



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 291 626**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03716239 .3**

(86) Fecha de presentación : **12.03.2003**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1490405**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2004**

(54) Título: **Anticuerpos humanos de ligando anti-hFas antagonista y fragmentos asociados.**

(30) Prioridad: **21.03.2002 US 367054 P**
10.09.2002 US 409768 P

(73) Titular/es: **ELI LILLY AND COMPANY**
Lilly Corporate Center
Indianapolis, Indiana 46285, US

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

(72) Inventor/es: **Lancaster, Joanne, Sloan**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 291 626 T3

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

Anticuerpos humanos de ligando anti-hFas antagonista y fragmentos asociados.

5 El ligando Fas (“FasL”) es una proteína que induce la apoptosis de una célula que expresa el antígeno Fas (“Fas”). Se cree que se puede inducir la apoptosis de las células que expresa el antígeno Fas por el enlace del FasL con el Fas de la superficie celular, lo que da como resultado la transferencia de una señal de apoptosis a la célula mediante el antígeno Fas. El ácido nucleico y las secuencias de proteína de los FasL de origen humano, de ratón y de rata se describen en la Patente de los Estados Unidos Nº 6.348.334 (que se incorpora por referencia en el presente documento).

10 El ligando Fas humano (“hFasL”) es un aminoácido de 40 kDa, una proteína enlazada a membrana de tipo II que es miembro de la familia TNF. Los FasL enlazados a membrana se pueden romper mediante metaloproteinasas para generar FasL soluble, que es principalmente un homotímero unido de forma no covalente (Mariani, y col., Eur. J. Immunol. 25:2303-7 (1995); Kayagaki, y col., J. Exp. Med. 182:1777-83 (1995); Tanaka, y col., EMBO 14(6):1129-15 35 (1995)). El FasL soluble parece ser menos citotóxico que el FasL enlazado a membrana (Nagata, Annu. Rev. Genet. 33:29-55 (1999)).

20 El FasL se expresa predominantemente en células T activadas y en células asesinas naturales (NK), mientras que el Fas se expresa en diferentes tipos de células (Hanabuchi, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4930-4 (1994); Suda, y col., J. Immunol. 154:3806-13 (1995); Arase, y col., J. Exp. Med. 181:1235-8 (1995)). La ruta de señalización Fas-FasL es importante en la modulación de las respuestas inmunes por inducción de la apoptosis celular. Recientemente se ha informado de que el FasL era un quimoatractor potente de neutrófilos, sugiriendo una función proinflamatoria de esta molécula. La ruta de señalización Fas-FasL ha sido implicada también en la patogénesis de múltiples enfermedades, entre las que se incluyen enfermedades autoinmunes, trastornos renales, sepsis, hepatitis vírica, VIH, gripe y enfermedad injerto versus huésped (consultar, por ejemplo, Krammer, y col., Immunol. Rev. 142:175-91 (1994); Nagata y Golstein, Science 267:1449-56 (1995); Yagita, y col., Immunol. Rev. 146:223-39 (1995); Elovaara, y col., Acta Neuropathologica, 98(4):355-62 (1999); Leroy, X. y col., APMIS, 109(6):469-73, 2001).

30 Se han descrito anticuerpos del hFasL comprendiendo secuencias de anticuerpos de ratón, así como especies de anticuerpos químéricos que tienen una fracción de la secuencia de un anticuerpo humano (*consultar, por ejemplo*, la Publicación de Patente Internacional Nº WO 95/18819 y las Patentes de los Estados Unidos con nros. 6.114.507 y 6.348.334 y 6.096.312, que se incorporan por referencia en el presente documento). Sin embargo, hay numerosos problemas inmunogénicos en el uso de anticuerpos químéricos. La producción de anticuerpos humanizados (es decir, químéricos) mediante tecnología de ADN recombinante consigue resultados inciertos, dando como resultado anticuerpos con afinidades de enlace impredecibles. La Patente de los Estados Unidos Nº 6.348.334 describe de forma no representativa anticuerpos dirigidos a FasL, sin embargo, no describe de forma específica las propiedades estructurales de dichos anticuerpos.

40 Los anticuerpos humanos, tal como se describen en el presente documento, son ventajosos sobre los anticuerpos no humanos y los anticuerpos humanizados, químéricos para uso en terapia en seres humanos por diversas razones. Un anticuerpo monoclonal humano, es decir, un anticuerpo que es completamente humano, es menos propenso a inducir una respuesta inmune en seres humanos que los anticuerpos que contienen porciones no humanas. Además, un anticuerpo humano es menos propenso a ser reconocido como un anticuerpo “extraño” en seres humanos. Esto dará como resultado una eliminación más lenta del anticuerpo humano del cuerpo que un anticuerpo no humano o parcialmente humano. De acuerdo con ello, se puede administrar un anticuerpo humano a dosis inferiores, o menos a menudo, que los anticuerpos no humanos o parcialmente humanos.

50 Para minimizar el potencial de reactividad por cruce de especies, existe necesidad de anticuerpos humanos frente a FasL, en particular FasL humano, con mayor afinidad de enlace con el FasL y la capacidad de interrumpir o antagonizar la actividad de la ruta de señalamiento Fas-FasL *in vitro* e *in vivo*. La presente memoria describe anticuerpos humanos terapéuticamente útiles, y porciones de los mismos enlazantes con antígeno, dirigidos contra el hFasL y caracterizados por una elevada afinidad de enlace con los polipéptidos hFasL, cinética de disociación lenta, y la capacidad de interrumpir o antagonizar al menos una actividad *in vitro* y/o *in vivo* asociada con los polipéptidos hFasL.

55 La presente invención proporciona anticuerpo humanos aislados anti-hFasL y porciones de los mismos enlazantes con antígeno. Los anticuerpos de la invención se caracterizan por una elevada afinidad de enlace con un polipéptido hFasL, cinética de disociación lenta, y la capacidad de antagonizar al menos una actividad *in vitro* y/o *in vivo* asociada con un polipéptido hFasL.

60 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo humano anti-hFasL aislado, o una porción del mismo enlazante con un antígeno que tiene una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR) y que comprende al menos dos polipéptidos que tienen una secuencia seleccionada entre las SEC. de ID. N°s 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, y 24, en el que dicho anticuerpo tiene una K_D inferior a 1×10^{-9} M.

65 Preferiblemente, se seleccionan al menos 3, 4, 5 ó 6 polipéptidos, en el que dichos polipéptidos preferiblemente existen en dicho anticuerpo en la misma posición CDR que se muestra en las Tablas 1, 2, ó 3 del presente documento.

ES 2 291 626 T3

Preferiblemente, la LCVR comprende un polipéptido con la secuencia mostrada en la SEC. de ID. Nº 2.

Preferiblemente, la LCVR comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 2 y la HCVR comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 10

5 De forma alternativa, la LCVR comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 2 y la HCVR comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 18.

10 De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, la región LCVR CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 4.

Preferiblemente, la región LCVR CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 6.

15 Preferiblemente, la región LCVR CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 8.

De acuerdo con otra forma de realización de la presente invención, se proporciona una región LCVR CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 4 y una región LCVR CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 6.

20 Preferiblemente, la región LCVR CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 4 y la región LCVR CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 8.

Preferiblemente, la región LCVR CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 6 y la región LCVR CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 8.

25 De forma más preferible, la región HCVR CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 12 ó 20.

30 Preferiblemente, la región HCVR CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 14 ó 22.

Preferiblemente, la región HCVR CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 16 ó 24.

35 De acuerdo con otra forma de realización de la presente invención, se proporciona una región HCVR CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 14 ó 22, y una región HCVR CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 16 ó 24.

40 Preferiblemente, la región HCVR CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 12 ó 20, y la región HCVR CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 14 ó 22.

Más preferiblemente, la región HCVR CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 12 ó 20, y la región HCVR CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. de ID. Nº 16 ó 24.

45 El anticuerpo aislado de acuerdo con la presente invención tiene una región constante de cadena pesada IgG1 De forma alternativa, el anticuerpo aislado de acuerdo con la presente invención tiene una región constante de cadena pesada IgG4.

50 Preferiblemente, la porción enlazante con el antígeno de la presente invención es un fragmento Fab. De forma alternativa, la porción enlazante con el antígeno de la presente invención es un fragmento F(ab')₂ o un fragmento Fv de cadena única.

55 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, el polinucleótido comprende al menos dos polinucleótidos que tienen una secuencia seleccionada entre las SEC. de ID. Nºs 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, y 23 y variantes de los mismos, según permita la degeneración del código genético.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un vector que contiene la molécula de ácido nucleico anteriormente mencionada.

60 Preferiblemente, el vector es un vector de expresión recombinante.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona una célula huésped que comprende el vector anteriormente mencionado el cual se ha incorporado de manera parcial o total al cromosoma de la célula huésped.

65 El anticuerpo humano anti-hFasL, o porción del mismo enlazante con un antígeno, se puede sintetizar cultivando una célula huésped de la invención en un medio de cultivo tal que se exprese en la célula un anticuerpo humano anti-hFasL o porción del mismo enlazante con un antígeno, de la presente invención.

ES 2 291 626 T3

El polipéptido de la presente invención, es decir, un anticuerpo humano anti-hFasL o porción del mismo enlazante con un antígeno, se puede preparar cultivando una célula huésped adecuada de la invención que comprende un vector de expresión de la invención en condiciones que promuevan la expresión del polipéptido, y purificar dicho polipéptido. Se contempla que dicha purificación puede ser procedente del la célula huésped, del medio de cultivo en el que se hace crecer la célula huésped o de ambos.

5 Poniendo en contacto el hFasL con un anticuerpo humano anti-hFasL (o porción del mismo enlazante con un antígeno) de la presente invención, se puede inhibir la actividad del hFasL.

10 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humano anti-hFasL o porción del mismo enlazante con un antígeno, de la invención. Se contempla que una composición farmacéutica de la invención puede comprender más de un anticuerpo humano anti-hFasL de la invención.

15 Una composición farmacéutica de la invención puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 La invención también realiza un procedimiento para neutralizar la actividad del FasL y un procedimiento para tratar o prevenir un trastorno en el que la actividad del FasL resulta perjudicial, que comprende administrar a un sujeto necesitado de la misma, una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica de la invención. En las formas de realización preferidas, los trastornos en los que la actividad del FasL resulta perjudicial son síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, sepsis, síndrome de disfunción multiorgánica, síndrome de estrés respiratorio agudo, sepsis grave, trauma, enfermedad injerto versus huésped, rechazo de órganos asociada con el trasplante de órganos, esclerosis múltiple, fibrosis idiopática pulmonar, osteoartritis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de 25 Crohn, colitis ulcerosa, infarto de miocardio agudo, cardiomiopatía, lesión por reperfusión cardiaca, diabetes, cánceres (preferiblemente tipos de cáncer que expresan o sobreexpresan FasL como mecanismo para evadir la respuesta inmune, entre los tipos de cáncer contemplados se incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de colon, NSCLC, linfoma y carcinoma hepatocelular), virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la gripe, 30 trastornos hepáticos entre los que se incluyen, pero no se limitan a, hepatitis vírica fulminante B o C, virus de la hepatitis C crónica, virus de la hepatitis B crónica, hepatitis alcohólica, cirrosis hepática, o trastornos renales entre los que se incluyen, pero no se limitan a enfermedad renal crónica, enfermedad renal grave y neuropatía diabética.

35 En otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un anticuerpo humano, y composiciones que comprenden el anticuerpo humano, producido mediante el hibridoma depositado como ATCC PTA-4017 o el hibrido- 40 ma depositado como ATCC PTA-4018 en la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia.

La invención no se limita a las formas de realización concretas descritas a continuación, ya que se pueden realizar variaciones de las formas de realización concretas, y sigue quedando en el ámbito de las reivindicaciones adjuntas. De esta forma, el alcance de la presente invención se establecerá mediante las reivindicaciones adjuntas.

