidos del 95-181, inclusive, del 114-281 inclusive, los residuos del 91-281 inclusive, los residuos del 92-281 inclusive, los residuos del 41-281 inclusive, los residuos del 15-281 inclusive, o los residuos del 1-281 inclusive de la secuencia aminoácida mostrada en la Figura 1A de Pitti y col., J. Biol. Chem., 271: 12687-12690 (1996), así como los fragmentos biológicamente activos, las variantes de delección, inserción o sustitución de las secuencias anteriores. En una realización, la secuencia polipeptídica comprende los residuos del 114-281. Opcionalmente, la secuencia polipeptídica tiene al menos los residuos del 91-281 o los residuos del 92-281. En otra realización preferida, los fragmentos o variantes biológicamente activos tienen al menos un 80% de identidad en la secuencia aminoácida, más preferentemente al menos un 90% de identidad en la secuencia aminoácida, e incluso más preferentemente al menos alrededor de un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad en la secuencia aminoácida con cualquiera de las secuencias anteriores. La definición comprende variantes por sustitución del ligando de Apo-2 que incluyen los aminoácidos del 91-281 de la Figura 1A de Pitti y col., J. Biol. Chem., 271: 12687-12690 (1996) en la cual al menos uno de los aminoácidos en posición 203, 218 ó 269 (usando la numeración de la secuencia proporcionada por Pitti y col., *supra*) se sustituyen por un residuo de alanina. La definición incluye el ligando de Apo-2 aislado de una fuente de ligando de Apo-2, tal como tipos de tejidos humanos, o de otra fuente o preparados por procedimientos de síntesis o recombinantes. El término ligando de Apo-2 también se refiere a los polipéptidos descritos en la patente internacional WO 97/25428 y patente internacional WO97/01633, *supra*.

- 55 El término "CPT-11" se refiere a una quimioterapia o agente quimioterapéutico el cual es un inhibidor de la topoisomerasa de clase I. El término "CPT-11" tal y como se usa aquí incluye los agentes quimioterapéuticos que tienen el nombre químico (4S)-4, 11-dietil-4-hidroxi-9-[(4-piperidino-piperidino)carboniloxil]-1H-pirano[3', 4':6,7]indolizino [1,2-b]quinolina-3, 14(4H, 12H) diona hidrocloreto trihidrato, y los nombres irinotecano, canfotecina, topotecan, o Camptosan® así como sus derivados solubles en agua o sales farmacéuticamente aceptables de tales agentes. El hidrocloreto de irinotecano tiene como fórmula empírica $C_{33}H_{38}N_4O_6 \cdot HCl \cdot 3H_2O$ y un peso molecular de aproximadamente 677.19. Tales nombres químicos y fórmulas químicas serán verdaderamente familiares a aquellos expertos en la materia. El Camptosan® está disponible comercialmente en Pharmacia & Upjohn y está aprobado para su venta por la FDA en los Estados Unidos. El prospecto del producto del Camptosan® indica que la molécula puede ser usada para el tratamiento de pacientes humanos con carcinoma colorectal metastásico cuya enfermedad ha recurrido o progresado siguiendo la terapia basada en 5-FU.

- 65 El "porcentaje (%) de identidad de la secuencia aminoácida" con respecto a las secuencias del polipéptido Apo-2L identificadas aquí se define como el porcentaje de residuos aminoácidos en una secuencia candidata que sean idénticos a los residuos aminoácidos de una secuencia Apo-2L, tras el alineamiento de las secuencias y la introduc-

ción de huecos, si es necesario, para alcanzar el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y no considerando como parte de la identidad de secuencia ninguna sustitución conservadora. Se pueden realizar alineamientos con el propósito de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia aminoacídica mediante distintos procedimientos conocidos en el área, por ejemplo, usando aplicaciones informáticas públicas tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para determinar alineamientos, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo alineamiento sobre la totalidad de las secuencias que se van a comparar. Opcionalmente, los valores del % de identidad en la secuencia aminoacídica se obtienen usando el programa de comparación de secuencias ALIGN. El programa de comparación de secuencia ALIGN-2 fue desarrollado por Genentech, Inc. y el código fuente se ha archivado junto con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor U.S. Washington, D.C., 20559, en donde está registrado bajo el número de registro de derechos de autor n° TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente a través de Genentech, Inc. South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 debe compilarse para usarse en un sistema operativo UNIX, preferiblemente una versión V4.0DUNIX. Todos los parámetros de comparación de secuencias están fijados por el programa ALIGN-2 y no varían. Sin embargo, el porcentaje de identidad de secuencia puede determinarse también usando el programa de comparación de secuencia NCBI-BLAST2 (Altschul y col., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 puede descargarse desde <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. El NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, parámetros que se fijan todos ellos como valores por defecto incluyendo, por ejemplo, desenmascarar=sí, cadena=todas, resultados esperados=10, mínima longitud de baja complejidad=15/5, valor-e de pase múltiple= 01, constante de pase múltiple =25, descenso para alineamiento con huecos final =25 y puntuación de matriz=BLOSUM62.

El término “anticuerpo” cuando se usa en referencia a un “anticuerpo con actividad agonista sobre el receptor del ligando de Apo-2” se utiliza en el sentido más amplio y específicamente abarca anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos suficientemente largos como para mimetizar la actividad apoptótica del ligando de Apo-2.

“El receptor del ligando de Apo-2” incluye los receptores conocidos en el área como “DR4” y “DR5”. Pan y col., describieron el miembro de la familia del receptor del TNF denominado “DR4” [Pan y col., Science, 276:111-113 (1997); véase también la patente internacional WO98/32856 publicada el 30 de Julio de 1998]. El receptor DR4 contiene un dominio citoplasmático de muerte capaz de poner en marcha el aparato de suicidio celular. Pan y col., demostraron que el DR4 se puede considerar un receptor para el ligando conocido como Apo2L/TRAIL. Sheridan y col., Science, 277:818-821 (1997) y Pan y col., Science, 277:815-818 (1997) describieron otro receptor para Apo2L/TRAIL [véase también, patente internacional WO98/51793 publicada el 19 de Noviembre de 1998; patente internacional WO98/41629 publicada el 24 de Septiembre de 1998]. Este receptor se conoce como DR5 (el receptor se ha denominado también alternativamente como Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAP08, TRICK2 o KILLER; Screaton y col., Curr. Biol., 7:693-696 (1997); Walczak y col., EMBO J., 16:5386-5387; Wu y col., Nature Genetics, 17:141-143 (1997); patente internacional WO98/3598 publicada el 20 de Agosto de 1998; patente europea EP870.827 publicada el 14 de Octubre de 1998; patente internacional WO98/46643 publicada el 22 de Octubre de 1998; patente internacional WO99/02653 publicada el 21 de Enero de 1999; patente internacional WO99/09165 publicada el 25 de Febrero de 1999; patente internacional WO99/1179 publicada el 11 de Marzo de 1999]. Al igual que DR4, se ha descrito que DR5 contiene un dominio citoplasmático de muerte y es capaz de señalizar para apoptosis. Como se describió anteriormente, otros receptores para Apo-2L incluyen DcR1, DcR2, y OPG [véase, Sheridan col., *supra*; Marsters y col., *supra* y Simonet y col., *supra*]. El término “receptor de Apo-2L” cuando se usa aquí engloba secuencias del receptor nativo y variantes del receptor. Estos términos incluyen el receptor de Apo-2L expresado en una variedad de mamíferos, incluyendo los humanos. El receptor de Apo-2L puede expresarse endógenamente, tal como ocurre de manera natural en una variedad de linajes de tejidos humanos, o puede expresarse mediante procedimientos sintéticos o recombinantes. Una “secuencia nativa del receptor de Apo-2L” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia aminoacídica que un receptor de Apo-2L derivado de la naturaleza. Por tanto, una secuencia nativa del receptor de Apo-2L puede tener la secuencia aminoacídica de un receptor de Apo-2L natural de cualquier mamífero. Dicha secuencia nativa del receptor de Apo-2L puede aislarse de la naturaleza o puede producirse mediante procedimientos recombinantes o sintéticos. El término “secuencia nativa del receptor de Apo-2L incluye específicamente formas naturales truncadas o secretadas del receptor (por ejemplo, una forma soluble que contenga, por ejemplo, una secuencia de un dominio extracelular), variantes que se presentan de forma natural (por ejemplo, formas de ajuste alternativo) y variantes alélicas que se presentan de forma natural. Las variantes del receptor pueden incluir fragmentos o mutantes por delección de la secuencia nativa del receptor de Apo-2L.

El término “anticuerpo monoclonal” tal y como se usa aquí se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos substancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que forman parte de la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones que se produzcan de forma natural y que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, al contrario de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra distintos determinantes (epitopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. Junto a su especificidad, los anticuerpos monoclonales presentan la ventaja de que son sintetizados por un cultivo de hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El término “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población de anticuerpos substancialmente homogénea, y no se interpreta como la producción requerida del anticuerpo mediante ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden prepararse

mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975), o pueden elaborarse mediante procedimientos del DNA recombinante (véase, por ejemplo, patente americana US nº 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” pueden también aislarse de librerías de anticuerpos en fagos, usando las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991).

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) en las cuales una fracción de las cadenas pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras el resto de la cadena/s es idéntica u homóloga con secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, en tanto presenten la actividad biológica deseada (Patente americana US nº 4.816.567; Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)).

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ u otras subsecuencias de los anticuerpos de unión al antígeno) que contengan secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulinas no humanas. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en el que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tengan la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de entramado (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden incluir residuos que no se encuentren en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o de entramado importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar en mayor medida y maximizar la preparación del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá substancialmente todos o al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o substancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o substancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Óptimamente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una fracción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann y col., *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo PRIMATIZEDTM en donde la región de unión al antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido inmunizando macacos con el antígeno de interés.

Los anticuerpos son típicamente proteínas o polipéptidos que muestran especificidad de unión por un antígeno específico. Los anticuerpos nativos habitualmente son glicoproteínas heterotetraméricas, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y 2 cadenas pesadas (H) idénticas. Típicamente, cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace covalente disulfuro, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de distintos isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también presenta puentes disulfuro intracatenarios espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera presenta un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que algunos residuos aminoacídicos en particular forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y pesada. [Chothia y col., *J. Mol. Biol.* 186:651-663 (1985); Novotny y Haber, *Proc. Natl., Acad. Sci. USA*, 82:4592-4596 (1985)]. Las cadenas ligeras de los anticuerpos de cualquier especie vertebrada pueden ser asignados a dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basándose en las secuencias aminoacídicas de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia aminoacídica del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden clasificarse en distintas clases. Hay cinco grandes clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de ellas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG4; IgA-1 e IgA-2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Se entiende por “fragmentos de anticuerpos” una fracción de un anticuerpo intacto, generalmente la de unión al antígeno o una región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos biespecíficos, moléculas de anticuerpos de cadena sencilla, y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticuerpos.

El término “variable” se usa aquí para describir ciertas fracciones de los dominios variables que difieren en su secuencia entre anticuerpos y que se usan en la unión y en la especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad habitualmente no está distribuida uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Típicamente, se concentran en 3 segmentos llamados regiones de determinación de la complementariedad (CDRs) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las fracciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan entramado (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada una de ellas cuatro regiones FR, que adoptan una configuración de lámina beta, conectada mediante tres CDRs los cuales forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de la estructura de lámina beta. Los CDRs de cada cadena se mantienen juntos en alta proximidad por las regiones FR y, con el CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos [véase Kabat, E.A. y col., *Sequences of Proteins of immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987)]. Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión

del anticuerpo al antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, híbridos y recombinantes producidos por ajuste de un dominio variable (incluyendo hipervariable) de un anticuerpo contra el receptor Apo-2L con un dominio constante (por ejemplo, anticuerpos “humanizados”), o una cadena ligera con una cadena pesada, o una cadena de una especie con una cadena de otra especie, o fusiones con proteínas heterólogas, a pesar de las especies de origen o designación de clases o subclases de inmunoglobulinas, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv), mientras muestren la actividad biológica o las propiedades deseadas. Véase, por ejemplo, patente americana n° 4.816.567 y Mage y col., en *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.79-97 (Marcel Dekker, Inc: New Cork, 1987).

