

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 251 767**

51 Int. Cl.:
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **98908474 .4**
96 Fecha de presentación: **11.02.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **1005488**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2000**

54 Título: **RECEPTOR QUE UNE TRAIL.**

30 Prioridad:
13.02.1997 US 799861
12.03.1997 US 815255
28.03.1997 US 829536
04.06.1997 US 869852
26.06.1997 US 883036

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.05.2006**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **07.03.2012**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **07.03.2012**

73 Titular/es:
IMMUNEX CORPORATION
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US

72 Inventor/es:
RAUCH, Charles y
WALCZAK, Henning

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 251 767 T5

DESCRIPCIÓN

Receptor que une TRAIL.

Antecedentes de la invención

Una proteína conocida como ligando que induce la apoptosis relacionada con el TNF (TRAIL) es un miembro de la familia de ligandos del factor de necrosis de tumores (Wiley y otros, Immunity, vol. 3, págs. 673-682, (1995)). El TRAIL ha demostrado la capacidad para inducir la apoptosis de ciertas células transformadas, incluyendo un cierto número de tipos diferentes de células de cáncer, así como células infectadas víricamente (Solicitud PCT WO 97/01633, y Wiley y otros, véase cita anterior).

La identificación de la proteína(s) receptor que se une al TRAIL se revelaría útil en el estudio posterior de las actividades biológicas del TRAIL. Sin embargo, antes de la presente invención, no se había informado de ningún receptor para el TRAIL.

Sumario de la invención

La presente invención está dirigida a una nueva proteína designada como receptor TRAIL (TRAIL-R), que se une a una proteína conocida como ligando que induce la apoptosis relacionada con el TNF (TRAIL). Se proporciona el ADN que contiene la codificación de TRAIL-R, como se define en las reivindicaciones, y los vectores de expresión que comprenden dicho ADN. Un procedimiento para la producción de polipéptidos TRAIL-R comprende el cultivo de células hospedadoras transformadas con un vector de expresión recombinante que contiene la codificación de TRAIL-R, bajo condiciones que promueven la expresión de TRAIL-R y, a continuación, la recuperación de los polipéptidos TRAIL-R expresados a partir del cultivo. Igualmente se proporcionan anticuerpos que se dirigen contra y que son inmunorreactivos con un polipéptido TRAIL-R que se une a un ligando que induce la apoptosis relacionada con el TNF (TRAIL), en el que TRAIL-R está caracterizado por comprender la secuencia de aminoácidos VPANEGD o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, en el que el anticuerpo se puede obtener usando una proteína TRAIL-R en forma de inmunógeno, dicha proteína TRAIL-R se puede obtener de células Jurkat, por medio de la disrupción de las células y purificación subsiguiente incluyendo cromatografía por afinidad, empleando una matriz de cromatografía que contiene TRAIL.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 presenta la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN del receptor humano TRAIL, así como la secuencia de aminoácidos codificada por él. Este fragmento de ADN se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 2 presenta los resultados del ensayo descrito en el Ejemplo 7. En el ensayo, una proteína de fusión TRAIL-R/Fc soluble bloqueó la apoptosis inducida por TRAIL de células Jurkat.

La Figura 3 presenta los resultados del experimento descrito en el Ejemplo 8. Los compuestos indicados demostraron que inhibían la apoptosis de células que expresan el receptor TRAIL.

Descripción detallada de la invención

Se proporciona aquí una nueva proteína designada como receptor TRAIL (TRAIL-R). El TRAIL-R se une a la citocina designada como ligando que induce la apoptosis relacionada con el TNF (TRAIL). Ciertos usos del TRAIL-R proceden de esta capacidad para unirse al TRAIL, tal como se expone aquí más adelante. El TRAIL-R encuentra su uso en la inhibición de actividades biológicas del TRAIL, o en la purificación del TRAIL, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad.

La secuencia de nucleótidos de la región de codificación de un ADN del receptor humano TRAIL se presenta en la SEC ID N°:1. La secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ADN de la SEC ID N°:1, se muestra en la SEC ID N°:2. Esta información de la secuencia identifica la proteína Receptor TRAIL como un miembro de la familia de receptores, el receptor del factor de necrosis de tumores (revisada por Smith y otros, en Cell, vol. 76, págs. 959-962, (1994)). El dominio extracelular contiene repeticiones ricas en cisteína; dichos motivos se ha informado que son importantes para la unión de ligandos en otros receptores de esta familia. El TRAIL-R contiene un denominado "dominio muerte" en la región citoplásmica; dichos dominios en otros ciertos receptores están asociados con la transducción de señales apopticas. Estas y otras características de la proteína se exponen con mayor detalle más adelante.

En una realización de la invención, los anticuerpos anteriores son anticuerpos monoclonales.

Una proteína TRAIL-R humana se purificó tal como se describe en el Ejemplo 1. En el Ejemplo 2, se presenta la información de la secuencia de aminoácidos derivados a partir de fragmentos de TRAIL-R. Una realización de la invención está dirigida a una proteína TRAIL-R humana purificada que es capaz de unirse al TRAIL, en la que el TRAIL-R se caracteriza por comprender la secuencia de aminoácidos VPANEGD (aminoácidos 327 a 333 de la SEC ID N°:2). En otra realización, el TRAIL-R comprende adicionalmente la secuencia ETLRQCFFDFADLVFDSWEPLMRKLGMLMDNEIKVAKAEAGHRDXTLML (aminoácidos 336 a 386 de la SEC ID N°:2,

con un aminoácido desconocido indicado como X). Igualmente, se proporcionan fragmentos de TRAIL-R que comprenden únicamente una de estas secuencias de aminoácidos caracterizantes.

La secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN de TRAIL-R, y la secuencia de aminoácidos codificada por ella, se presentan en la Figura 1 (SEC ID N°:3 y SEC ID N°:4); véase Ejemplo 3. La secuencia de aminoácidos presentada en la Figura 1 tiene características de los denominados "dominios muerte" encontrados en la región citoplásmica de otras ciertas proteínas receptores. De dichos dominios se ha informado que están asociados con la transducción de señales apópticas. Los dominios muerte citoplásmicos han sido identificados en el antígeno Fas (Itoh y Nagata, J. Biol. Chem., vol. 268, pág. 10932, (1993)), en el receptor tipo I del TNF (Tartaglia y otros, Cell, vol. 74, pág. 845, (1993)), en DR3 (Chinnaiyan y otros, Science, vol. 274, págs. 990-992, (1996)), y en CAR-1 (Brojatsch y otros, Cell, vol. 87, págs. 845-855, (1996)). La función de estos dominios muerte en la iniciación de cascadas de señalamiento apóptico intracelular se expone adicionalmente más adelante.

La SEC ID N°:1 presenta la secuencia de nucleótido de la región de codificación de un ADN de Receptor humano TRAIL, incluyendo un codón de iniciación (ATG) y un codón de terminación (TAA). La secuencia de aminoácido codificada por el ADN de la SEC ID N°:1 se presenta en la SEC ID N°:2. El fragmento representado en la Figura 1 corresponde a la región del TRAIL-R que se presenta como los aminoácidos 336 a 386 en la SEC ID N°:2.

La proteína TRAIL-R de la SEC ID N°:2 incluye una región hidrófoba N-terminal que funciona como un péptido señal, seguida de un dominio extracelular, una región transmembrana que comprende los aminoácidos 211 a 231, y un dominio citoplásmico C-terminal. El análisis mediante ordenador predice que el péptido señal corresponde a los restos 1 a 51 de la SEC ID N°:2. De acuerdo con ello, la escisión del péptido señal proporcionaría una proteína madura que comprende los aminoácidos 52 a 440 de la SEC ID N°:2. El peso molecular calculado para una proteína madura que contiene los restos 52 a 440 de la SEC ID N°:2 es aproximadamente de 43 kilodaltons. Los sitios de escisión de peptidasa señal precedidos mediante ordenador los más probablemente a continuación (en orden descendente), se producen después de los aminoácidos 50 y 58 de la SEC ID N°:2.

En otra realización de la invención, el resto N-terminal de una proteína TRAIL-R madura es el resto isoleucina en la posición 56 de la SEC ID N°:2. Las secuencias de varios fragmentos péptidos de digestión trípica de TRAIL-R se determinaron mediante una combinación de secuenciación N-terminal y Nano-ES MS/MS (nano electropulverización en tándem con espectroscopía de masa). El aminoácido N-terminal de uno de los fragmentos péptidos fue la isoleucina en la posición 56 de la SEC ID N°:2. Puesto que este fragmento no estuvo precedido por un sitio de escisión tripsina, el resto 56 (Ile) puede corresponder al resto N-terminal resultante de la escisión del péptido señal.

Una realización adicional de la invención está dirigida a TRAIL-R maduro que tiene el aminoácido 54 como el resto N-terminal. En una preparación de TRAIL-R (una proteína de fusión TRAIL-R/Fc soluble expresada en células CV1-EBNA), el péptido señal se escindió después del resto 53 de la SEC ID N°:2.

El experto en la técnica reconocerá que el peso molecular de preparaciones particulares de la proteína TRAIL-R puede diferir, de acuerdo con factores tales como el grado de glucosilación. El patrón de glucosilación de una preparación particular de TRAIL-R puede variar de acuerdo, por ejemplo, con el tipo de células en las cuales esté expresada la proteína. Además, una preparación dada puede incluir múltiples especies glucosiladas diferencialmente de la proteína. Se proporcionan aquí polipéptidos TRAIL-R con o sin una glucosilación patrón nativa asociada. La expresión de polipéptidos TRAIL-R en sistemas de expresión bacterianos, tal como E. coli, proporciona moléculas no glucosiladas.

En una realización, la proteína se caracteriza por un peso molecular comprendido dentro del intervalo de 50 a 55 kilodaltons, que es el peso molecular determinado para una preparación de TRAIL-R humano de longitud total, nativo. El peso molecular puede determinarse mediante SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

El Ejemplo 1 presenta un procedimiento para la purificación de una proteína TRAIL-R. Las células Jurkat se rompieron, y el procedimiento de purificación subsiguiente incluyó la cromatografía de afinidad (la cual usa una matriz de cromatografía que contiene TRAIL), y HPLC de fase inversa.

Los polipéptidos TRAIL-R de la presente invención pueden purificarse mediante cualquier procedimiento alternativo adecuado, usando técnicas de purificación de proteínas conocidas. En un procedimiento alternativo, la matriz de cromatografía comprende, en su lugar, un anticuerpo que se une al TRAIL-R. Otros tipos de células que expresan el TRAIL-R (p. ej., las células PS-1 descritas en el Ejemplo 2) pueden ser substituidas por las células Jurkat. Las células pueden ser rotas por cualquiera de las numerosas técnicas conocidas, incluyendo el ciclo congelación-descongelación, tratamiento por ultrasonidos, rotura mecánica, o mediante el uso de agentes de lisado de células.

El grado deseado de pureza depende del uso a que se destine la proteína. Un grado relativamente alto de pureza es deseable cuando la proteína se usa, por ejemplo, para ser administrada in vivo. De manera ventajosa, los polipéptidos TRAIL-R se purifican de manera tal que ninguna banda de proteína que correspondan a otras proteínas (no TRAIL-R) sean detectables durante el análisis mediante SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Un experto en la

técnica en el campo pertinente reconocerá que mediante SDS-PAGE pueden visualizarse múltiples bandas correspondientes a la proteína TRAIL-R, debido a la glucosilación diferencial, al tratamiento post-traducción diferencial, y similares. Lo más preferiblemente, la TRAIL-R se purifica hasta una homogeneidad substancial, tal como se indica mediante una banda de proteína única durante el análisis mediante SDS-PAGE. La banda de proteína puede visualizarse mediante teñido con plata, teñido con azul Coomassie, o (si la proteína está radiomarcada) mediante autoradiografía.

La presente invención abarca a TRAIL-R en varias formas, incluyendo aquellas que se producen de manera natural o que se producen a través de diversas técnicas tales como procedimientos que implican la tecnología de ADN recombinante. Dichas formas de TRAIL-R incluyen, pero sin limitarse a ellas, fragmentos, derivados, variantes, y oligómeros de TRAIL-R, así como proteínas de fusión que contienen TRAIL-R o fragmentos del mismo, tal como se establece en las reivindicaciones.

El TRAIL-R puede modificarse para crear derivados del mismo, mediante la formación de conjugados covalentes o agregados con otras partes químicas, tales como grupos glucosilo, lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares. Los derivados covalentes de TRAIL-R pueden prepararse mediante el ligamiento de partes químicas a grupos funcionales sobre las cadenas laterales de aminoácidos del TRAIL-R o en los N-terminales o C-terminales de un polipéptido TRAIL-R. Los conjugados que comprenden agentes de diagnóstico (detectables) o terapéuticos unidos al TRAIL-R se contemplan aquí, tal como se expone con mayor detalle más adelante.

Otros derivados de TRAIL-R dentro del ámbito de esta invención, incluyen conjugados covalentes o agregados de polipéptidos TRAIL-R con otras proteínas o polipéptidos, tal como mediante síntesis en cultivo recombinante como fusiones N-terminales o C-terminales. Los ejemplos de proteínas de fusión se exponen más adelante en relación con oligómeros TRAIL-R. Además, las proteínas de fusión que contienen TRAIL-R pueden comprender péptidos agregados para facilitar la purificación e identificación del TRAIL-R. Dichos péptidos incluyen, por ejemplo, poly-Hys o los péptidos de identificación antigénicos descritos en la Patente de EE.UU. No. 5.011.912, y en Hopp y otros, Bio/Tecnology, vol. 6, pág. 1204, (1988). Uno de dichos péptidos es el péptido Flag®, Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys, el cual es altamente antigénico y proporciona un epitope unido reversiblemente mediante un anticuerpo monoclonal específico, lo que permite el rápido ensayo y la fácil purificación de la proteína recombinante expresada. Un hibridoma murino designado como 4E11 produce un anticuerpo monoclonal que se une al péptido Flag® en presencia de ciertos cationes metálicos divalentes, tal como se describe en la Patente de EE.UU. 5.011.912. La línea de células de hibridoma 4E11 ha sido depositada en el American Type Culture Collection bajo el número de registro HB 9259. Los anticuerpos monoclonales que se unen al péptido Flag® se encuentran disponibles de Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, Connecticut.

En la presente invención, se proporcionan tanto las formas unidas a la membrana de la célula como las solubles (secretadas) de TRAIL-R. El TRAIL-R soluble puede identificarse (y distinguirse de las contrapartes unidas a la membrana no soluble) mediante la separación de las células intactas que expresan un polipéptido TRAIL-R a partir del medio de cultivo, p. ej., mediante centrifugación, y ensayo del medio (sobrenadante) para determinar la presencia de la proteína deseada. La presencia de TRAIL-R en el medio indica que la proteína ha sido secretada a partir de las células y, de acuerdo con ello, es una forma soluble de la proteína deseada.

Las formas solubles de las proteínas receptores carecen, típicamente, de la región transmembrana que causaría la retención de la proteína sobre la superficie de la célula. En una realización de la invención, un polipéptido TRAIL-R soluble comprende el dominio extracelular de la proteína. Un polipéptido TRAIL-R soluble puede incluir el dominio citoplásmico, o una porción del mismo, siempre y cuando que el polipéptido haya sido secretado a partir de la célula en la cual se ha producido. Un ejemplo de un TRAIL-R soluble es un TRAIL-R humano soluble que comprende los aminoácidos 52 a 210 de la SEC ID N°:2. Otros polipéptidos TRAIL-R solubles incluyen, pero sin limitarse a ellos, polipéptidos que comprenden los aminoácidos x a 210 de la SEC ID N°:2, en donde x es un número entero desde 51 hasta 59.

Las formas solubles de TRAIL-R poseen ciertas ventajas sobre la forma unida a la membrana de la proteína. La purificación de la proteína a partir de células hospedadoras recombinantes se facilita, dado que las proteínas solubles son secretadas a partir de las células. Además, las proteínas solubles son generalmente más adecuadas para ciertas aplicaciones, p. ej., para administración intravenosa.

En la presente invención, se proporcionan fragmentos de TRAIL-R. Dichos fragmentos pueden prepararse mediante cualquiera de entre un cierto número de técnicas convencionales. Los fragmentos péptidos deseados pueden ser sintetizados químicamente. Una alternativa implica la generación de fragmentos de TRAIL-R mediante digestión enzimática, p. ej., mediante tratamiento de la proteína con una enzima conocida para la escisión de proteínas en sitios definidos mediante restos de aminoácidos particulares. Otra técnica adecuada aún, implica el aislamiento y amplificación de un fragmento de ADN que contiene la codificación de un fragmento polipéptido deseado, mediante la reacción de cadena de polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen las terminaciones deseadas del fragmento de ADN se usan como los cebadores 5' y 3' en la PCR.