45 Un anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina compuesta por cuatro cadenas de polipéptido, dos cadenas pesadas (H) (aproximadamente 50-70 kDa cuando es de longitud completa) y dos cadenas ligeras (L) (aproximadamente 25 kDa cuando es de longitud completa) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Las cadenas ligeras se clasifican en kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican en gamma, mu, alfa, delta, o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, respectivamente. Cada cadena pesada está compuesta de una 50 región variable de cadena pesada (que se abrevia en el presente documento como HCVR) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está constituida por tres regiones (CH1, CH2, y CH3) para IgG, IgD, y IgA; y 4 regiones (CH1, CH2, CH3, y CH4) para IgM y IgE. Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de cadena ligera (que se abrevia en el presente documento como LCVR) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está constituida por una región, CL. Las regiones HCVR y LCVR 55 se pueden subdividir de forma adicional en regiones de hipervariabilidad, denominada regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada HCVR y LCVR está compuesto por CDR y cuatro FR, ordenadas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La asignación de los aminoácidos a cada región se realiza de acuerdo con convenciones bien conocidas (Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991); Chothia, y col., J. Mol. Biol. 196:901-17 (1987); Chothia, y col., Nature 342:878-83 (1989)). La capacidad funcional del anticuerpo para enlazar con un antígeno concreto está ampliamente determinada por los CDR.

60 El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo monoclonal *per se*. Un anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo humano, anticuerpo químico y/o anticuerpo humanizado. Un anticuerpo monoclonal puede ser un fragmento Fab, fragmento Fab' o fragmento F(ab')2 de un anticuerpo humano, anticuerpo químico y/o anticuerpo humanizado. Además, un anticuerpo monoclonal puede ser fragmento de FV de cadena única.

65 El término "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, es (i) un anticuerpo intacto, (ii) un anticuerpo sustancialmente intacto, (iii) una porción de anticuerpo que comprende un emplazamiento de enlace con el antígeno, o (iv) una porción de un anticuerpo que comprende un fragmento Fab, fragmento Fab' o F(ab')2, que

ES 2 291 626 T3

tiene regiones variables y constantes codificadas mediante la información de la secuencia de ácido nucleico que se encuentra en la región de inmunoglobulina de la línea germinal humana o en formas recombinadas y/o mutadas de las mismas, ya se produzcan o no dichos anticuerpos en células humanas. El término “anticuerpo humano” incluye también un anticuerpo humano diseñado mediante ingeniería genética para tomar la forma de un fragmento de cadena única de FV.

5 Los anticuerpos químéricos, humanizados o injertados en CDR que contienen al menos una región Fc, FR, o CDR no humana, no son anticuerpos humanos tal como se define en el presente documento.

10 El término “hFasL” se refiere a un Ligando Fas humano, un miembro de la familia de ligandos del factor de necrosis del tumor que se describe en Suda, y col., Célula 75:1169-78 (1993). La función del hFasL se describe de forma adicional en Krammer, y col., Immunol. Rev. 142:175-91 (1994); Nagata y Golstein, Science 267(5203):1449-56 (1995); y Yagita, y col., Immunol. Rev. 146:223-39 (1995). Se pretende que el término “Ligando Fas” abarque hFasL así como los homólogos de hFasL derivados de otras especies. Se pretende que los términos “hFasL” y “FasL” incluyan las formas de los mismos que se pueden preparar mediante procedimientos convencionales de expresión recombinante, o conseguirse por vía comercial (Alexis[®] Biochemicals, Nº de catálogo 522-001), así como generarse de forma sintética.

15 El término “soluble”, cuando se usa en unión con FasL, se refiere a una forma escindida de una forma de FasL “asociado con membrana” o “enlazado a membrana”. FasL soluble describe los fragmentos solubles que contienen al menos una porción de la región extracelular del FasL enlazado a membrana. El FasL soluble se genera mediante escisión con metaloproteinasa en un emplazamiento específico de la región extracelular del FasL, dando como resultado una molécula soluble (Hohlbaum, y col., J. Exp. Med. 191(7):1209-20 (2000); Tanaka, y col., Nat. Med. 2(3):317-22 (1996); y Kayagaki, y col., J. Exp. Med. 182(6):1777-83 (1995)). Al igual que la forma enlazada con la membrana, el FasL soluble es capaz de inducir la apoptosis tras el enlace con Fas.

20 Las frases “propiedad biológica” o “característica biológica”, o los términos “actividad” o “bioactividad”, en referencia a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención, se usan de manera intercambiable en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, afinidad de epitopo y especificidad (por ejemplo, anticuerpo humano anti-hFasL que enlaza con hFasL), capacidad de antagonizar la actividad del polipéptido diana *in vivo* y/o *in vitro* (por ejemplo, bioactividad de FasL), la estabilidad *in vivo* del anticuerpo y las propiedades inmunogénicas del anticuerpo. Otras propiedades o características biológicas identificables del anticuerpo reconocidas en la técnica incluyen, por ejemplo, reactividad cruzada (es decir, con homólogos no humanos del polipéptido diana o con otras proteínas o tejidos, generalmente), y capacidad para conservar niveles de expresión elevados de la proteína en células de mamífero. Las propiedades o características anteriormente mencionadas pueden observarse o medirse usando técnicas reconocidas en la técnica entre las que se incluyen, pero no se limitan a, ELISA, ELISA competitivo, análisis de resonancia del plasmón BIACore[®], ensayos de neutralización, *in vitro* y *in vivo* (por ejemplo, los Ejemplos 1, 2, y 3), e inmunohistoquímica con secciones de tejido procedentes de diferentes fuentes, tales como de ser humano, primate, o cualquier otra fuente que se pueda necesitar.

25 40 El término “epitopo” tal como se usa en el presente documento se refiere a una región de una molécula de proteína a la que se puede enlazar un anticuerpo. Un “epitopo inmunogénico” se define como la parte de una proteína que desencadena una respuesta de anticuerpo cuando toda la proteína es inmunógena. Ver, por ejemplo, Geysen, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002 (1984). Una “porción de enlace con el antígeno” de un anticuerpo, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una región de un anticuerpo que interactúa o se enlaza con un epitopo con el cual el anticuerpo se enlaza con la porción de enlace del antígeno dentro de un anticuerpo. La porción de enlace del antígeno puede existir fuera del contexto del anticuerpo de longitud completa y sigue estando considerado como la porción de enlace del antígeno del cuerpo si gira o no interactuando o uniéndose con el epitopo.

30 45 50 El término “inhibir” o “inhibiendo” significa neutralizar, antagonizar, prohibir, prevenir, restringir, ralentizar, interrumpir, detener o invertir la progresión o gravedad de lo que se inhibe, incluyendo pero sin limitarse a una actividad, estado o dolencia.

55 El término “aislados” cuando se usa en relación a un ácido nucleico o proteína (por ejemplo, un anticuerpo), se refiere a una secuencia de ácido nucleico o proteína que se identifica y separa desde al menos un contaminante (ácido nucleico o proteína, respectivamente) al que está normalmente asociado en su fuente natural. El ácido nucleico o proteína aislado está presente en una forma o selección que es diferente de la que se encuentra en la naturaleza. En contraste, los ácidos nucleicos o proteínas no aislados son los que se encuentran en la naturaleza. Preferiblemente, un “anticuerpo aislado” es un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen distintas especificidades antigenicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que enlaza específicamente con el Ligando hFas sustancialmente libre de anticuerpos que enlanzan específicamente con antígenos distintos al polipéptido del Ligando hFas).

60 Tal como se usa en el presente documento, el término “purificado”, o “purificar”, significa el resultado de cualquier procedimiento que elimine algún contaminante del compuesto del interés, tal como una proteína o ácido nucleico. El porcentaje de un componente purificado de este modo se aumenta en la muestra. En las formas de realización preferidas, el anticuerpo será purificado (1) hasta más del 95% en peso de anticuerpo tal como se determina mediante el procedimiento de Lowry y más preferible más del 99% en peso, y (2) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie, o preferiblemente, tinción de plata.

ES 2 291 626 T3

Los términos “numeración Kabat” y “marcado Kabat” se usan de forma intercambiable en el presente documento. Estos términos, que se reconocen en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de restos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariable) que otros restos de aminoácidos en las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo (Kabat, y col., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat, y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication Nº 91-3242 (1991)).

Un polinucleótido está “enlazado de forma operativa” cuando está colocado en relación funcional con otro polinucleótido. El ADN de una secuencia líder presecuencia o secretaria está enlazado de forma operativa con el ADN de un polipéptido que se expresa en forma de preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o mejorador está enlazado de forma operativa a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia.

Los animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir anticuerpo humano en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena se pueden usar en la invención. La transferencia del gen de la inmunoglobulina de la línea germinal humana en dicha línea germinal de ratones mutantes dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación con antígeno. Consultar, por ejemplo, Jakobovits, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-5 (1993); Jakobovits, y col., Nature 362:255-8 (1993); Bruggemann, y col., Year in Immun. 7:33 (1993); Nature 148:1547-53 (1994), Nature Biotechnology 14:826 (1996); Gross, y col., Nature 404:995-9 (2000); y Patentes de los Estados Unidos con nros. 5.877.397; 5.874.299; 5.814.318; 5.789.650; 5.770.429; 5.661.016; 5.633.425; 5.625.126; 5.569.825; y 5.545.806.

Los anticuerpos humanos se pueden también en librerías de presentación de fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol. 227:381-8 (1992)). Las técnicas de Cole, y col., y de Boemer, y col., están comprendidas también entre aquellas técnicas disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole, y col., Monoclonal Anticuerpos and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); y Boemer, y col., J. Immunol. 147:86-95 (1991)).

Los anticuerpos humanos recombinantes se puede someter también a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de la Ig humana, mutagénesis *in vivo*) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones HCVR y LCVR de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, puesto que derivan de las secuencias HCVR y LCVR relacionadas con la línea germinal humana, pueden no existir de manera natural dentro del repertorio de anticuerpos de la línea germinal humana *in vivo*.

El término “neutralizar” o “antagonizar” en referencia a un anticuerpo anti- FasL o la frase “anticuerpo que antagoniza (o neutraliza) la actividad FasL” o “antagoniza (o neutraliza) FasL” se pretende que se refiera a un anticuerpo, o porción del mismo que enlaza con el antígeno, cuyo enlace con, o entrada en contacto con FasL da como resultado la inhibición de la actividad biológica inducida por los polipéptidos del FasL. Se puede evaluar la inhibición de la actividad biológica del FasL midiendo uno o más indicadores *in vitro* o *in vivo* de la actividad biológica de FasL incluyendo, pero sin limitarse a, la inducción de señalamiento intracelular mediado por FasL, apoptosis, quimiotaxis neutrófila, o inhibición del ligando del receptor en un ensayo del ligando del receptor del FasL. Los indicadores de la actividad biológica de FasL se pueden evaluar mediante uno o más ensayos *in vitro* o *in vivo* conocidos en la técnica. Preferiblemente, se puede evaluar la capacidad de un anticuerpo para neutralizar o antagonizar la actividad del FasL mediante apoptosis mediada por Fas-FasL.

Los términos “individual”, “sujeto”, y “paciente”, usados de forma intercambiable en el presente documento, se refieren a un mamífero incluyendo pero sin limitarse a, murina, simio, ser humano, animales mamíferos de granja, animales mamíferos deportivos, y mamíferos mascota.

El término “ K_{off} ”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad para la disociación de un anticuerpo desde el complejo anticuerpo/antígeno. La constante de velocidad de disociación (K_{off}) de un anticuerpo anti-hFasL humano puede determinarse mediante resonancia superficial de plasmón BIACore® tal como se describe de forma general en el Ejemplo 3. Por lo general, el análisis BIACore® mide las interacciones de enlace en tiempo real entre el ligando (polipéptido recombinante FasL inmovilizado sobre una matriz de biosensores) y analito (anticuerpos en solución) mediante resonancia superficial de plasmón (SPR) usando el sistema BIACore (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). La SPR también se puede realizar inmovilizando el analito (anticuerpos en una matriz de biosensores) y presentando el ligando en solución. Una baja velocidad para el complejo antígeno/anticuerpo se refiere a una K_{off} de $10^{-3}s^{-1}$ o menos, preferiblemente $10^{-4}s^{-1}$ o menos, o incluso más preferiblemente $10^{-5}s^{-1}$ o menos.

El término “ K_D ”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la constante del equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. A efectos de la presente invención, K_D se puede determinar tal como se muestra en el Ejemplo 3. Los anticuerpos con alta avidez y/o afinidad por un epitopo concreto tienen una K_D de $10^{-7} M$ o menos, preferiblemente $10^{-8} M$ o menos, más preferiblemente $10^{-9} M$ o menos.