Un “anticuerpo humano” es aquel que posee una secuencia aminoacídica que corresponde a aquella de un anticuerpo producido por un humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para generar anticuerpos humanos como se describen aquí. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden prepararse usando diversas técnicas conocidas en el área. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona a partir de una librería de fagos, en la que se expresan anticuerpos humanos (Vaughan y col. *Nature Biotechnology*, 14:309-314 (1996); Sheets y col. *PNAS*, (USA) 95:6157-6162 (1998)); Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222:581 (1991)). Los anticuerpos humanos también pueden prepararse introduciendo un locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes para las inmunoglobulinas endógenas se han inactivado parcial o totalmente. Tras el cambio, se observa la producción de anticuerpos humanos que se asemejan estrechamente a lo observado en humanos en todos los aspectos, incluyendo la reordenación génica, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Esta aproximación se describe, por ejemplo, en las patentes americanas n° 5.545,807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016 y en las siguientes publicaciones científicas Marks y col., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992); Lonberg y col., *Nature*, 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368:812-13 (1994); Fishwild y col., *Nature Biotechnology*, 14: 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13:65-93 (1995). Alternativamente, el anticuerpo humano puede prepararse vía la inmortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (dichos linfocitos B pueden obtenerse a partir de un individuo o pueden haber sido inmunizados *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole y col., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner y col., *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991); y la patente americana n° 5.750.373.

El término región “Fc” se usa para definir la región C terminal de una cadena pesada de una inmunoglobulina que puede generarse por digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una secuencia nativa de una región Fc o una variante de una región Fc. Aunque los límites de una región Fc de una cadena pesada de una inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de una cadena pesada de una IgG humana se define que habitualmente va de un residuo aminoacídico de alrededor de la posición Cys226, o de alrededor de la posición Pro230 al extremo carboxi-terminal de la región Fc (usando aquí el sistema de numeración según Kabat y col., *supra*). La región Fc de una inmunoglobulina generalmente comprende dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y opcionalmente comprende un dominio CH4.

Por “cadena de una región Fc” se entiende aquí una de las dos cadenas polipeptídicas de una región Fc.

El “dominio CH2” de una región Fc de una IgG humana (también denominado como dominio “Cγ2”) habitualmente se extiende desde un residuo aminoacídico situado alrededor de la posición 231 a un residuo aminoacídico de alrededor de la posición 340. El dominio CH2 es único en el sentido que no se empareja estrechamente con ningún otro dominio. Más bien, 2 cadenas de carbohidrato N-unidas se interponen entre los dos dominios CH2 de una molécula IgG nativa intacta. Se ha especulado que el carbohidrato puede proporcionar un sustituto para el emparejamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985). El dominio CH2 aquí puede ser una secuencia nativa del dominio CH2 o una variante del dominio CH2.

El “dominio CH3” comprende el tramo de residuos de C-terminal a un dominio CH2 en una región Fc (es decir de un residuo aminoacídico de alrededor de la posición 341 a un residuo aminoacídico de alrededor de la posición 447 de una IgG). La región CH3 aquí puede ser un dominio CH3 de la secuencia nativa o una variante del dominio CH3 (por ejemplo, un dominio CH3 con una “protuberancia” introducida en una cadena y la “cavidad” correspondiente introducida en la otra cadena; véase patente americana n° 5.821.333).

Se define como “región bisagra” el tramo que comprende las posiciones de alrededor de Glu216, o alrededor de Cys226 a alrededor de Pro230 de una IgG1 (Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985)). Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de la IgG1 colocando el primer y el último residuo de cisteína formando enlaces S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones. La región bisagra aquí puede ser una región bisagra de la secuencia nativa o una variante de la región bisagra. Las dos cadenas polipeptídicas de una variante de la región bisagra retienen generalmente al menos un residuo de cisteína por cadena polipeptídica, por lo que las dos cadenas polipeptídicas de una variante de la región bisagra pueden formar un enlace disulfuro entre las dos cadenas. La región bisagra preferida aquí es una región bisagra de la secuencia nativa humana, por ejemplo, una región bisagra de una secuencia nativa de una IgG1 humana.

Una “región Fc funcional” posee al menos una “función efectora” de una región Fc de secuencia nativa. A modo de ejemplo, entre las “funciones efectoras” se incluye la unión C1q; la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); la unión al receptor de Fc; la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); la fagocitosis; la disminución de los receptores de superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B; BCR), etc. Dichas funciones efectoras generalmente requieren la región Fc para combinarse con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de un anticuerpo) y pueden ser analizadas mediante diversos ensayos conocidos en el área para evaluar tales funciones efectoras de un anticuerpo.

Una “región Fc de secuencia nativa” comprende una secuencia aminoacídica idéntica a la secuencia aminoacídica de una región Fc que se encuentra en la naturaleza. Una “variante de una región Fc” comprende una secuencia aminoacídica que difiere de la región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación en un aminoácido. Preferentemente, la variante de la región Fc tiene al menos la sustitución de un aminoácido comparado con la región Fc de secuencia nativa de o de la región Fc de un polipéptido emparentado, por ejemplo, de alrededor de uno a alrededor de diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de alrededor de una a alrededor de cinco sustituciones aminoacídicas en una secuencia nativa de una región Fc o en la región Fc de un polipéptido emparentado. La variante de la región Fc aquí preferentemente poseerá al menos alrededor de un 80% de identidad en la secuencia con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido emparentado, y más preferentemente al menos alrededor de un 90% de identidad con ella, más preferentemente al menos alrededor de un 95% de identidad de la secuencia con la misma.

Los términos “receptor de Fc” y “FcR” se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es una secuencia nativa de un FcR humano. Además, un FcR preferido es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activador”) y FcγRIIB (un receptor inhibidor), los cuales tienen secuencias aminoacídicas similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina de un inmunoreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático (revisado en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). Los FcRs 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 FcRs, incluyendo aquellos que se identifiquen en el futuro, se engloban aquí en el término “FcR”. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, el cual es responsable de la transferencia de IgGs maternas al feto (Guyer y col., *J. Immunol.*, 117:587 (1976); y Kim y col., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

Un anticuerpo “de afinidad madurada” es aquel con una o más alteraciones en uno o más de sus CDRs lo que conlleva una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, comparado con el anticuerpo parental el cual no posee dichas alteraciones. Los anticuerpos de afinidad madurada preferidos tendrán una afinidad en el rango nanomolar o incluso picomolar por el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madurada se generan mediante procedimientos conocidos en el área. Marks y col., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992) describe la maduración de afinidad para los dominios de barajamiento VH y VL. La mutagénesis al azar de CDR y/o de residuos de entramado se describe por: Barbas col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier y col., *Gene*, 169:147-155 (1995); Yelton y col., *J. Immunol.*, 155:1994-2004 (1995); Jackson y col., *J. Immunol.*, 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins y col., *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992).

Los términos “agonista” y “agonístico” cuando se usan aquí se refieren o describen una molécula que es capaz de, directa o indirectamente, inducir, promover o aumentar sustancialmente la actividad biológica o la activación de un receptor para el ligando de Apo-2. Opcionalmente, un “anticuerpo agonista del receptor de Apo-2L” es un anticuerpo que presenta una actividad que mimetiza o es comparable a la del ligando de Apo-2. Preferentemente, el agonista es una molécula que es capaz de inducir apoptosis en células de mamífero. Incluso más preferentemente, el agonista es un anticuerpo dirigido a un receptor Apo-2L y dicho anticuerpo presenta una actividad apoptótica igual o mayor que la del polipéptido Apo-2L descrito en el Ejemplo 1. Opcionalmente, la actividad agonista de dicha molécula puede determinarse ensayando la molécula sola o en una forma entrecruzada usando una inmunoglobulina Fc o complemento (descrito más adelante), en un ensayo descrito en el Ejemplo 2 para analizar la apoptosis de células 9D u otras células que expresan un receptor de Apo-2L tal como DR4 o DR5.

“Aislado” cuando se usa para describir diversas proteínas descritas aquí, se refiere a una proteína que ha sido identificada y separada y/o aislada de un componente de su entorno natural. Son componentes contaminantes de su entorno natural materiales que típicamente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos de la proteína, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos de naturaleza proteica y no proteica. En una realización preferente, la proteína será purificada (1) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia aminoacídica N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (2) hasta homogeneidad mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) bajo condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. Las proteínas aisladas incluyen proteínas *in situ* dentro de células recombinantes puesto que al menos un componente del entorno natural de la proteína no estará presente. Habitualmente, sin embargo, la proteína aislada se preparará mediante al menos un paso de purificación.

“Biológicamente activo” o “actividad biológica” para los propósitos de la presente invención significa (a) tener la capacidad de inducir o estimular apoptosis en al menos un tipo de células de cancerosas de mamífero o de células

infectadas por virus *in vivo* o *ex vivo*; (b) ser capaz de dar lugar a un anticuerpo, es decir, inmunogénico; o (c) retener la actividad de un polipéptido del ligando de Apo-2 natural.

Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se usa aquí se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula *in vitro* y/o *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser aquel que reduzca significativamente el porcentaje de células en fase S. Entre los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento se incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en una fase distinta de la S), tales como agentes que inducen arresto en fase G1 y fase M. Entre los bloqueantes clásicos de la fase M se incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), TAXOL® e inhibidores de la topo II tales como la doxorubicina, la epirubicina, la daunorubicina, el etopósido, la bleomicina. Aquellos agentes que producen el paro en fase G1 también propagan el efecto a la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes del DNA como el tamoxifeno, la prednisona, la dacarbacina, la mecloretamina el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo y el ara-C. Se puede encontrar información adicional en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” por Murakami y col. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente la página 13.

El término “profármaco”, tal como se usa en esta solicitud, hace referencia a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacológicamente activa que es menos citotóxica para las células cancerosas comparado con el fármaco parental y es capaz de ser activado enzimáticamente o convertido en el parental más activo. Véase, por ejemplo, Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy” *Biochemical. Society Transactions*, 14, pp 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella, y col, “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery”, *Directed Drug Delivery*, Borchartd y col., (ed.), pp 247-267, Humana Press (1985). El profármaco de esta invención incluye, pero no se limita a, profármacos que contienen fosfato, tiofosfato, sulfato, péptidos, profármacos modificados por D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen beta-lactama, opcionalmente, profármacos que contienen sustituciones de fenoxiacetamida u opcionalmente profármacos que contienen sustituciones de fenilacetamida, profármacos 5-fluorocitosina y otros profármacos fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco citotóxico libre más activo. Entre los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivarse en una forma profármaco para ser usada en esta invención, se incluyen, pero no se limitan a, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos más adelante.

El término “agente citotóxico” se usa aquí para referirse a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa la destrucción de las mismas. El término se entiende que incluye isótopos radioactivos (por ejemplo, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como pequeñas moléculas de toxinas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil para el tratamiento de condiciones como el cáncer. Entre los ejemplos de tales agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes tales como el tiotepa, y la ciclofosfamida (CYTOXAN™); alquil sulfonatos tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carbocadona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamida, trietilenetiofosforamida y trimetilolomelamina, acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan); briostatina; callistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adocolesina, carcelesina y bicelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1y 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancrastistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafacina, clofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de hidrócloruro de mecloretamina; melfalan, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas como la carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos como la enediyne (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina γ_1 y caliqueamicina θ_1 , véase, por ejemplo, *Agnew Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33:183-186 (1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromoproteínas relacionadas como cromóforos de enediyne), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirolino-doxorubicina y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicina, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, es-treptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos como el metotrexato y el 5-fluorouracilo (5FU); análogos del ácido fólico como la denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenales como aminoglute-timida, mitotano, trilostano; suministradores de ácido fólico como el ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofos-famida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatrexato; defofamina; demecolcina; diazicu-na; elfornitina; acetato de elliptinino; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentosta-tina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbicina; PSK®; razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triacicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbacina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pi-pobromano; gacitosina; arabinósido (“Ara-C”); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxol (TAXOL®, Bristol Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxol (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Anthony, Fran-ce); clorambucilo, gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino como cisplatino y

carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; el inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinóico; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción de hormonas sobre tumores tales como antiestrógenos incluyendo por ejemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de la aromatasa; 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolide, y goserelina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

El término “citoquina” es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Entre los ejemplos de tales citoquinas se encuentran las linfoquinas, las monoquinas, y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas de crecimiento tales como la hormona de crecimiento humana la N-metionil hormona del crecimiento humana, y la hormona del crecimiento bovina; la hormona paratiroidea; la tiroxina; la insulina; la proinsulina; la relaxina; la prorelaxina; hormonas glicoproteicas como la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona estimulante tiroidea (TSH) y la hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento de fibroblastos; la prolactina; el lactógeno de placenta; el factor de necrosis tumoral-alfa y -beta; la sustancia inhibidora de Mullerian; el péptido asociado a gonadotropina de ratón; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento del endotelio vascular; la integrina; la trombopoyetina (TPO); los factores de crecimiento nervioso como NGF-alfa; el factor de crecimiento de plaquetas, los factores de crecimiento transformante (TGFs) tales como el TGF-alfa y el TGF-beta; el factor 1 y 2 de crecimiento tipo insulina; eritropoyetina (EPO); los factores osteoinductores; interferones como el interferón-alfa, -beta y -gamma, los factores de crecimiento de colonias (CSFs) como el CSF de macrófagos (M-CSF); el CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y el CSF de granulocitos (G-CSF); las interleuquinas (ILs) como la IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; factor de necrosis tumoral como el TNF-alfa o el TNF-beta; y otros factores polipeptídicos incluyendo el LIF y el ligando kit (KL). Tal y como se usa aquí, el término citoquina incluye proteínas de origen natural o procedentes de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de citoquinas de secuencia nativa.