Los ejemplos de fragmentos son los establecidos en las reivindicaciones. Los fragmentos derivados a partir del dominio

citoplásmico encuentran su utilidad en estudios de la transducción de la señal mediada por TRAIL-R, y en la regulación de procesos celulares asociados con la transducción de señales biológicas. Igualmente, los fragmentos de polipéptido TRAIL-R pueden usarse como inmunógenos, en la generación de anticuerpos. Las realizaciones particulares están dirigidas a fragmentos del polipéptido TRAIL-R que retienen la capacidad para unirse a TRAIL. Un fragmento de este tipo puede ser un polipéptido TRAIL-R soluble, tal como se describe anteriormente.

En la presente invención, se proporcionan las variantes que se producen de manera natural de la proteína TRAIL-R de la SEC ID N°:2. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, proteínas que resultan de episodios de corte y empalme de ARNm alternos, o de la escisión proteolítica de la proteína TRAIL-R. El corte y empalme alterno de ARNm puede producir, por ejemplo, una proteína TRAIL-R truncada pero biológicamente activa, tal como una forma soluble que se produce de manera natural de la proteína. Las variaciones atribuibles a la proteólisis incluyen, por ejemplo, diferencias en los N- o C-terminales durante la expresión en diferentes tipos de células hospedadoras, debido a la separación proteolítica a partir de uno o más aminoácidos terminales de la proteína TRAIL-R (generalmente a partir de 1-5 aminoácidos terminales). Las proteínas TRAIL-R en las cuales las diferencias en la secuencia de aminoácidos son atribuibles a polimorfismo genético (variación alélica entre individuos que producen la proteína) son igualmente contempladas en la presente invención.

El experto en la técnica reconocerá igualmente que la posición(es) en la cual se escinde el péptido señal puede diferir de la precedida por el programa de ordenador, y puede variar de acuerdo con factores tales como el tipo de células hospedadoras usadas en la expresión de un polipéptido TRAIL-R recombinante. Una preparación de proteína puede incluir una mezcla de moléculas de proteína que tengan aminoácidos N-terminal diferentes, resultantes de la escisión del péptido señal en más de un sitio. Tal como se ha expuesto anteriormente, las realizaciones particulares de proteínas TRAIL-R maduras proporcionadas aquí, incluyen, pero sin limitarse a ellas, proteínas que tienen el resto en la posición 51, 52, 54, 56, ó 59 de la SEC ID N°:2, como el aminoácido N-terminal.

Con respecto a la exposición aquí de varios dominios de la proteína TRAIL-R, el experto en la técnica reconocerá que los límites anteriormente descritos de dichas regiones de la proteína son aproximados. Como ilustración de ello, los límites de la región transmembrana (los cuales pueden predecirse usando programadas de ordenador disponible para tal fin) pueden diferir de los descritos anteriormente. De acuerdo con ello, se contemplan aquí los polipéptidos TRAIL-R solubles en los cuales el C-terminal del dominio extracelular difiere del resto así identificado anteriormente.

Las sondas basadas en la secuencia de ADN humano de la SEC ID N°:3 o la SEC ID N°:1, pueden usarse para rastrear bibliotecas de ADNc derivadas a partir de otras especies de mamíferos, usando técnicas de hibridación de entrecruzamiento de especies convencionales.

Las secuencias de ADN de TRAIL-R pueden variar de las secuencias nativas aquí descritas. Debido a la conocida degeneración del código genético, en el que más de un codón puede contener la codificación del mismo aminoácido, una secuencia de ADN puede variar de la mostrada en la SEC ID N°:1 y además contener el código de una proteína TRAIL-R que tenga la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:2. Dichas variantes de secuencias de ADN pueden provenir de mutaciones silenciosas (p. ej., producidas durante amplificación por PCR), o pueden ser el producto de la mutagénesis deliberada de una secuencia nativa. De acuerdo con ello, entre las secuencias de ADN aquí proporcionadas se encuentran secuencias TRAIL-R nativas (p. ej., ADNc que comprende la secuencia de nucleótidos presentada en la SEC ID N°:1) y ADN que está degenerado como un resultado del código genético con respecto a una secuencia de ADN de TRAIL-R nativa.

Entre los polipéptidos TRAIL-R aquí descritos, se encuentran variantes de polipéptidos TRAIL-R nativos que retienen una actividad biológica de un TRAIL-R nativo. Dichas variantes incluyen polipéptidos que son substancialmente homólogos a TRAIL-R nativos, pero que tienen una secuencia de aminoácidos diferente de la de un TRAIL-R nativo debido a una o más delecciones, inserciones o substituciones. Las realizaciones particulares incluyen, pero sin limitarse a ellas, polipéptidos TRAIL-R que comprenden desde una hasta diez delecciones, inserciones o substituciones de restos de aminoácidos, cuando se comparan con una secuencia TRAIL-R nativa. Los ADNs que contienen la codificación de los TRAIL-R aquí descritos, incluyen variantes que difieren de una secuencia de ADN de TRAIL-R nativo, debido a una o más delecciones, inserciones o substituciones, pero que contienen el código de un polipéptido TRAIL-R biológicamente activo. Una actividad biológica del TRAIL-R es la capacidad para unirse a TRAIL.

En la presente invención, se describen moléculas de ácido nucleico capaces de hibridación al ADN de la SEC ID N°:1 o la SEC ID N°:3, bajo condiciones moderadamente restrictivas o altamente restrictivas, y las cuales contiene el código de un TRAIL-R biológicamente activo. Dichos ácidos nucleicos de hibridación incluyen, pero sin limitarse a ellos, secuencias de ADN variantes y ADN derivado a partir de especies no humanas, p. ej., mamíferos no humanos.

Las condiciones moderadamente restrictivas incluyen condiciones descritas, por ejemplo, por Sambrook y otros, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., vol. I, págs. 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989). Las condiciones para una restricción moderada, tal como son definidas por Sambrook y otros, incluyen el uso de una solución de prelavado de 5X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0) y condiciones de hibridación de aproximadamente 55°C, 5X SSC, durante una noche. Las condiciones altamente restrictivas incluyen temperaturas más altas de hibridación y

lavado. Una realización de la invención está dirigida a secuencias de ADN que se hibridan al ADN de las SEC ID NOS:1 ó 3 bajo condiciones altamente restrictivas, en donde dichas condiciones incluyen la hibridación a 68°C seguido de lavado en 0,1X SSC/SDS al 0,1% a 63-68°C.

En las realizaciones particulares de la invención, un polipéptido TRAIL-R variante difiere en la secuencia de aminoácidos de un TRAIL-R nativo, pero es substancialmente equivalente a un TRAIL-R nativo en cuanto a una actividad biológica. Un ejemplo es un TRAIL-R variante que se une a TRAIL con esencialmente la misma afinidad de unión que lo hace un TRAIL-R nativo. La afinidad de unión puede medirse mediante procedimientos convencionales, p. ej., tales como los descritos en la Patente de EE.UU. No. 5.512.457.

Las secuencias de aminoácidos variantes pueden comprender sustitución(es) conservadora(s), lo que significa que uno o más restos de aminoácidos de un TRAIL-R nativo está reemplazado por un resto diferente, pero que el TRAIL-R sustituido de manera conservadora retiene una actividad biológica deseada de la proteína nativa (p. ej., la capacidad de unirse a TRAIL). Un aminoácido dado puede ser reemplazado por un resto que tenga características fisicoquímicas similares. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un resto alifático por otro, tal como Ile, Val, Leu, o Ala por otro, o sustituciones de un resto polar por otro, tal como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn. Otras sustituciones conservadoras, p. ej., que implican sustituciones de regiones enteras que tienen características de hidrofobicidad similares, son bien conocidas.

En otro ejemplo de variantes, las secuencias que tienen la codificación de restos Cys que no son esenciales para la actividad biológica, pueden alterarse para dar lugar a que los restos Cys sean eliminados o reemplazados por otros aminoácidos, previniendo la formación de puentes disulfuro intramoleculares incorrectos durante la renaturalización. Ciertos receptores de la familia TNF-R contienen motivos repetidos ricos en cisteína en sus dominios extracelulares (Marsters y otros, J. Biol. Chem., vol. 267, págs. 5747-5750, (1992)). Estas repeticiones se estima que son importantes para la unión de ligandos. Con el fin de ilustrarlas, Marsters y otros, véase cita anterior, han informado que los polipéptidos tipo I del TNF-R soluble que carecen de una de las repeticiones muestran una reducción de diez veces en la afinidad de unión por el TNF α y el TNF β ; la delección de la segunda repetición da como resultado una pérdida completa de unión detectable de los ligandos. El TRAIL-R humano de la SEC ID N°:2 contiene dos de dichas repeticiones ricas en cisteína, incluyendo el primero los restos 94 a 137, e incluyendo el segundo los restos 138 a 178. Los restos de cisteína dentro de estos dominios ricos en cisteína permanecen de manera ventajosa inalterados en los TRAIL-R variantes, cuando se desea la retención de la actividad de unión del TRAIL.

Con el fin de potenciar la expresión en sistemas de levadura en los cuales está presente la actividad KEX2 proteasa, se prepararon otras variantes mediante la modificación de restos aminoácidos dibásicos adyacentes. El documento EP 212.914 describe el uso de mutagénesis específica del sitio para inactivar sitios de tratamiento de KEX2 proteasa en una proteína. Los sitios de tratamiento de KEX2 proteasa son inactivados mediante la delección, adición o sustitución de restos para alterar pares Arg-Arg, Arg-Lys, y Lys-Arg con el fin de eliminar la incidencia de estos restos básicos adyacentes. El TRAIL-R humano maduro contiene dichos pares de restos básicos adyacentes en los aminoácidos 72-73, 154-155, 322-323, 323-324, y 359-360 de la SEC ID N°:2. Las parejas Lys-Lys son considerablemente menos susceptibles a la escisión mediante KEX2, y la conversión de Arg-Lys o Lys-Arg a Lys-Lys, representa una vía conservadora y preferida para la inactivación de sitios KEX2.

Los polipéptidos TRAIL-R, incluyendo las variantes y fragmentos de los mismos, pueden ensayarse para determinar su actividad biológica en cualquier ensayo adecuado. La capacidad de un polipéptido TRAIL-R para unirse a TRAIL, puede confirmarse en ensayos de unión convencionales, ejemplos de los cuales se describen aquí más adelante.

Sistemas de expresión

La presente invención proporciona igualmente vectores de expresión y clonación recombinantes que contienen el ADN de TRAIL-R, así como la célula hospedadora que contiene los vectores recombinantes. Los vectores de expresión que comprenden el ADN de TRAIL-R pueden usarse para preparar polipéptidos TRAIL-R codificados por el ADN. Un procedimiento para la producción de polipéptidos TRAIL-R comprende el cultivo de células hospedadoras transformadas con un vector de expresión recombinante que contiene la codificación de TRAIL-R, bajo condiciones que promueven la expresión de TRAIL-R y, a continuación, la recuperación de los polipéptidos TRAIL-R a partir del cultivo. El experto en la técnica reconocerá que el procedimiento para la purificación del TRAIL-R expresado variará de acuerdo con factores tales como el tipo de células hospedadoras usadas, y de si el TRAIL-R es una forma unida a la membrana o si es una forma soluble que está secretada a partir de la célula hospedadora.

Puede usarse cualquier sistema de expresión adecuado. Los vectores incluyen un ADN que contiene la codificación de un polipéptido TRAIL-R, ligado de manera operativa a secuencias de nucleótidos reguladores de la transcripción o la traducción, tales como las derivadas a partir de un gen mamífero, microbiano, vírico, o de insecto. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores de transcripción, operadores, o potenciadores, un sitio de unión ribosómico ARNm, y secuencias apropiadas que controlan la iniciación y terminación de la transcripción y traducción. Las secuencias de nucleótidos están ligadas de manera operativa cuando la secuencia reguladora se refiere funcionalmente a la

secuencia de ADN de TRAIL-R. De acuerdo con ello, una secuencia de nucleótido promotor está ligada de manera operativa a una secuencia de ADN de TRAIL-R si la secuencia de nucleótido promotor controla la transcripción de la secuencia de ADN de TRAIL-R. Generalmente, dentro del vector de expresión se incorpora un origen de replicación que confiere la capacidad para replicarse en las células hospedadoras deseadas, y un gen de selección mediante el cual se identifican los transformantes.

Además, dentro de los vectores de expresión puede incorporarse una secuencia que contiene la codificación de un péptido señal apropiado (nativo u homólogo). Una secuencia de ADN para un péptido señal (conductor secretor) puede fusionarse en el marco de lectura de la secuencia de TRAIL-R, de manera tal que el TRAIL-R es inicialmente traducido como una proteína de fusión que comprende el péptido señal. Un péptido señal que es funcional en las células hospedadoras deseadas promueve la secreción extracelular del polipéptido TRAIL-R. El péptido señal se escinde del polipéptido TRAIL durante la secreción del TRAIL-R a partir de la célula.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptidos TRAIL-R incluyen procariotas, levadura o células eucarióticas superiores. Generalmente, las células de mamífero o de insecto son las preferidas para uso como células hospedadoras. Los vectores de expresión y clonación apropiados para uso con células hospedadoras bacterianas, fúngicas, de levadura y de mamífero, se describen, por ejemplo, por Pouwels y otros, en *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, (1985). Igualmente, podrían usarse sistemas de traducción libres de célula para producir polipéptidos TRAIL-R usando ARN derivados a partir de constructos de ADN aquí descritos.

Las procariotas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo, *E. coli* o *Bacilli*. Las células hospedadoras procariotas adecuadas para transformación incluyen, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y otras diversas especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*. En una célula hospedadora procariótica, tal como *E. coli*, un polipéptido TRAIL-R puede incluir un resto metionina N-terminal para facilitar la expresión del polipéptido recombinante en la célula hospedadora procariótica. La Met N-terminal puede ser escindida a partir del polipéptido TRAIL-R recombinante expresado.

Los vectores de expresión para uso en células hospedadoras procarióticas comprenden, generalmente, uno o más genes marcadores seleccionables fenotípicos. Un gen marcador seleccionable fenotípico es, por ejemplo, un gen que contiene la codificación de una proteína que confiere resistencia a antibióticos o que suministra una exigencia autotrófica. Los ejemplos de vectores de expresión útiles para células hospedadoras procarióticas incluyen los derivados a partir de plásmidos disponibles comercialmente tal como el vector de clonación pBR322 (ATCC 37017). El pBR322 contiene genes para resistencia a la ampicilina y tetraciclina y, de esta forma, proporciona medios simples para la identificación de células transformadas. Dentro del vector pBR322 están insertados un promotor apropiado y una secuencia de ADN de TRAIL-R. Otros vectores disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo, el pKK223-3 (Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y el pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA).

Las secuencias promotoras comúnmente usadas para vectores de expresión de células hospedadoras procarióticas recombinantes incluyen β -lactamasa (penicilinas), sistema promotor lactosa (Chang y otros, *Nature*, vol. 275, pág. 615, (1978); y Goeddel y otros, *Nature*, vol. 281, pág. 544, (1979)), sistema promotor triptófano (*trp*) (Goeddel y otros, *Nucl. Acids Res.*, vol. 8, pág. 4057, (1980); y documento EP-A-36776) y el promotor *tac* (Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, pág. 412, (1982)). Un sistema de expresión de célula hospedadora procariótica particularmente útil usa un fago λ del promotor P_L y una secuencia represora termolábil *cl857ts*. Los vectores plásmidos disponibles del American Type Culture Collection que incorporan derivados del fago λ del promotor P_L , incluyen el plásmido pHUB2 (residente en la cepa JMB9 de *E. coli*, ATCC 37092) y el pPLc28 (residente en RR1 de *E. coli*, ATCC 53082).