El término “vector” incluye una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha enlazado incluyendo pero sin limitarse a, plásmidos y vectores víricos. Algunos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se han introducido, mientras que otros vectores se pueden integrar en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la célula huésped y, de esta forma, se replican junto con el genoma del huésped. Más aún, algunos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están

ES 2 291 626 T3

enlazados de forma operativa. Dichos vectores se denominan en el presente documento como “vectores recombinantes de expresión” (o simplemente “vectores de expresión”).

El término “célula huésped” incluye una célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido receptora de cualquier vector recombinante (o vectores recombinantes) o polinucleótido aislados de la invención. Las células huésped incluyen progenie de una única célula huésped, y la progenie no debe ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en ADN complementario total) a la célula pariente original debido a mutación natural, accidental, o deliberada y/o cambio. Una célula huésped incluye una célula transfectada o infectada *in vivo* o *in vitro* con un vector recombinante o un polinucleótido de la invención. Una célula huésped que comprende un vector recombinante de la invención puede denominarse también “célula huésped recombinante”. Preferiblemente, la célula huésped es bacteriana o de mamífero; si es de mamífero, se prefiere una célula CHO, COS, NSO o 293.

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales humanos que son específicos para, y neutralizan, un polipéptido hFasL, fragmento antigénico del mismo, o una actividad hFasL. También se describen los fragmentos de las cadenas ligeras y pesadas que son altamente específicos para, y neutralizan, un polipéptido hFasL, fragmento antigénico del mismo, o una actividad hFasL, preferiblemente el enlace de hFasL a Fas. Esta elevada especificidad para enlazar FasL permite los anticuerpos anti-hFasL humanos, porciones de los mismos enlazantes con antígeno, y anticuerpos monoclonales humanos con dicha especificidad para ser inmunoterapéutico para las enfermedades asociadas con Fas-FasL.

De acuerdo con una forma de realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porción del mismo enlazante con un antígeno, que comprende al menos uno, preferiblemente al menos dos, de las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo constituido por las SEC. DE ID. N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, y 24. Las secuencias representadas en las SEC. DE ID. N°: 4, 6, 8, 12, 14, 16, 20, 22 y 24, cuando están presentes en un anticuerpo de la invención están colocadas de manera preferible en el anticuerpo de la invención en la misma posición CDR que se representa en las Tablas 1, 2 y 3 en el presente documento y tal como se colocan en la SEC. DE ID. N°: 2 (para las SEC. DE ID. N°: 4, 6 y 8), SEC. DE ID. N°: 10 (para las SEC. DE ID. N°: 12, 14, y 16) y SEC. DE ID. N°: 18 (para las SEC. DE ID. N°: 20, 22 y 24).

En otra forma de realización preferida la invención proporciona un anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porción del mismo enlazante con un antígeno, que se enlaza con un polipéptido FasL soluble (o fragmento antigénico del mismo) con una constante del equilibrio de disociación, K_D , de 2×10^{-7} M o menos, más preferiblemente 2×10^{-8} M o menos e incluso más preferiblemente 2×10^{-9} M o menos (tal como se determina mediante resonancia de plasmón de superficie en fase sólida BIACore® a temperatura ambiente), se disocia del es polipéptido FasL con una constante de velocidad k_{off} baja, y tiene la capacidad de antagonizar la actividad de un polipéptido FasL.

Otra forma de realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porción del mismo enlazante con un antígeno, que inhibe la apoptosis mediada por FasL en un ensayo de neutralización *in vitro* con un CI_{50} de 10 nM o menos (alternativamente 9 nM o menos, 8 nM o menos, 7 nM o menos, 6 nM o menos, o 5 nM o menos) para el FasL enlazado a la membrana, o un CI_{50} de 0,2 nM o menos (alternativamente 0,19 nM o menos, 0,18 nM o menos, 0,17 nM o menos, o 0,15 nM o menos) para el FasL soluble. Dicha porción que enlaza con el antígeno de la invención puede existir en solitario o dentro de un anticuerpo humano hFasL. En una forma de realización más preferida, el anticuerpo humano anti-hFasL se enlaza con un polipéptido FasL soluble con una constante del equilibrio de disociación, K_D , de 1×10^{-7} M o menos, más preferiblemente 1×10^{-8} M o menos, incluso más preferiblemente 1×10^{-9} M o menos (tal como se determina mediante BIACore® en fase sólida a temperatura ambiente). Ejemplos de anticuerpos anti-hFasL humanos que cumplen los criterios cinéticos y de neutralización anteriormente mencionados incluyen los anticuerpos 3E1 y 4G11, tal como se describe en los Ejemplos 1, 2, y 3.

El anticuerpo humano anti-hFasL más preferido de la presente invención es el que se denomina en el presente documento como 3E1. El anticuerpo 3E1 tiene LCVR y HCVR que comprenden a polipéptido con una secuencia como se muestra en las SEC. DE ID. N°: 2 y SEC. DE ID. N°: 10, respectivamente (ver las Tablas 1 y 3 en el presente documento). Las secuencias de los polinucleótidos de ejemplo que codifican las LCVR y HCVR de 3E1 se muestran en las SEC. DE ID. N°: 1 y SEC. DE ID. N°: 9, respectivamente.

En otra forma de realización, un anticuerpo anti-hFasL humano preferido es el que se denomina en el presente documento como 4G11. El anticuerpo 4G11 tiene unas LCVR y HCVR que comprende un polipéptido con una secuencia como se muestra en las SEC. DE ID. N°: 2 y SEC. DE ID. N°: 18, respectivamente (ver las Tablas 2 y 3 en el presente documento). Las secuencias de los polinucleótidos de ejemplo que codifican las LCVR y HCVR de 4G11 se muestran en las SEC. DE ID. N°: 1 y SEC. DE ID. N°: 17, respectivamente.

En otra forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo Fab anti-hFasL humano aislado y un fragmento $F(ab')_2$ de anticuerpo anti-hFasL humano que comprende un HCVR que comprende un polipéptido con las secuencias de aminoácidos de las SEC. DE ID. N°: 10 o SEC. DE ID. N°: 18, y que comprende además un LCVR que comprende un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC. DE ID. N°: 2 para cada anticuerpo, 3E1 y 4G11. En otra forma de realización mas, la invención proporciona un anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porciones de los mismos enlazantes con antígeno, que comprende al menos dos, preferiblemente al menos 3, 4 5 ó 6 polipéptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por las SEC. DE ID. N°: 4, 6, 8, 12, 14, 16, 20, 22, y 24. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos como se muestra en las SEC. DE ID. NROS:

ES 2 291 626 T3

4, 12 o 20, cuando aparece en un anticuerpo de la invención, se localiza en el CDR1. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEC. DE ID. N°s: 6, 14 o 22, cuando aparece en un anticuerpo de la invención, se localiza en el CDR2. Y, preferiblemente la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC. DE ID. N°s: 8, 16, o 24, cuando aparece en un anticuerpo de la invención, se localizan en el CDR3. Las formas de realización preferidas 5 proporcionan un anticuerpo anti-hFasL humano aislados, o porción del mismo de enlace con un antígeno, que inhibe la apoptosis inducida por FasL soluble en un ensayo de neutralización *in vitro* con una IC_{50} de 0,5 nM o menos, más preferiblemente aproximadamente 0,3 o menos, más preferiblemente aproximadamente 0,15 nM o menos; o la proliferación o apoptosis inducido por FasL enlazado a membrana en un ensayo de neutralización *in vitro* con una IC_{50} de 10 nM o menos, preferiblemente aproximadamente 9, 8, 7, 6 o 5 nM o menos.

10 La presente invención se dirige también a líneas celulares que producen un anticuerpo anti-hFasL humano descrito en el presente documento. El aislamiento de líneas celulares que producen un anticuerpo monoclonal de la invención puede realizarse mediante técnicas rutinarias de selección conocidas en la técnica. Se han depositado varias líneas celulares que producen un anticuerpo anti-hFasL humano de la presente invención en la ATCC (American Type Culture Collection). Al hibridoma de ratón que segregó la IgG4 kappa humana (procedente de un ratón HuMab-ratón[®]) 3E1 15 se le asignó el número de referencia ATCC PTA-4017, y al hibridoma de ratón que segregó la IgG4 kappa humana (procedente de un ratón HuMab-ratón[®]) 4G11 se le asignó el número de referencia ATCC PTA-4018. Los anticuerpos anti-hFasL humanos de la presente invención más preferidos tienen la misma, o una sustancialmente similar, secuencia de aminoácidos con al menos 2, 3, 4, 5 ó 6 regiones hipervariables (es decir, CDR) están presentes en uno o más de 20 los anticuerpos anteriormente mencionados depositados en la ATCC.

30 Se puede usar una amplia variedad de sistemas de expresión huésped para expresar anticuerpo de la presente invención entre los que se incluyen sistemas de expresión procariotas (bacterianos) y eucariotas (tales como levadura, baculovírica, de planta, mamífero y otras células animales, animales transgénicos y células de hibridoma, así como en sistemas de expresión de presentación de fagos. Un ejemplo de vector de expresión bacteriano adecuado es pUC119 (Sfi), y un ejemplo de vector de expresión procariota adecuado es pcADN3.1 modificado con un sistema de selección DHFR debilitado. Se conocen en la técnica otros sistemas de expresión de anticuerpo, y se contemplan en el presente documento. Se conocen en la técnica numerosas células huésped de mamífero, incluyendo pero sin limitarse a, células COS, CHO, NSO y 293.

35 Un anticuerpo de la invención puede prepararse a partir de la expresión recombinante de los genes de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina en una célula huésped. Para expresar de manera recombinante un anticuerpo, se transfecita una célula huésped con uno o más vectores recombinantes de expresión que transportan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo de forma que dichas cadenas ligera y pesada se expresen en la célula huésped. Preferiblemente, los anticuerpos recombinantes se secretan en el medio en el que se cultivan las células huésped, a partir del cual pueden recuperarse los anticuerpos. Se usan metodologías convencionales de ADN recombinante para obtener los genes de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo, para incorporar dichos genes en los vectores recombinantes de expresión, y para introducir los vectores en las células huésped. Dichas metodologías convencionales de ADN recombinante se describen en, por ejemplo, Sambrook, Fritsch, y Maniatis (Eds.), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989); Ausubel, y col. (Eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989); y en la Patente de los Estados Unidos N° 4.816397 de Boss, y col.

45 Un ADN aislado que codifica una región HCVR puede ser convertido a un gen de cadena pesada de longitud completa enlazando de forma operativa el ADN que codifica la HCVR a otra molécula de ADN que codifica los genes de la región constante de cadena pesada (CH1, CH2, y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de cadena pesada humana se conocen en la técnica. Consultar, por ejemplo, Kabat, y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242 (1991). Los fragmentos de ADN que abarcan dichas regiones se pueden obtener mediante amplificación 50 convencional por PCR. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD y cualquier variante alotípica de la misma tal como se describe en Kabat (*supra*), pero más preferiblemente es una región constante IgG4 o un IgG1. De manera alternativa, la porción que enlaza con el antígeno puede ser un fragmento de Fab, un fragmento de F(ab')₂, o un fragmento de Fv (scFv) de cadena sencilla. Para un fragmento de Fab de gen de cadena pesada, el ADN que codifica HCVR puede ser enlazado de forma operativa a otra molécula de ADN que codifique únicamente una región constante CH1 de cadena pesada.

60 Un ADN aislado que codifica una región LCVR puede ser convertido a un gen de cadena ligera de longitud completa (tal como un gen Fab de cadena ligera) enlazando de forma operativa el ADN que codifica la LCVR a otra molécula de ADN que codifica los genes de la región constante de cadena ligera, CL. Consultar, por ejemplo, Kabat, *supra*. Los fragmentos de ADN que abarcan dichas regiones se pueden obtener mediante amplificación convencional por PCR. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

65 Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifica los HCVR- y LCVR se enlanzan de forma operativa a otro fragmento que codifica un enlazante flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de forma tal que las secuencias HCVR y LCVR se pueden expresar en forma de proteína de cadena única contigua sencilla, con las regiones LCVR y HCVR unidas en el enlazante flexible. Consultar, por ejemplo, Bird, y col., Science 242:423-6 (1988); Huston, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83 (1988); McCafferty, y col., Nature 348:552-4 (1990).