El término “tratamiento” o “terapia” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas.

El término “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de un fármaco efectiva para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco debe reducir el número de células cancerosas, reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en parte y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en parte y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en parte, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en parte un o más de un síntoma asociado a la enfermedad. Hasta cierto punto el fármaco debe prevenir el crecimiento y/o causar la muerte de las células cancerosas existentes, debe ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia *in vivo* puede medirse, por ejemplo, analizando la carga o el volumen del tumor, el tiempo de progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinar las tasas de respuesta (RR).

El término “mamífero” para el propósito del tratamiento o terapia hace referencia a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo el hombre, los animales domésticos y de granja, y los animales del zoológico, los deportivos o las mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferentemente el mamífero es el hombre.

Los términos “cáncer”, “canceroso”, o “maligno” se refiere a o describe la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen, el cáncer de colon, el cáncer colorrectal, el cáncer rectal, el cáncer de células escamosas, el cáncer pulmonar de células pequeñas, el cáncer pulmonar de células no pequeñas, el linfoma de Hodgkin’s y no Hodgkin’s, el cáncer testicular, el cáncer esofágico gastrointestinal renal, el cáncer pancreático, el glioblastoma, el cáncer cervical, el cáncer ovárico, glioma, el cáncer de hígado, el cáncer de vesícula, el hepatoma, el cáncer de mama, el carcinoma endometrial, el carcinoma de glándulas salivares, el cáncer de riñón, el cáncer de hígado, el cáncer de próstata, el cáncer vulval, el cáncer tiroideo, el carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cuello y cabeza.

II. Materiales y métodos

Generalmente, los procedimientos de la invención para inducir apoptosis en células de mamífero engloban la exposición de las células a una cantidad efectiva de ligando de Apo-2 y de CPT-11 o una cantidad efectiva de anticuerpo agonista del receptor de Apo-2L y CPT-11. Preferentemente, la cantidad de Apo-2L (o del anticuerpo agonista) y de CPT-11 empleada serán aquellas efectivas para inducir apoptosis de manera sinérgica. Esto puede conseguirse *in vivo* o *ex vivo* según, por ejemplo, los procedimientos descritos más adelante y en los Ejemplos. Entre las condiciones o desórdenes a ser tratadas con el ligando de Apo-2 o el anticuerpo agonista y CPT-11 se incluyen a modo de ejemplo cánceres benignos o malignos.

A. Materiales

El Apo-2L que puede emplearse en los procedimientos incluye los polipéptidos Apo-2L descritos en Pitti y col., *supra*, patente internacional WO 97/25428, *supra*, y WO97/01633, *supra* (los polipéptidos denominados como TRAIL). Se contempla el uso de diversas formas de Apo-2L, tales como el polipéptido completo así como formas solubles de Apo-2L las cuales comprenden una secuencia de un dominio extracelular (ECD). Ejemplos de tales secuencias ECD solubles incluyen polipéptidos que comprenden los aminoácidos 114-281, 95-281, 91-281, o 92-281 de la secuencia de Apo-2L mostrada en la Figura 1A de Pitti y col., J. Biol. Chem., 271:12687-12690 (1996). Se considera actualmente que el polipéptido que comprende los aminoácidos 92-281 es una forma truncada natural del Apo-2L. Los solicitantes han expresado el Apo-2L humano en células CHO y han observado que el polipéptido que va de las posiciones 92-281 es la forma expresada de Apo-2L. Se incluyen formas modificadas de Apo-2L, tales como las formas modificadas covalentemente descritas en la patente internacional WO 97/25428. En particular, se incluye para su uso en los procedimientos presentes el Apo-2L unido a un polímero no proteico tal como el polietilén glicol. El polipéptido Apo-2L puede prepararse según cualquiera de los procedimientos descritos en la patente internacional WO 97/25428.

Las variantes del ligando de Apo-2 que presentan actividad apoptótica y que pueden utilizarse en los procedimientos incluyen, por ejemplo, aquellos identificados mediante técnicas de “cribado de alanina”. Variantes particulares por sustitución incluyen los aminoácidos 91-281 de la Figura 1A de Pitti y col., J. Biol. Chem., 271:12687-12690 (1996) en las que al menos uno de los aminoácidos en posición 203, 218, o 269 es sustituido por un residuo de alanina. Opcionalmente, las variantes del ligando de Apo-2 pueden incluir una o más de estas 3 sustituciones distintas.

Se contempla que una molécula que mimetiza la actividad apoptótica de Apo-2L pueda emplearse alternativamente en los procedimientos que se describen en este momento. Los ejemplos de tales moléculas incluyen anticuerpos agonistas que pueden inducir apoptosis al menos de manera comparable o similar a Apo-2L. En particular, estos anticuerpos agonistas comprenderían anticuerpos para uno o más de los receptores para Apo-2L. Preferentemente, el anticuerpo agonista se dirige contra un receptor Apo-2L que presenta un dominio de muerte citoplásmico tal como DR4 o DR5. Incluso más preferentemente, el anticuerpo agonista se une a dicho receptor y la unión puede determinarse, por ejemplo, mediante separación de células activadas por fluorescencia (FACS) o ensayo enzimático de inmunoabsorción (ELISA) tal y como se describe en el Ejemplo 2. Los anticuerpos agonistas dirigidos al receptor denominado DR5 o (Apo-2) se han preparado usando técnicas de fusión tales como las descritas más adelante. Uno de los anticuerpos agonistas de DR5 o receptor Apo-2 se denomina como 3FII.39.7 y ha sido depositado en el ATCC con el n° HB-12456 el 13 de Enero de 1998. Otros anticuerpos del receptor DR5 incluyen el 3H3.14.5, depositado en el ATCC tal y como se muestra aquí. La actividad agonista de los anticuerpos del receptor Apo-2L puede determinarse usando diversos procedimientos para analizar la actividad apoptótica, y opcionalmente, la actividad apoptótica de dicho anticuerpo puede determinarse analizando el anticuerpo, solo o en una forma inmovilizada usando una inmunoglobulina Fc o complemento (descrita más adelante), en el ensayo descrito en el Ejemplo 2 para analizar la apoptosis de células 9D u otras células que expresen un receptor Apo-2L tal como DR4 o DR5.

Adicionalmente, se han preparado anticuerpos agonistas dirigidos contra otro receptor de Apo-2L denominado DR4. Uno de los anticuerpos agonistas para el DR4 se denomina 4H6.17.8 y se ha depositado en el ATCC con el n° HB-12455 el 13 de Enero de 1998. Otros anticuerpos agonistas para el DR4 incluyen los anticuerpos 4E7.24.3, 1H5.25.9, 4G7.18.8, y 5G11.17.1 los cuales han sido depositados en la ATCC, tal y como se muestra más adelante. La actividad agonista de los anticuerpos para el receptor de Apo-2L puede determinarse usando diversos procedimientos para analizar la actividad apoptótica, y opcionalmente, la actividad apoptótica de dicho anticuerpo puede determinarse analizando el anticuerpo, solo o en una forma inmovilizada usando una inmunoglobulina Fc o complemento (descrita más adelante), en el ensayo descrito en el Ejemplo 2 para analizar la apoptosis de células 9D u otras células que expresen un receptor de Apo-2L tal como DR4 o DR5.

Los anticuerpos agonistas contemplados en la invención incluyen anticuerpos que se unen a un solo receptor de Apo-2L o a más de uno. Un anticuerpo que se une a más de un receptor de Apo-2L puede caracterizarse como un anticuerpo que presenta reacción cruzada con dos o más antígenos diferentes y es capaz de unirse a cada uno de los distintos antígenos, por ejemplo, como se determina por ensayo enzimático de inmunoabsorción (ELISA) o por separación de células activadas por fluorescencia (FACS) como en los ejemplos descritos más adelante. Opcionalmente, un anticuerpo que presenta reacciones cruzadas específicamente con dos o más antígenos diferentes es aquel que se une a un primer antígeno y además se une a un segundo antígeno distinto, en donde la capacidad de unión del anticuerpo por el segundo antígeno a la concentración de anticuerpo de alrededor de 10 µg/mL es de alrededor de un 50% a un 100% (preferentemente de alrededor de un 75% a aproximadamente un 100%) de la capacidad de unión del primer antígeno determinada en un ensayo enzimático de inmunoabsorción (ELISA) de captura (como en los ejemplos que se muestran más adelante). Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse específicamente a DR5 (el “primer antígeno”) y reaccionar de forma cruzada específicamente con otro receptor Apo-2L como DR4 (el “segundo antígeno”), en donde el grado de unión de alrededor de 10 µg/mL del anticuerpo a DR4 es aproximadamente de un 50% a alrededor del 100% de la capacidad de unión del anticuerpo por DR5 en el ensayo enzimático de inmunoabsorción (ELISA) de captura. Se describen con mayor detalle diversos anticuerpos con reacción cruzada para receptores Apo-2L en la solicitud de Patente Internacional n° PCT/US99/13197.

Como se describe más adelante, ejemplos de dichas formas de anticuerpos incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos de la invención pueden incluir anticuerpos policlonales. Los procedimientos para la preparación de anticuerpos policlonales son conocidos por los expertos en el área. Los anticuerpos policlonales pueden generarse en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea un adyuvante. Típicamente, el agente inmunizante y/o el adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir un polipéptido DR4 o DR5 (o un ECD de DR4 o DR5) o una proteína de fusión. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante a una proteína que se sabe inmunogénica en el mamífero que va a ser inmunizado. Ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen pero no están limitados a la hemocianina de lapa, albúmina sérica, tiroglobulina bovina, y el inhibidor de tripsina de soja. Ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen el adyuvante completo de Freund, y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato sintético de trehalosa). El protocolo de inmunización puede seleccionarse por cualquier especialista en el área sin excesiva experimentación. El mamífero puede entonces ser sangrado, y el suero ensayado para titular el anticuerpo. Si se desea el mamífero puede ser reinyectado hasta que el título del anticuerpo aumente o alcance la meseta en la curva de titulación.

2. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos de la invención pueden, alternativamente, ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando procedimientos de hibridoma, tales como aquellos descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). En un procedimiento del hibridoma, se inmuniza un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado, con un agente inmunizante para dar lugar a linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que específicamente se unirán al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*.

El agente inmunizante típicamente incluirá un polipéptido DR4 o DR5 o una proteína de fusión de los mismos, tales como una proteína de fusión de DR4 o DR5 ECD-IgG.

Generalmente, se usan tanto linfocitos de sangre periférica ("PBLs") si se desean células de origen humano o células de bazo o de nodo linfático si se desean fuentes de mamífero no humanos. Los linfocitos se fusionan entonces con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, como polietilén glicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103]. Las líneas inmortalizadas son habitualmente células transformadas de mamífero, particularmente, células de mieloma de origen murino, bovino o humano. Habitualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen del enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo de los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que previenen el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

Las líneas inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, aseguran un nivel de expresión del anticuerpo alto y estable por parte de las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y de American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Un ejemplo de tales líneas celulares de mieloma murino es la P3X63AgU.1 descrita más adelante en el Ejemplo 2. Las líneas celulares de mieloma humano y las de heteromieloma de ratón y hombre también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63].

El medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan puede a continuación analizarse por la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor de Apo-2L. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por la inmunoprecipitación o mediante el ensayo de unión *in vitro*, como el radioinmunoensayo (ELISA). Dichas técnicas y ensayos son conocidos en la materia. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse por el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de que las células de hibridoma deseadas se identifiquen, es posible subclonar los clones mediante dilución limitante y crecerlos mediante procedimientos estándares [Goding, *supra*]. Los medios de cultivo adecuados para dicho propósito incluyen, por ejemplo, el Medio de Eagle Modificado por Dulbecco o el RPMI 1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden crecerse *in vivo* en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo o de fluido de ascitas mediante procedimientos de purificación con inmunoglobulinas convencionales como por ejemplo la Sepharose-proteína A, la cromatografía de hidroxilapatita, la electroforesis en gel, la diálisis o la cromatografía por afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también pueden generarse mediante procedimientos del DNA recombinante, como los descritos en la patente americana U.S. 4.816.567. El DNA que codifica los anticuerpos monoclonales de la in-

vención puede aislarse fácilmente y secuenciarse por procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos murinos). Las células de hibridomas de la invención sirven como una fuente preferida de dicho DNA. Una vez aislado, el DNA puede colocarse en vectores de expresión adecuados, que se transfectan a continuación en células huésped como las células de simio COS, las células de ovario de hámster chino (CHO), o las células de mieloma que de lo contrario no producirían proteína inmunoglobulínica, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El DNA también puede modificarse, por ejemplo, mediante sustitución de la secuencia codificante de los dominios constantes de cadena ligera y pesada humanas por las secuencias murinas homólogas [patente americana U.S. 4.816.567; Morrison y col., *supra*] o mediante unión covalente con la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulínico. Dicho polipéptido no inmunoglobulínico puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación antigénica de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico. Opcionalmente, los anticuerpos quiméricos pueden construirse de forma que incluyan al menos un dominio variable o hipervariable de un anticuerpo anti-receptor de Apo-2L seleccionado de entre los anticuerpos 4H6.17.8, 3F11.39.7, 4E7.24.3, 1H5.25.9, 4G7.18.8, 5G11.17.1 y 3H3.14.5 aquí descritos.