Como alternativa, el TRAIL-R puede expresarse en células hospedadoras de levadura, preferiblemente a partir del género *Saccharomyces* (p. ej., *S. cerevisiae*). Igualmente, pueden usarse otros géneros de levadura, tal como *Pichia* o *Kluyveromyces*. Los vectores de levadura frecuentemente contienen una secuencia de origen de replicación procedente de un plásmido de levadura de 2 μ , una secuencia replicante autónomamente (ARS), una región promotora, secuencias para poliadenilación, secuencia para terminación de transcripción, y un gen marcador seleccionable. Las secuencias promotoras adecuadas para vectores de levaduras incluyen, entre otras, promotores para metalotioneina, 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman y otros, *J. Biol. Chem.*, vol. 255, pág. 2073, (1980)) u otras enzimas glucolíticas (Hess y otros, *J. Adv. Enzyme Reg.*, vol. 7, pág. 149, (1968); y Holland y otros, *Biochem.*, vol. 17, pág. 4900, (1978)), tal como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosefosfato isomerasa, fosfo-glucosa isomerasa, y glucoquinasa. Otros vectores y promotores adecuados para uso en la expresión en levaduras se describen adicionalmente por Hitzeman en el documento EPA-73.657. Otra alternativa es el promotor ADH2 reprimible mediante glucosa descrito por Russell y otros (*J. Biol. Chem.*, vol. 258, pág. 2674, (1982)) y Beier y otros (*Nature*, vol. 300, pág. 724, (1982)). Los vectores lanzadera replicables tanto en levadura como en *E. coli* pueden construirse mediante la inserción de secuencias de ADN procedentes de pBR322 para selección y replicación en *E. coli* (gen *Amp^r* y origen de replicación) dentro de los vectores de levadura anteriormente descritos.

La secuencia conductora factor α de levadura puede usarse para dirigir la secreción del polipéptido TRAIL-R. La secuencia conductora factor α se inserta, frecuentemente, entre la secuencia promotora y la secuencia del gen estructural. Véase, p. ej., Kurjan y otros, *Cell*, vol. 30, pág. 933, (1982) y Bitter y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 81, pág. 5330, (1984). Otras secuencias conductoras adecuadas para facilitar la secreción de polipéptidos recombinantes a partir de huéspedes de levadura son conocidas por los expertos en la técnica. Una secuencia conductora puede modificarse cerca de su extremo 3' con el fin de contener uno o más sitios de restricción. Esto facilitará la fusión de la secuencia conductora al gen estructural.

Los protocolos de transformación de levadura son conocidos por los expertos en la técnica. Uno de dichos protocolos es el descrito por Hinnen y otros, en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 75, pág. 1929, (1978). El protocolo de Hinnen y otros, selecciona para transformantes Trp^+ en un medio selectivo, en el que el medio selectivo está formado por base de nitrógeno de levadura al 0,67%, ácidos casamino al 0,5%, glucosa al 2%, 10 $\mu\text{g/ml}$ de adenina y 20 $\mu\text{g/ml}$ de uracilo.

Las células hospedadoras de levadura transformadas mediante vectores que contienen una secuencia promotora ADH2 pueden desarrollarse para la inducción de la expresión en un medio "rico". Un ejemplo de un medio rico es uno que comprende extracto de levadura al 1%, peptona al 2%, y glucosa al 1%, suplementado con 80 $\mu\text{g/ml}$ de adenina y 80 $\mu\text{g/ml}$ de uracilo. La desrepresión del promotor ADH2 se produce cuando se agota la glucosa del medio.

Los sistemas de cultivo de células hospedadoras de mamíferos o insectos pueden usarse, igualmente, para expresar polipéptidos TRAIL-R recombinantes. Los sistemas de Bacculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos han sido revisados por Luckow y Summers, en *Bio/Technology*, vol. 6, pág. 47, (1988). Igualmente, pueden usarse líneas de células establecidas de origen mamífero. Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman y otros, *Cell*, vol. 23, pág. 175, (1981)), células L, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hamster chino (CHO), células HeLa, y líneas de células BHK (ATCC CRL 10), y la línea de células CV1/EBNA derivada a partir de la línea de células de riñón de mono verde africano CV1 (ATCC CCL 70), tal como ha sido descrita por McMahan y otros (*EMBO J.*, vol. 10, pág. 2821, (1991)).

Las secuencias de control de transcripción y de traducción para vectores de expresión de células hospedadoras de mamíferos pueden escindirse a partir de genomas víricos. Las secuencias promotoras y las secuencias potenciadoras comúnmente usadas derivan a partir del virus Polyoma, Adenovirus 2, Virus símico 40 (SV40) y citomegalovirus humano. Las secuencias de ADN derivadas a partir del genoma del virus SV40, por ejemplo, el origen SV40, promotor temprano y tardío, potenciador, corte y empalme, y sitios de poliadenilación, pueden usarse para proporcionar otros elementos genéticos para la expresión de una secuencia de gen estructural en una célula hospedadora de mamífero. Los promotores temprano y tardío víricos son particularmente útiles dado que ambos son fácilmente obtenidos a partir de un genoma vírico en forma de un fragmento, el cual, puede contener, igualmente, un origen de replicación vírico (Fiers y otros, *Nature*, vol. 273, pág. 113, (1978)). Igualmente, pueden usarse fragmentos SV40 más grandes o más pequeños, siempre y cuando esté incluida la secuencia de aproximadamente 250 pb que se extiende desde el sitio Hind III hacia el sitio Bgl I localizada en el origen de replicación vírico SV40.

Los vectores de expresión para uso en células hospedadoras de mamíferos pueden construirse, por ejemplo, tal como ha sido descrito por Okayama y Berg (*Mol. Cell. Biol.*, vol. 3, pág. 280, (1983)). Un sistema útil para la expresión de alto nivel estable de ADNc de mamíferos en células epiteliales mamarias murinas C127, puede construirse substancialmente tal como ha sido descrito por Cosman y otros (*Mol. Immunol.*, vol. 23, pág. 935, (1986)). Un vector de alta expresión, el PMLSV N1/N4, descrito por Cosman y otros, en *Nature*, vol. 312, pág. 768, (1984), ha sido depositado como ATCC 39890. En los documentos EP-A-0367566 y WO 91/18982, se describen vectores de expresión de mamíferos adicionales. Como una alternativa, el vector puede derivar a partir de un retrovirus. La sobreexpresión de TRAIL-R de longitud total ha dado como resultado el ampollamiento de la membrana y la condensación nuclear de células CV-1/EBNA transfectadas, lo que indica que el mecanismo de la muerte celular fue la apoptosis. Para células hospedadoras en las cuales se produce dicha apoptosis mediada por TRAIL-R, puede incluir en el sistema de expresión un inhibidor adecuado de la apoptosis.

Para inhibir la apoptosis inducida por TRAIL-R de células hospedadoras que expresan TRAIL-R recombinante, las células pueden co-transfectarse con un vector de expresión que contenga la codificación de un polipéptido que funcione como un inhibidor de la apoptosis. Los vectores de expresión que contienen la codificación de dichos polipéptidos pueden prepararse mediante procedimientos convencionales. Otra vía implica la adición de un inhibidor de la apoptosis al medio de cultivo. En los Ejemplos 6 y 8 se ilustra el uso de poxvirus CrmA, baculovirus P35, un fragmento C-terminal de FADD, y el derivado tripéptido zVAD-fmk, para reducir la muerte de células hospedadoras.

El zVAD-fmk (benciloxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometil-cetona) es un compuesto con base tripéptida, disponible de Enzyme System Products, Dublin, California. Tal como se ilustra en el Ejemplo 8, el zVAD-fmk puede agregarse al medio en el cual se han cultivado las células que expresan TRAIL-R.

La proteína derivada de la viruela del ganado vacuno de 38 kilodaltons designada posteriormente como CrmA, ha sido descrita por Pickup y otros (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 83, págs. 7698-7702, (1986)). La información de la secuencia

para CrmA se presenta en la Figura 4 de Pickup y otros, véase cita anterior. Una vía para la producción y purificación de la proteína CrmA ha sido descrita por Ray y otros (Cell, vol. 69, págs. 597-604, (1992)).

Una proteína de 35 kilodaltons codificada por el virus polihedrosis nuclear Autographa californica, un baculovirus, ha sido descrita por Friesen y Miller (J. Virol., vol. 61, págs. 2264-2272, (1987)). La información de la secuencia para esta proteína, designada aquí como baculovirus p35, se presenta en la Figura 5 de Friesen y Miller, véase cita anterior.

La proteína citoplásmica que contiene el dominio muerte FADD (también conocido como MORT1), ha sido descrita por Boldin y otros (J. Biol. Chem., vol. 270, págs. 7795-7798, (1995)). Se ha reseñado que FADD se asocia, directamente o indirectamente, con el dominio muerte citoplásmico de ciertos receptores que median en la apoptosis (Boldin y otros, Cell, vol. 85, págs. 803-815, (Junio 1996); Hsu y otros, Cell, vol. 84, págs. 299-308, (1996)).

En una realización de la presente invención, los polipéptidos FADD truncados que incluyen el dominio muerte (localizado en la porción C-terminal de la proteína), pero que carecen de la región N-terminal a la cual se le ha atribuido las funciones efectoras de la apoptosis, se usan para reducir la apoptosis. El uso de polipéptidos mutantes con delección de FADD, truncados en el N-terminal, para inhibir la muerte de las células que expresan otros receptores que inducen la apoptosis, ha sido descrito por Hsu y otros (Cell, vol. 84, págs. 299-308, (1996)).

Este enfoque se ilustra en el Ejemplo 8, el cual usa un polipéptido negativo FADD-dominante (FADD-DN) adecuado, que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 117 a 245 de la secuencia de aminoácidos MORT1 presentada por Boldin y otros (J. Biol. Chem., vol. 270, págs. 7795-7798, (1995)). En el Ejemplo 8, las células se co-transfectaron con un vector de expresión que contiene la codificación de TRAIL-R, y con un vector de expresión que contiene la codificación del péptido Flag® anteriormente descrito, fusionado al N-terminal del polipéptido FADD-DN.

Sin desear teorizar, una posible explicación es que los fragmentos C-terminales de FADD se asocian con el dominio muerte intracelular del receptor, pero carece de la porción N-terminal de la proteína que es necesaria para efectuar la apoptosis (Hsu y otros, Cell, vol. 84, págs. 299-308, (enero 1996); Boldin y otros, Cell, vol. 85, págs. 803-815, (Junio 1996)). De acuerdo con ello, el FADD truncado puede bloquear la asociación del FADD de longitud total, endógeno, con el dominio muerte del receptor; consecuentemente, está inhibida la apoptosis que se iniciaría mediante dicho FADD endógeno.

Otros inhibidores de la apoptosis útiles en sistemas de expresión de la presente invención, pueden identificarse en procedimientos de ensayo convencionales. Uno de dichos ensayos, en el cual los compuestos se ensayan para determinar la capacidad para reducir la apoptosis de las células que expresan TRAIL-R, se encuentra descrito en el Ejemplo 8.

El poxvirus CrmA, el baculovirus P35, y el zVAD-fmk son inhibidores caspasa víricos. Otros inhibidores caspasa pueden ensayarse para determinar la capacidad para reducir la muerte de células mediada por TRAIL-R.

El uso de CrmA, de baculovirus p35, y ciertos derivados de péptidos (incluyendo el zVAD-fmk), como inhibidores de la apoptosis en células/sistemas particulares, ha sido expuesto por Sarin y otros (J. Exp. Med., vol. 184, págs. 2445-2450, (Diciembre 1996)). El papel de las proteasas de la familia de la enzima que convierte la interleuquina-1 β (ICE) en las cascadas de transducción de la señal que conducen a la muerte programada de células, y el uso de inhibidores de dichas proteasas para bloquear la apoptosis, ha sido expuesta por Sarin y otros, véase cita anterior, y Muzio y otros, (Cell, vol. 85, págs. 817-827, (1996)).

Generalmente, los inhibidores de la apoptosis no necesitan ser usados para la expresión de polipéptidos TRAIL-R que carecen del dominio citoplásmico (es decir, que carecen de la región de la proteína implicada en la trasducción de la señal). De acuerdo con ello, los sistemas de expresión para la producción de polipéptidos TRAIL-R solubles que comprenden únicamente el dominio extracelular (o un fragmento del mismo), no necesitan incluir uno de los inhibidores de la apoptosis anteriormente descritos.

Con respecto a los péptidos señal que pueden usarse en la producción de TRAIL-R, el péptido señal nativo de TRAIL-R puede ser reemplazado, si se desea, por un péptido señal heterólogo o una secuencia conductora. La selección del péptido señal o conductor depende de factores tales como el tipo de células hospedadoras en las cuales ha de producirse el TRAIL-R recombinante. Como ilustración, los ejemplos de péptidos señal heterólogos que son funcionales en las células hospedadoras de mamífero, incluyen la secuencia señal para la interleuquina-7 (IL-7) descrita en la Patente de EE.UU. 4.965.195, la secuencia señal para el receptor de interleuquina-2 descrita por Cosman y otros, (Nature, vol. 312, pág. 768, (1984)); el péptido señal receptor de interleuquina-4 descrito en el documento EP 367.566; el péptido señal del receptor de interleuquina-1 del tipo I descrito en la Patente de EE.UU. 4.968.607; y el péptido señal del receptor de interleuquina-1 del tipo II descrito en la EP 460.846.

Formas oligoméricas de TRAIL-R

Abarcados por la presente invención, se encuentran oligómeros que contienen polipéptidos TRAIL-R. Los oligómeros

TRAIL-R pueden estar en la forma de dímeros, trímeros, u oligómeros superiores, ligados covalentemente o ligados no covalentemente.

Una realización de la invención está dirigida a oligómeros que comprenden polipéptidos TRAIL-R múltiples unidos a través de interacciones covalentes o no covalentes entre partes peptídicas fusionadas a los polipéptidos TRAIL-R. Dichos péptidos pueden ser enlaces peptídicos (espaciadores) o péptidos que tienen la propiedad de promover la oligomerización. Los cerradores de leucina y ciertos polipéptidos derivados a partir de anticuerpos se encuentran entre los péptidos que pueden promover la oligomerización de polipéptidos TRAIL-R unidos a ellos, tal como se describe con mayor detalle más adelante.

En realizaciones particulares, los oligómeros comprenden desde dos hasta cuatro polipéptidos TRAIL-R. Los restos TRAIL-R del oligómero pueden ser polipéptidos solubles, tal como se ha descrito anteriormente.

Como una alternativa, un oligómero TRAIL-R se prepara usando polipéptidos derivados a partir de inmunoglobulinas. La preparación de proteínas de fusión que comprenden ciertos polipéptidos heterólogos fusionados a diversas porciones de polipéptidos derivados de anticuerpos (incluyendo el domino Fc) ha sido descrita, p. ej., por Ashkenazi y otros (PNAS USA, vol. 88, pág. 10533, (1991); Byrn y otros (Nature, vol. 344, pág. 677, (1990); y Hollenbaugh y Aruffo ("Construcción de proteínas de fusión de inmunoglobulina" en Current Protocols in Immunology, Supl. 4, págs. 10.19.1-10.19.11, (1992)).

Una realización de la presente invención está dirigida a un dímero TRAIL-R que comprende dos proteínas de fusión creadas mediante la fusión de TRAIL-R a la región Fc de un anticuerpo. Una fusión de un gen que contiene la codificación de la proteína de fusión TRAIL-R/Fc está insertada dentro de un vector de expresión apropiado. Las proteínas de fusión TRAIL-R/Fc están expresadas en células hospedadoras transformadas con el vector de expresión recombinante, y más predisuestas a ensamblar moléculas anticuerpo, con lo cual se forman enlaces disulfuro intercadena entre las partes Fc para proporcionar TRAIL-R divalente.

Lo que se proporcionan aquí, son proteínas de fusión que comprenden un polipéptido TRAIL-R fusionado a un polipéptido Fc derivado a partir de un anticuerpo. Igualmente, se proporciona el ADN que contiene la codificación de dichas proteínas de fusión, así como dímeros que contienen dos proteínas de fusión unidas a través de enlaces disulfuro entre partes Fc de los mismos. El término "polipéptido Fc" tal como aquí se usa, incluye formas nativas y muteínas de polipéptidos derivados a partir de la región Fc de un anticuerpo. Igualmente, se incluyen las formas truncadas de dichos polipéptidos conteniendo la región bisagra que promueve la dimerización.

Un polipéptido Fc adecuado, descrito en la Solicitud PCT WO 93/10151, es un polipéptido de cadena sencilla que se extiende desde la región bisagra N-terminal hasta la C-terminal nativa de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano. Otro polipéptido Fc útil, es la muteína Fc descrita en la Patente de EE.UU. 5.457.035 y por Baum y otros (EMBO J., vol. 13, págs. 3992-4001, (1994)). La secuencia de aminoácidos de esta muteína es idéntica a la de la secuencia Fc nativa presentada en el documento WO 93/10151, excepto que el aminoácido 19 ha sido cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 ha sido cambiado de Leu a Glu, y el aminoácido 22 ha sido cambiado de Gly a Ala. La muteína muestra afinidad reducida por los receptores Fc.