ES 2 291 626 T3

Para expresar un anticuerpo de la invención, un ADN que codifica una cadena ligera y/o pesada de longitud parcial o completa, obtenido tal como se ha descrito más arriba, se inserta en un vector de expresión de forma que el gen queda enlazado de forma operativa a secuencias de control de transcripción y traducción. En este contexto, el término “enlazado de forma operativa” significa que un gen de anticuerpo se une dentro de un vector de forma que

- 5 las secuencias de control de transcripción y traducción dentro del vector actúan con su función pretendida de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. Las secuencias del vector de expresión y de control de expresión se eligen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vectores diferentes o, más normalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante 10 procedimientos convencionales. Adicionalmente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo anti-hFasL humano procedente de una célula huésped. El gen de las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo anti-hFasL humano se puede clonar en el vector de forma tal que el péptido señal está enlazado de forma operativa en el marco con el amino final del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo.

- 15 Además de(del) los gen(es) de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo, un vector de expresión recombinante de la invención lleva secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de las cadenas del anticuerpo en la célula huésped. El término “secuencia reguladora” se pretenda que incluya promotores, mejoradores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación), según sea necesario, que controlen la transcripción 20 o traducción de(de los) gen(es) de la cadena del anticuerpo. El diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en célula huésped de mamífero incluye elementos víricos que dirigen la expresión de elevados niveles de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o mejoradores derivados del citomegalovirus (CMV), Virus 40 de simio (SV40), adenovirus, 25 (por ejemplo, el promotor principal tardío de adenovirus (AdMLP)) y virus del poliomielitis.

Además de los genes de cadena pesada y/o ligera y secuencias reguladoras, vectores recombinantes de expresión de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación de las células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y uno o más genes marcadores que se pueden seleccionar. El gen marcador que se puede seleccionar facilita la selección de las células huésped en las que se ha introducido el vector. Por ejemplo, típicamente, el gen marcador que se puede seleccionar confiere resistencia a fármacos, tales como tal como G418, higromicina, o metotrexato, a la célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores que se pueden seleccionar preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped DHFR-menos con selección/amplificación con metotrexato), el gen *neo* (para selección con G418), y la glutamino 35 sintetasa (GS) en una línea celular GS-negativa (tal como NS0) para selección/amplificación.

Para la expresión de las cadenas ligera y/o pesada, el(los) vector(es) de expresión(s) que codifica(n) las cadenas pesada y/o ligera se transfetta al interior de una célula huésped mediante técnicas convencionales, *por ejemplo*, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección en DEAE-dextrano, y similares. Aunque es teóricamente 40 posible expresar los anticuerpos de la invención tanto en células huésped procariotas como eucariotas, se usan células eucariotas, y más preferiblemente las células huésped de mamífero, porque es más posible que dichas células ensamblen y segreguen un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo. Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen ovario de hámster chino (Chinese Hamster Ovary (células CHO) (incluyendo células DHFR-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20 (1980), usados con un marcador que se puede seleccionar DHFR, por ejemplo, tal como se describe en Kaufman y Sharp, J. Mol. Biol. 159:601-21 (1982)), células de mieloma NS0, células COS, y células SP2/0. Cuando los vectores recombinantes de expresión que codifican los genes del anticuerpo se introducen en las células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que han crecido las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse de la célula huésped 45 y/o del medio de cultivo usando procedimientos convencionales de purificación.

Las células huésped se pueden usar también para producir partes, o fragmentos, de anticuerpos intactos, por ejemplo, fragmentos de Fab o moléculas scFv. Se entenderá que las variaciones del procedimiento anterior quedan dentro 50 del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifica tanto la cadena ligera como la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo de esta invención. Se puede usar también la tecnología del ADN recombinante para eliminar todo o parte del ADN que codifica tanto cualquiera como ambas cadenas ligera y pesada que no sea necesario para enlazan con el ligando hFas. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncado quedan también abarcadas en los anticuerpos de la invención.

En un sistema preferido de expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo en células DHFR-CHO mediante transfección mediada con fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo están cada uno enlazado de forma operativa con elementos reguladores mejorador/promotor (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, tal como un elemento regulador mejorador CMV/promotor AdMLP o un elemento regulador mejorador SV40/promotor AdMLP para conseguir elevados niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante lleva también un gen DHFR que permite la selección de las células, por ejemplo, células CHO, que se han transfectado con el vector usando 60

ES 2 291 626 T3

selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y se recupera el anticuerpo intacto del medio de cultivo. Se emplean técnicas convencionales de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar los transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Los anticuerpos, o porciones de los mismos enlazantes con antígeno, de la invención se pueden expresar en un animal (por ejemplo, un ratón) que sea transgénico para los genes de la inmunoglobulina humana (consultar, por ejemplo, Taylor, y col., Nucleic Acids Res. 20:6287-95(1992)). También se pueden modificar células de plantas para crear plantas transgénicas que expresen el anticuerpo, o una porción del mismo enlazante con un antígeno, de la invención.

En vista de lo anterior, otra forma de realización de la invención se refiere a composiciones de ácidos nucleicos, vectores, y células huésped que se pueden usar para la expresión recombinante de los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención. Preferiblemente, la invención proporciona ácido nucleicos aislados que comprenden una región que codifica uno o más CDR de 3E1 o 4G11 e incluso más preferiblemente aquellos CDR existen en la proteína expresada (por ejemplo, un anticuerpo o porción del mismo que enlaza con el antígeno) en el mismo emplazamiento CDR dentro de la estructura del anticuerpo según existe en los anticuerpos 3E1 o 4G11. Preferiblemente, la invención proporciona ácido nucleicos aislados que comprenden una región que codifica la región variable de la cadena pesada de 3E1 o 4G11 y/o la región variable de la cadena ligera de 3E1 o 4G01. De acuerdo con ello, en una forma de realización, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que comprende una región variable de la cadena pesada del anticuerpo de la cadena pesada CDR3 de 3E1 con una secuencia como la que se muestra en las SEC. DE ID. Nº: 16 y/o una cadena pesada CDR2 con una secuencia como la que se muestra en las SEC. DE ID. Nº: 14 y/o la cadena pesada CDR1 de 3E1 con la secuencia que se muestra en la SEC. DE ID. Nº: 12. Lo más preferible, el ácido nucleico aislado codifica un polipéptido que comprende una región variable de la cadena pesada del anticuerpo con una secuencia como la que se muestra en las SEC. DE ID. Nº: 10 (la región completa HCVR de 3E1).

En otra forma de realización, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que comprende una región variable de la cadena pesada 4G11 de la cadena pesada CDR3 con una secuencia como la que se muestra en las SEC. DE ID. Nº: 24 y/o la cadena pesada 4G11 de la cadena pesada CDR2 con una secuencia como la que se muestra en las SEC. DE ID. Nº: 22 y/o la cadena pesada 4G11 de CDR1 con una secuencia como la que se muestra en la SEC. DE ID. Nº: 20. Incluso más preferible, el ácido nucleico aislado codifica un polipéptido que comprende un región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia que se muestra en la SEC. DE ID. Nº: 18 (la región HCVR completa de 4G11).

Se contempla que la cadena pesada y/o ligera presente en un anticuerpo de la invención puede comprender diferentes combinaciones de los CDR de la invención, por ejemplo, CDR1 y CDR2; CDR1 y CDR3; CDR2 y CDR3; o CDR1, CDR2 y CDR3. (CDR1 con una secuencia como se muestra en las SEC. DE ID. Nºs: 4, 12 o 20; CDR2 con una secuencia como se muestra en las SEC. DE ID. Nºs: 6, 14 o 22; CDR3 con una secuencia como se muestra en las SEC. DE ID. Nºs: 8, 16 o 24). Preferiblemente, las secuencias CDR, cuando aparecen en un anticuerpo de la invención, existen en la misma posición CDR, en un anticuerpo de la invención en que están en los anticuerpos 3E1 o 4G11. Se contempla que el CDR puede aparecer en diferentes cadenas en otros anticuerpos de la invención de manera distinta de cómo lo hacen en los anticuerpos 3E1 o 4G11. Sin embargo, lo más preferible, las secuencias CDR cuando aparecen en un anticuerpo de la invención, aparecen en la misma posición del CDR y en la misma cadena (ligera o pesada) como lo hacen en los anticuerpos 3E1 o 4G11.

En otra forma de realización más, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. DE ID. Nº: 2 (es decir, la LCVR 3E1 o 4G11). Preferiblemente este ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC. DE ID. Nº: 1, aunque las personas expertas en la técnica apreciarán que, debido a la degeneración del código, otras secuencias de nucleótidos pueden codificar la secuencia de aminoácidos de la SEC. DE ID. Nº: 2. El ácido nucleico puede codificar únicamente la LCVR o puede también codificar la región constante de cadena ligera de un anticuerpo, enlazada de forma operativa con la LCVR. En una forma de realización, este ácido nucleico está en un vector de expresión recombinante.

En otra forma de realización más, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. DE ID. Nº: 10 (es decir, la 3E1 de HCVR). Este ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEC. DE ID. Nº: 9, aunque las personas expertas en la técnica apreciarán que, debido a la degeneración del código, otras secuencias de nucleótidos pueden codificar la secuencia de aminoácidos de la SEC. DE ID. Nº: 10. El ácido nucleico puede codificar únicamente la HCVR o puede también codificar la región constante de cadena pesada de un anticuerpo, enlazada de forma operativa con la HCVR. En una forma de realización, este ácido nucleico está en un vector de expresión recombinante

En otra forma de realización más, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. DE ID. Nº: 18 (es decir, la 4G11 de HCVR). Este ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEC. DE ID. Nº: 17, aunque las personas expertas en la técnica apreciarán que, debido a la degeneración del código, otras secuencias de nucleótidos pueden codificar la secuencia de aminoácidos de la SEC. DE ID. Nº: 18. El ácido nucleico puede codificar

ES 2 291 626 T3

únicamente la HCVR o puede también codificar la región constante de cadena pesada de un anticuerpo, enlazada de forma operativa con la HCVR. En una forma de realización, este ácido nucleico está en un vector de expresión recombinante.

5 La invención también proporciona vectores recombinantes de expresión que codifica tanto la cadena pesada de un anticuerpo pesado como la cadena ligera de un anticuerpo. Por ejemplo, en una forma de realización, la invención proporciona un vector de expresión recombinante que codifica:

- 10 a) una cadena pesada de un anticuerpo que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionadas entre el grupo constituido por las SEC. DE ID. N°s: 10 y 18; y
b) una cadena ligera de un anticuerpo que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. DE ID. N°: 2.

15 La invención también proporciona células huésped en las que se han introducido uno o más de los vectores recombinantes de expresión de la invención. Preferiblemente, la célula huésped es una célula huésped de mamífero, más preferiblemente la célula huésped es una célula CHO, una célula NS0 o una célula COS. Aún más, la invención proporciona un procedimiento para sintetizar un anticuerpo humano recombinante de la invención cultivando una célula huésped de la invención un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetiza un anticuerpo humano recombinante de la invención. El procedimiento puede comprender además el aislamiento del anticuerpo humano recombinante desde 20 el medio de cultivo, la célula huésped, o ambos.

25 Una vez expresados, los anticuerpos completos, sus dímeros las cadenas individuales ligera y pesada u otras formas de la inmunoglobulina de la presente invención pueden purificarse de acuerdo con los procedimientos convencionales en la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna de intercambio iónico, afinidad, fase reversa, interacciones hidrófobas, electroforesis en gel y similares. Se prefieren las inmunoglobulinas sustancialmente puras con una homogeneidad de al menos aproximadamente 90 al 95%, y se prefiere más una homogeneidad del 98 al 99%, para uso farmacéutico. Una vez purificado, parcialmente o hasta la homogeneidad deseada, los polipéptidos pueden usarse a continuación de forma terapéutica o profiláctica, tal como se declara en el presente documento.

30 Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la presente invención pueden incorporarse a composiciones farmacéuticas adecuadas para su dosificación a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. 35 Las composiciones farmacéuticas para dosificación se diseñan para ser apropiadas para el modo de administración seleccionado, y se usan según sea apropiado diluyentes, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes dispersantes, tampones, tensioactivos, conservantes, agentes de solubilización y similares.