Opcionalmente, los anticuerpos agonistas de la presente invención se unirán al mismo epitopo(s) de cualquiera de los anticuerpos 4H6.17.8, 3F11.39.7, 4E7.24.3, 1H5.25.9, 4G7.18.8, 5G11.17.1 y 3H3.14.5 aquí descritos. Ello puede determinarse mediante la realización de diversos ensayos, como los descritos aquí. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo monoclonal tiene la misma especificidad que los anticuerpos DR4 o DR5 referidos aquí, es posible comparar su actividad en los ensayos de bloqueo o en los ensayos de inducción apoptótica.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen “anticuerpos de unión cruzada”. El término “unido de forma cruzada” tal como se utiliza aquí hace referencia a la unión de al menos dos moléculas de IgG para formar una molécula (o molécula sencilla). Los anticuerpos contra el receptor de Apo-2L pueden estar unidos mediante diversas moléculas engarce, opcionalmente los anticuerpos DR4 están unidos por una molécula anti-IgG, un complemento, una modificación química o mediante ingeniería molecular. Será evidente por los expertos en la materia que el complemento tiene relativamente una elevada afinidad para las moléculas de anticuerpo una vez que los anticuerpos se han unido a la membrana de la superficie celular. Según ello, se cree que el complemento puede utilizarse como una molécula para unir dos o más anticuerpos unidos a una membrana de superficie celular. Entre los diversos isotipos Ig murinos, Ig; el IgG2a y el IgG2b fijan el complemento.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender opcionalmente anticuerpos dímicos, así como formas multivalentes de anticuerpos. Los expertos en la materia pueden construir dichos dímeros o formas multivalentes mediante técnicas conocidas en la materia utilizando los anticuerpos anti-receptor de Apo-2L descritos aquí.

Los anticuerpos de la invención pueden también comprender anticuerpos monovalentes. Los procedimientos para la preparación de anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, un procedimiento que implica la expresión recombinante de la cadena ligera de inmunoglobulina y la cadena pesada recombinante. La cadena pesada se trunca generalmente por cualquier punto de la región Fc para prevenir la unión de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes se sustituyen por otros residuos aminoacídicos o se delecionan para evitar la unión.

Los procedimientos *in vitro* también son adecuados para la preparación de anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de lo mismo, en particular, fragmentos Fab, puede lograrse utilizando técnicas rutinarias conocidas en la materia. Por ejemplo, la digestión puede realizarse utilizando papaína. Ejemplos de digestión con papaína se describen en la patente internacional WO 94/29348, publicada el 12/22/94 y la patente americana U.S. 4.342.566. La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión antigénica idénticos, denominados Fab, cada uno con un sitio antigénico de unión, y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación antigénica y es todavía capaz de unirse al antígeno.

Los fragmentos Fab producidos en la digestión del anticuerpo también contienen los dominios constantes de cadena ligera y el primer dominio constante de cadena pesada (CH1). Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi-terminal del dominio CH1 de cadena pesada o en una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación aquí para Fab' en la que los residuos de cisteína de los dominios constantes tienen un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ se producen originalmente como pares de fragmentos Fab' con las cisteínas de la región bisagra entre ellos. También se conocen otros tipos de acoplamiento químicos de los fragmentos de anticuerpo.

Los fragmentos Fv de cadena sencilla también se pueden producir, tal como se describe en Iliades y col., FEBS Letters, 409:437-441 (1997). El acoplamiento de dichos fragmentos de cadena sencilla con diversos engarces se describe en Kortt y col., Protein Engineering, 10:423-433 (1997).

Además de los anticuerpos descritos anteriormente, se contempla que los anticuerpos quiméricos o híbridos puedan prepararse *in vitro* mediante procedimientos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que implican agentes de unión. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden generarse mediante una reacción de intercambio de disulfuros o mediante la formación de un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen el iminotiolato y el metil-4-mercaptobutirimidato.

Los anticuerpos anti-receptor de Apo-2L de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de los anticuerpos no-humanos (por ejemplo, los murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas o fragmentos de inmunoglobulina (como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión al antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no-humana. Los anticuerpos humanizados incluyen las inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en el que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se reemplaza por residuos de una CDR de una especie no-humana (anticuerpo donante) como la de ratón, rata o conejo con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de entramado Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos correspondientes no-humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se hallen ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o de entramado importadas. Por lo general, el anticuerpo humanizado comprenderá esencialmente todas o al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o esencialmente todas las regiones CDR corresponden con las una inmunoglobulina humana y todas o esencialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones y col., *Nature*, 321:552-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

Los procedimientos para la humanización de anticuerpos no humanos son bien conocidos en la materia. Por lo general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente no humana. Estos residuos aminoácidos no humanos son referidos a menudo como residuos "de importación", los cuales son obtenidos de un dominio variable "de importación". La humanización puede realizarse esencialmente según el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven y col., *Science*, 239:1534-1536 (1988)], mediante sustitución de las secuencias CDR de roedor por las CDR correspondientes de un anticuerpo humano. Según ello, dichos anticuerpo "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente americana U.S. 4.816.567), en donde menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son anticuerpos humanos en los que residuos CDR y posiblemente algunos residuos FR se han sustituido por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor. Las fuentes de dichos residuos de importación o dominios variables de importación (o CDRs) incluyen los anticuerpos anti-receptor de Apo-2L depositados 4H6.17.8, 3F11.39.7, 4E7.24.3, 1H5.25.9, 4G7.18.8, 5G11.17.1 y 3H3.14.5 descritos aquí.

La elección de dominios variables humanos, tanto los ligeros como los pesados, para utilizar en la generación de anticuerpos humanizados es muy importante con el fin de reducir la antigenicidad. De acuerdo con el procedimiento del "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a una librería completa de secuencias de dominios variables humanos. A continuación se acepta la secuencia humana más próxima a la de roedor como la región de entramado humana (FR) para el anticuerpo humanizado [Sims y col., *J. Immunol.*, 151:2296-2308 (1993); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987)]. Otro procedimiento utiliza una región de entramado determinada derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región de entramado puede utilizarse para diversos anticuerpos humanizados distintos [Carter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285-4289 (1992); Presta y col., *J. Immunol.*, 151:2623-2632 (1993)].

Es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de una afinidad elevada para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Con el fin de alcanzar dicho objetivo, de acuerdo con un procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales mediante modelos tridimensionales y secuencias humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están generalmente disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Existen programas informáticos disponibles que ilustran y expresan las conformaciones estructurales en tres dimensiones de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas representaciones permite el análisis de la función probable en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los residuos FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de la secuencia consenso e importada para lograr la característica del anticuerpo deseado, como una afinidad aumentada por el antígeno(s) diana(s). Por lo general, los residuos CDR están implicados directa y más esencialmente en influenciar la unión del antígeno [véase, la patente internacional WO 94/04679, publicada el 3 de Marzo de 1994].

Los anticuerpos monoclonales pueden generarse mediante una adaptación del procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein mediante la utilización de linfocitos B humanos como la pareja de unión. Los linfocitos B humanos productores de un anticuerpo de interés pueden, por ejemplo, aislarse de un individuo humano, después de obtener el debido consentimiento informado. Por ejemplo, el individuo puede producir anticuerpos contra un autoantígeno tal como sucede en algunos trastornos como el lupus sistémico eritematoso (Shoenfeld y col., *J. Clin. Invest.*, 70:205 (1982)), la trombocitopenia púrpura inmune (ITP) (Nugent y col., *Blood*, 70(1):16-22 (1987)), o el cáncer. Alternativamente, o adicionalmente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Por ejemplo, es posible exponer linfocitos aislados de sangre periférica humanos *in vitro* a un agente lisomotrófico (por ejemplo, L-leucina-O-metil éster, ácido L-glutámico dimetil éster o L-leucil-L-leucina-O-metil éster) (patente americana US 5.567.610, Borrebaeck y col.,) y/o linfocitos de sangre periférica humana mermados en células T pueden tratarse *in vitro* con adyuvantes como el 8-mercaptoguanosina y las citoquinas (patente americana U.S. 5.229.275, Goroff y col.).

Los linfocitos B recuperados del individuo o del inmunizado *in vitro* se immortalizan con el fin de generar un anticuerpo humano monoclonal. Las técnicas para la immortalización de linfocitos B incluyen, aunque no por ello se limitan a éstas: (a) fusión de los linfocitos B humanos con células de mieloma humano, murino o células de heteromieloma murino-humano; (b) transformación viral (por ejemplo, con el virus de Epstein Barr; véase Nugent y col., *supra*, por ejemplo); (c) fusión con células de linfoma.

Los linfocitos pueden fusionarse con células de mieloma mediante la utilización de un agente de fusión, como el polietilén glicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). De esta manera, se preparan las células de hibridoma y se crecen en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT. Se han descrito líneas celulares adecuadas de mieloma humano y heteromieloma murino-humano (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se analiza para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o ensayo de unión *in vitro*, como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).

Después de haber identificado las células de hibridoma que producen anticuerpos con la afinidad, especificidad y/o actividad deseadas, se pueden subclonar los clones mediante procesos de dilución limitante y crecer mediante procedimientos estándares (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, el D-MEM o el RPMI 1640. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido de ascitas o suero mediante procedimientos de purificación convencionales como, por ejemplo, cromatografía de proteína-A, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos humanos también pueden generarse mediante la utilización de un huésped no humano, como un ratón, capaz de producir anticuerpos humanos. Tal como se indicó más arriba, existen en la actualidad ratones transgénicos disponibles capaces, después de la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota de la región de unión de cadena ligera-pesada del anticuerpo (JH) en los ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la serie de inmunoglobulinas de línea germinal humana en dichos ratones de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos después de sufrir el estímulo antigénico. Véase, por ejemplo, Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann y col., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); patente americana U.S. 5.591.669; patente americana US 5.589.369; y patente americana 5.545.807. Los anticuerpos humanos también pueden prepararse mediante la utilización de ratones SCID-hu (Duchosal y col., *Nature* 355:258-262 (1992)).

En otra realización, el anticuerpo humano puede seleccionarse a partir de una librería de expresión de fagos de anticuerpos. La preparación de librerías de anticuerpos o de fragmentos de lo mismo es bien conocida en la materia y puede utilizarse cualquiera de los procedimientos conocidos para construir una familia de vectores de transformación que pueden introducirse en las células huésped. Pueden prepararse librerías de cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos en fagos (Huse y col., *Science*, 246:1275 (1989)) o de proteínas de fusión en fagos o fagémidos de acuerdo con procedimientos conocidos. Véase, por ejemplo, Vaughan y col., *Nature Biotechnology* 14:309-314 (1996); Barbas y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7978-7982 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992); Barbas y col., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:4457-4461 (1992); Griffiths y col., *EMBO Journal*, 13:3245-3260 (1994); de Kruij y col., *J. Mol. Biol.*, 248:97-105 (1995); patente internacional 98/05344; patente internacional WO 98/15833; patente internacional WO 97/47314; patente internacional WO 97/44491; patente internacional WO 97/35196; patente internacional WO 95/34648; patente americana US 5.712.089; patente americana US 5.702.892; patente americana US 5.427.908; patente americana US 5.403.484; patente americana US 5.432.018; patente americana 5.270.170; patente internacional 92/06176; patente internacional WO 99/06587; patente americana US 5.514.548; patente internacional WO 97/08320; y patente americana US 5.702.892. El antígeno de interés se hibrida con la librería de fagos utilizando procedimientos conocidos en la materia para la selección de fagos-anticuerpos que se unan al antígeno diana.

Los anticuerpos del receptor de Apo-2L, tal como se describe aquí, poseerán opcionalmente una o más actividades o propiedades biológicas deseadas. Dichos anticuerpos pueden incluir aunque no se limiten a los anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos y anticuerpos de afinidad madurada. Tal como se describió más arriba, los anticuerpos pueden construirse o diseñarse según técnicas diversas para lograr estas actividades o propiedades deseadas. En una realización, el anticuerpo del receptor de Apo-2L tendrá una afinidad de unión por el receptor DR4 o DR5 de al menos 10^5 M^{-1} , preferentemente en el intervalo de 10^6 M^{-1} a 10^7 M^{-1} , más preferentemente, en el intervalo de 10^8 M^{-1} a 10^{12} M^{-1} y aún más preferentemente en el intervalo de 10^9 M^{-1} a 10^{12} M^{-1} . La afinidad de unión del anticuerpo puede determinarse sin demasiada experimentación mediante el análisis del anticuerpo de acuerdo con las técnicas conocidas en la materia, incluyendo el análisis de Scatchard (véase Munson y col., *supra*). Por ejemplo, un anticuerpo anti-

DR4 puede analizarse por su afinidad de unión con la construcción del receptor DR4-IgG, tal como se describe en el Ejemplo 2.