En otras realizaciones, el TRAIL-R puede substituirse por la porción variable de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo. Si las proteínas de fusión se hacen tanto con cadenas ligeras como pesadas de un anticuerpo, es posible formar un oligómero TRAIL-R con tantas como cuatro regiones extracelulares TRAIL-R.

Como alternativa, el oligómero es una proteína de fusión que comprende múltiples polipéptidos TRAIL-R, con o sin enlaces peptídicos (péptidos espaciadores). Entre los enlaces peptídicos adecuados se encuentran los descritos en las Patentes de EE.UU. 4.751.180 y 4.935.233. Una secuencia de ADN que contiene la codificación de un enlace peptídico deseado puede insertarse entre, y dentro del mismo marco de lectura, las secuencias de ADN que contienen la codificación de TRAIL-R, usando cualquier técnica convencional adecuada. Por ejemplo, un oligonucleótido químicamente sintetizado que contenga la codificación del enlace puede ligarse entre secuencias que contienen la codificación del TRAIL-R. En realizaciones particulares, una proteína de fusión comprende desde dos hasta cuatro polipéptidos TRAIL-R solubles, separados por enlaces peptídicos.

Otro procedimiento para la preparación de TRAIL-R oligómero implica el uso de un cerrador leucina. Los dominios del cerrador leucina son péptidos que promueven la oligomerización de las proteínas en las cuales se encuentran. Los cerradores leucina fueron originalmente identificados en diversas proteínas de unión de ADN (Landschulz y otros, Science, vol. 240, pág. 1759, (1988)), y están desde que se han encontrado en una diversidad de proteínas diferentes. Entre los cerradores leucina conocidos se encuentran péptidos que se producen de manera natural y derivados de los mismos, que se dimerizan o trimerizan. En la Solicitud PCT WO 94/10308, se describen ejemplos de dominios de cerradores leucina adecuados para la producción de proteínas oligómeras solubles, y el cerrador leucina derivado a partir de proteína D tensioactiva de pulmón (SPD) descrita por Hoppe y otros (FEBS Letters, vol. 344, pág. 191, (1994)). El uso de un cerrador leucina modificado que permita la trimerización estable de una proteína heteróloga fusionada a él, ha sido descrito por

Fanslow y otros (Semin. Immunol., vol. 6, págs. 267-278, (1994)). Las proteínas de fusión recombinantes que comprenden un polipéptido TRAIL-R soluble fusionado a un péptido cerrador leucina se expresan en células hospedadoras adecuadas, y el TRAIL-R oligómero soluble que forman se recupera a partir del sobrenadante del cultivo.

- 5 El TRAIL-R oligomérico tiene la propiedad de sitios de unión bivalentes, trivalentes, etc., para TRAIL. Las proteínas de fusión anteriormente descritas que comprenden restos Fc (y los oligómeros formados a partir de ellas), ofrecen la ventaja de una fácil purificación mediante cromatografía de afinidad sobre columnas de Proteína A o Proteína G. Se proporcionan aquí secuencias de ADN que contienen la codificación de TRAIL-R oligómero, o que contienen la codificación de proteínas de fusión útiles en la preparación de oligómeros TRAIL-R.

Ensayos

- 10 Las proteínas TRAIL-R (incluyendo fragmentos, variantes, oligómeros, y otras formas de TRAIL-R), pueden ensayarse para determinar la capacidad de unirse a TRAIL en cualquier ensayo adecuado, tal como un ensayo de unión convencional. A modo de ilustración, el TRAIL-R puede marcarse con un reactivo detectable (p. ej., un radionúclido, cromóforo, enzima que cataliza una reacción colorimétrica o fluorométrica, y similares). El TRAIL-R marcado se pone en
15 contacto con células que expresan TRAIL. A continuación, las células se lavan para separar el TRAIL-R marcado no unido, y la presencia del marcador unido a la célula se determina mediante una técnica adecuada, seleccionada de acuerdo con la naturaleza del marcador.

- Un ejemplo de un procedimiento de ensayo de unión es el siguiente. Se construyó un vector de expresión recombinante que contenía el ADNc de TRAIL-R, p. ej., tal como ha sido descrito en la Solicitud PCT WO 97/01633. La información del ADN y la secuencia de aminoácidos para TRAIL humano y de ratón se presenta en el documento WO 97/01633. El TRAIL
20 comprende un dominio citoplásmico N-terminal, una región transmembrana, y un dominio extracelular C-terminal. Las células CV-1-EBNA-1 en discos de 10 cm² se transfectaron con el vector de expresión recombinante. Las células CV-1/EBNA-1 (ATCC CRL 10478) expresan de manera constitutiva el antígeno-1 nuclear del EBV impulsado a partir del potenciador/promotor temprano inmediato del CMV. El CV-1-EBNA-1 se derivó a partir de la línea de células de riñón de mono verde africano CV-1 (ATCC CCL 70), tal como ha sido descrito por McMahan y otros (EMBO J., vol. 10, pág. 2821, (1991)).
25

- Las células transfectadas se cultivaron durante 24 horas y, a continuación, las células de cada disco se dividen dentro de una placa de 24 pocillos. Después de cultivadas durante un período adicional de 48 horas, las células transfectadas (aproximadamente 4x10⁴ células/pocillo) se lavaron con BM-NFDM, que es un medio de unión (RPMI 1640 conteniendo 25 mg/ml de albúmina de suero bovino, 2 mg/ml de azida sódica, Hepes 20 mM, pH 7,2), al cual se habían agregado 50
30 mg/ml de leche en polvo desnatada. A continuación, las células se incubaron durante 1 hora a 37°C con varias concentraciones de una proteína de fusión TRAIL-R/Fc soluble. A continuación, las células se lavaron y se incubaron con una concentración de saturación constante de un IgG antihumano de ratón marcado con ¹²⁵I en medio de unión, con agitación suave durante 1 hora a 37°C. Después de un lavado intenso, las células se liberaron mediante tripsinización.

- El IgG antihumano de ratón usado anteriormente está dirigido contra la región Fc de IgG humano y puede obtenerse de Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA. El anticuerpo está radioyodado usando el procedimiento estándar de cloramina T. El anticuerpo se une a la porción Fc de cualquier proteína TRAIL-R/Fc que se haya unido a las células. En todos los ensayos, la unión no específica del anticuerpo marcado con ¹²⁵I se ensayó en la ausencia de TRAIL-T/Fc, así como en la presencia de TRAIL-R/Fc y un exceso molar 200 veces de anticuerpo IgG anti-humano de ratón no marcado.
35

- El anticuerpo marcado con ¹²⁵I unido a las células se cuantificó sobre un contador Packard Autogamma. Los cálculos de afinidad (Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci., vol. 51, pág. 660, (1949)) se generaron sobre RS/1 (BBN Software, Boston, MA) trabajando sobre un ordenador Microwax.
40

- Otro tipo de ensayo de unión adecuado es un ensayo de unión de competencia. A modo de ilustración, la actividad biológica de una variante de TRAIL-R puede determinarse ensayando la capacidad de las variantes para competir con un
45 TRAIL-R nativo por la unión a TRAIL.

- Los ensayos de unión de competencia pueden llevarse a cabo mediante metodología convencional. Los reactivos que pueden usarse en los ensayos de unión de competencia incluyen TRAIL-R radiomarcado y células intactas que expresan TRAIL (endógeno o recombinante) sobre la superficie de la célula. Por ejemplo, un fragmento de TRAIL-R soluble radiomarcado puede usarse para competir con una variante de TRAIL-R soluble por la unión al TRAIL de la superficie de la célula. En lugar de células intactas, se podría substituir una proteína de fusión TRAIL/Fc soluble unida a una fase sólida mediante la interacción de una proteína A o Proteína G (sobre la fase sólida) con el resto Fc. Las columnas cromatográficas que contienen la Proteína A o la Proteína G incluyen las disponibles de Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ. Otro tipo de ensayo de unión de competencia usa TRAIL soluble radiomarcado, tal como una proteína de fusión TRAIL/Fc soluble, y células intactas que expresan TRAIL-R. Pueden obtenerse resultados cualitativos mediante
55 ensayos de unión en placa autorradiográficos, en tanto que, para generar resultados cuantitativos, pueden usarse

representaciones Scatchard (Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci., vol. 51, pág. 660, (1949)).

Otro tipo de ensayo para determinar la actividad biológica, implica el ensayo de un polipéptido TRAIL-R para determinar la capacidad de bloquear la apoptosis mediada por TRAIL de células diana, tal como, por ejemplo, la línea de células T leucémicas humanas, conocida como células Jurkat. La apoptosis mediada por TRAIL de la línea de células designada como Jurkat clon E6-1 (ATCC TIB 152) ha sido demostrada en procedimientos de ensayo descritos en la Solicitud PCT WO 97/01633.

Usos del TRAIL-R

Los usos del TRAIL-R incluyen, pero sin limitarse a ellos, los siguientes. Algunos de estos usos del TRAIL-R surgen de su capacidad para unirse a TRAIL.

- 10 El TRAIL-R se usa como un reactivo de purificación de proteínas. Los polipéptidos TRAIL-R pueden unirse a un material soporte sólido y usarse para purificar proteínas TRAIL mediante cromatografía de afinidad. En realizaciones particulares, un polipéptido TRAIL-R (en cualquier forma de las aquí descritas que es capaz de unirse a TRAIL), está unido a un soporte sólido mediante procedimientos convencionales. A modo de un ejemplo, se encuentran disponibles columnas de cromatografía que contienen grupos funcionales que reaccionan con grupos funcionales situados sobre las cadenas laterales de aminoácidos de las proteínas (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ). Como una alternativa, una proteína TRAIL-R/Fc está unida a columnas de cromatografía que contienen Proteína A o Proteína G a través de interacciones con el resto Fc.

- 20 El TRAIL-R se usa igualmente en la medición de la actividad biológica de proteínas TRAIL en cuanto a su afinidad de unión por TRAIL-R. De acuerdo con ello, las proteínas TRAIL-R pueden ser usadas por aquellos que realizan estudios de "aseguramiento de la calidad", p. ej., para monitorizar la vida media y la estabilidad de la proteína TRAIL bajo diferentes condiciones. A modo de ilustración, el TRAIL-R puede usarse en un estudio de afinidad de unión para medir la actividad biológica de una proteína TRAIL que ha sido almacenada a diferentes temperaturas, o producida en tipos de células diferentes. Igualmente, el TRAIL-R puede usarse para determinar si se retiene la actividad biológica después de la modificación de una proteína TRAIL (p. ej., modificación química, truncamiento, mutación, etc.). La afinidad de unión de la proteína TRAIL modificada por TRAIL-R se compara con la de una proteína TRAIL no modificada con el fin de detectar cualquier impacto negativo de la modificación sobre la actividad biológica del TRAIL. De esta forma, puede comprobarse la actividad biológica de una proteína TRAIL antes de usarse, por ejemplo, en un estudio de investigación.

- 30 Igualmente, el TRAIL-R se usa en la purificación o identificación de células que expresan TRAIL sobre la superficie de la célula. Los polipéptidos TRAIL-R están unidos a una fase sólida tal como una matriz de columna de cromatografía o un sustrato adecuado similar. Por ejemplo, pueden recubrirse microesferas magnéticas con TRAIL-R y mantenerse en un recipiente de incubación mediante un campo magnético. Las suspensiones de mezclas de células que contienen células que expresan TRAIL se ponen en contacto con la fase sólida que contiene sobre ella el TRAIL-R. Las células que expresan el TRAIL sobre la superficie de la célula se unen al TRAIL-R fijado y, a continuación, las células no unidas se separan mediante lavado.

- 35 Como alternativa, el TRAIL-R puede conjugarse a un resto detectable y, a continuación, incubarse con células para ser ensayado para determinar la expresión del TRAIL. Después de la incubación, el TRAIL-R marcado no unido se separa y se determina la presencia o la ausencia del resto detectable sobre las células.

- 40 En una alternativa adicional, se incuban mezclas de células sospechosas de contener células TRAIL con TRAIL-R biotinilado. Típicamente, los períodos de incubación son de al menos una hora de duración con el fin de asegurar la suficiente unión. A continuación, la mezcla resultante se pasa a través de una columna empaquetada con perlas recubiertas con avidina, con lo cual, la alta afinidad de unión de la biotina por la avidina proporciona la unión de las células deseadas a las perlas. Los procedimientos para el uso de perlas recubiertas con avidina son conocidos (véase, Berenson y otros, J. Cell. Biochem., vol. 10D, pág. 239, (1986)). El lavado para separar el material no unido, y la liberación de las células unidas, se lleva a cabo usando procedimientos convencionales.

- 45 Los polipéptidos TRAIL-R se usan igualmente como vehículos para el suministro de agentes unidos a través de ellos a células que portan TRAIL. Las células que expresan TRAIL incluyen las identificadas por Wiley y otros (Immunity, vol. 3, págs. 673-682, (1995)). De acuerdo con ello, las proteínas TRAIL-R pueden usarse para el suministro de agentes de diagnóstico o terapéuticos a dichas células (o a otros tipos de células que resultan expresar TRAIL sobre la superficie de la célula) en procedimientos in vitro o in vivo.

- 50 Los agentes detectables (de diagnóstico) y terapéuticos que pueden estar unidos a un polipéptido TRAIL-R incluyen, pero sin limitarse a ellos, toxinas, otros agentes citotóxicos, fármacos, radionúclidos, cromóforos, enzimas que catalizan una reacción colorimétrica o fluorométrica, y similares, eligiéndose el agente particular de acuerdo con la aplicación a la que se le destine. Entre las toxinas se encuentran la ricina, abrina, toxina de la difteria, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, proteínas de inactivación ribosómica, micotoxinas tal como tricotecenos, y derivados y fragmentos (p. ej., cadenas

sencillas) de las mismas. Los radionúclidos adecuados para uso en diagnóstico incluyen, pero sin limitarse a ellos, ^{123}I , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , y ^{76}Br . Los ejemplos de radionúclidos adecuados para uso terapéutico son ^{131}I , ^{211}At , ^{77}Br , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{109}Pd , ^{64}Cu , y ^{67}Cu .

- 5 Dichos agentes pueden unirse al TRAIL-R mediante cualquier procedimiento convencional adecuado. El TRAIL-R, al ser una proteína, comprende grupos funcionales sobre las cadenas laterales de aminoácidos que se pueden hacer reaccionar con grupos funcionales sobre un agente deseado para formar, por ejemplo, enlaces covalentes. Como alternativa, la proteína o agente puede ser derivado con el fin de generar o unir un grupo funcional reactivo deseado. La derivación puede implicar la unión de uno de los reactivos de emparejamiento bifuncionales disponibles para la unión de varias moléculas a proteínas (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois). Se conocen un cierto número de técnicas para el radiomarcado de proteínas. Los metales radionúclidos pueden unirse al TRAIL-R mediante el uso, por ejemplo, de un agente quelante bifuncional adecuado.

Los conjugados que comprenden TRAIL-R y un agente de diagnóstico o terapéutico adecuado (preferiblemente ligado covalentemente) se preparan de esta forma. Los conjugados se administran o se usan de otra forma, en una cantidad apropiada para la aplicación particular.

- 15 El ADN y los polipéptidos TRAIL-R de la presente invención puede usarse en el desarrollo de tratamientos para cualquier trastorno mediado (directamente o indirectamente) por cantidades defectuosas, o insuficientes, de TRAIL-R. Los polipéptidos TRAIL-R pueden administrarse a un maífero aquejado por un trastorno de este tipo. Como alternativa, puede adoptarse una vía de terapia de genes. La descripción en este documento de secuencias de nucleótidos TRAIL-R nativos permite la detección de genes TRAIL-R defectuosos, y la sustitución de los mismos con genes que contienen la codificación de TRAIL-R normal. Los genes defectuosos pueden detectarse en ensayos de diagnóstico in vitro, y mediante la comparación de una secuencia de nucleótidos TRAIL-R nativo aquí descrita con la de un gen TRAIL-R derivado a partir de una persona sospechosa de albergar un defecto en este gen.

- 25 Otro uso de la proteína de la presente invención es una herramienta de investigación para el estudio de los efectos biológicos que resultan de la inhibición de las interacciones del TRAIL/TRAIL-R sobre diferentes tipos de células. Los polipéptidos TRAIL-R pueden usarse igualmente en ensayos in vitro para la detección de TRAIL o TRAIL-R o las interacciones de los mismos.