40 Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-hFasL humano de la presente invención puede administrarse a un mamífero en riesgo de padecer patologías asociadas con las interacciones Fas-FasL usando técnicas de dosificación convencionales mediante administración por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual, o en supositorios.

45 Los anticuerpos de la invención pueden incorporarse a una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. Se prefiere la dosificación en el sistema periférico por inyección intravenosa o intraperitoneal o subcutánea. Los vehículos adecuados para dichas inyecciones son corrientes y conocidos en la técnica.

50 Las composiciones farmacéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Por tanto, las composiciones farmacéuticas pueden esterilizarse por filtración tras realizar la formulación, o hacerse microbiológicamente aceptable mediante cualquier otro procedimiento. Una composición típica para infusión intravenosa puede tener un volumen como mucho de 250 ml de fluido, tal como solución de Ringer estéril una concentración de anticuerpo entre 1 y 100 mg/ml, o más. Todos los agentes terapéuticos de la invención pueden congelarse o liofilizarse para almacenamiento, y reconstituirse en un vehículo estéril apropiado antes de uso. La liofilización y reconstitución puede llevar a grados variables de pérdida de actividad del anticuerpo, (por ejemplo, con 55 inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos IgM tienden a tener mayor pérdida de actividad que los anticuerpos IgG). Deben ajustarse las dosificaciones para compensar. Generalmente, se prefiere un pH comprendido entre 6 y 8.

60 El FasL tiene un papel crítico en la patología asociada con una variedad de trastornos que implican factores inmunológicos e inflamatorios. Por tanto, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-hFasL humano de la invención puede usarse para tratar o prevenir enfermedades autoinmunes e inflamatorias incluyendo pero sin limitarse a, son síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, sepsis, síndrome de disfunción multiorgánica, síndrome de estrés respiratorio agudo, sepsis grave, trauma, enfermedad injerto versus huésped, rechazo de órganos asociada con el trasplante de órganos, esclerosis múltiple, fibrosis idiopática pulmonar, osteoartritis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, infarto de miocardio agudo, cardiomiopatía, lesión por reperfusión cardiaca, diabetes, cánceres (preferiblemente tipos de cáncer que expresan o sobreexpresan FasL como mecanismo para evadir la respuesta inmune, entre los tipos de cáncer contemplados se incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de colon, NSCLC, linfoma y carcinoma hepatocelular), virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la gripe, trastornos hepáticos entre los que se incluyen, pero no se limitan a, hepatitis

ES 2 291 626 T3

vírica fulminante B o C, virus de la hepatitis C crónica, virus de la hepatitis B crónica, hepatitis alcohólica, cirrosis hepática, o trastornos renales entre los que se incluyen, pero no se limitan a enfermedad renal crónica, enfermedad renal grave y neuropatía diabética.

5 El uso de un anticuerpo anti-hFasL humano de la presente invención para el tratamiento de al menos uno de los trastornos anteriormente mencionados en los que la actividad del FasL es perjudicial queda también contemplada en el presente documento. Adicionalmente, el uso de un anticuerpo anti-hFasL humano de la presente invención para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de al menos uno de los trastornos anteriormente mencionados en los que la actividad del FasL es perjudicial queda también contemplada.

10 Tal como se usa en el presente documento, los términos “tratamiento”, “tratar”, y similares, se refieren a obtener un efecto deseado farmacológico y/o. El efecto puede ser profiláctico en término se evitar completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma, y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso que se pueda atribuir a la enfermedad. “Tratamiento”, tal como se usa en el presente documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, en particular un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad se desarrolle en un sujeto que esté predisposto a la enfermedad pero que no se haya diagnosticado aún que la padece; (b) inhibiendo la enfermedad, es decir, deteniendo su desarrollo y (c) aliviando la enfermedad, es decir, siendo causa de la regresión de la enfermedad.

20 Una composición farmacéutica de la invención preferiblemente es una “cantidad terapéuticamente efectiva” o una “cantidad profilácticamente efectiva” de un anticuerpo de la invención. Una “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad efectiva, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo puede variar de acuerdo a factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y sexo del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para desencadenar la respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también una en la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo, o porción del mismo enlazante con un antígeno, queda superado por los efectos terapéuticos beneficiosos. Una “cantidad profilácticamente efectiva” se refiere a una cantidad efectiva, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente, puesto que se usa una dosis profiláctica en los sujetos antes de que hayan desarrollado o estén en un estadio temprano de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será inferior a la cantidad terapéuticamente efectiva.

25 Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para conseguir la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar una única pastilla gruesa, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o la dosis puede aumentarse o reducir proporcionalmente según sea indicado según las exigencias de la situación terapéutica.

30 Dada su capacidad para enlazar con el hFasL, los anticuerpos de la invención pueden usarse para detectar los polipéptidos del FasL (por ejemplo, en una muestra biológica tal como suero o plasma) usando un inmunoensayo convencional tal como un enzima enlazado con ensayos inmunosorbentes (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), o inmunohistoquímica tisular. La invención proporciona un procedimiento para detector FasL en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención y detectar tanto el anticuerpo (o porción de anticuerpo) enlazado a hFasL o el anticuerpo (o porción de anticuerpo), no enlazado para detectar el hFasL en la muestra biológica. El anticuerpo se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo enlazado o no enlazado. Entre las sustancias detectables adecuadas se incluyen varios enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. Entre los ejemplos de enzimas adecuados se incluye la peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, betagalactosidasa, o acetilcolinesterasa; entre los ejemplos de grupos prostéticos complejos adecuados se incluye estreptavidina/biotina y avidita/biotina; entre los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados se incluye umbelifera, fluoresceína isotiocianato de fluoresceína, rodamina, díclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de danilo o ficeritriana; un ejemplo de un material luminescente incluye luminol; y los ejemplos de un material radioactivo incluye ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, o ³H.

35 El FasL puede ensayarse en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo competitivo usando patrones de FasL marcados con unas sustancia detectable y un anticuerpo anti-hFasL humano no marcado. En este ensayo, se combinan la muestra biológica, los patrones de FasL marcados y el anticuerpo anti-hFasL humano y se determina la cantidad de patrón FasL marcado enlazado con el anticuerpo no marcado. La cantidad de FasL en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de patrón FasL marcado unido al anticuerpo anti-hFasL humano.

40 Se puede usar un anticuerpo anti-hFasL de la presente invención en un ensayo de diagnóstico respecto de la expresión de FasL. Se pueden usar diferentes técnicas de ensayo de diagnóstico conocidas en la técnica, tales como ensayos de enlace competitivo, ensayos en sandwich ELISA directo o indirecto, y ensayos de inmunoprecipitación realizados en fase tanto homogénea como heterogénea. Consultar, por ejemplo, Zola, Monoclonal Anticuerpos: A Manual de Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158. El anticuerpo usado en el ensayo puede marcarse con un resto que se puede detectar. El resto que se puede detectar debe ser capaz de producir, de forma tanto directa como indirecta, una señal que se puede detectar. Por ejemplo, el resto que se puede detectar puede ser un radioisótopo, ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, o ¹²⁵I, un compuesto fluorescente o quimioluminiscente (tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina), o un enzima (tal como fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. Se puede usar cualquier procedimiento conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo con el resto que se puede detectar.

ES 2 291 626 T3

Ejemplo 1

Actividad funcional determinada usando un ensayo de Jurkat con hFasL soluble

5 Se preparó medio FasL/mejorador a una concentración 4 x. 1 x de medio contiene 50 ng/ml de FasL recombinante humano soluble (Alexis[®] Biochemicals, Nº de catálogo 522-001) y 1 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2 ratón (mejorador; Sigma Chemical Co., Nº de catálogo F-3165) en medio de ensayo celular Jurkat (DMEM:F-12 (3:1), FBS al 10%, HEPES 20 mM, y 50 µg/ml de Gentamicina). Se usó 1 x media como control de “100% de apoptosis”. Se usó el medio celular Jurkat sin FasL o mejorador como control de “0% de apoptosis”.

10 El medio se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Para cada determinación, se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos 25 µl de cualquiera de los medios con ligando Fas mejorado 4 x o una muestra de control. A continuación, se añadieron 25 µl a cada pocillo, bien de muestra de inhibidor (anticuerpo anti-hFasL3E1 o 4G11) o una muestra de control. Esta adición diluyó todas las muestras y medio a la mitad de su concentración original. Las 15 muestras se incubaron de 45 a 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 µl de células Jurkat, a una concentración de 10⁶ células/ml de solución. Esta adición produjo FasL mejorado 1 x a un cuarto de su concentración original y 5 x 10⁴ Jurkat células/pocillo. Las placas se incubaron durante tres horas a 37°C en dióxido de carbono al 5%. Se añadió reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche, Nº de catálogo 1.644.807) a una concentración de 10 µl/pocillo. Las placas se incubaron de nuevo durante aproximadamente 18 horas a 37°C 20 en dióxido de carbono al 5%. A continuación, las placas se leyeron en un lector de placas espectrofotométricas a una longitud de onda óptima de 450 nm. Los resultados indican que ambos anticuerpos anti-hFasL humanos, 3E1 y 4G11, son efectivos para neutralizar la apoptosis mediada por FasL soluble en este ensayo.

25 Ejemplo 2

Ensayo CHO-K1/Jurkat con FasL enlazado a membrana

Se diseño mediante ingeniería genética una línea celular CHO-K1 que expresaba de manera estable una versión de 30 hFasL no escindible, marcada como Del.huFasL CHO-K1, para ensayar la capacidad de los anticuerpos 3E1 y 4G11 para bloquear la actividad del FasL asociado a la membrana. Esta línea celular expresa niveles superficiales de FasL, que cuando se cultiva conjuntamente con las células Jurkat, induce la apoptosis de Jurkat.

35 Se preparó medio de células adherentes CHO-1 usando DMEM:F-12 (3:1), FBS al 5%, 40 µg/ml de L-proline (Sigma), 50 µg/ml de Gentamicin (Sigma), y 600 µg/ml de G418. Para cada determinación se añadieron aproximadamente 10⁴ células CHO-K1 (tanto Del.huFasL o las CHO-K1 parientes) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Las células se incubaron durante toda la noche a 37°C en dióxido de carbono al 5%. El medio se eliminó, y se añadieron a cada pocillo 100 µl tanto de muestra de inhibidor (anticuerpo 3E1 o 4G11; diluciones en serie que cubren un intervalo 40 de concentraciones) como de control (medio). Las placas se incubaron durante una hora a 37°C en dióxido de carbono al 5%. Se añadieron cincuenta microlitros de células Jurkat (2,5 x 10⁵ células/pocillo) a cada pocillo, y las placas se incubaron durante dos horas a 37°C en dióxido de carbono al 5%. Se añadieron diez microlitros de reactivo de proliferación celular WST-1 por pocillo. A continuación, las placas se leyeron en un lector de placas espectrofotométricas a una longitud de onda óptima de 450 nm. Los resultados indican que ambos anticuerpos, 3E1 y 4G11, son efectivos para bloquear la apoptosis mediada por FasL enlazado a la membrana en este ensayo.

45

Ejemplo 3

Medida de la afinidad de los Anticuerpos Monoclonales

50 Se midió la afinidad de varios anticuerpos anti-hFasL respecto de FasL soluble recombinante humano (rhs) (Alexis[®] Biochemicals, Nº de catálogo 522-001) usando un instrumento BIACore[®] 2000. El BIACore[®] usa las propiedades ópticas de resonancia de plasmón de superficie para detectar la alteración en la concentración de proteína en las moléculas que interactúan con una matriz biosensora de dextrano. Excepto cuando se indica, todos los reactivos y materiales se obtuvieron de BIACore[®] AB (Uppsala, Suecia). Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente. Las muestras se disolvieron en tampón HBS-EP (cloruro de sodio 150 mM EDTA, 3 mM, tensioactivo P-20al 0,005% (p/v), y HEPES 10 mM, pH 7,4). Se inmovilizó el anticuerpo Fc Cabra anti- humano se inmovilizó en las células de flujo 1 y 2 de un chip sensor a un nivel de 500 unidades de respuesta (RU) usando un kit de acoplamiento de amina.