En otra realización, el anticuerpo anti-receptor de Apo-2L de la invención se une al mismo epitopo en DR4 o DR5 con el que se une a Apo-2L, o se une a un epitopo en DR4 o DR5 que coincide o solapa con el epitopo en DR4 o DR5, respectivamente, con el que se une a Apo-2L. El anticuerpo puede también interactuar para crear una conformación estérica que prevenga la unión del ligando Apo-2 con DR4 o DR5. La propiedad de unión del epitopo del anticuerpo de la presente invención puede determinarse utilizando técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, puede analizarse el anticuerpo en un ensayo *in vitro*, como un ensayo de inhibición competitiva, para determinar la capacidad del anticuerpo para bloquear o inhibir la unión de Apo-2L con DR4 o DR5. Opcionalmente, el anticuerpo puede analizarse en un ensayo de inhibición competitiva para determinar la capacidad de, por ejemplo, un anticuerpo anti-DR4 para inhibir la unión de un polipéptido DR4-IgG (tal como se describe en el Ejemplo 1) con una construcción DR4-IgG (tal como se describe en el Ejemplo 2) o con una célula que exprese DR4. Opcionalmente, el anticuerpo será capaz de bloquear o inhibir la unión de Apo-2L con el receptor en al menos un 50%, preferentemente en un 75% y más preferentemente en un 90%, que se determinará, por ejemplo, mediante un ensayo de inhibición competitiva *in vitro* utilizando una forma soluble del ligando de Apo-2 (TRAIL) y un DR4 ECD-IgG (tal como se describe en el Ejemplo 2).

En una realización preferida, el anticuerpo comprenderá un anticuerpo agonista con actividad que mimetice o sea comparable con al del ligando de Apo-2 (TRAIL). Preferentemente, un tal anticuerpo agonístico para DR4 o DR5 inducirá apoptosis en al menos un tipo de cáncer o línea celular tumoral o tumor primario. La actividad apoptótica de un anticuerpo agonístico para DR4 o DR5 puede determinarse utilizando ensayos conocidos *in vivo* o *in vitro*. Ejemplos de dichos ensayos *in vivo* o *in vitro* se describen con detalle en la sección de los Ejemplos de más abajo. La actividad apoptótica *in vitro* puede determinarse mediante técnicas conocidas como la unión de la Anexina V. La actividad apoptótica *in vivo* puede determinarse, por ejemplo, cuantificando la reducción en la masa o volumen tumoral.

3. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos distintos. En el caso presente, una de las especificaciones es para un receptor de Apo-2L, la otra es para cualquier otro antígeno, y preferentemente para una proteína de superficie celular o receptor o una subunidad del receptor.

Los procedimientos para generar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la materia. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadenas ligera/pesada de inmunoglobulinas, en donde las dos cadenas tienen especificidades distintas [Milstein y Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)]. Debido a la reordenación aleatoria de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas distintas de anticuerpos, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se logra generalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. Procedimientos similares se describen en la patente internacional WO 93/08829, publicada el 13 de Mayo de 1993, y en Traunecker y col., *EMBO J*; 10:3655-3659 (1991).

Los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse con las secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se realiza preferentemente con un dominio constante de cadena pesada, que comprende a menos parte de la bisagra y regiones CH2 y CH3. Es preferible que la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera esté presente en al menos una de las fusiones. Los DNAs que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se inserten en vectores de expresión separados y se co-transfecten en un organismo huésped adecuado. Para mayores detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y col., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

4. Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados también se hallan dentro del ámbito de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Se ha propuesto que dichos anticuerpos dirijan, por ejemplo, las células del sistema inmune contra las células no deseadas [patente americana US4.676.980], y para el tratamiento de la infección por VIH [patente internacional WO 91/00360; patente internacional WO 92/200373; patente europea EP 03089]. Los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* mediante la utilización de procedimientos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo aquellos que implican agentes de unión. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse mediante la utilización de una reacción de intercambio de disulfuros o mediante la formación de un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen el iminotiolato y el metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la patente americana US 4.676.980.

5. Anticuerpos triespecíficos

Los anticuerpos triespecíficos también se hallan dentro del ámbito de la invención. Dichos anticuerpos se describen por ejemplo en Iliades y col., *supra* y Kortt y col., *supra*.

6. Otras modificaciones

Otras modificaciones de los anticuerpos del receptor de Apo-2L se contemplan aquí. Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse mediante conjugación del anticuerpo con un agente citotóxico (como una molécula de toxina) o una enzima activadora del profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente peptídil quimioterapéutico, véase la patente internacional WO 81/01145) en un fármaco anti-canceroso activo. Véase, por ejemplo, la patente internacional WO 88/07378 y la patente americana US 4.975.278. Esta tecnología también es referida como “terapia de profármacos mediados por enzimas dependiente de anticuerpos” (ADEPT).

El componente enzimático del inmunoconjugado para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal modo que lo convierta en una forma citotóxica más activa. Las enzimas que son de utilidad en dicho procedimiento de la invención incluyen, aunque no se limitan a, la fosfatasa alcalina de utilidad para convertir los profármacos que convierten fosfatos en fármacos libres; la arilsulfatasa para convertir los profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; la citosina desaminasa de utilidad para convertir la fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso, 5-fluorouracil; las proteasas, como la proteasa de Serratia, la termolisina, la subtilina, las carboxipeptidasas y las catepsinas (como las catepsinas By L), que son útiles para la conversión de los profármacos-péptido en fármacos libres; las caspasas como la caspasa 3; las D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen D-aminoácidos sustituyentes; las enzimas que cortan carbohidratos como la beta-galactosidasa y la neuraminidasa de utilidad para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; la beta-lactamasa de utilidad para convertir fármacos derivados con beta-lactamas en fármacos libres; y las penicilina amidasas, como la penicilina V amidasa o la penicilina G amidasa, para convertir fármacos derivados en sus nitrógenos de grupos amina con grupos fenoxiacetil o fenilacetil, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la materia como “abzimas”, pueden utilizarse para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328:457-458 (1987)).

Las enzimas pueden unirse covalentemente a los anticuerpos mediante técnicas bien conocidas en la materia tal como la utilización de reactivos de unión heterobifuncionales. Alternativamente, las proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión al anticuerpo de un anticuerpo de la invención unida con por lo menos una porción activa funcionalmente de una enzima de la invención puede construirse mediante la utilización de técnicas del DNA recombinantes bien conocidas en la materia (véase por ejemplo, Neuberger y col., Nature, 312:604-608 (1984)).

También se contemplan en la presente invención otras modificaciones del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar unido con diversos polímeros no proteicos, p.ej., el polietilén glicol, el polipropilén glicol, los polioxialquilenos, o los copolímeros de polietilén glicol y el polipropilén glicol. El anticuerpo también puede estar incluido en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coarcepción o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de poli-hidroximetilcelulosa o de gelatina) en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microsferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., ED., (1980). Para aumentar la vida media sérica del anticuerpo, se puede incorporar un epitopo de rescate de unión al receptor en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la patente americana U.S. 5.739.277, por ejemplo. Tal como se utiliza aquí, el término “epitopo de unión al receptor de rescate” hace referencia a un epitopo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) que es responsable para el aumento de la vida media *in vivo* de la molécula de IgG.

7. Procedimientos recombinantes

La invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos aquí descritos, vectores y células huésped que comprenden el ácido nucleico y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo.

Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico codificante se aísla e inserta en un vector replicable para la posterior clonación (amplificación del DNA) o para la expresión. El DNA que codifica el anticuerpo se aísla rápidamente y se secuenciar mediante la utilización de procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante la utilización de sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican el anticuerpo). Existen muchos vectores disponibles. Los componentes del vector incluyen generalmente, aunque no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento intensificador de la transcripción, un promotor, y una secuencia de finalización de la transcripción.

Los procedimientos incluyen aquí procedimientos para la producción de anticuerpos del receptor de Apo-2L recombinantes que comprenden las etapas de: (a) proporcionar un vector que comprende una secuencia de DNA codificante de una cadena ligera o pesada de un anticuerpo anti-receptor de Apo-2L (o de ambas, una cadena ligera y una pesada), (b) la transfección o la transformación de una célula huésped con el vector, y (c) el cultivo de la célula(s) huésped(es) con el vector en condiciones suficientes para producir el producto de anticuerpo anti- receptor de Apo-2L recombinante.

(i) Componente de secuencia señal

El anticuerpo anti-receptor de Apo-2L de la presente invención puede producirse de forma recombinante no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, el cual es preferentemen-

te una secuencia señal u otro polipéptido con un sitio de corte específico en el extremo N-terminal de la proteína o el polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferentemente una que es reconocida y procesada (es decir, que se corta por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para las células huésped procariotas que no reconocen ni procesan la secuencia señal nativa del anticuerpo, dicha secuencia señal se sustituye por una de procariotas seleccionada de entre, por ejemplo, el grupo constituyente en la fosfatasa alcalina, la penicilinas, 1pp, o los líderes de la enterotoxina II estable al calor. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal puede sustituirse por ejemplo por el líder de la invertasa de levaduras, el líder del factor α (incluyendo los líderes del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa albicans, o la secuencia señal descrita en la patente internacional WO 90/1346. En la expresión de células de mamífero, se pueden utilizar las secuencias señal de mamífero así como los líderes secretorios virales, por ejemplo, la señal gD de herpes simplex.

El DNA para dicha región precursora está ligado en la misma pauta de lectura con el DNA que codifica el anticuerpo.

(ii) *Componente de origen de replicación*

Tanto los vectores de clonación como de expresión contienen una secuencia de ácido nucleico que permite la replicación del vector en una o más células huéspedes seleccionadas. Por lo general, en los vectores de clonación, esta secuencia es una que permite la replicación del vector de forma independiente del DNA del cromosoma del huésped, e incluye los orígenes de replicación o las secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas en para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levaduras y diversos orígenes virales (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son de utilidad para los vectores de clonación en células de mamífero. Por lo general, el componente de origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamíferos (el origen de SV40 se utiliza únicamente porque contiene el promotor temprano).

(iii) *Componente de gen de selección*

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a los antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles de medios complejos, por ejemplo, el gen codificante de la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para parar el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que se transformaron satisfactoriamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y por ello sobreviven al régimen de selección. Ejemplos de dicha selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para las células de mamífero son las que permiten la identificación de células competentes para incorporar el ácido nucleico del anticuerpo, como los genes de DHFR, timidina quinasa, metalotioneína I y II, y preferentemente metalotioneínas de primates, adenosina deaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican en primer lugar cultivando todas las transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (MTX), un antagonista competitivo del DHFR. Si se utiliza el DHFR de tipo silvestre, una célula huésped adecuada es la línea de células de ovario de hámster chino (CHO) deficientes en actividad DHFR.

Alternativamente, las células huésped (en particular las huéspedes de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con las secuencias de DNA que codifican el anticuerpo anti-receptor de Apo-2L, la proteína DHFR de tipo silvestre, y otro marcador seleccionable como la aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse por el crecimiento celular en un medio que contenga un agente de selección para el marcador seleccionable como un antibiótico aminoglicósido, por ejemplo, la kanamicina, la neomicina, o el G418. Véase la patente americana U.S. 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para utilizar en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levaduras YRp7 (Stinchcomb y col., *Nature*, 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura carente de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona un entorno eficaz para detectar la transformación mediante el crecimiento en ausencia de triptófano. De modo similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu-2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan por plásmidos conocidos que contienen el gen *Leu2*.

Además, los vectores derivados del plásmido circular 1,6 μ m pKD1 pueden utilizarse para transformar levaduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternera recombinante se publicó para *K. lactis* por Van den Berg, *Biol/Technology*, 8:135 (1990). También se han descrito

vectores de expresión multicopia para la secreción de albúmina sérica humana recombinante madura por las cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleeer y col., Bio/Technology, 9:968-975 (1991).

(iv) *Componente de promotor*

Los vectores de expresión y clonación contienen generalmente un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está unido operativamente al ácido nucleico del anticuerpo. Los promotores adecuados para utilizar con los huéspedes procariotas incluyen el promotor *phoA*, los sistemas de promotores de la β -lactamasa y la lactosa, la fosfatasa alcalina, un sistema de promotor del triptófano (*trp*) y los promotores híbridos como el promotor *tac*. Sin embargo, también son adecuados otros promotores de bacterias conocidos. Los promotores para utilizar en sistemas de bacterias también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente con el DNA que codifica el anticuerpo anti-receptor de Apo-2L.