- El TRAIL-R puede usarse en la inhibición de la actividad biológica del TRAIL, en procedimientos in vitro o in vivo. Un polipéptido TRAIL-R purificado puede usarse para inhibir la unión del TRAIL al TRAIL-R de superficie de célula endógena. De esta forma, se inhiben los efectos biológicos que resultan de la unión de TRAIL a receptores endógenos. Pueden usarse varias formas de TRAIL-R incluyendo, por ejemplo, los fragmentos de TRAIL-R anteriormente descritos, oligómeros, derivados, y variantes que sean capaces de unirse a TRAIL. En una realización, se usa un TRAIL-R soluble para inhibir una actividad biológica de TRAIL, p. ej., para inhibir la apoptosis mediada por TRAIL de células particulares.

El TRAIL-R puede administrarse a un mamífero para tratar un trastorno mediado por TRAIL. Dichos trastornos mediados por TRAIL incluyen estados causados (directamente o indirectamente) o exacerbados por TRAIL.

- 35 El TRAIL-R puede ser útil para el tratamiento de microangiopatías trombóticas. Un trastorno de este tipo es la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) (Kwaan, H.C., Semin. Hematol., vol. 24, pág. 71, (1987); Thompson y otros, Blood, vol. 80, pág. 1890, (1992)). Se ha informado por parte de los U.S. Centers for Disease Control de crecientes tasas de mortalidad asociadas a la TTP (Torok y otros, Am. J. Hematol., vol. 50, pág. 84, (1995)).

- 40 El plasma procedente de pacientes afligidos con TTP (incluyendo pacientes con VIH^+ y VIH^-) induce la apoptosis de células endoteliales humanas de origen microvascular dérmico, pero no de origen vascular grande (Laurence y otros, Blood, vol. 87, pág. 3245, (15 Abril, 1996)). De acuerdo con ello, se piensa que el plasma de pacientes con TTP contiene uno o más factores que directamente o indirectamente inducen la apoptosis. Tal como se describe en la Solicitud PCT WO 97/ 01633 (que se incorpora aquí como referencia), el TRAIL está presente en el suero de pacientes con TTP, y puede desempeñar un papel en la inducción de la apoptosis de células endoteliales microvasculares.

- 45 Otra microangiopatía trombótica es el síndrome hemolítico-urémico (HUS) (Moake, J.L., Lancet, vol. 343, pág. 393, (1994); Melnyk y otros, Arch. Intern. Med., vol. 155, pág. 2077, (1995); Thompson y otros, véase cita anterior). Una realización de la invención está dirigida al uso del TRAIL-R para tratar la afección a la cual frecuentemente se hace referencia como de "HUS adulto" (incluso considerando que puede afectar a niños igualmente). Un trastorno conocido como HUS asociado con diarrea infantil difiere en cuanto a etiología del HUS adulto.

- 50 Otras afecciones caracterizadas por la coagulación de vasos sanguíneos pequeños puede tratarse usando TRAIL-R. Dichas afecciones incluyen, pero sin limitarse a ellas, las siguientes. Los problemas cardíacos observados en aproximadamente el 5-10% de pacientes con SIDA pediátricos se estima que implican la coagulación de pequeños vasos sanguíneos. La rotura de la microvasculatura en el corazón ha sido reseñada en pacientes con esclerosis múltiple. Como un ejemplo adicional, se contempla el tratamiento del lupus eritematoso sistémico (SLE).

En una realización, el plasma o la sangre de un paciente se pone en contacto con TRAIL-R ex vivo. El TRAIL-R puede estar unido a una matriz de cromatografía adecuada mediante procedimientos convencionales. El plasma o la sangre del paciente fluye a través de una columna de cromatografía que contiene TRAIL-R unido a la matriz, antes de retornar al paciente. El receptor inmovilizado se une al TRAIL, separando, de esta forma, la proteína TRAIL de la sangre del paciente.

- 5 Como alternativa, el TRAIL-R puede administrarse in vivo a un paciente aquejado de una microangiopatía trombótica. En una realización, se administra al paciente una forma soluble de TRAIL-R.

De acuerdo con ello, la presente invención proporciona TRAIL-R para el tratamiento de una microangiopatía trombótica. Puede usarse un polipéptido TRAIL-R en procedimientos in vivo o ex vivo para inhibir la lesión mediada por TRAIL a (p. ej., la apoptosis de) células endoteliales microvasculares.

- 10 El TRAIL-R puede usarse conjuntamente con otros agentes útiles en el tratamiento de un trastorno particular. En un estudio in vitro informado por Laurence y otros (Blood, vol. 87, pág. 3245, (1996)), se logró alguna reducción de apoptosis mediada por plasma con TTP de células endoteliales microvasculares, usando un anticuerpo de bloqueo anti-Fas, ácido aurintricarboxílico, o plasma normal desprovisto de crioprecipitado.

- 15 De acuerdo con ello, un paciente puede tratarse con un agente que inhibe la apoptosis, mediada por un ligando de Fas, de células endoteliales, en combinación con un agente que inhibe la apoptosis mediada por TRAIL-R de células endoteliales. En una realización, se administran tanto TRAIL-R como un anticuerpo de bloqueo anti-Fas a un paciente aquejado por un trastorno caracterizado por microangiopatía trombótica, tal como TTP o HUS. En la Publicación de la Solicitud PCT número WO 95/10540, se describen ejemplos de anticuerpos monoclonales de bloqueo dirigidos contra el antígeno Fas (CD95).

- 20 Otra realización de la presente invención está dirigida al uso de TRAIL-R para reducir la muerte mediada por TRAIL de células T en pacientes infectados de VIH. La función de la apoptosis de la célula T en el desarrollo del SIDA ha sido el sujeto de un cierto número de estudios (véanse, por ejemplo, Meyaard y otros, Science, vol. 257, págs. 217-219, (1992); Groux y otros, J. Exp. Med., vol. 175, pág. 331, (1992); y Oyaizu y otros, en Cell Activation and Apoptosis in HIV Infection, Andrieu y Lu, Eds., Plenum Press, New York, págs. 101-114, (1995)). Ciertos investigadores han estudiado la función de la apoptosis mediada por Fas; igualmente, se ha explorado la implicación de la enzima que convierte la interleuquina-1 β (ICE) (Estaquier y otros, Blood, vol. 87, págs. 4959-4966, (1996); Mitra y otros, Immunology, vol. 87, págs. 581-585, (1996); Katsikis y otros, J. Exp. Med., vol. 181, págs. 2029-2036, (1995)). Es posible que la apoptosis de la célula T se produzca a través de múltiples mecanismos.

- 30 Al menos parte de la muerte de células T observada en pacientes con VIH⁺ se estima que está mediada por TRAIL. Sin desear teorizar, se estima que dicha muerte de células T mediada por TRAIL se produce a través del mecanismo conocido como muerte de células inducida por activación (AICD).

- 35 Las células T humanas activadas son inducidas a llevar a cabo la muerte programada de células (apoptosis) mediante iniciación a través del complejo receptor de células CD3/T, un proceso denominado muerte de células inducida por activación (AICD). La AICD de células T de CD4⁺ aisladas a partir de individuos asintomáticos infectados con VIH, ha sido ya informada (Groux y otros, véase cita anterior). De acuerdo con ello, la AICD puede jugar un papel en el agotamiento de células T de CD⁺ y la progresión hacia el SIDA en individuos infectados con VIH.

- 40 La presente invención proporciona TRAIL-R para la inhibición de la muerte de células T mediada por TRAIL en pacientes con VIH⁺ (preferiblemente, un polipéptido TRAIL-R soluble). En una realización, el paciente es asintomático cuando comienza el tratamiento con TRAIL-R. Si se desea, antes del tratamiento, pueden extraerse células T de sangre periférica procedente de un paciente con VIH⁺, y ensayarse para determinar su susceptibilidad a la muerte de células mediada por TRAIL mediante procedimientos convencionales.

- 45 En una realización, el plasma o la sangre de un paciente se pone en contacto con TRAIL-R ex vivo. El TRAIL-R puede estar unido a una matriz de cromatografía adecuada mediante procedimientos convencionales. El plasma o la sangre del paciente fluye a través de una columna de cromatografía que contiene TRAIL-R unido a la matriz, antes de retornar al paciente. El TRAIL-R inmovilizado se une al TRAIL, separando, de esta forma, la proteína TRAIL de la sangre del paciente.

- 50 En el tratamiento de pacientes con VIH⁺, el TRAIL-R puede usarse en combinación con otros inhibidores de la apoptosis de la célula T. La apoptosis mediada por Fas ha sido igualmente implicada en la pérdida de células T en individuos con VIH⁺ (Katsikis y otros, J. Exp. Med., vol. 181, págs. 2029-2036, (1995)). De acuerdo con ello, un paciente susceptible tanto a la muerte de células T mediada por el ligando Fas (Fas-L) como mediada por TRAIL, puede ser tratado tanto con un agente que bloquee las interacciones TRAIL/TRAIL-R como con un agente que bloquee las interacciones Fas-L/Fas. Los agentes adecuados para el bloqueo de la unión de Fas-L a Fas, incluyen, pero sin limitarse a ellos, polipéptidos Fas solubles; formas oligómeras de polipéptidos Fas solubles (p. ej., dímeros de sFas/Fc); anticuerpos anti-Fas que se unen a Fas sin transducir la señal biológica que da como resultado la apoptosis; anticuerpos anti-Fas-L que bloquean la unión de

Fas-L a Fas; y muteínas de Fas-L que se unen a Fas pero que no transducen la señal biológica que da como resultado la apoptosis. Preferiblemente, los anticuerpos usados en el procedimiento son anticuerpos monoclonales. Los ejemplos de agentes adecuados para el bloqueo de interacciones Fas-L/Fas, incluyendo el bloqueo de anticuerpos monoclonales anti-Fas, se encuentran descritos en el documento WO 95/10540.

- 5 En la invención, se proporcionan composiciones que comprenden una cantidad eficaz de un polipéptido TRAIL-R de la presente invención, en combinación con otros componentes tales como un diluyente, vehículo o excipiente aceptable fisiológicamente. El TRAIL-R puede formularse de acuerdo con procedimientos conocidos usados para preparar composiciones útiles farmacéuticamente. El TRAIL-R puede combinarse mezclado, bien como el único material activo o con otros materiales activos conocidos adecuados para una indicación dada, con diluyentes aceptables farmacéuticamente (p. ej., solución salina, Tris-HCl, acetato, y soluciones tamponadas con fosfato), conservantes (p. ej.,
- 10 timerosal, alcohol bencílico, parabenos), emulsificadores, solubilizadores, adyuvantes y/o vehículos. Las formulaciones adecuadas para composiciones farmacéuticas incluyen las descritas el Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., (1980), Mack Publishing Company, Easton, PA.

- 15 Además, dichas composiciones pueden contener TRAIL-R acomplejado con polietilenglicol (PEG), iones metálicos, o incorporado dentro de compuestos polímeros tal como ácido poliacético, ácido poliglicólico, hidrogeles, dextrano, etc., o incorporado dentro de liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, trazas de eritrocito o esferoblastos. Dichas composiciones influirán en el estado físico, solubilidad, estabilidad, velocidad de liberación in vivo, y velocidad de aclaramiento in vivo del TRAIL-R y, de acuerdo con ello, se eligen de acuerdo con la aplicación deseada. El TRAIL-R puede encontrar uso igualmente, expresado sobre la superficie de una célula.

- 20 Las composiciones de la presente invención pueden contener un polipéptido TRAIL-R en cualquiera de las formas aquí descritas. En realizaciones particulares, la composición comprende un polipéptido TRAIL-R soluble o un oligómero que comprende polipéptidos TRAIL-R solubles.

- El TRAIL-R puede administrarse en cualquier forma adecuada, p. ej., tópicamente, parenteralmente, o mediante inhalación. El término "parenteral" incluye inyección, p. ej., mediante vías subcutánea, intravenosa, o intramuscular,
- 25 incluyendo igualmente la administración localizada, p. ej., en un sitio de enfermedad o lesión. Igualmente, se contempla la liberación sostenida a partir de implantes. Un experto en la técnica pertinente reconocerá que las dosificaciones adecuadas variarán, dependiendo de factores tales como la naturaleza del trastorno a tratar, el peso corporal del paciente, edad, y estado general, y la vía de administración. Las dosis preliminares pueden determinarse de acuerdo con ensayos en animales, realizándose la reducción de los niveles de dosificaciones para administración humana de acuerdo con las prácticas aceptadas en la técnica.
- 30

Igualmente, se contemplan composiciones que comprenden ácidos nucleicos TRAIL-R en formulaciones aceptables fisiológicamente. El ADN de TRAIL-R puede formularse, por ejemplo, para inyección.

Anticuerpos

- Se proporcionan anticuerpos que se dirigen contra y que son inmunorreactivos con un polipéptido TRAIL-R que se une a un ligando que induce la apoptosis relacionada con el TNF (TRAIL), en el que TRAIL-R está caracterizado por comprender la secuencia de aminoácidos VPANEGD o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, en el que el anticuerpo se puede obtener usando una proteína TRAIL-R en forma de inmunógeno, dicha proteína TRAIL-R se puede obtener de células Jurkat, por medio de la disrupción de las células y purificación subsiguiente incluyendo cromatografía por afinidad, empleando una matriz de cromatografía que contiene TRAIL y HPLC de fase inversa. Dichos anticuerpos se unen
- 40 específicamente a TRAIL-R, en cuanto que los anticuerpos se unen a TRAIL-R a través de sitios de unión de antígeno del anticuerpo (en oposición a la unión no específica).

La proteína TRAIL-R preparada tal como se describe en el Ejemplo 1, puede usarse como un inmunógeno en la producción de anticuerpos inmunoreactivos con ella.

- Los anticuerpos monoclonales y policlonales pueden prepararse mediante técnicas convencionales. Véase, por ejemplo, Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet y otros (eds.), Plenum Press, New York, (1980); y Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988). La producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra TRAIL-R se ilustra adicionalmente en el Ejemplo 4.
- 45

- Los fragmentos de unión de antígeno de dichos anticuerpos, los cuales pueden producirse mediante técnicas convencionales, se encuentran igualmente abarcados por la presente invención. Los ejemplos de dichos fragmentos incluyen, pero sin limitarse a ellos, fragmentos Fab y F(ab')₂. Igualmente, se proporcionan fragmentos de anticuerpos y derivados producidos mediante técnicas de modificación por ingeniería genética.
- 50

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, p. ej., versiones humanizadas de anticuerpos monoclonales murinos. Dichos anticuerpos humanizados pueden prepararse mediante técnicas conocidas, y

ofrecen la ventaja de una inmunogenicidad reducida cuando los anticuerpos se administran a humanos. En una realización, un anticuerpo monoclonal humanizado comprende la región variable de un anticuerpo murino (o solamente el sitio de unión del antígeno del mismo) y una región constante derivada a partir de un anticuerpo humano. Como alternativa, un fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender el sitio de unión del antígeno de un anticuerpo monoclonal murino y un fragmento de región variable (que carece del sitio de unión del antígeno) derivada a partir de un anticuerpo humano. Los procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales quiméricos y mediante ingeniería genética adicionales, incluyen los descritos por Riechmann y otros (Nature, vol. 332, pág. 323, (1988)), Liu y otros (PNAS, vol. 84, pág. 3439, (1987)), Larrick y otros (Bio/Technology, vol. 7, pág. 934, (1989)), y Winter y Harris (TIPS, vol. 14, pág. 139, (Mayo, 1993)).

Entre los usos de los anticuerpos se encuentra el uso en ensayos para detectar la presencia de polipéptidos TRAIL-R, tanto in vitro como in vivo. Igualmente, los anticuerpos pueden usarse en la purificación de proteínas TRAIL-R mediante cromatografía de inunoafinidad.

Los anticuerpos que adicionalmente pueden bloquear la unión de TRAIL-R a TRAIL, pueden usarse para inhibir una actividad biológica que resulta de dicha unión. Dichos anticuerpos de bloqueo pueden identificarse usando cualquier procedimiento de ensayo adecuado, tal como mediante el ensayo de anticuerpos para determinar la capacidad de inhibir la unión de TRAIL a células que expresan TRAIL-R. Los ejemplos de dichas células son las células Jurkat y las células PS1 descritas en el Ejemplo 2 más adelante. Como alternativa, los anticuerpos de bloqueo pueden identificarse en ensayos para determinar la capacidad para inhibir un efecto biológico que resulta de la unión de TRAIL a células diana. Los anticuerpos pueden ensayarse para determinar la capacidad, por ejemplo, para inhibir la lisis mediada por TRAIL de células Jurkat.