60 Se evaluó el enlace de rhs FasL usando múltiples ciclos analíticos. Cada ciclo se realizó a un caudal de 50 µl/minuto y estuvo constituida por las siguientes etapas: inyección de un anticuerpo anti-hFasL3E1 a 1 µg/ml, inyección de 240 µl de rhs FasL (a partir de 100 nM y usando diluciones en serie de dos potencias para cada ciclo), seguido por 20 minutos para disociación y generación usando 50 µl de cloruro de glicina 10 mM pH 1,5. Se evaluaron las velocidades de asociación y disociación usando un modelo de enlace “Langmuir 1:1 con transporte de masa” con el software BIAsimulation.

ES 2 291 626 T3

Ejemplo 4

Ensayo de apoptosis de HepG2 usando ligando Fas recombinante soluble

5 Se usó una línea celular HepG2 (carcinoma hepatocelular; ATCC #HB-8065) para evaluar la neutralización de FasL recombinante soluble mediante los by anticuerpos 3E1 y 4G11. El medio celular se preparó usando DMEM:F-12 (3:1), FBS al 10%, HEPES 20 mM, y 50 µg/ml de gentamicina. Para cada determinación, se sembraron las células HepG2 en una placa de 96 pocillos recubiertos con poli-D-lisina concentración de 1 x 10⁴ células/pocillo en 200 µl de medio. Las células se incubaron durante toda la noche a 37°C en dióxido de carbono al 5%. El medio se eliminó,
10 y se sustituyó con 100 µl de medio que contiene 60 µg/ml de sulfato de bleomicina (Sigma Chemical, Nº de catálogo B8416). Las placas se incubaron durante toda la noche usando una cámara de humedad.

15 Se preparó una solución stock de FasL-FLAG humano en medio de ensayo (la concentración final es 50 ng/ml de FasL y 1 µg/ml de mejorador anti-FLAG para formar el FasL mejorado). Se añadieron los anticuerpos Anti-FasL a una parte de la solución stock para preparar el medio FasL mejorado con inhibidor. Cada solución se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Para las muestras de control del 100% de apoptosis, se añadieron 50 µl/pocillo de la solución del FasL mejorado al medio que ya contenía belomicina en los pocillos. A continuación, las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C en dióxido de carbono al 5%.

20 Se realizó una dilución uno a uno de reactivo de proliferación celular WST-1 y medio. Se añadieron veinte microlitros de WST-1 diluido a cada pocillo. Las placas se incubaron de nuevo durante toda la noche a 37°C en dióxido de carbono al 5%. A continuación, las placas se leyeron en un lector de placas espectrofotométricas a una longitud de onda óptima de 450 nm. Los resultados indican que a medida que la concentración de anticuerpo disminuye, la apoptosis aumenta.
25

Ejemplo 5

Clonación y secuenciación de las regiones de enlace de cadena pesada y ligera del antígeno

30 Se clonó la región de la cadena pesada y ligera para neutralizar el mAb 3E1 humano, y se secuenció usando los siguientes protocolos.

35 Se preparó el ARNm a partir de 2 x 10⁶ células de hibridoma usando el protocolo Micro-Fast Track (Invitrogen) suministrado com el kit. Se preparó el ADNc a partir de un precipitado en 200 µl de etanol de ARNm usando un kit de ciclado de ADNc (Invitrogen) agitando circularmente la alícuota de ARNm durante treinta minutos a 14.999 rpm a 4°C seguido por lavado del residuo con etanol al 70%. El residuo secado al aire se volvió a suspender en 11,5 µl de agua estéril, y se preparó el ADNc siguiendo las instrucciones del kit. El ADNc se precipitó usando etanol, y a continuación se volvió a suspender en 30 µl de agua para uso en la PCR.
40

45 Se ajustaron las reacciones PCR con cebadores degenerados en el extremo 5' de la región variable de la cadena pesada y ligera emparejada con los cebadores 3' de la región constante. Por cada 50 µl de reacción, se usó 1 µl de ADNc. Las reacciones se ajustaron como para uso con *Pfu* I seguido por veinte ciclos. Los productos PCT se comprobaron haciendo correr 5 µl de cada reacción en un gel de agarosa al 2%. Las reacciones positivas se clonaron usando el kit de clonación Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen). Se secuenciaron minipreparaciones a partir de los clones positivos, y se analizaron respecto de los reordenamientos de genes productivos. Los resultados de las reacciones PCR independientes y el secuenciamiento de múltiples clones revelaron secuencias de la presente invención.

Ejemplo 6

Ensayo del hepatocito primario de rata

50 La apoptosis juega un papel primordial en el daño hepático tóxico, fallo fulminante del hígado, carcinoma hepatocelular, enfermedad del hígado inmunomedidos y hepatitis vírica (Kanzler y Galle, Seminars Cancer Biol. 10(3): 173-84 (2000)). Los estudios anteriores han demostrado que los hepatocitos primarios humanos son susceptibles a la apoptosis inducida por FasL. Los, que se obtienen más fácilmente, han indicado que estas células son igualmente susceptibles a la apoptosis inducida por hFasL. Este sistema de ensayo se usó para demostrar que la muerte de los hepatocitos de rata y la activación de la caspasa, indicativa de un señalamiento intracelular mediante interacción FasL, se inhibe mediante los anticuerpos monoclonales humanos anti-hFasL, 3E1 y 4G11.
55

60 Se consiguieron hepatocitos primarios de rata en matriz en placas de 12 pocillos a 7 x 10⁵ células/pocillo *In Vitro* Technologies, Nº de catálogo M00717MG). Las células se incubaron durante cuatro o veinticuatro horas en las siguientes condiciones: (1) sin estimular, (2) FasL humano estimulado, (3) hFasL estimulado más FasL inhibido (usando los anticuerpos 3E1 y 4G11), o (4) FasL estimulado más caspasa 3 inhibida. Estas células se analizaron de acuerdo con dos ensayos: (a) análisis de la lactato deshidrogenasa, y (b) análisis de caspasa 3/8, ejemplificados en los Ejemplos 6a y 6b, respectivamente. La liberación de lactato deshidrogenasa desde las células indica la muerte celular por cualquier motivo. La liberación de las caspasas 3 y 3/8 desde las células indica apoptosis mediada por Fas-FasL

ES 2 291 626 T3

Ejemplo 6a

Análisis de la lactato deshidrogenasa

5 El reactivo lactato deshidrogenasa LD-L20 (Sigma Chemical, Nº de catálogo 228-20) es una mezcla de lactato y NAD usado para la determinación cinética cuantitativa de la actividad de la lactato deshidrogenasa. La lactato deshidrogenasa cataliza la oxidación de lactato a piruvato, con la reducción simultánea de NAD. La formación de NADH da como resultado un aumento de la absorbancia a λ 340 nm. La velocidad del aumento en la absorbancia a λ 340 nm es directamente proporcional a la actividad LD en la muestra.

10 En una placa de 96 pocillos, se mezclaron 10 μ l de muestra en medio de cultivo celular con 200 μ l de reactivo LD-L precalentado. La placa se colocó en un lector de placas a 37°C para una incubación de 60 segundos, leyendo la absorbancia a λ 340 nm en tres momentos temporales: 0, 30, y 60 segundos. La lectura inicial de la absorbancia (momento temporal 0 segundos) se restó de la lectura final de la absorbancia (momento temporal 60 segundos) para 15 obtener Δ absorbancia/minuto. Los resultados indican que la presencia de anticuerpo reduce grandemente la liberación de lactato deshidrogenasa desde las células, lo que significa una disminución en la muerte celular.

Ejemplo 6b

Análisis de la caspasa 3/8

Se usó el kit de ensayo fluorescente ApoAlert Caspase (Clontech, Nº de catálogo K2026-2) para detectar la actividad de las caspasas específicas (3, 8, o 9/6), que están activas en diferentes momentos del procedimiento apoptótico. 25 La 7-amino-4-trifluorometil cumarina (AFC), conjugada con un sustrato, se rompe de forma proteolítica mediante la caspasa apropiada en la muestra, y la AFC libre flúorese a λ 505 nm.

En una placa de 96 pocillos de color negro, se mezclaron 50 μ L de lisato celular con 50 μ l de tampón de reacción y 5 μ l de sustrato de caspasa-3 o caspasa-8. La mezcla se incubó a 37°C durante una hora, y se leyó en un lector de 30 fluorescencia para placas con una excitación de λ 400 nm y una emisión de λ 505 nm. Las emisiones de muestras apoptóticas se compararon con las no inducidas y los controles inhibidos, permitiendo la determinación del aumento en la actividad de la proteasa. Los resultados indican que la activación de la caspasa 3/8 se inhibe completamente en las muestras que contienen FasL más anticuerpo anti-hFasL.

Ejemplo 7

Actividad funcional usando células Jurkat con FasL nativo sobreexpresado

40 La estimulación de células Jurkat T con un anticuerpo inmovilizado en el complejo CD3 del receptor de la célula T induce la activación celular y la sobreexpresión del FasL nativo. La muerte de la célula inducida por la activación se produce a continuación, lo que puede medirse directamente evaluando la supervivencia celular o la actividad de la caspasa 3 activa. Este sistema se usa para determinar la capacidad de un anticuerpo anti-FasL (se usó 3E1, aunque se contempla que se puede usar 4G11 u otros anticuerpos de la invención) para bloquear la muerte celular.

45 Placas de 96 pocillos de fondo redondo no tratadas con cultivos de tejidos se recubrieron con el anticuerpo CD3 anti-humano (50 μ l/pocillo, 1 μ g/ml en PBS) a 4°C durante toda la noche. A continuación, las placas se lavaron con PBS para eliminar el anticuerpo no enlazado. Se añadieron las células Jurkat T a los pocillos 50.000 células/pocillo en solitario o junto con inhibidor (Anticuerpo 3E1) o una IgG₄ de control en diferentes concentraciones (de 5 μ g/ml a 5 ng/ml en un volumen final de 100 μ l en medio de ensayo Jurkat), y se incubaron durante 34 horas a 37°C en dióxido de carbono al 5%. A continuación se añadió reactivo WST-1 (disponible, por ejemplo de Panvera) (10 μ l/pocillo) y las placas se incubaron durante 24 horas más. Se usó WST-1 para medir el número de células viables. Los resultados indicaron que los anticuerpos anti-hFasL usados en el ensayo fueron efectivos para neutralizar la apoptosis mediada por FasL nativo en este ensayo.

55 Alternativamente, placas de 24 pocillos (cultivo no tisular) se recubrieron con el anticuerpo anti-CD3 tal como se ha descrito más arriba. Se añadieron a continuación las células Jurkat T (200.000 células/pocillo) en solitario o junto con el anticuerpo inhibidor o de control (volumen final de 400 μ l) y se incubaron durante 24 o 48 horas a 37°C en dióxido de carbono al 5%. A continuación se cosecharon las células, y se lavaron. Las células se permeabilizaron 60 (Cytoperm/Cytofix, Pharmingen nº 554722) y se tiñeron con un anticuerpo caspasa 3-FIFC anti-activo (Pharmingen nº 559341), y se evaluó la tinción celular mediante citometría de flujo. Los resultados indican que los anticuerpos anti-hFasL fueron efectivos en la inhibición de la activación de la caspasa 3 (la actividad de la caspasa 3 lleva a la apoptosis celular).

ES 2 291 626 T3

Ejemplo 8

Anticuerpos Anti-FasL inhiben la apoptosis de células T humanas infectadas con VIH

5 Las células T de la sangre periférica están normalmente inactivadas, hasta que se estimula una respuesta inmune. Sin embargo, las células T periféricas de pacientes infectados con VIH presentan un fenotipo activado, que incluye la sobreexpresión del Fas superficial y la inducción de FasL. Se contempla que esta interacción de superficie Fas-FasL es responsable de la pérdida de muchas de las células T periféricas no infectadas con VIH por apoptosis. Para investigar si los anticuerpos FasL pueden bloquear esta muerte celular, se realizó el siguiente experimento.