Se conocen las secuencias promotoras para los eucariotas. Idealmente, todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada a aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción. Otra secuencia hallada a 70-80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas existe una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A en el extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de forma adecuada en los vectores de expresión de eucariotas.

Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para utilizar con huéspedes de levaduras incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, como la enolasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la hexoquinasa, la piruvato descarboxilasa, la fosfofructoquinasa, la glucosa-6-fosfato isomerasa, la 3-fosfoglicerato mutasa, la piruvato quinasa, la triosafofosfato isomerasa, la fosfoglucoquinasa y la glucoquinasa.

Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles presentan la ventaja adicional de tener una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, el isocitocromo C, la fosfatasa ácida, las enzimas degradantes asociadas con el metabolismo del nitrógeno, la metalotioneína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y las enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Vectores y promotores adecuados para utilizar en la expresión con levaduras se describen en la patente europea EP 73.657. Los intensificadores de levaduras también se utilizan de forma ventajosa con los promotores de levaduras.

La transcripción del anticuerpo anti-receptor de Apo-2L a partir de los vectores en las células huésped de mamífero se controla, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus como el poliovirus, el virus de la viruela aviar, el adenovirus (como el Adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviar, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y más preferentemente del Simian Virus 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico por calor, y siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de las células huésped.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen como un fragmento de restricción SV40 que también contiene el origen viral de replicación de SV40. El promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano se obtiene de forma adecuada como un fragmento de restricción HindIII. Un sistema para la expresión del DNA en huéspedes de mamífero que utiliza el virus del papiloma bovino como vector se describe en la patente americana U.S. 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente americana U.S. 4.601.978. Véase también Reyes y col., Nature 297:598-601 (1982) sobre la expresión del ADNc del β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus herpes simplex. Alternativamente, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous puede utilizarse como el promotor.

(v) *Componente de elemento intensificador*

La transcripción de un DNA que codifica el anticuerpo anti-receptor de Apo-2L de la presente invención por los eucariotas superiores se aumenta a menudo mediante inserción de una secuencia intensificadora en el vector. En la actualidad, se conocen muchas de las secuencias intensificadoras para genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se utilizará un intensificador de un virus de célula eucariota. Ejemplos incluyen el intensificador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el intensificador del promotor temprano del citomegalovirus, el intensificador del poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y los intensificadores de adenovirus. Véase, Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) sobre elementos intensificadores para la activación de promotores eucariotas. El intensificador puede ajustarse en el vector en una posición 5' o 3' respecto a la secuencia codificante del anticuerpo, pero se localiza preferentemente en 5' del promotor.

(vi) *Componente de finalización de la transcripción*

Los vectores de expresión utilizados en células huésped eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animal, humanas, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán las secuencias necesarias para la finalización de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles comúnmente a partir del extremo 5', y ocasionalmente del 3', regiones no traducidas de DNAs o ADNcs eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos traducidos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo multivalente. Un componente de finalización de la transcripción útil es la región

de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase la patente internacional WO 94/11026 y el vector de expresión descrito en la presente invención.

(vii) *Selección y transformación de células huésped*

Células huésped adecuadas para la clonación o expresión del DNA en los vectores de la presente invención son las células procariotas, levaduras o eucariotas superiores descritas más arriba. Procariotas adecuados para este propósito incluyen las eubacterias, como las Gram positivas, por ejemplo, las Enterobacteriáceas como *Escherichia*, por ejemplo *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como Bacilli como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en la patente DD 26.710 (publicada el 12 de Abril de 1989), *Pseudomonas* como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un huésped de clonación preferido es *E. coli*, *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque también son adecuadas otras cepas como *E. coli*B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), y *E. coli*W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas como los hongos filamentosos o las levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican el anticuerpo anti-receptor de Apo-2L. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura del pan común, es el huésped más comúnmente utilizado entre los microorganismos eucariotas inferiores. Sin embargo, diversos otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles aquí, como *Schizosaccharomyces pombe*, huéspedes *Kluyveromyces* como *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.242), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. drosophilum* (ATCC 36.906); *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (patente europea EP 402.226); *Pichia pastoris* (patente europea EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (patente europea EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* como *Schwanniomyces occidentalis*; y los hongos filamentosos como por ejemplo *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus* como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insecto y de plantas. Son de disponibilidad pública numerosas cepas de baculovirus y sus variantes, así como se han identificado las correspondientes células huésped de insecto permisivas de huéspedes como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Son de disponibilidad pública diversas cepas virales para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de Autographa californica NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV. Dichos virus pueden utilizarse como el virus de acuerdo con la presente invención, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células de plantas de algodón, maíz, patatas, soja, petunia, tomate y tabaco pueden también utilizarse como huéspedes.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en las células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero de utilidad son la línea CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrional humano (células 293 o las mismas subclonadas para el crecimiento en un cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); las células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/DJFR (CHO, Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA ATCC CCL2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL5); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; una línea de hepatoma humano (Hep G2); y células de mieloma o de linfoma (por ejemplo, células Y0, J558L, P3 y NS0)(véase la patente americana US 5.807.715).

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según sea indicado para la inducción de los promotores, se seleccionan los transformantes o se amplifican los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) *Cultivo de células huésped*

Las células huésped utilizadas para producir el anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en diversos medios. Medios disponibles comercialmente como el Ham's F10 (Sigma), el Minimal Essential Medium ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) son adecuados para el cultivo de las células huésped. Además, cualquier medio descrito en Ham y col., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes y col., Anal. Biochem. 102:25 (1980), patentes americanas 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; 5.122.469; patentes internacionales WO 90/03430; WO 87/00195; o la patente americana 30.985 pueden utilizarse como el medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (como la insulina, la transferrina, o el factor de crecimiento epitelial), las sales (como el cloruro sódico, el calcio, magnesio y fosfato), tampones (como el HEPES), nucleótidos (como la adenosina y la timidina), antibióticos (como el fármaco GENTAMYCINTM), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos).

cos presentes generalmente a concentraciones finales del orden micromolar), y la glucosa o una fuente equivalente de energía. Cualquier otro suplemento necesario puede también incluirse a concentraciones adecuadas que conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, como la temperatura, pH, y similar, son los utilizados anteriormente con la célula huésped seleccionada, y serán evidentes a un experto en la materia.

(ix) Purificación

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, se eliminan los restos de partículas celulares, células huésped o fragmentos de células lisadas, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter y col., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, la pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA, y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los restos celulares pueden eliminarse mediante centrifugación. Si el anticuerpo se secreta en el medio, se concentran generalmente en primer lugar los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión mediante un filtro concentrador de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa como el PMSF puede incluirse en cualquiera de las etapas para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes fortuitos.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo esta última la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de las especies y del isotipo de cualquier región Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede utilizarse para purificar anticuerpos que están basados en las cadenas pesada $\gamma 1$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark y col., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para la $\gamma 3$ humana (Guss y col., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la cual se une el ligando de afinidad es la mayoría de las veces la agarosa, pero también están disponibles otras matrices. Las matrices estables mecánicamente como las de vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los logrados con la agarosa. Si el anticuerpo comprende un dominio CH3, se puede utilizar la resina BakerbondABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas son el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico o la precipitación por etanol. La HPLC de fase reversa, cromatografía en sílice, cromatografía de heparina SEPHAROSE™ sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de SDS-PAGE y precipitación con sulfato amónico también están disponibles dependiendo del anticuerpo a recuperar.

B. Formulaciones

El ligando Apo-2 o el anticuerpo agonista del receptor de Apo-2L y CPT-11 se administran preferentemente en un vehículo. Las moléculas pueden administrarse en un solo vehículo, o alternativamente, pueden incluirse en vehículos separados. Los vehículos adecuados y sus formulaciones se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., 1980, Mack Publishing Co., editado por Oslo y col. De forma típica, una cantidad adecuada de una sal aceptable farmacéuticamente se utiliza en el vehículo para rendir la formulación isotónica. Ejemplos de vehículos incluyen la solución salina de Ringer y la solución de dextrosa. El pH de la solución se halla entre 5-8, y más preferentemente entre 7,4 a 7,8. Será evidente para los expertos en la materia que ciertos vehículos pueden ser más preferibles dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración y la concentración del agente a administrar. El vehículo puede estar en la forma de una formulación liofilizada o solución acuosa.

Los vehículos aceptables, excipientes o estabilizantes son preferentemente no tóxicos a las células y/o los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas e incluyen tampones como el fosfato, el citrato, y otros ácidos orgánicos; los antioxidantes como el ácido ascórbico y la metionina; los conservantes (como el cloruro de amonio octadecildimetilbencil; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butil o bencil; los alquil parabenos como el metil o el propil paraben; el catecol; el resorcinol; el ciclohexanol; el 3-pentanol; y el m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas como la seroalbúmina, la gelatina, o las inmunoglobulinas; los polímeros hidrofílicos como la polivinilpirrolidona; los aminoácidos como la glicina, la glutamina, la asparraguina, la histidina, la arginina o la lisina; los monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo la glucosa, la manosa, o las dextrinas; los agentes quelantes como el EDTA; los azúcares como la sacarosa, el manitol, la trehalosa o el sorbitol; las parejas de iones formadores de sales como el sodio; y/o los tensoactivos iónicos y no iónicos como el TWEEN™, PLURONICS™, o el polietilén glicol (PEG).

La formulación puede contener también más de un compuesto activo si fuera necesario para la indicación determinada a tratar, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no interfieran de modo adverso unos con otros. Alternativa o aditivamente, la composición puede comprender un agente citotóxico, una citoquina o un agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada en combinación con cantidades que son efectivas para el propósito pretendido.

El Apo-2L o el anticuerpo agonista y CPT-11 también pueden estar incluidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación

de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Oslo, A. Ed. (1980).

- 5 Las formulaciones a utilizar para la administración *in vivo* deberían ser estériles. Ello se logra mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Pueden prepararse preparaciones de liberación prolongada. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, dichas matrices son artículos con formas determinadas, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación prolongada incluyen los poliésteres, los hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), los poliláctidos (patente americana U.S. 3.773.919), los copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, el acetato de etilén-vinilo no degradable, los copolímeros degradables de ácido glicólico-ácido láctico como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras los polímeros como el etilén-vinil acetato y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante aproximadamente 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos más cortos.

C. Modos de administración

20 La Apo-2L o el anticuerpo agonista del receptor de Apo-2L y CPT-11 pueden administrarse según procedimientos conocidos, como la administración intravenosa en forma de bolo, o mediante infusión continua durante un período de tiempo por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o inhalación. Opcionalmente, la administración puede realizarse por una mini-bomba de infusión utilizando diversos dispositivos disponibles comercialmente.

Las dosis efectivas y los programas para la administración del ligando de Apo-2 o el anticuerpo agonista y CPT-11 pueden determinarse empíricamente, y la realización de dichas determinaciones es competencia de los expertos en la materia. Se cree en la actualidad que una dosis o cantidad eficaz de ligando de Apo-2 utilizado solo puede hallarse en el intervalo de aproximadamente 1 μ g/Kg a 100 mg/Kg de peso corporal o más por día. Una dosis o cantidad eficaz de CPT-11 utilizado solo puede hallarse en el intervalo de aproximadamente 1 mg/m² a 150 mg/m². Es posible realizar un escala entre especies de las dosificaciones de forma conocida en la materia, por ejemplo, tal como se describe en Mordenti y col., Pharmaceut Res., 8;1351 (1991). Los expertos en la materia entenderán que la dosificación del ligando de Apo-2 o el anticuerpo agonista y CPT-11 que deben administrarse variarán dependiendo de, por ejemplo, el mamífero que recibirá el ligando de Apo-2 o el anticuerpo agonista y CPT-11, la vía de administración, y otros fármacos o terapias a administrar al mamífero.

Dependiendo del tipo de células y/o de la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 μ g/Kg a 15 mg/Kg (p.ej., 0,1-20 mg/Kg) de anticuerpo agonista es una dosificación candidata inicial para la administración, si, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosificación típica diaria puede hallarse en el intervalo de 1 μ g/Kg a 100 mg/Kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o mayores, dependiendo de la condición, el tratamiento se prolonga hasta la supresión de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser de utilidad otros regímenes de dosificación.

Se contempla que puedan utilizarse otras terapias en los procedimientos. Estas otras terapias pueden incluir, aunque sin por ello limitarse, otras quimioterapias (o agentes quimioterapéuticos) y/o terapias por radiación, inmunoadyuvantes, agentes inhibidores del crecimiento, citoquinas. Los ejemplos incluyen las interleuquinas (por ejemplo, la IL-1, IL-2, IL-3, IL-6), el factor inhibidor de la leucemia, los interferones, el TGF-beta, la eritropoyetina, la tromboyetina y el anticuerpo anti-VEGF. También pueden utilizarse otros agentes conocidos por inducir la apoptosis en las células de mamífero, los cuales incluyen el TNF- α , TNF- β (linfotóxina- α), ligando de CD30, ligando de 4-1BB y ligando de Apo-1.