Un anticuerpo de este tipo puede usarse en un procedimiento in vitro, o administrarse in vivo para inhibir una actividad biológica mediada por TRAIL-R. De esta forma, pueden tratarse los trastornos causados o exacerbados (directamente o indirectamente) mediante la interacción de TRAIL con el receptor TRAIL de superficie de células. Un procedimiento terapéutico implica la administración in vivo de un anticuerpo de bloqueo a un mamífero en una cantidad eficaz para inhibir una actividad biológica mediada por TRAIL. De esta forma, pueden tratarse los trastornos causados o exacerbados mediante TRAIL, directamente o indirectamente. Los anticuerpos monoclonales son los generalmente preferidos para uso en dichos procedimientos terapéuticos. En una realización, se usa un fragmento de anticuerpo de unión de antígeno.

Un anticuerpo de bloqueo dirigido contra TRAIL-R puede ser substituido por TRAIL-R en el procedimiento anteriormente descrito de tratamiento de la microangiopatía trombótica, p. ej., en el tratamiento de TTP o HUS. El anticuerpo se administra in vivo, con el fin de inhibir la lesión mediada por TRAIL a (p. ej., la apoptosis de) células endoteliales microvasculares.

Los anticuerpos generados contra TRAIL-R pueden rastrearse para determinar las propiedades agonísticas (es decir, mimetización de ligandos). Dichos anticuerpos, mediante la unión a TRAIL-R de superficie de célula, inducen efectos biológicos (p. ej., transducción de señales biológicas) similares a los efectos biológicos inducidos cuando TRAIL se une a TRAIL-R de superficie de célula. Los anticuerpos agonísticos pueden usarse para inducir apoptosis de ciertas células de cáncer o de células infectadas víricamente, tal como ha sido informado para TRAIL. La capacidad de TRAIL para matar células de cáncer (incluyendo, pero sin limitarse a células de melanoma, leucemia, y linfoma) y de células infectadas víricamente, ha sido descrita por Wiley y otros (Immunity, vol. 3, págs. 673-682, (1995)); y en la Solicitud PCT WO 97/01633.

En la presente invención, se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo que está dirigido contra TRAIL-R, y un diluyente, excipiente, o vehículo aceptable fisiológicamente. Los componentes adecuados de dichas composiciones son tal como se han descrito anteriormente para composiciones que contienen proteínas TRAIL-R.

Igualmente, se proporcionan aquí conjugados que comprenden un agente detectable (p. ej., de diagnóstico) o terapéutico, unido a un anticuerpo dirigido contra y que son inmunorreactivos con un polipéptido TRAIL-R que se une a un ligando que induce la apoptosis relacionada con el TNF (TRAIL), en el que TRAIL-R está caracterizado por comprender la secuencia de aminoácidos VPANEGD o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, en el que el anticuerpo se puede obtener usando una proteína TRAIL-R en forma de inmunógeno, dicha proteína TRAIL-R se puede obtener de células Jurkat, por medio de la disrupción de las células y purificación subsiguiente incluyendo cromatografía por afinidad, empleando una matriz de cromatografía que contiene TRAIL y HPLC de fase inversa. Los ejemplos de dichos agentes se han presentado anteriormente. Los conjugados encuentran su uso en procedimientos in vitro o in vivo.

Ácidos nucleicos

La presente invención proporciona ácidos nucleicos TRAIL-R. Dichos ácidos nucleicos incluyen, pero sin limitarse a ellos, ADN que contiene la codificación del péptido descrito en el Ejemplo 2. Dichos ADN pueden identificarse a partir del conocimiento del código genético. Otros ácidos nucleicos de la presente invención incluyen ADN aislados que comprenden la secuencia de nucleótidos presentada en la SEC ID N°:1 o tal como se establece en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona ácidos nucleicos aislados útiles en la producción de polipéptidos TRAIL-R, p. ej., en los sistemas de expresión recombinantes expuestos anteriormente. Dichos ácidos nucleicos incluyen, pero sin limitarse a ellos, el ADN del TRAIL-R humano de la SEC ID N°:1. Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención incluyen el ADN de TRAIL-R tanto en la forma de una sola hebra como de doble hebra, así como el ARN complemento de las mismas. El ADN del TRAIL-R incluye, por ejemplo, ADNc, ADN genómico, ADN químicamente sintetizado, ADN amplificado mediante PCR, y combinaciones de los mismos. El ADN genómico puede aislarse mediante técnicas convencionales, p. ej., usando el ADNc de la SEC ID N°:1 ó 3, o un fragmento adecuado del mismo, como una sonda.

Se proporcionan los ADN que contienen la codificación del TRAIL-R en cualquiera de las formas aquí contempladas (p. ej., TRAIL-R de longitud total o tal como se establece en las reivindicaciones). Las realizaciones particulares de los ADN que contienen la codificación de TRAIL-R, incluyen un ADN que contiene la codificación del TRAIL-R humano de longitud total de la SEC ID N°:2 (incluyendo el péptido señal N-terminal), y un ADN que contiene la codificación de un TRAIL-R humano maduro de longitud total. Otras realizaciones incluyen ADN que contiene la codificación de TRAIL-R soluble (p. ej., conteniendo la codificación del dominio extracelular de la proteína de la SEC ID N°:2, bien sea con o sin el péptido señal).

Los ácidos nucleicos proporcionados aquí incluyen ADN y ARN complementos de dichos fragmentos, conjuntamente con formas de una sola hebra y de hebra doble del ADN de TRAIL-R.

Entre los usos de los fragmentos de ácido nucleico TRAIL-R está el uso como sondas o cebadores. Mediante el uso del conocimiento del código genético en combinación con las secuencias de aminoácidos establecidas en el Ejemplo 2, pueden prepararse conjuntos de oligonucleótidos degenerados. Dichos oligonucleótidos encuentran uso como cebadores, p. ej., en reacciones de cadena de polimerasa (PCR), mediante las cuales los fragmentos de ADN de TRAIL-R se aíslan y amplifican.

Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos TRAIL-R incluyen oligonucleótidos de sentido o antisentido que comprenden una secuencia de ácido nucleico de una sola hebra (bien ARN o bien ADN), capaz de unirse a secuencias ARNm de TRAIL-R (sentido) o ADN de TRAIL-R (antisentido) diana. La capacidad para derivar un oligonucleótido de sentido o antisentido, en base a una secuencia de ADNc que contiene la codificación de una proteína dada, ha sido descrita, por ejemplo, por Stein y Cohen (Cancer Res., vol. 48, pág. 2659, (1988)) y por van der Krol y otros (BioTechniques, vol. 6, pág. 958, (1988)).

La unión de oligonucleótidos de sentido o antisentido a secuencias de ácido nucleico diana, da como resultado la formación de dúplex que bloquean la transcripción o traducción de la secuencia diana por uno de entre varios medios, incluyendo la degradación potenciada de los dúplex, la terminación prematura de la transcripción o traducción, o por otros medios. De acuerdo con ello, los oligonucleótidos antisentido pueden usarse para bloquear la expresión de proteínas TRAIL-R. Los oligonucleótidos de sentido o antisentido comprenden, además, oligonucleótidos que tienen estructuras principales fosfodiéster modificadas mediante azúcar (u otros enlaces azúcar, tales como los descritos en el documento WO 91/06629) y en las que dichos enlaces azúcar son resistentes a nucleasas endógenas. Dichos oligonucleótidos con enlaces azúcar resistentes son estables in vivo (es decir, capaces de resistir la degradación enzimática), pero retienen la especificidad de la secuencia como para ser capaces de unirse a secuencias de nucleótidos diana.

Otros ejemplos de oligonucleótidos de sentido o antisentido incluyen aquellos oligonucleótidos que están unidos covalentemente a partes orgánicas, tales como los descritos en el documento WO 90/10448, y a otros restos que incrementan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácido nucleico diana, tal como poly-(L-lisina). Además aún, pueden estar unidos agentes intercalantes, tal como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos, a oligonucleótidos de sentido o antisentido con el fin de modificar las especificidades de unión del oligonucleótido de sentido o antisentido por la secuencia de nucleótido diana.

Los oligonucleótidos de sentido o antisentido pueden introducirse dentro de una célula que contenga la secuencia de ácido nucleico diana, mediante cualquier procedimiento de transferencia de genes, incluyendo, por ejemplo, la transfección de ADN mediada por CaPO_4 , la electroporación, o mediante el uso de vectores de transferencia de genes tal como el virus Epstein-Barr. En un procedimiento preferido, un oligonucleótido de sentido o antisentido se inserta dentro de un vector retroviral adecuado. Una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana se pone en contacto con el vector retroviral recombinante, bien in vitro o bien ex vivo. Los vectores retrovirales adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos, los derivados a partir del retrovirus murino M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado a partir de M-MuLV), o los vectores de copia doble designados como DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase WO 90/13641).

Igualmente, los oligonucleótidos de sentido o antisentido pueden introducirse dentro de una célula que contenga la secuencia de nucleótido diana, mediante la formación de un conjugado con una molécula de unión de ligando, tal como la descrita en WO 91/04753. Las moléculas de unión de ligandos incluyen, pero sin limitarse a ellas, receptores de superficie de célula, factores de desarrollo, otras citocinas, u otros ligandos que se unen a receptores de superficie de célula. Preferiblemente, la conjugación de la molécula de unión de ligando no interfiere substancialmente con la capacidad de la molécula de unión de ligando para unirse a su molécula o receptor correspondiente, o para bloquear la entrada del

oligonucleótido de sentido o antisentido, o su versión conjugada, dentro de la célula.

Como alternativa, puede introducirse un oligonucleótido de sentido o antisentido dentro de una célula que contenga la secuencia de ácido nucleico diana, mediante la formación de un complejo lípido-oligonucleótido, tal como se describe en el documento WO 90/10448. Preferiblemente, el complejo lípido-oligonucleótido de sentido o antisentido se disocia dentro de la célula mediante una lipasa endógena.

Los ejemplos siguientes se proporcionan con el fin de ilustrar adicionalmente las realizaciones particulares de la invención, no debiéndose considerar como limitativos del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Purificación de proteína TRAIL-R

Se preparó una proteína Receptor TRAIL (TRAIL-R) humana mediante el procedimiento siguiente. La TRAIL-R se aisló a partir de membranas celulares de células Jurkat, una línea de células de leucemia T aguda humana. Las células Jurkat se eligieron debido a que una banda específica puede ser precipitada por afinidad a partir de células Jurkat biotiniladas en la superficie, usando Flag®-TRAIL covalentemente acoplado a perlas de Affi-gel (Biorad Laboratories, Richmond, CA). La banda precipitada tiene un peso molecular de aproximadamente 52 kD. Igualmente, se encontraba presente una banda específica menor de aproximadamente 42 kD, posiblemente atribuida a un producto de rotura proteolítica o a una forma menos glucosilada del TRAIL-R.

Aproximadamente se recolectaron 50.000 millones de células Jurkat mediante centrifugación (80 ml de gránulo de células), se lavaron una vez con PBS y, a continuación, se congelaron bruscamente sobre nitrógeno líquido. Las membranas de plasma se aislaron de acuerdo con el procedimiento número tres descrito por Maeda y otros, en *Biochim. et Biophys. Acta*, vol. 73, pág. 115, (1983), con cinco modificaciones:

1. Los inhibidores de proteasa siguientes se incluyeron en todas las soluciones a las concentraciones indicadas: Aprotidina, 150 nM; EDTA, 5 mM; Leupeptina 1 μ M; pA-PMSF, 20 μ M; Pefabloc, 500 μ M; Pepstatina A, 1 μ M; PMSF, 500 μ M.
2. No se usó ditiotretitol.
3. No se usó ADNasa en la solución de homogeneización.
4. Se usaron 1,25 ml de tampón de homogeneización por ml de gránulo de célula.
5. La homogeneización se llevó a cabo mediante cinco pasadas a través de un homogeneizador suave de vidrio molido.

Después del aislamiento de las membranas de las células, las proteínas se solubilizaron volviendo a suspender las membranas aisladas en 50 ml de PBS que contenía octilglucósido al 1% y todos los inhibidores de proteasa anteriormente mencionados a las concentraciones anteriormente indicadas. A continuación, la solución resultante se batió repetidamente durante una incubación de treinta minutos a 4°C. A continuación, la solución se centrifugó a 20.000 rpm en un rotor SW28 en una ultracentrífuga Beckman LE-80 (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA), a 4°C durante 30 minutos, con el fin de obtener el sobrenadante (el extracto de membrana).

Cromatografía

La primera etapa de purificación de TRAIL-R fuera del extracto de membrana preparado anteriormente, fue mediante cromatografía de afinidad. En primer lugar, el extracto de membrana se aplicó a una columna de Affi-gel anti-Flag® M2 (10 mg de anticuerpo monoclonal M2 acoplado a 2 ml de perlas de Affi-gel), para absorber cualquier material de unión no específicamente. A continuación, se aplicó el paso de flujo a una columna de Affi-gel Flag®-TRAIL (10 mg de proteína recombinante acoplada a 1 ml de perlas de Affi-gel).

El soporte de Affi-gel es un éster de N-hidroxi-succinimida de una perla de gel de agarosa reticulado, derivado (disponible de Biorad Laboratories, Richmond, CA). Tal como se ha expuesto anteriormente, el péptido Flag®, Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys, proporciona un epítopo unido de manera reversible mediante anticuerpos monoclonales específicos, lo cual permite el rápido ensayo y la fácil purificación de la proteína recombinante expresada. El M2 es un anticuerpo monoclonal que se une a Flag®. Los anticuerpos monoclonales que se unen al péptido Flag®, así como otros reactivos para la preparación y uso de proteínas de fusión Flag®, se encuentran disponibles de Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, Connecticut. La preparación de proteínas de fusión Flag®-TRAIL (que comprenden Flag® fusionado a un polipéptido TRAIL soluble), se encuentra descrita adicionalmente en la Solicitud PCT WO 97/01633, la cual se incorpora aquí como referencia.

La columna se lavó con 25 ml de cada uno de los tampones siguientes, en el orden indicado:

1. PBS conteniendo octilglucósido al 1%.
2. PBS.

3. PBS conteniendo adicionalmente NaCl 200 mM.

4. PBS.

El material unido se eluyó con citrato Na 50 mM (pH 3) en fracciones de 1 ml e inmediatamente se neutralizó con 300 µl de Tris-HCl 1 M (pH 8,5) por fracción. La actividad de unión del TRAIL de cada fracción se determinó mediante un ensayo ELISA específico de TRAIL-R tal como se describe más adelante. Las fracciones con alta actividad de unión a TRAIL se agruparon, se llevaron a ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%, y posteriormente se cromatografiaron sobre una columna HPLC de fase inversa capilar [columna capilar de silicona fundida de 500 µm de diámetro interno X 25 cm, empaquetada con material Vydac C₄ (Vydac, Hesperia, CA)], usando un gradiente lineal (2% por minuto) de desde 0% hasta 100% de acetonitrilo en agua conteniendo TFA al 0,1%. Las fracciones que contenían alta actividad de unión a TRAIL, se determinaron, a continuación, tal como se ha indicado anteriormente, se agruparon, y, cuando se estimó oportuno, se liofilizaron.

Ensayo ELISA específico de TRAIL-R

Las diluciones seriadas de muestras que contenían TRAIL-R (en NaHCO₃ 50 mM, llevadas a pH 9 con NaOH), se usaron para recubrir placas de microvaloración E.I.A. de fondo plano de 96 pocillos Linbro/Titertek (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH) en una proporción de 100 µl/pocillo. Después de incubación a 4°C durante 16 horas, los pocillos se lavaron seis veces con 200 µl de PBS conteniendo Tween-20 al 0,05% (PBS-Tween). A continuación, el pocillo se incubaron con Flag®-TRAIL en una proporción de 1 µg/ml en PBS-Tween con suero vacuno fetal (FCS) al 5% durante 90 minutos (100 µl por pocillo), seguido de lavado tal como anteriormente. A continuación, cada pocillo se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-Flag® M2 en una proporción de 1 µg/ml en PBS-Tween conteniendo FCS al 5% durante 90 minutos (100 µl por pocillo), seguido de lavado tal como anteriormente. Posteriormente, los pocillos se incubaron con un anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante específico de anti-mIgG1 de cabra policlonal (a una dilución de 1:5000 de la solución madre comercial en PBS-Tween conteniendo FCS al 5%) durante 90 minutos (100 µl por pocillo). El anticuerpo conjugado con HRP se obtuvo de Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, Alabama. A continuación, los pocillos se lavaron seis veces, tal como anteriormente.