10 Las células mononucleares de la sangre periférica se purificaron a partir de sangre completa de pacientes infectados con VIH usando un Ficoll-Hypaque. Las células se añadieron a placas de 24 pocillos a 700.000 células/pocillo en medio solo o junto con PHA (5 µg/ml) e IL-2 recombinante (50 U/ml), que activó las células de forma adicional. Las células se incubaron con o sin los anticuerpos anti-FasL (de 2 µg/ml a 200 ng/ml en un volumen final de 500 15 µl). Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C en dióxido de carbono al 5%. A continuación, las células se cosecharon, lavaron e incubaron con el anticuerpo anti-CD4-PE. A continuación, las células se lavaron de nuevo, se permeabilizaron y se tiñeron con un anticuerpo caspasa 3-FIFC anti-activo (Pharmingen nº 559341), y se evaluó la tinción celular mediante citometría de flujo. Los resultados indican que los anticuerpos anti-hFasL fueron efectivos en la reducción de la activación de la caspasa 3, y por tanto, de la apoptosis, en los linfocitos de la sangre periférica tanto 20 CD4 positivos como CD4 negativos.

25 (Tabla pasa a página siguiente)

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 291 626 T3

TABLA 1

ADN de la región variable de cadena pesada 3E1, y secuencia de aminoácidos

5	Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S
1	CAGGTGCAGC TGGTGCAGTC TGGAGCTGAG GTGAAGAACG CTGGGGCCTC
10	GTCCACGTCG ACCACGTCAG ACCTCGACTC CACTTCTTCG GACCCCGGAG
	CDR1
15	V K V S C K A S G Y I F I R H G
51	AGTGAAGGTC TCCTGCAAGG CTTCTGGTTA CATCTTTATC AGACATGGTA
	TCACTTCCAG AGGACGTTCC GAAGACCAAT GTAGAAATAG TCTGTACCAT
20	I T W V R Q A P G Q G L E W M G W
101	TCACCTGGGT GCGACAGGCC CCTGGACAAG GGCTTGAGTG GATGGGATGG
	AGTGGACCCA CGCTGTCCGG GGACCTGTT CCGAACTCAC CTACCCTACC
	CDR2
30	I N A Y N G N T N Y A Q K V Q G R
151	ATCAAACGCTT ACAATGGTAA CACAAACTAT GCACAGAAAGG TCCAGGGCAG
	TAGTTGCGAA TGTTACCATT GTGTTGATA CGTGTCTTCC AGGTCCCCTC
35	V T M T T D K S T S T A Y M E L
201	AGTCACCATG ACCACAGACA AATCCACGAG CACAGCCTAC ATGGAGCTGA
	TCAGTGGTAC TGGTGTCTGT TTAGGTGCTC GTGTCGGATG TACCTCGACT
40	R S L R S D D A A V Y Y C A R E T
251	GGAGCCTGAG ATCTGACGAC GCGGCCGTGT ATTATTGTGC GAGAGAGACT
	CCTCGGACTC TAGACTGCTG CGCCGGCACA TAATAACACG CTCTCTCTGA
	CDR3
50	M V R G V P L D Y W G Q G T L V T
301	ATGGTTGGGG GAGTTCCCT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC
	TACCAAGCCC CTCAAGGGGA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAAGTG
55	V S S A S T K G P S V F P L A
351	CGTCTCCTCA GCTTCCACCA AGGGCCCCATC AGTCTTCCCC CTGGCG
	GCAGAGGAGT CGAAGGGTGGT TCCCAGGTAG TCAGAAGGGG GACCGC

ES 2 291 626 T3

TABLA 2

ADN de la región variable de cadena pesada 4G11, y secuencia de aminoácidos

5

1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S
 CAGGTGCAGC TGGTGCAGTC TGGAGCTGAG GTGAAGAACG CTGGGGCCCTC
 GTCCACGTCG ACCACGTCAG ACCTCGACTC CACTTCTTCG GACCCCGGAG

10

51 V K V S C K A S G Y I F I S H G
 AGTGAAGGTC TCCTGCAAGG CCTCTGGTTA CATCTTATC AGTCATGGTA
 TCACCTCCAG AGGACGTTCC GAAGACCAAT GTAGAAATAG TCAGTACCAT

15

20 I S W V R Q A P G Q G L E W M G W
 101 TCAGTTGGGT GCGACAGGCC CCTGGACAAG GGCTTGAGTG GATGGGATGG
 AGTCAACCCA CGCTGTCCGG GGACCTGTTG CCGAACTCAC CTACCCCTACC

25

151 I N A Y S G N T N Y A Q K L Q G R
 ATCAAACGCTT ACAGTGGTAA CACAAACTAT GCACAGAACG TCCAGGGCAG
 TAGTTGCGAA TGTCACCAATT GTGTTTGATA CGTGTCTTCG AGGTCCCCGTC

30

201 V T M T T D R S T S T A Y M E L
 AGTCACCATG ACCACAGACA GATCCACGAG CACAGCCTAC ATGGAGCTGA
 TCAGTGGTAC TGGTGTCTGT CTAGGTGCTC GTGTGGATG TACCTCGACT

35

40 R S L R S D D T A V Y Y C A R E T
 251 GGAGCCTGAG ATCTGACGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGAGAGACT
 CCTCGGACTC TAGACTGCTG TGCCGGACA TAATGACACG CTCTCTCTGA

45

301 M V R G V P C D Y W G Q G T L V T
 ATGGTTCGGG GAGTTCCCTG TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC
 TACCAAGCCC CTCAAGGGAC ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG

50

351 V S S A S T K G P S V F P L A
 CGTCTCCTCA GCTTCCACCA AGGGCCCATC CGTCTTCCCC CTGGCG
 GCAGAGGAGT CGAAGGTGGT TCCCGGGTAG GCAGAAGGGG GACCGC

55

60

65

ES 2 291 626 T3

TABLA 3

ADN de la región variable de cadena ligera 3E1 y 4G11, y secuencia de aminoácidos

5

10 E I V L T Q S P G T L S L S P G E
 1 GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA
 CTTTAACACA ACTGCGTCAG AGGTCCGTGG GACAGAAACA GAGGTCCCCT

CDR1

15 R A T L S C R A S Q S V S S S Y
 51 AAGAGGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTAGC AGCAGCTACT
 TTCTCGGTGG GAGAGGACGT CCCGGTCAGT CTCACAATCG TCGTCGATGA

20 L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y
 101 TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT
 ATCGGACCAT GGTCGTCTT GGACCGGTCC GAGGGTCCGA GGAGTAGATA

CDR2

25 G A S S R A T G I P D R F S G S G
 151 GGTGCATCCA GCAGGGCAC TGCGATCCA GACAGGTTCA GTGGCAGTGG
 CCACGTAGGT CGTCCGGTG ACCGTAGGGT CTGTCCAAGT CACCGTCACC

CDR3

35 S G T D F T L T I S R L E P E D
 201 GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG CCTGAAGATT
 CAGACCCCTGT CTGAAGTGAG AGTGGTAGTC GTCTGACCTC GGACTTCTAA

40 F A V Y Y C Q Q Y G S S P W T F G
 251 TTGCAGTGTAA TTACTGTCAG CAGTATGGTA GCTCACCGTG GACGTTCGGC
 AACGTCACAT AATGACAGTC GTCATACCAT CGAGTGGCAC CTGCAAGCCG

45 Q G T K V E I K R T V A A P S V F
 301 CAAGGGACCA AGGTGGAAAT CAAACGAAC GTGGCTGCAC CATCTGTCTT
 GTTCCCTGGT TCCACCTTTA GTTGCTTGA CACCGACGTG GTAGACAGAA

50

55 I F P
 351 CATCTTCCCG
 GTAGAAAGGGC

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porción del mismo enlazante con un antígeno, que comprende una 5 región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR), y que comprende al menos dos polipéptidos que tienen una secuencia seleccionada a partir de las SEC. DE ID. N°s: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, y 24, en el que dicho anticuerpo tiene una K_D inferior a 1×10^{-9} M.
- 10 2. El anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porción del mismo enlazante con un antígeno de la reivindicación 1 en el que el LCVR comprende un polipéptido con la secuencia mostrada en la SEC. DE ID. N°: 2.
- 15 3. El anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porción del mismo enlazante con un antígeno de la reivindicación 1 en el que el LCVR comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. DE ID. N°: 2; y en el que el HCVR comprende un polipéptido con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. DE ID. N°: 10.
- 20 4. El anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porción del mismo enlazante con un antígeno de la reivindicación 1 en el que el LCVR comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. DE ID. N°: 2; y en el que el HCVR comprende un polipéptido con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. DE ID. N°: 18.
- 25 5. El anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porción del mismo enlazante con un antígeno de la reivindicación 1 en el que la región CDR1 de LCVR comprende la secuencia mostrada en la SEC. DE ID. N°: 4.
6. El anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porción del mismo enlazante con un antígeno de la reivindicación 1 en el que la región CDR2 de LCVR comprende la secuencia mostrada en la SEC. DE ID. N°: 6.
- 30 7. El anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porción del mismo enlazante con un antígeno de la reivindicación 1 en el que la región CDR3 de LCVR comprende la secuencia mostrada en la SEC. DE ID. N°: 8.
8. El anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porción del mismo enlazante con un antígeno de la reivindicación 1 en el que la región CDR1 de LCVR comprende la secuencia mostrada en la SEC. DE ID. N°: 4., y en el que la región CDR2 de LCVR comprende la secuencia mostrada en la SEC. DE ID. N°: 6.
- 35 9. El anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porción del mismo enlazante con un antígeno de la reivindicación 1 en el que la región CDR1 de LCVR comprende la secuencia mostrada en la SEC. DE ID. N°: 4., y en el que la región CDR3 de LCVR comprende la secuencia mostrada en la SEC. DE ID. N°: 8.
10. El anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porción del mismo enlazante con un antígeno de la reivindicación 1 en el que la región CDR2 de LCVR comprende la secuencia mostrada en la SEC. DE ID. N°: 6., y en el que la región CDR3 de LCVR comprende la secuencia mostrada en la SEC. DE ID. N°: 8.
- 40 11. El anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porción del mismo enlazante con un antígeno de la reivindicación 1 en el que la región CDR1 de HCVR comprende la secuencia mostrada en la SEC. DE ID. N°: 12 ó 20.
12. El anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porción del mismo enlazante con un antígeno de la reivindicación 1 en el que la región CDR2 de HCVR comprende la secuencia mostrada en la SEC. DE ID. N°: 14 ó 22.
- 45 13. El anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porción del mismo enlazante con un antígeno de la reivindicación 1 en el que la región CDR3 de HCVR comprende la secuencia mostrada en la SEC. DE ID. N°: 16 ó 24.
14. El anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porción del mismo enlazante con un antígeno de la reivindicación 1 en el que la región CDR2 de HCVR comprende la secuencia mostrada en la SEC. DE ID. N°: 14 ó 22, y la región CDR3 de HCVR comprende la secuencia mostrada en la SEC. DE ID. N°: 16 ó 24.
- 50 15. El anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porción del mismo enlazante con un antígeno de la reivindicación 1 en el que la región CDR1 de HCVR comprende la secuencia mostrada en la SEC. DE ID. N°: 12 ó 20, y la región CDR2 de HCVR comprende la secuencia mostrada en la SEC. DE ID. N°: 14 ó 22.
16. El anticuerpo anti-hFasL humano aislado, o porción del mismo enlazante con un antígeno de la reivindicación 1 en el que la región CDR1 de HCVR comprende la secuencia mostrada en la SEC. DE ID. N°: 12 ó 20, y la región CDR3 de HCVR comprende la secuencia mostrada en la SEC. DE ID. N°: 16 ó 24.
- 55 17. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que tiene una región constante de cadena pesada IgG1.
18. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que tiene una región constante de cadena pesada IgG4.
- 60 19. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que es un fragmento Fab.