Las quimioterapias adicionales contempladas por la presente invención incluyen sustancias químicas o fármacos que son conocidos en la materia y están disponibles comercialmente, como la Adriamicina, la Doxorubicina, el 5-fluorouracil, la citosina arabinósido (Ara-C), la Ciclofosfamida, el Leucovorin, el Thiotepa, el Busulfán, el Citoxin, el Taxol, el Toxotere, el Metotrexato, la Cisplatina, el Melfalán, la Vinblastina, la Bleomicina, el Etoposido, la Ifosfamida, la Mitomicina C, el Mitoxantrón, la Vincristina, la Vinorelbina, el Carboplatin, el Tenipósido, la Daunomicina, la Carminomicina, la Aminopterina, la Dactinomicina, las Mitomicinas, las Esperamicinas (véase la patente americana U.S. 4.675.187), el Melfalán y otras mostazas nitrogenadas. También se incluyen los agentes que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre los tumores como el tamoxifeno o la onapristona.

Los esquemas de preparación y dosificación para dicha quimioterapia pueden utilizarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante o determinarse empíricamente por el experto en la materia. Los esquemas de preparación y dosificación para dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Willimas & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterapéutico puede administrarse antes o después de la administración de Apo-2L o el anticuerpo agonista y/o CPR-11, o puede administrarse simultáneamente.

La quimioterapia se administra preferentemente en un vehículo, como el descrito anteriormente. El modo de administración o la quimioterapia puede ser el mismo que el utilizado por el ligando de Apo-2 o el anticuerpo agonista o CPT-11, o puede administrarse de modo distinto.

La radioterapia puede administrarse de acuerdo con los protocolos comúnmente utilizados en la materia y bien conocidos por los expertos en dicha materia. Dicha terapia incluye la radiación de cesio, iridio, yodo, o cobalto. La radioterapia puede ser de todo el cuerpo o dirigida localmente a un sitio o tejido específico del cuerpo. De modo característico, la radioterapia se administra en pulsos durante un período de tiempo de aproximadamente 1 a 2 semanas. La radioterapia puede, sin embargo, administrarse durante períodos más prolongados. Opcionalmente, la radioterapia puede administrarse como una dosis sencilla o dosis múltiples secuenciales.

El ligando de Apo-2 o el anticuerpo agonista y CPT-11 (y otra o más terapia) pueden administrarse de forma concurrente o secuencial. Después de la administración del ligando de Apo-2 o del anticuerpo agonista y de CPT-11, pueden analizarse las células tratadas *in vitro*. En un tratamiento *in vitro*, el mamífero tratado puede controlarse de formas diversas bien conocidas en la materia. Por ejemplo, análisis físico de la masa tumoral mediante biopsia o técnicas de análisis por la imagen por rayos X.

III. Artículos de fabricación

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales de utilidad para el tratamiento de los trastornos descritos más arriba. El artículo de fabricación comprende un envase y una etiqueta. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los envases pueden estar formados por diversos materiales como el vidrio o el plástico. El envase contiene una composición que es eficaz para el tratamiento de la condición y que puede tener un acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa para solución intravenosa o un vial con un tapón agujereable por una aguja hipodérmica). Los agentes activos en la combinación son el ligando de Apo-2 o el anticuerpo agonista y CPT-11. La etiqueta sobre el envase, o asociada con éste, indica que la composición se utiliza para el tratamiento de la condición a elegir. El artículo de fabricación puede además comprender un segundo envase que comprenda un tampón aceptable farmacéuticamente, como el tampón fosfato salino, la solución de Ringer o la solución de dextrosa. Es posible incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial o del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y folletos con las instrucciones para su utilización.

Los siguientes ejemplos se ofrecen como ilustración y no como limitación. Las descripciones de todas las citas en la especificación se han incorporado en las referencias.

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra la inhibición sinérgica del crecimiento del tumor por el ligando de Apo-2 y CPT-11 *in vivo*.

La línea celular de carcinoma de colon COLO205 (disponible de NCI) se creció y se mantuvo de acuerdo con los procedimientos del fabricante. En resumen, las células COLO205 se cultivaron en medio DMEM/F12 (50:50) con concentración alta de glucosa y suero bovino fetal al 10% y L-glutamina 2 mM. El ligando de Apo-2 que comprende los aminoácidos 114-281 se preparó en *E. coli*. La porción extracelular del Apo-2L humano (aminoácidos 114-281; véase Pitti y col., *supra*) se subclonó en el plásmido de expresión pS1346 (Scholtissek y col., *Gene*, 62:55-64 (1988)) con un codón iniciador de metionina añadido, y se expresó bajo el control del promotor *trp* en la cepa W3110 de *E. coli*, en fermentadores de 10 L o 100 L. La pasta celular que contenía el Apo-2L humano, soluble y recombinante se extrajo con un tampón con Tris 0,1 M/NaCl 0,2 M/EDTA 150 mM, pH 8,0. El extracto se precipitó con sulfato amónico al 40%. La purificación a una homogeneidad > 98% se logró mediante dos etapas de separación por cromatografía consecutivas en columnas de hidroxipatita y agarosa NTA-Ni. (Aunque carece de una etiqueta de polihistidina, el fragmento de Apo-2L de 114-281 soluble recombinante parece ser que se une a la columna de Ni-NTA a través de residuos de histidina endógenos). La pureza se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-sodio dodecil sulfato (SDS) y tinción con nitrato de plata o azul de coomassie, por análisis de secuencia aminoacídica y por exclusión por tamaño en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). CPT-11 (Camptosar®) se obtuvo de Pharmacia & Upjohn.

Los ratones *nude* atímicos (Jackson Laboratories) se inyectaron subcutáneamente con 5 millones de células de carcinoma de colon COLO205 y se crecieron los tumores hasta alcanzar un tamaño de aproximadamente 120 mm³. Los ratones portadores de tumores se agruparon aleatoriamente en 4 grupos de 9 ratones por grupo y se trataron con: un vehículo (Tris 20 mM, Trehalosa al 8%, Tween-20 al 0,01%, pH 7,5), o Apo-2L (30 mg/Kg en los días 0-4 y 7-11), o CPT-11 (80 mg/Kg en los días 0,4 y 8), o una combinación de Apo-2L (30 mg/Kg/día en los días 0-4 y 7-11) más CPT-11 (80 mg/Kg/día en los días 0,4 y 8). Los volúmenes tumorales se determinaron en los días indicados durante 34 días.

Tal como se muestra en la Figura 1, tanto Apo-2L (triángulos vacíos) como CPT-11 (cuadrados vacíos) suprimieron el crecimiento del tumor durante el período del tratamiento, aunque el crecimiento tumoral se reanudó días después en los 9 animales de cada grupo. Por el contrario, la combinación de Apo-2L con CPT-11 (triángulos vacíos) causó un encogimiento importante del tumor, lo que resultó en la eliminación completa del tumor en 8 de los 9 animales en el grupo de tratamiento combinatorio.

Los resultados de este experimento indican que las combinaciones de tratamiento con ligando de Apo-2 y CPT-11 inhiben sinérgicamente el crecimiento de las células cancerosas *in vivo*.

Ejemplo 2

Este ejemplo muestra la inhibición sinérgica del crecimiento tumoral por el anticuerpo agonista del receptor DR4, 4H6.17.8 ("4H6"), y CPT-11 *in vivo*.

El anticuerpo agonista se preparó de la manera siguiente. Se preparó una construcción soluble de DR4 ECD inmuno adhesina. Se clonó una secuencia DR4 ECD madura (aminoácidos 1-218 mostrados en Pan y col., *supra*) en un vector pCMV-1 Flag (Kodak) cadena abajo de la secuencia señal Flag y fusionado con la región CH1, bisagra y Fc de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana G1, tal como se describió previamente por Aruffo y col., [Cell, 61:1303-1313 (1990)]. La inmuno adhesina se expresó mediante transfección transitoria en las células 293 humanas y se purificó de los sobrenadantes celulares por cromatografía de afinidad con proteína A, tal como se describió por Ashkenazi y col., (Proc. Natl. Acad. Sci., 88:10535-10539 (1991)).

Los ratones Balb/c (obtenidos de Charles River Laboratories) se inmunizaron mediante inyección de 0,5 mg/50 μ l de una proteína DR4 ECD-inmuno adhesina (tal como se describió anteriormente) (diluida en adyuvante MPL-TDM obtenido de Ribi Immunochemical Research Inc., Hamilton, MT) 11 veces en cada almohadilla de las patas traseras a intervalos de 3-4 días.

Tres días después del último estímulo, se extrajeron los nódulos linfáticos poplíteos de los ratones y se preparó una suspensión de células individuales en medio DMEM (obtenido de Blowhitaker Corp.) suplementado con penicilina-estreptomicina al 1%. Las células del nódulo linfático se fusionaron con las células de mieloma murino P3X63AgU.1 (ATCC CRL 1597) mediante la utilización de polietilén glicol al 35% y se cultivaron en placas de 96 pocillos. Los hibridomas que resultaron de la fusión se seleccionaron en medio HAT. Diez días después de la fusión, los sobrenadantes del cultivo de hibridomas se analizaron en un ensayo ELISA para la presencia de anticuerpos monoclonales que se unen a la proteína DR4 ECD- inmuno adhesina (descrito más arriba).

En el ELISA, se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorp; Nunc, Kamstrup, Dinamarca) mediante adición de 50 μ l de anti-IgG Fc humana de cabra (de Cappel Laboratories) en PBS para cada pocillo y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron a continuación tres veces con tampón de lavado (PBS con Tween-20 al 0,05%). Los pocillos en la placa de microtitulación se bloquearon con 200 μ l de albúmina sérica bovina al 2% en PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron a continuación tres veces con tampón de lavado.

Después de la etapa de lavado, se añadieron 50 μ l de proteína DR4 ECD inmuno adhesina a 0,4 μ g/ml en el tampón de ensayo a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador, seguido de tres lavados con el tampón de lavado.

Después de las etapas de lavado, se añadieron 100 μ l de los sobrenadantes del anticuerpo purificado por columna de Proteína G-Sepharose (10 μ g/ml) a los pocillos designados. Se añadieron 100 μ l de P3X63AgU.1 al medio condicionado de células de mieloma a los otros pocillos designados como controles. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador y luego se lavaron tres veces con el tampón de lavado.

A continuación, se añadieron 50 μ l del anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Cappel Laboratories), diluido a 1:1000 en tampón de ensayo (albúmina sérica bovina al 0,5%, Tween-20 al 0,05% en PBS) a cada pocillo en las placas incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador. Las placas se lavaron tres veces con el tampón de lavado, y a continuación se añadieron 50 μ l del sustrato (TMB Microwell Peroxidase Substrate; Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD) a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se paró añadiendo 50 μ l de TMB 1- Solución de Parada del Componente (Dietil Glicol; Kirkegaard & Perry) a cada pocillo, y se leyó la absorbancia a 450 nm en una placa lectora de microtitulación.

Los sobrenadantes de los hibridomas se analizaron inicialmente en el ELISA por su capacidad para unirse a DR4-IgG pero no a CD4-IgG. Los sobrenadantes positivos en el ELISA se analizaron luego por FACS mediante la utilización de células 9D (una línea celular linfóide B humana que expresa DR4, Genentech, Inc.) y un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC. Para este análisis, 25 μ l de células (4×10^6 células/ml) resuspendidas en el tampón del separador de células (PBS con FCS al 1% y NaN3 al 0,02%) se añadieron a los pocillos de microtitulación de fondo en U, se mezclaron con 100 μ l del sobrenadante del cultivo o con el anticuerpo purificado (10 μ g/ml) en el tampón del separador de células, y se incubaron durante 30 min en hielo. Las células se lavaron y se incubaron con 100 μ l de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron dos veces, se resuspendieron en 150 μ l de tampón separador de células y luego se analizaron con el FACscan (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

La tinción del FACS de las células 9D demostró que los anticuerpos 4E7.24.3 y 4H6.17.8 reconocieron al receptor DR4 en las células 9D. Los sobrenadantes del hibridoma y los anticuerpos purificados se analizaron por la actividad para inducir apoptosis en las células 9D mediada por DR4. Las células 9D (5×10^5 células/0,5 ml) se incubaron con 5 μ g de mAbs DR4 (4E7.24.3 o 4H6.17.8) o los anticuerpos control IgG en 200 μ l de medio RPMI completo a 4°C

durante 15 minutos. Las células se incubaron durante 5 minutos a 37°C con o sin 10 µg de anticuerpo de cabra anti-IgG Fc de ratón (ICN Pharmaceuticasl) en 300 µl de RPMI completo. En este punto, las células se incubaron durante toda la noche a 37°C y en presencia de CO₂ al 7%. Las células se cosecharon a continuación y se lavaron con PBS. La apoptosis de las células se determinó mediante tinción de la anexina V-FITC que se une a la fosfatidilserina de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Clontech). Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 200 µl de tampón de unión. Se añadieron 10 µl de anexina-V-FITC (1 µg/ml) y 10 µl de yoduro de propidio a las células. Después de la incubación durante 15 minutos en la oscuridad, las células 9D se analizaron por FACS.