Para el desarrollo del ensayo ELISA, se agregaron a los pocillos una mezcla de substrato [100 µl por pocillo de una premezcla 1:1 de Substrato de Peroxidasa TMB y de Solución B de Peroxidasa (Kirkegaard Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland)]. Después de una reacción de color suficiente, la reacción enzimática se terminó mediante la adición de H₂SO₄ 2 N (50 µl por pocillo). La intensidad del color (indicativa de la actividad de unión de TRAIL) se determinó midiendo la extinción a 450 nm sobre un lector de placas V Max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Ejemplo 2: Secuencias de aminoácidos

(a) TRAIL-R purificada a partir de células Jurkat

La proteína TRAIL-R aislada a partir de células Jurkat se digirió con tripsina, usando procedimientos convencionales. El análisis de secuencias de aminoácidos se llevó a cabo sobre uno de los fragmentos péptidos producidos por el digesto triptico. Se encontró que el fragmento contenía la secuencia siguiente, la cual corresponde a los aminoácidos 327 a 333 de la secuencia presentada en la SEC ID N°2: VPANEGD.

(b) TRAIL-R purificada a partir de células PS-1

Igualmente, se aisló la proteína TRAIL-R a partir de células PS-1. La PS-1 es una línea de células B humana que espontáneamente surge después de la irradiación letal de linfocitos de sangre periférica (PBL) humana. La proteína TRAIL-R se digirió con tripsina, usando procedimientos convencionales. El análisis de la secuencia de aminoácidos se llevó a cabo sobre fragmentos producidos a partir del digesto triptico. Se encontró que uno de los fragmentos contenía la secuencia siguiente, la cual, al igual que el fragmento presentado en (a), corresponde a los aminoácidos 327 a 333 de la secuencia presentada en la SEC ID N°2: VPANEGD.

Ejemplo 3: ADN y secuencias de aminoácidos

Se determinó la secuencia de aminoácidos de los fragmentos de péptidos del digesto triptico adicional de TRAIL-R. Se prepararon oligonucleótidos degenerados, en base a la secuencia de aminoácidos de dos de los péptidos. Un fragmento de ADN de TRAIL-R se aisló y amplificó mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR), usando los oligonucleótidos degenerados como cebadores 5' y 3'. La PCR se llevó a cabo de acuerdo con procedimientos convencionales, usando ADNc derivado a partir de la línea de células PS-1 descrita en el Ejemplo 2, como el molde. La secuencia de nucleótido del fragmento de ADN de TRAIL-R aislado (excluyendo las porciones que corresponden a la parte de los cebadores), y la secuencia de aminoácidos codificada por ellos, se presentan en la Figura 1 (SEC ID NOS: 3 y 4). La secuencia del fragmento de ADN de TRAIL-R entero aislado mediante PCR corresponde a los nucleótidos 988 a 1164 de la SEC ID N°1, la cual contiene el código de los aminoácidos 330 a 388 de la SEC ID N°2.

La secuencia de aminoácidos en la SEC ID N°:4 porta una homología significativa con los denominados dominios muerte encontrados en otros ciertos receptores. La región citoplásmica de Fas y del receptor TNF tipo I contienen cada uno un dominio muerte, que está asociado con la transducción de una señal apoptótica (Tartaglia y otros, Cell, vol. 74, pág. 845, (1993); Itoh y Nagata, J. Biol. Chem., vol. 268, pág. 10932, (1993)). De acuerdo con ello, la secuencia presentada en la SEC ID N°:4 se estima que se encuentra dentro del dominio citoplásmico de TRAIL-R.

Una sonda derivada a partir del fragmento aislado anterior se usó para rastrear una biblioteca ADNc (ADNc derivado de fibroblasto de prepucio humano en el vector λ gt10), y se aisló un ADNc de TRAIL-R humano. La secuencia de nucleótidos de la región de codificación de este ADNc se presenta en la SEC ID N°:1, y la secuencia de aminoácidos codificada por ella se muestra en la SEC ID N°:2.

Ejemplo 4: Anticuerpos monoclonales que se unen a TRAIL-R

Este ejemplo ilustra un procedimiento para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra y que son inmunorreactivos con un polipéptido TRAIL-R que se une a un ligando que induce la apoptosis relacionada con el TNF (TRAIL), en el que TRAIL-R está caracterizado por comprender la secuencia de aminoácidos VPANEGD o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, en el que el anticuerpo se puede obtener usando una proteína TRAIL-R en forma de inmunógeno, dicha proteína TRAIL-R se puede obtener de células Jurkat, por medio de la disrupción de las células y purificación subsiguiente incluyendo cromatografía por afinidad, empleando una matriz de cromatografía que contiene TRAIL y HPLC de fase inversa, usando técnicas convencionales tales como las descritas en la Patente de EE.UU. 4.411.993. En resumen, se inmunizaron ratones con inmunógeno TRAIL-R emulsificado en adyuvante de Freund completo, e inyectaron en cantidades que variaron desde 10-100 μ g subcutáneamente o intraperitonealmente. Diez a doce días más tarde, los animales inmunizados se reforzaron con TRAIL-R adicional emulsificado en adyuvante de Freund incompleto. Después de esto, los ratones se reforzaron periódicamente de acuerdo con un esquema de inmunización semanalmente o quincenalmente. Periódicamente se extrajeron muestras de suero mediante sangrado retro-orbital o corte de la punta de la cola, con el fin de ensayar los anticuerpos TRAIL-R mediante el ensayo de transferencia de puntos, ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) o la inhibición de la unión de TRAIL.

Después de la detección de un título de anticuerpo apropiado, a los animales positivos se les administró una última inyección intravenosa de TRAIL-R en solución salina. Tres a cuatro días después, los animales se sacrificaron, se recolectaron las células de bazo, y las células de bazo se fusionaron a una línea de células de mieloma murino, p. ej., NS1 o, preferiblemente, P3x63Ag8.653 (ATCC CRL 1580). Las fusiones generaron células de hibridoma, las cuales se sembraron en placas de microvaloración múltiples en un medio selectivo (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma, e híbridos de células de bazo.

Las células de hibridoma se rastrearon mediante ELISA para determinar su reactividad frente a TRAIL-R purificado mediante adaptaciones de las técnicas descritas por Engvall y otros, en Immunochem., vol. 8, pág. 871, (1971) y en la Patente de EE.UU. 4.703.004. Una técnica de rastreo preferida es la técnica de captura de anticuerpos descrita por Beckmann y otros (J. Immunol., vol. 144, pág. 4212, (1990)). Las células de hibridoma positivas pueden inyectarse intraperitonealmente dentro de ratones BALB/c singénicos para producir ascitis que contiene altas concentraciones de anticuerpos monoclonales anti-TRAIL-R. Como alternativa, pueden desarrollarse células de hibridoma in vitro en matraces o botellas giratorias mediante varias técnicas. Los anticuerpos monoclonales producidos en ascitis de ratón pueden purificarse mediante precipitación en sulfato de amonio, seguido de cromatografía de exclusión de gel. Como alternativa, puede igualmente usarse la cromatografía de afinidad basada en la unión del anticuerpo a Proteína A o proteína G, al igual que puede hacerse con la cromatografía de afinidad basada en la unión a TRAIL-R.

Ejemplo 5: Análisis mediante transferencia Northern

La distribución del tejido del ARNm de TRAIL-R se investigó mediante análisis de transferencia Northern, tal como sigue. Una parte alícuota de una sonda radiomarcada (la misma sonda radiomarcada usada para rastrear la biblioteca de ADNc en el Ejemplo 3), se agregó a dos transferencias Northern de tejidos múltiples humanos diferentes (Clontech, Palo alto, CA; Biochain, Palo Alto, CA). La hibridación se llevó a cabo a 63°C en formamida al 50% tal como ha sido previamente descrita (March y otros, Nature, vol. 315, págs. 641-647, (1985)). A continuación, las transferencias se lavaron con 2X SSC, SDS al 0,1% a 68°C durante 30 minutos. Para estandarizar las cargas de ARN se usó una sonda específica de glicerol-aldehído-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

En todos los tejidos examinados, se encontró presente un solo transcripto de 4,4 kilobases (kb), incluyendo bazo, timo, linfocitos de sangre periférica (PBL), próstata, testículos, ovario, útero, placenta, y tejidos múltiples conjuntamente con el tracto gastro-intestinal (incluyendo esófago, estómago, duodeno, yeyuno/íleon, colon, recto, e intestino delgado). Las células y tejidos con los niveles más altos de ARNm de TRAIL-R son los PBL, bazo, y ovario, tal como se muestra comparando las hibridaciones de control con una sonda específica de GAPDH.

Ejemplo 6: Ensayo de unión

El TRAIL-R humano de longitud total se expresó y ensayó para determinar la capacidad para unirse a TRAIL. El ensayo de unión se llevó a cabo como sigue.

En el ensayo, se usó una proteína de fusión que comprendía un péptido cerrador de leucina fusionado al N-terminal de un polipéptido TRAIL soluble (LZ-TRAIL). Se preparó un constructo de expresión, esencialmente tal como ha sido descrito para la preparación del constructo de expresión Flag®-TRAIL por Wiley y otros (Immunity, vol. 8, págs. 673-682, (1995)), excepto que el ADN que contiene la codificación del péptido Flag® se reemplazó por una secuencia que contenía la codificación de un cerrador de leucina modificado que permitía la trimerización. El constructo, en el vector de expresión pDC409, contiene el código de una secuencia conductora derivada a partir de citomegalovirus humano, seguido de la parte del cerrador de leucina fusionado al N-terminal de un polipéptido TRAIL soluble. El polipéptido TRAIL comprende los aminoácidos 95-281 de TRAIL humano (un fragmento del dominio extracelular), tal como ha sido descrito por Wiley y otros (véase cita anterior). El LZ-TRAIL se expresó en células CHO, y se purificó a partir del sobrenadante del cultivo.

El vector de expresión designado como pDC409, es un vector de expresión de mamífero derivado a partir del vector pDC406 descrito por McMahan y otros (EMBO J., vol. 10, págs. 2821-2832, (1991)). Las características agregadas al pDC409 (comparadas con el pDC406) incluyen sitios de restricción únicos en el sitio de clonación múltiple (mcs); tres codones de parada (uno en cada marco de lectura) posicionados más abajo del mcs; y un promotor T7 polimerasa, más abajo del mcs, que facilita la secuenciación del ADN insertado dentro del mcs.

Para la expresión de la proteína TRAIL-R humana de longitud total, la región de codificación entera (es decir, la secuencia de ADN presentada en la SEC ID N°:1) se amplificó mediante la reacción de cadena de polimerasa (PCR). El molde usado en la PCR fue el clon ADNc aislado a partir de una biblioteca de ADNc de fibroblasto de prepucio humano, tal como se ha descrito en el Ejemplo 3. El ADN amplificado y aislado se insertó dentro del vector de expresión pDC409, con el fin de proporcionar un constructo designado como pDC409-TRAIL-R.

La proteína CrmA se usó para inhibir la apoptosis de las células hospedadoras que expresan TRAIL-R recombinante, tal como se ha expuesto anteriormente y en el Ejemplo 8. Un vector de expresión designado como pDC409-CrmA contenía el ADN con la codificación del poxvirus CrmA en pDC409. La proteína derivada de la viruela del ganado vacuno de 38 kilodaltons se la designó posteriormente como CrmA tal como ha sido descrito por Pickup y otros (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 83, págs. 7698-7702, (1986)).

Las células CV-1/EBNA se co-transfectaron con pDC409-TRAIL-R conjuntamente con pDC409-CrmA o con pDC409-CrmA solo. Las células se cultivaron en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina, estreptomycin, y glutamina. 48 horas después de la transfección, las células fueron separadas no enzimáticamente e incubadas con LZ-TRAIL (5 µg/ml), un anticuerpo monoclonal anti-LZ biotinilado (5 µg/ml) y estreptavidina conjugada con ficoeritrina (1:400), antes de análisis mediante escaneado de células activado por fluorescencia (FACS). El análisis citométrico se llevó a cabo sobre un FACscan (Beckton Dickinson, San Jose, CA).

Las células CV-1/EBNA co-transfectadas con vectores que contenían la codificación TRAIL-R y CrmA, mostraron una unión significativamente potenciada de LZ-TRAIL, comparada con las células transfectadas con el vector que contiene la codificación de CrmA solo.

Ejemplo 7: El TRAIL-R bloquea la apoptosis inducida por TRAIL de células diana

El TRAIL-R se ensayó para determinar la capacidad para bloquear la apoptosis inducida por TRAIL de células Jurkat. El TRAIL-R usado en este ensayo estaba en la forma de una proteína de fusión designada como sTRAIL-R/Fc, la cual comprendía el dominio extracelular de TRAIL-R humano, fusionado al N-terminal de un polipéptido Fc derivado a partir de IgG1 humano.

Las células CV-1/EBNA se transfectaron con un vector de expresión recombinante que comprendía una fusión de gen conteniendo la codificación de la proteína sTRAIL-R/Fc, en el vector pDC409 descrito en el Ejemplo 6, y se cultivaron para permitir la expresión de la proteína de fusión. La proteína de fusión sTRAIL-R/Fc se recuperó a partir del sobrenadante del cultivo. Los procedimientos para la fusión del ADN conteniendo la codificación de un polipéptido Fc de IgG1 a ADN conteniendo la codificación de una proteína heteróloga, han sido descritos por Smith y otros (Cell, vol. 73, págs. 1349-1360, (1993)); en el presente caso, se usaron procedimientos análogos.

Una proteína de fusión designada como TNF-R2-Fc, usada como un control, que comprendía el dominio extracelular de la proteína receptor de TNF conocida como TNF-R p75 o p80 (Smith y otros, Science, vol. 248, págs. 1019-1023, (1990); Smith y otros, Cell, vol. 76, págs. 959-962, (1994)), se fusionó a un polipéptido Fc. En el ensayo, se usó igualmente un anticuerpo monoclonal que es un anticuerpo de bloqueo dirigido contra TRAIL humano.

Las células Jurkat se incubaron con concentraciones variables o constantes de LZ-TRAIL (la proteína de fusión LZ-TRAIL descrita en el Ejemplo 6), en la ausencia o presencia de concentraciones variables de sTRAIL-R-Fc, TNF-R2-Fc, o el anticuerpo monoclonal específico de TRAIL. La muerte de células se cuantificó usando un ensayo de viabilidad de células MTT (MTT es el bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio), tal como ha sido ya descrito (Mosmann, J.

Immunol. Methods, vol. 65, págs. 55-63, (1983)). Los resultados se muestran en la Figura 2, la cual representa el porcentaje de muerte de células para células Jurkat que fueron no tratadas (Δ) o que fueron tratadas con concentraciones variables (\blacktriangle) o constantes (\circ , \bullet , \square , \blacksquare) de LZ-TRAIL (13 ng/ml), en la ausencia (\bullet) o la presencia de concentraciones variables de TRAIL-R2-Fc (\blacksquare), TNF-R2-Fc (\square), o el anticuerpo anti-TRAIL (\circ). Las concentraciones variables de todas las sustancias comenzaron a 10 μ g/ml y fueron diluidas en serie.

El anticuerpo monoclonal anti-TRAIL y el sTRAIL-R/Fc bloquearon cada uno de ellos la apoptosis inducida por TRAIL en una forma dependiente de la dosis, en tanto que con TNF-R2-Fc no fue así. De acuerdo con ello, el dominio extracelular de TRAIL-R es capaz de unirse a TRAIL, y de inhibición de la apoptosis mediada por TRAIL de células diana.

Ejemplo 8: La apoptosis inducida por TRAIL-R se bloquea mediante inhibidores caspasa y FADD-DN

Las células CV-1/EBNA se transfectaron, mediante el procedimiento DEAE-dextrano, con plásmidos de expresión para TRAIL-R (pDC409-TRAIL-R), conjuntamente con un exceso de tres veces el vector de expresión vacío (pDC409) en presencia o ausencia de z-VAD-fmk (10 μ M; en medio de cultivo), o conjuntamente con un exceso de tres veces el vector de expresión pDC409-CrmA, pDC409-p35, o pDC409-FADD-DN. Además, se co-transfectaron conjuntamente con todas las mezclas de ADN, 400 ng/portaobjeto de un vector de expresión para el gen lacZ de E. coli. Las células transfectadas se cultivaron en cámaras montadas sobre portaobjetos.

El vector de expresión de mamífero pDC409, y el vector pDC409-TRAIL-R que contiene la codificación de la longitud total de TRAIL-R humano, se describen en el Ejemplo 6. El derivado tripeptídico zVAD-fmk (benciloxi-carbonil-Val-Ala-Asp-fluorometil-cetona) se encuentra disponible de Enzyme System Products, Dublín, California.

La proteína derivada de la viruela del ganado vacuno de 38 kilodaltons, designada posteriormente como CrmA, ha sido descrita por Pickup y otros (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 83, págs. 7698-7702, (1986)). La información de la secuencia para CrmA se presenta en la Figura 4 de Pickup y otros, véase cita anterior.