ES 2 291 626 T3

20. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que es un fragmento F(ab')₂.
21. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que es un fragmento de Fv de cadena sencilla.
- 5 22. Una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-hFasL humano o porción del mismo enlazante con un antígeno, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21.
- 10 23. Una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido de la reivindicación 22, en la que el polinucleótido comprende al menos dos polipéptidos que tienen una secuencia seleccionada a partir de las SEC. DE ID. N°s: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y 23 y variantes de las mismas, según permita la degeneración del código genético.
- 15 24. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 22 y la reivindicación 23.
- 25 25. El vector de la reivindicación 24, en el que el vector es un vector de expresión.
- 20 26. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 24 o la reivindicación 25.
27. Un anticuerpo humano producido mediante el hibridoma seleccionado a partir del hibridoma depositado como ATCC PTA-4017 y el hibridoma depositado como ATCC PTA-4018.
- 25 28. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, o porción del mismo enlazante con un antígeno, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 o la reivindicación 27 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
29. Un anticuerpo, o porción del mismo enlazante con un antígeno, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 o la reivindicación 27 para uso como medicamento.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 291 626 T3

LISTA DE SECUENCIAS

SEC. de ID. N° 1 → polinucleótido que codifica la región variable de cadena ligera de 3E1 o 4G11

5
GAAATTGTGTTGACGCAGTCCTCCAGGCACCCCTGCTTGTCTCCAGGGAAAGAGGCCACCCCTCTCC
TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAACCTGGCCAGGCT
10 CCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGT
GGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAGTGTATTAC
TGTCACTGGTAGCTCACCGTGGACGTTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAAC
GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTCCCCG

SEC. de ID. N° 2 → secuencia de aminoácidos que codifican la región variable de cadena ligera de 3E1 o 4G11

15
EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQS VSSSYLA WYQQKPGQAPRLI YGASSRATGIPDRFSGS
GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS SPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP

20
SEC. de ID. N° 3 → polinucleótido que codifica la región variable de cadena ligera CDR1 de 3E1 o 4G11

25
AGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCC

SEC. de ID. N° 4 → secuencia de aminoácidos que codifican la región variable de cadena ligera CDR1 de 3E1 o
4G11

30
RASQSVSSSYLA

SEC. de ID. N° 5 → polinucleótido que codifica la región variable de cadena ligera CDR2 de 3E1 o 4G11

35

GGTGCATCCAGCAGGCCACT

40
SEC. de ID. N° 6 → secuencia de aminoácidos que codifican la región variable de cadena ligera CDR2 de 3E1 o
4G11

45
GASSRAT

45

SEC. de ID. N° 7 → polinucleótido que codifica la región variable de cadena ligera CDR3 de 3E1 o 4G11

50
CAGCACTATGGTAGCTACCGTGGACG

SEC. de ID. N° 8 → secuencia de aminoácidos que codifican la región variable de cadena ligera CDR3 de 3E1 o
4G11

55

QQYGSSPWT

60
SEC. de ID. N° 9 → polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada 3E1 de 3E1 o 4G11

65
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGC
AAGGCTTCTGGTTACATCTTATCAGACATGGTATCACCTGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGG
CTTGAGTGGATGGATGGATCAACGCTTACAATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGGTCCAGGGC
AGAGTCACCATGACCACAGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCT
GACGACGGCGGCCGTGTATTATTGTGCGAGAGAGACTATGGTCGGGGAGTTCCCCCTGACTACTGG
GGCCAGGGAACCTGGTACCGTCTCAGCTTCCACCAAGGGCCATCAGTCTTCCCCCTGGCG

ES 2 291 626 T3

SEC. de ID. N° 10 → secuencia de aminoácidos que codifican la región variable de cadena pesada 3E1

5 **QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYIFIRHGITWVRQAPGQGLEWMGINAYNGNTNYAQKVQG
RVTMTTDKSTSTAYMELRSLSDDAAVYYCARETMVRGVPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA**

SEC. de ID. N° 11 → polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada CDR1 de 3E1

10 AGACATGGTATCACC

15 SEC. de ID. N° 12 → secuencia de aminoácidos que codifican la región variable de cadena pesada CDR1 de 3E1

RHGIT

20 SEC. de ID. N° 13 → polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada CDR2 de 3E1

25 TGGATCAACGCTTACAATGGTAACACAAACTATGCACAGAACGGTCCAGGGC

SEC. de ID. N° 14 → secuencia de aminoácidos que codifican la región variable de cadena pesada CDR2 de 3E1

30 WINAYNGNTNYAQKVQG

SEC. de ID. N° 15 → polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada CDR3 de 3E1

35 GAGACTATGGTTGGGGAGTTCCCCTTGACTAC

40 SEC. de ID. N° 16 → secuencia de aminoácidos que codifican la región variable de cadena pesada CDR3 de 3E1

ETMVRGVPLDY

45 SEC. de ID. N° 17 → polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada 4G11

50 **CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAACGCTGGGGCTCAGTGAAGGTCTCCTGC
AAGGCTTCTGGTTACATCTTATCAGTCATGGTATCAGTTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGG
CTTGAGTGGATGGATGGATCAACGCTTACAGTGGTAACACAAACTATGCACAGAACGCTCCAGGGC
AGAGTCACCATGACCACAGACAGATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCT
GACGACACGGCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGACTATGGTTGGGGAGTTCCCTGTGACTACTGG
GGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCATCCGTCTCCCCCTGGCG**

55 SEC. de ID. N° 18 → secuencia de aminoácidos que codifican la región variable de cadena pesada 4G11

60 **QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYIFISHGISWVRQAPGQGLEWMGINAYSGNTNYAQKLQG
RVTMTTDKSTSTAYMELRSLSDDAAVYYCARETMVRGVPCDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA**

65 SEC. de ID. N° 19 → polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada CDR1 de 4G11

AGTCATGGTATCAGT

ES 2 291 626 T3

SEC. de ID. N° 20 → secuencia de aminoácidos que codifican la región variable de cadena pesada CDR1 de 4G11

5 SHGIS

SEC. de ID. N° 21 → polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada CDR2 de 4G11

10 TGGATCAACGCTTACAGTGGTAACACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGC

SEC. de ID. N° 22 → secuencia de aminoácidos que codifican la región variable de cadena pesada CDR2 de 4G11

15

WINAYSGNTNYAQKLQG

20 SEC. de ID. N° 23 → polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada CDR3 de 4G11

GAGACTATGGTTCGGGGAGTTCCCTGTGACTAC

25

SEC. de ID. N° 24 → secuencia de aminoácidos que codifican la región variable de cadena pesada CDR3 de 4G11

30 ETMVRGVPCDY

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Eli Lilly and Company

<120> Anticuerpos antagonísticos del ligando Anti-hFas humano y fragmentos del mismo

<130> X15450

40 <160> 24

<170> PatentIn versión 3.1

45 <210> 1

<211> 360

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

50 <220>

<221> CDS

<222> (1) ... (360)

55 <223>

60

65

ES 2 291 626 T3

<400> 1

	gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly 1 5 10 15	48
5	gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser 20 25 30	96
10	tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu 35 40 45	144
15	atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser 50 55 60	192
	ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu 65 70 75 80	240
20	cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca ccg Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro 85 90 95	288
25	tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cga act gtg gct Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala 100 105 110	336
30	gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro 115 120	360

<210> 2

<211> 120

35 <212> PTR

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

40	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly 1 5 10 15
45	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser 20 25 30
	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu 35 40 45
50	Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser 50 55 60
	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu 65 70 75 80
55	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro 85 90 95
	Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala 100 105 110
60	Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro 115 120

ES 2 291 626 T3

<210> 3
<211> 36
<212> ADN
5 <213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
10 <222> (1) ... (36)
<223>

15 <400> 3
36
agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc tac tta gcc
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

20
<210> 3
<211> 36
<212> ADN
25 <213> *Homo sapiens*

<400> 4
30 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

50 <210> 5
35 <211> 21
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

40 <220>
<221> CDS
<222> (1) ... (21)

45 <223>

<400> 5
21
55 ggt gca tcc agc agg gcc act
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

60 <210> 6
<211> 7
<212> PTR
<213> *Homo sapiens*

65 <400> 6
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

ES 2 291 626 T3

<210> 7
<211> 27
<212> ADN
5 <213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
10 <222> (1) ... (27)
<223>

<400> 7
15

cag cag tat ggt agc tca ccg tgg acg	27
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr	
1 5	

20

<210> 8
<211> 9
25 <212> PTR
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

30 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 9
35 <211> 396
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

40 <220>
<221> CDS
<222> (1) ... (396)

45 <223>

50

55

60

65

ES 2 291 626 T3

<400> 9

	cag gtg cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag cct ggg gcc Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15	48
5	tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac atc ttt atc aga cat Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Arg His 20 25 30	96
10		
15	ggt atc acc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg Gly Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met 35 40 45	144
20	gga tgg atc aac gct tac aat ggt aac aca aac tat gca cag aag gtc Gly Trp Ile Asn Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Val 50 55 60	192
25	cag ggc aga gtc acc atg acc aca gac aaa tcc acg agc aca gcc tac Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80	240
30	atg gag ctg agg agc ctg aga tct gac gac gcg gcc gtg tat tat tgt Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
35	gcg aga gag act atg gtt cgg gga gtt ccc ctt gac tac tgg ggc cag Ala Arg Glu Thr Met Val Arg Gly Val Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln 100 105 110	336
40	gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct tcc acc aag ggc cca tca gtc Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val 115 120 125	384
45	ttc ccc ctg gcg Phe Pro Leu Ala 130	396
50	<210> 10 <211> 132 <212> PTR <213> <i>Homo sapiens</i>	

55

60

65

ES 2 291 626 T3

<400> 12

Arg	His	Gly	Ile	Thr
1			5	

5

<210> 13

<211> 51

<212> ADN

10

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

15

<222> (1) ... (51)

<223>

20 <400> 13

tgg	atc	aac	gct	tac	aat	gtt	aac	aca	aac	tat	gca	cag	aag	gtc	cag
Trp	Ile	Asn	Ala	Tyr	Asn	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Val	Gln
1				5					10					15	

48

25

ggc
Gly

51

30 <210> 14

<211> 17

<212> PTR

35

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

Trp	Ile	Asn	Ala	Tyr	Asn	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Val	Gln
1				5				10					15		

40

Gly

45 <210> 15

<211> 33

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

50

<220>

<221> CDS

<222> (1) ... (33)

<223>

55 <400> 15

gag	act	atg	gtt	cgg	gga	gtt	ccc	ctt	gac	tac
Glu	Thr	Met	Val	Arg	Gly	Val	Pro	Leu	Asp	Tyr
1				5				10		

33

60

<210> 16

<211> 11

<212> PTR

65

ES 2 291 626 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

5 Glu Thr Met Val Arg Gly Val Pro Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 17

10 <211> 396

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

15 <220>

<221> CDS

<222> (1) ... (396)

20 <223>

<400> 17

25 cag gtg cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

30 tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac atc ttt atc atc agt cat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Ser His
 20 25 30

35 ggg atc agt tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

40 gga tgg atc aac gct tac agt ggt aac aca aac tat gca cag aag ctc 192
 Gly Trp Ile Asn Ala Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

45 cag ggc aga gtc acc atg acc aca gac aga tcc acg agc aca gcc tac 240
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

50 atg gag ctg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

55 gcg aga gag act atg gtt cgg gga gtt ccc tgt gac tac tgg ggc cag 336
 Ala Arg Glu Thr Met Val Arg Gly Val Pro Cys Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

60 gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct tcc acc aag ggc cca tcc gtc 384
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

65 ttc ccc ctg gcg 396
 Phe Pro Leu Ala
 130

<210> 18

<211> 132

<212> PTR

<213> *Homo sapiens*

ES 2 291 626 T3

<400> 18

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

<210> 19

<211> 15

40 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

45 <220>

<221> CDS

<222> (1) ... (15)

<223>

50 <400> 19

55	agt cat ggt atc agt Ser His Gly Ile Ser 1 5	15
----	---	----

<210> 20

60 <211> 5

<212> PTR

<213> *Homo sapiens*

65 <400> 20

1	Ser His Gly Ile Ser 5
---	--------------------------

ES 2 291 626 T3

<210> 21
 <211> 51
 <212> ADN
 5 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> CDS
 10 <222> (1) ... (51)
 <223>

 <400> 21
 15
 tgg atc aac gct tac agt ggt aac aca aac tat gca cag aag ctc cag 48
 Trp Ile Asn Ala Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
 1 5 10 15
 20 ggc 51
 Gly
 <210> 22
 25 <211> 17
 <212> PTR
 <213> *Homo sapiens*

 30 <400> 22

 Trp Ile Asn Ala Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
 1 5 10 15
 35 Gly

 <210> 23
 40 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 45 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) ... (33)
 <223>
 50
 <400> 23

 55 gag act atg gtt cg^g gga gtt ccc tgt gac tac 33
 Glu Thr Met Val Arg Gly Val Pro Cys Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 24
 <211> 11
 60 <212> PTR
 <213> *Homo sapiens*

 65 <400> 24

 Glu Thr Met Val Arg Gly Val Pro Cys Asp Tyr
 1 5 10