Ambos anticuerpos anti-DR4 (en ausencia del anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG de ratón) indujeron la apoptosis en las células 9D comparado con los anticuerpos control. La actividad agonística de ambos anticuerpos anti-DR4, sin embargo, se aumentó mediante unión con el receptor DR4 en presencia del anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG de ratón. Esta apoptosis aumentada por ambos anticuerpos anti-DR4 es comparable con la actividad apoptótica de Apo-2L en las células 9D.

El estudio *in vivo* que examina los efectos del anticuerpo monoclonal 4H6.17.8 más CPT-11 (comparado con los otros grupos de tratamiento indicados en la Figura 2) se condujeron esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 1 anterior, excepto que en los grupos de tratamiento del anticuerpo, anticuerpo anti-DR4, 4H6, (5 mg/Kg; preparado tal como se describió más arriba) se administraron por inyección i.p. a los ratones dos veces por semana durante la duración del estudio. En los grupos de tratamiento con Apo-2L, ésta se administró mediante inyección i.p. en los días 0-4 a 60 mg/Kg/día. En los grupos de tratamiento con CPT-11, ésta se administró por vía i.v. en los días 0, 4 y 8 a 80 mg/Kg.

Los resultados se muestran en la Figura 2. Cada agente causó un retraso significativo en la progresión tumoral. La combinación de Apo-2L o el anticuerpo monoclonal anti-DR4 con CPT-11 causó una regresión tumoral, con un tiempo de retraso mucho mayor para la progresión tumoral comparado con los tratamientos con únicamente el agente. El anticuerpo monoclonal anti-DR4 fue más efectivo que el Apo-2L, tanto como agente único o en combinación con CPT-11. Una respuesta parcial (el tumor disminuyó en más del 50% de su valor inicial) tuvo lugar en todos los ratones tratados con el anticuerpo anti-DR4 más CPT-11, pero sólo 6 de 10 ratones tratados con Apo-2L más CPT-11. Estos resultados muestran que los agonistas del receptor de Apo-2L cooperan sinérgicamente con CPT-11 para inhibir la progresión tumoral más allá de la suma aditiva de los efectos de tratamientos con un agente único.

Depósito del material

Los materiales siguientes se han depositado en el American Type Culture Collection, 1080 University Boulevard, Manassas, Virginia, USA (ATCC):

Material	Depósito ATCC número	Fecha del depósito
4E7.24.3	HB-12454	13 de Enero de 1998
4H6.17.8	HB-12455	13 de Enero de 1998
1H5.25.9	HB-12695	1 de Abril de 1999
4G7.18.8	PTA-99	21 de Mayo de 1999
5G11.17.1	HB-12694	1 de Abril de 1999
3F11.39.7	HB-12456	13 de Enero de 1998
3H3.14.5	HB-12534	2 de Junio de 1998

El depósito se realizó según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional de Depósito de Microorganismos para Procedimientos de Patentes y sus Regulaciones (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años desde la fecha del depósito. El depósito estará disponible por ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest y sometido a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegure la disponibilidad permanente y no restringida de la progenie del cultivo del depósito para el público tras la expedición de la patente pertinente americana U.S. o la solicitud de patente foránea, quien fuera la que haya aparecido primero, y asegure la viabilidad de la progenie al responsable determinado por el Comisionado Americano U.S. de Patentes y Marcas a de acuerdo con la Sección 35 USC 122 y las normas del Comisionado (incluyendo la Sección 37 CFR 1.14 con particular referencia a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha acordado de que si un cultivo de los materiales en depósito muere o se pierde o se destruye cuando se cultiva en las condiciones adecuadas, los materiales se reemplazarán prontamente tras notificación con otro de lo mismo. La disponibilidad del material depositado no debe considerarse como una licencia para practicar la invención en contravención de los derechos garantizados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

La descripción escrita en la presente invención se considera suficiente para permitir a un experto en la materia la práctica de la invención. La presente invención no debe estar limitada en el ámbito de la invención. Incluso, diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas aquí serán evidentes a los expertos en la materia a partir de la descripción proporcionada más arriba y se hallan dentro del ámbito de las reivindicaciones anexadas.

REIVINDICACIONES

1. Utilización del anticuerpo agonístico anti-receptor del ligando de Apo-2 en la fabricación de un medicamento para la inducción de apoptosis en células de cáncer de mamífero, donde el medicamento está destinado a la administración concurrente o secuencial con una cantidad sinérgicamente efectiva de CPT-11.
2. Utilización de CPT-11 en la fabricación de un medicamento para la inducción de apoptosis en células de cáncer de mamífero, donde el medicamento está destinado a la administración concurrente o secuencial con una cantidad sinérgicamente efectiva de anticuerpo agonístico anti-receptor del ligando de Apo-2.
3. Utilización de una cantidad sinérgicamente efectiva del anticuerpo agonístico anti-receptor del ligando de Apo-2 y CPT-11 en la fabricación de un medicamento para la inducción de apoptosis en células de cáncer de mamífero.
4. Procedimiento de inducción de apoptosis en células de cáncer de mamífero en el cultivo celular o *ex vivo*, que comprende la exposición de células cancerosas de mamífero en el cultivo celular o *ex vivo* con una cantidad sinérgicamente efectiva de anticuerpo agonístico anti-receptor del ligando de Apo-2 y CPT-11.
5. Utilización o procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho anticuerpo agonístico comprende un anticuerpo anti-receptor DR4.
6. Utilización o procedimiento según la reivindicación 5, donde dicho anticuerpo anti-receptor DR4 es un anticuerpo monoclonal.
7. Utilización o procedimiento según la reivindicación 6, donde dicho anticuerpo monoclonal anti-receptor DR4 comprende un anticuerpo quimérico.
8. Utilización o procedimiento según la reivindicación 6, donde dicho anticuerpo monoclonal anti-receptor DR4 comprende un anticuerpo humano.
9. Utilización o procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho anticuerpo agonístico comprende un anticuerpo anti-receptor DR5.
10. Utilización o procedimiento según la reivindicación 9, donde dicho anticuerpo anti-receptor DR5 es un anticuerpo monoclonal.
11. Utilización o procedimiento según la reivindicación 10, donde dicho anticuerpo monoclonal anti-receptor DR5 comprende un anticuerpo quimérico.
12. Utilización o procedimiento según la reivindicación 10, donde dicho anticuerpo monoclonal anti-receptor DR5 comprende un anticuerpo humano.
13. Utilización o procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho anticuerpo agonístico anti-receptor del ligando de Apo-2 es un anticuerpo que reacciona de forma cruzada con más de un receptor del ligando de Apo-2.
14. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el medicamento está destinado a la administración con uno o más agentes inhibidores del crecimiento.
15. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el medicamento está destinado a la administración con radioterapia.
16. Procedimiento según la reivindicación 4, que además comprende la exposición de las células cancerosas a uno o más agentes inhibidores del crecimiento.
17. Procedimiento según la reivindicación 4, que además comprende la exposición de las células cancerosas a radiación.
18. Utilización o procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde las células cancerosas comprenden las células de cáncer colorectal.
19. Cantidad sinérgicamente efectiva del anticuerpo agonístico anti-receptor del ligando de Apo-2 y de CPT-11 para la administración concurrente o secuencial en un procedimiento de tratamiento médico.
20. Composición que comprende una cantidad sinérgicamente efectiva del anticuerpo agonístico anti-receptor del ligando de Apo-2 y CPT-11 en un vehículo.
21. Equipo que comprende una cantidad sinérgicamente efectiva del anticuerpo agonístico anti-receptor del ligando de Apo-2 y CPT-11 para la administración concurrente o secuencial en el tratamiento del cáncer en un mamífero.

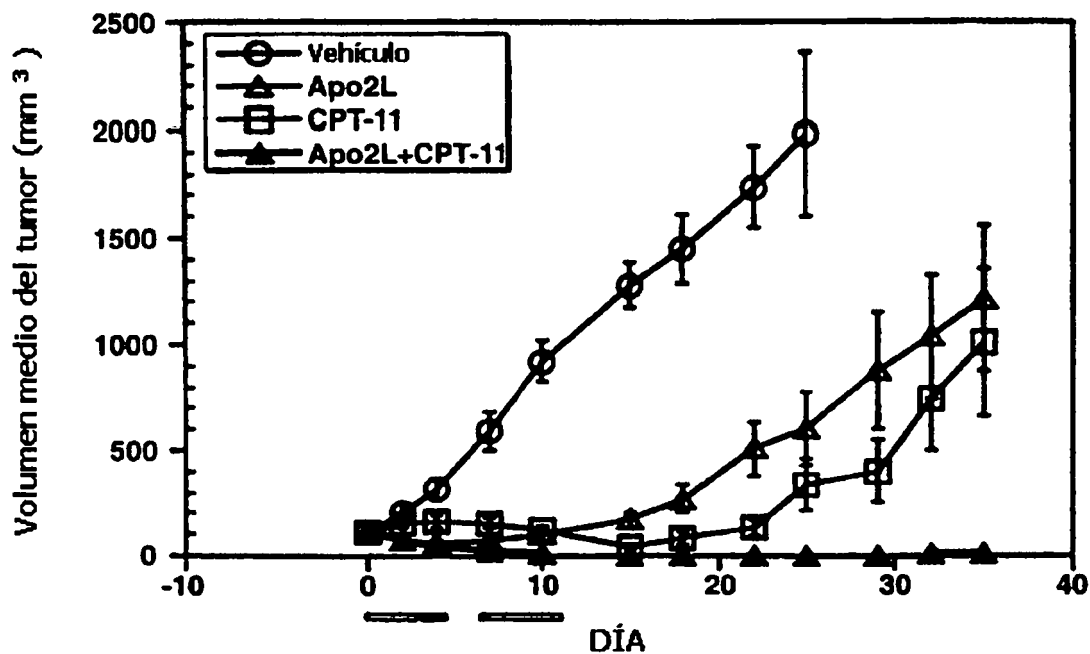


FIG._1

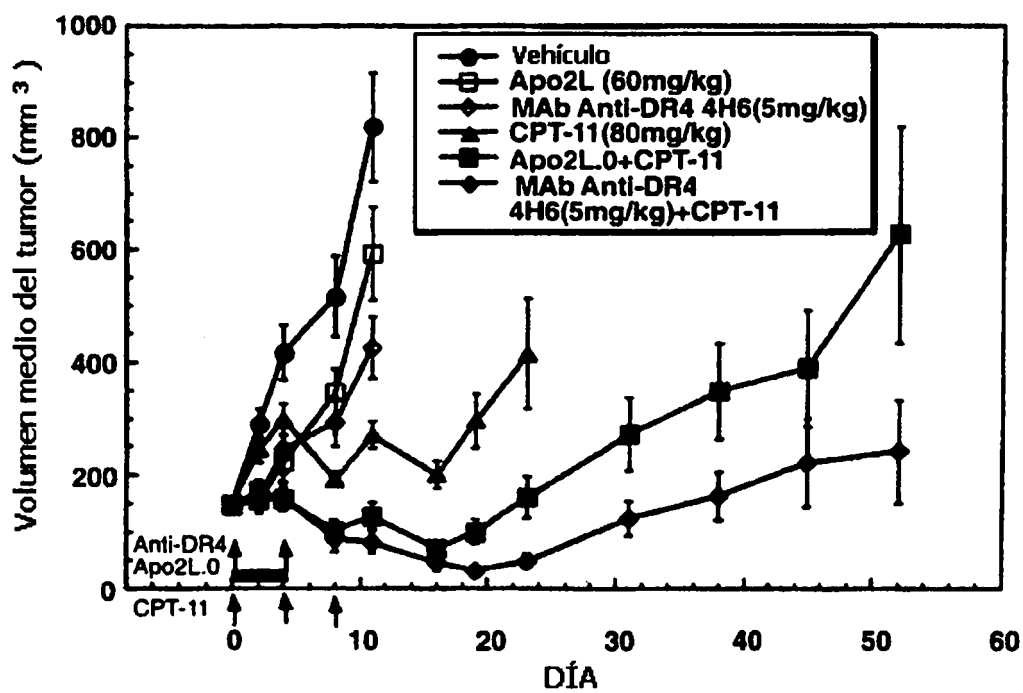


FIG._2