La proteína de 35 kilodaltons codificada por el virus polihedrosis nuclear de Autographa californica, un baculovirus, ha sido descrito por Friesen y Miller (J. Virol., vol. 61, págs. 2264-2272, (1987)). La información de la secuencia para esta proteína, designada aquí como baculovirus p35, se presenta en la Figura 5 de Friesen y Miller, véase cita anterior.

La FADD (también designada como MORT1) ha sido descrita por Boldin y otros (J. Biol. Chem., vol. 270, págs. 7795-7798, (1995)). La proteína denominada como FADD-DN (FADD dominante negativo) es un fragmento C-terminal de FADD que incluye el dominio muerte. El ADN que contiene la codificación de FADD-DN, fusionado a un epitope Flag® N-terminal tag (descrito anteriormente), se insertó dentro del vector de expresión pDC409 descrito en el Ejemplo 6, para formar el pDC409-FADD-DN. El polipéptido FADD-DN corresponde a los aminoácidos 117 a 245 de la secuencia de aminoácidos MORT1 presentada por Boldin y otros, véase cita anterior.

48 horas después de la transfección, las células se lavaron con PBS, se fijaron con glutaraldehído y se incubaron con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosido). Las células que expresan β -galactosidasa se tiñen de azul. Una disminución en el porcentaje de células teñidas indica pérdida de expresión β -galactosidasa, y está en correlación con la muerte de células que expresan la proteína(s) co-transfectada con el gen lacZ.

Los resultados se presentan en la Figura 3, en la que los valores trazados representan la desviación promedia y estándar de al menos tres experimentos separados. El poxvirus CrmA, el baculovirus p35, el FADD-DN, y el z-VAD-fmk, reducen, cada uno de ellos, de manera eficaz la muerte de células transfectadas que expresan TRAIL-R.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Immunex Corporation

<120> Receptor que se une a TRAIL

<130> P21913EP

<140> 98908474.4

<141> 1998-02-11

<150> US08/799,861

<151> 1997-02-13

<150> US08/815,255

<151> 1997-03-12

<150> US08/829,536

<151> 1997-03-28

<150> US08/869,852

<151> 1997-06-04

<150> US08/883,036

<151> 1997-06-26

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1323

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1323)

<400> 1

atg gaa caa cgg gga cag aac gcc ccg gcc gct tcg ggg gcc cgg aaa 48
Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg Lys
1 5 10 15

agg cac ggc cca gga ccc agg gag gcg cgg gga gcc agg cct ggg ccc 96
Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro Gly Pro
20 25 30

cgg gtc ccc aag acc ctt gtg ctc gtt gtc gcc gcg gtc ctg ctg ttg	144
Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val Leu Leu Leu	
35 40 45	
gtc tca gct gag tct gct ctg atc acc caa caa gac cta gct ccc cag	192
Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln	
50 55 60	
cag aga gcg gcc cca caa caa aag agg tcc agc ccc tca gag gga ttg	240
Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu	
65 70 75 80	
tgt cca cct gga cac cat atc tca gaa gac ggt aga gat tgc atc tcc	288
Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser	
85 90 95	
tgc aaa tat gga cag gac tat agc act cac tgg aat gac ctc ctt ttc	336
Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe	
100 105 110	
tgc ttg cgc tgc acc agg tgt gat tca ggt gaa gtg gag cta agt ccg	384
Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro	
115 120 125	
tgc acc acg acc aga aac aca gtg tgt cag tgc gaa gaa ggc acc ttc	432
Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe	
130 135 140	
cgg gaa gaa gat tct cct gag atg tgc cgg aag tgc cgc aca ggg tgt	480
Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys	
145 150 155 160	
ccc aga ggg atg gtc aag gtc ggt gat tgt aca ccc tgg agt gac atc	528
Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile	
165 170 175	
gaa tgt gtc cac aaa gaa tca ggt aca aag cac agt ggg gaa gcc cca	576
Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Thr Lys His Ser Gly Glu Ala Pro	
180 185 190	
gct gtg gag gag acg gtg acc tcc agc cca ggg act cct gcc tct ccc	624
Ala Val Glu Glu Thr Val Thr Ser Ser Pro Gly Thr Pro Ala Ser Pro	
195 200 205	
tgt tct ctc tca ggc atc atc ata gga gtc aca gtt gca gcc gta gtc	672
Cys Ser Leu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala Ala Val Val	
210 215 220	

ttg att gtg gct gtg ttt gtt tgc aag tct tta ctg tgg aag aaa gtc	720
Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp Lys Lys Val	
225 230 235 240	
ctt cct tac ctg aaa ggc atc tgc tca ggt ggt ggt ggg gac cct gag	768
Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly Asp Pro Glu	
245 250 255	
cgt gtg gac aga agc tca caa cga cct ggg gct gag gac aat gtc ctc	816
Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp Asn Val Leu	
260 265 270	
aat gag atc gtg agt atc ttg cag ccc acc cag gtc cct gag cag gaa	864
Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val Pro Glu Gln Glu	
275 280 285	
atg gaa gtc cag gag cca gca gag cca aca ggt gtc aac atg ttg tcc	912
Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val Asn Met Leu Ser	
290 295 300	
ccc ggg gag tca gag cat ctg ctg gaa ccg gca gaa gct gaa agg tct	960
Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala Glu Ala Glu Arg Ser	
305 310 315 320	
cag agg agg agg ctg ctg gtt cca gca aat gaa ggt gat ccc act gag	1008
Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn Glu Gly Asp Pro Thr Glu	
325 330 335	
act ctg aga cag tgc ttc gat gac ttt gca gac ttg gtg ccc ttt gac	1056
Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val Pro Phe Asp	
340 345 350	
tcc tgg gag ccg ctc atg agg aag ttg ggc ctc atg gac aat gag ata	1104
Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu Ile	
355 360 365	
aag gtg gct aaa gct gag gca gcg ggc cac agg gac acc ttg tac acg	1152
Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Tyr Thr	
370 375 380	
atg ctg ata aag tgg gtc aac aaa acc ggg cga gat gcc tct gtc cac	1200
Met Leu Ile Lys Trp Val Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala Ser Val His	
385 390 395 400	
acc ctg ctg gat gcc ttg gag acg ctg gga gag aga ctt gcc aag cag	1248
Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu Ala Lys Gln	
405 410 415	

aag att gag gac cac ttg ttg agc tct gga aag ttc atg tat cta gaa 1296
 Lys Ile Glu Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met Tyr Leu Glu
 420 425 430

ggt aat gca gac tct gcc atg tcc taa 1323
 Gly Asn Ala Asp Ser Ala Met Ser
 435 440

<210> 2
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg Lys
 1 5 10 15
 Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro Gly Pro
 20 25 30
 Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val Leu Leu Leu
 35 40 45
 Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln
 50 55 60
 Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu
 65 70 75 80
 Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser
 85 90 95
 Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe
 100 105 110
 Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro
 115 120 125
 Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe
 130 135 140
 Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys
 145 150 155 160
 Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile
 165 170 175

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

Gly Asn Ala Asp Ser Ala Met Ser
435 440

<210> 3
<211> 157
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (3)..(155)

<400> 3
ct gag act ctg aga cag tgc ttc gat gac ttt gca gac ttg gtg ccc 47
Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val Pro
1 5 10 15
ttt gac tcc tgg gag ccg ctc atg agg aag ttg ggc ctc atg gac aat 95
Phe Asp Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn
20 25 30
gag ata aag gtg gct aaa gct gag gca gcg ggc cac agg gac acc ttg 143
Glu Ile Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu
35 40 45
tnc acn atg ctg at 157
Xaa Xaa Met Leu
50

<210> 4
<211> 51
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val Pro Phe
1 5 10 15
Asp Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu
20 25 30
Ile Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Xaa
35 40 45
Xaa Met Leu
50

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido Flag

<400> 5

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Val Pro Ala Asn Glu Gly Asp

1 5

<210> 7

<211> 51

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val Pro Phe

1 5 10 15

Asp Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu

20 25 30

Ile Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Xaa

35 40 45

Thr Met Leu

50

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido receptor de ligando que induce la apoptosis relacionada con el TNF (TRAIL-R) purificado, que se une al ligando que induce la apoptosis relacionada con el TNF (TRAIL), en el que el TRAIL-R está **caracterizado por** comprender la secuencia de aminoácidos VPANEGD.
- 5 2. Un polipéptido TRAIL-R de la Reivindicación 1, en el que dicho polipéptido está **caracterizado** además por un peso molecular de aproximadamente 50 a 55 kilodaltons, tal como se determina mediante SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida.
3. Un polipéptido TRAIL-R de la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, en el dicho polipéptido está **caracterizado** además por comprender la secuencia de aminoácidos
10 ETLRQCFFDDFADLVPFDSWEPLMRKLGLMDNEIKVAKAEAGHRDTLXTML.
4. Un polipéptido TRAIL-R purificado seleccionado entre el grupo que consiste en:
 - (a) el polipéptido TRAIL-R de la SEC ID N°:2; y
 - (b) un polipéptido que comprende los aminoácidos x a 440 de la SEC ID N°:2, en el que x representa un número entero del 51 al 59; y
 - 15 (c) un polipéptido que comprende los aminoácidos 54 a 440 de la SEC ID N°:2.
5. Un polipéptido TRAIL-R, en el que dicho polipéptido es un TRAIL-R soluble que consiste en los aminoácidos x a 210 de la SEC ID N°:2, en el que x representa un número entero del 51 al 59.
6. Un polipéptido TRAIL-R de la Reivindicación 5, que comprende los aminoácidos 52 a 210 de la SEC ID N°:2.
7. Un oligómero que comprende desde dos hasta cuatro polipéptidos TRAIL-R de la Reivindicación 4, o desde dos hasta cuatro polipéptidos TRAIL-R de la Reivindicación 5 o la Reivindicación 6.
8. Una composición que comprende un polipéptido TRAIL-R de la Reivindicación, 4, 5 ó 6, y un diluyente, excipiente o vehículo aceptable fisiológicamente,
9. Un ADN de TRAIL-R aislado que contiene el código de un polipéptido TRAIL-R, en el que dicho polipéptido TRAIL-R se une al ligando que induce la apoptosis relacionada con el TNF (TRAIL), en el que dicho ADN comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°:3.
- 25 10. Un ADN de TRAIL-R aislado, en el que dicho ADN contiene el código de un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en:
 - (a) el polipéptido TRAIL-R de la SEC ID N°:2; y
 - (b) un polipéptido que consiste en los aminoácidos x a 440 de la SEC ID N°:2, en el que x representa un número entero del 51 al 59; y
 - 30 (c) un polipéptido que consiste en los aminoácidos 54 a 440 de la SEC ID N°:2.
11. Un ADN de TRAIL-R aislado, en el que dicho ADN contiene el código de un polipéptido es un TRAIL-R soluble que comprende los aminoácidos x a 210 de la SEC ID N°:2, en el que x representa un número entero del 51 al 59.
12. Un ADN de TRAIL-R de la Reivindicación 11, en el que dicho ADN codifica un polipéptido que comprende los aminoácidos 52 a 210 de la SEC ID N°:2.
- 35 13. Un vector de expresión que comprende un ADN que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
 - (a) el polipéptido TRAIL-R de la SEC ID N°:2; y
 - (b) un polipéptido que consiste en los aminoácidos x a 440 de la SEC ID N°:2, en el que x representa un número entero del 51 al 59; y
 - 40 (c) un polipéptido que consiste en los aminoácidos 54 a 440 de la SEC ID N°:2.
14. Una célula hospedadora transformada con una expresión de la Reivindicación 13.
15. Un anticuerpo que está dirigido contra y que es inmunorreactivo con un polipéptido TRAIL-R de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, en el que el anticuerpo se puede obtener usando una proteína TRAIL-R como un inmunógeno, dicha proteína TRAIL-R se puede obtener de células Jurkat, por

medio de la disrupción de las células y purificación subsiguiente incluyendo cromatografía por afinidad, empleando una matriz de cromatografía que contiene TRAIL y HPLC de fase inversa.

16. Un anticuerpo de la Reivindicación 15, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

5 17. Una composición que comprende un anticuerpo de la Reivindicación 15 o la Reivindicación 16 y un diluyente, excipiente o vehículo aceptable fisiológicamente.

FIGURA 1

```

1  CTGAGACTCTGAGACAGTGCTTCGATGACTTTGCAGACTT 40
   -----+-----+-----+-----+
   GACTCTGAGACTCTGTCACGAAGCTACTGAAACGTCTGAA

       E T L R Q C F D D F A D L

41  GGTGCCCTTTGACTCCTGGGAGCCGCTCATGAGGAAGTTG 80
   -----+-----+-----+-----+
   CCACGGGAAACTGAGGACCCTCGGCGAGTACTCCTTCAAC

       V P F D S W E P L M R K L

81  GGCCTCATGGACAATGAGATAAAGGTGGCTAAAGCTGAGG 120
   -----+-----+-----+-----+
   CCGGAGTACCTGTTACTCTATTTCACCGATTTCGACTCC

       G L M D N E I K V A K A E A

121 CAGCGGGCCACAGGGACACCTTGTNCACNATGCTGAT 157
   -----+-----+-----+-----
   GTCGCCCCGGTGTCCCTGTGGAACANGTGNTACGACTA

       A G H R D T L X T M L

```


FIGURA 2

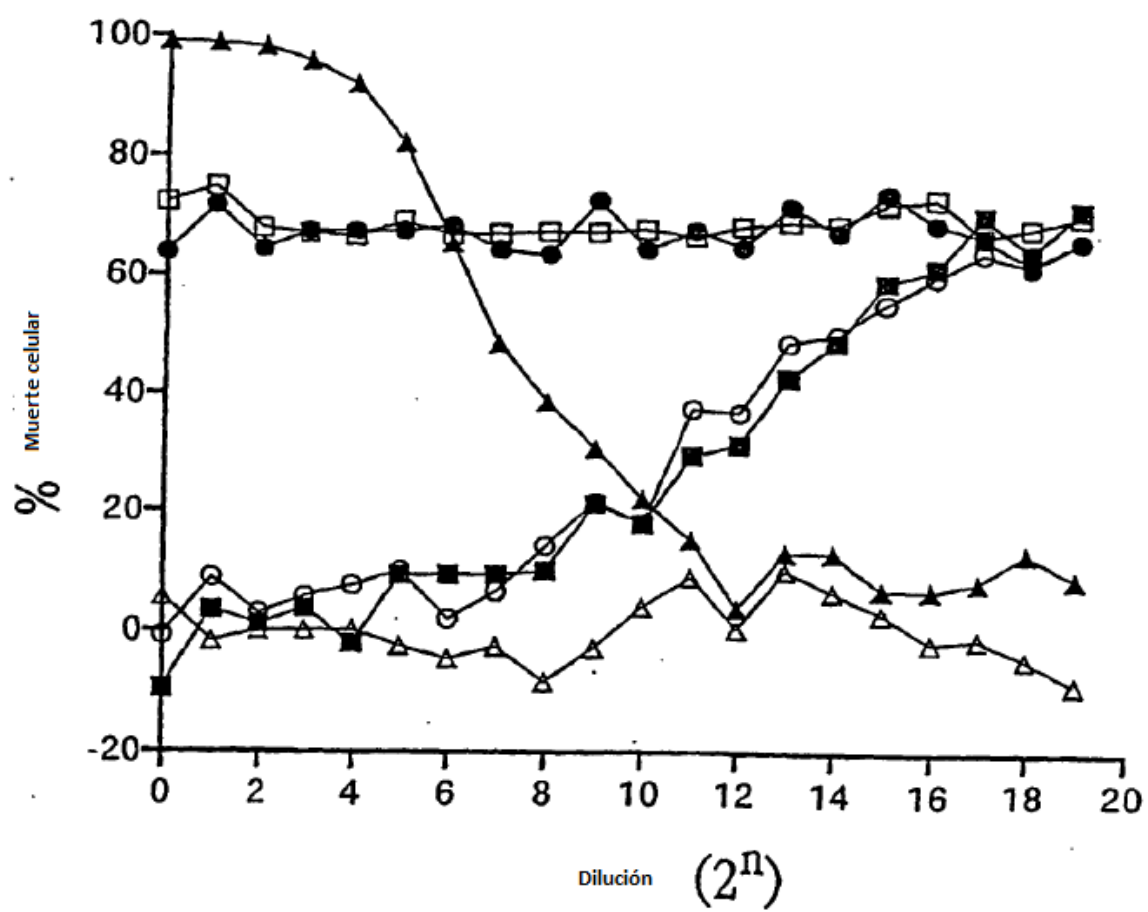


FIGURA 3

