



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 265 511**

(51) Int. Cl.:
C07K 16/40 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02762749 .6**

(86) Fecha de presentación : **04.09.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1423429**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.2004**

(54) Título: **Anticuerpos contra la caspasa-8, su preparación y su uso.**

(30) Prioridad: **04.09.2001 IL 145279**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2007

(73) Titular/es:
YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT Co., Ltd.
Weizmann Institute of Science Herzl St.
P.O. Box 95
Rehovot 76100, IL

(72) Inventor/es: **Wallach, David;**
Goncharov, Tanya y
Kolumam, Ganesh

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 265 511 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra la caspasa-8, su preparación y su uso.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a anticuerpos contra una región específica en la caspasa 8, y a su uso.

Antecedentes de la invención

10 El factor de necrosis tumoral (TNF-alfa) y la linfotóxina (TNF-beta) son citocinas proinflamatorias multifuncionales formadas principalmente por leucocitos mononucleares, que tienen muchos efectos sobre las células (Wallach, D. (1986) en: *Interferon 7* (Ion Gresser, ed.), pág. 83-122, Academic Press, Londres; y Beutler y Cerami (1987). Tanto TNF-alfa como TNF-beta inician sus efectos uniéndose a receptores de superficie celular específicos. Algunos de los
15 efectos es probable que sean beneficiosos para el organismo: pueden destruir, por ejemplo, células tumorales o células infectadas por virus y aumentar las actividades antibacterianas de los granulocitos. De este modo, el TNF contribuye a la defensa del organismo frente a tumores y agentes infecciosos y contribuye a la recuperación de lesiones. Por tanto, el TNF puede utilizarse como agente antitumoral, en cuya aplicación se une a sus receptores sobre la superficie de células tumorales e inicia así los eventos que conducen a la muerte de las células tumorales. El TNF puede utilizarse
20 también como agente antiinfeccioso.

Sin embargo, el TNF-alfa tiene efectos dañinos. Hay evidencias de que la sobreproducción de TNF-alfa puede desempeñar un papel patogénico importante en varias enfermedades. Por ejemplo, los efectos del TNF-alfa, principalmente sobre los vasos, son conocidos por ser una causa importante de los síntomas de shock séptico (Tracey *et al.*,
25 1994). En algunas enfermedades, el TNF puede causar una pérdida de peso excesiva (caquexia) al suprimir actividades de adipocitos y al causar anorexia, y el TNF-alfa se ha denominado por tanto caquectina. Se ha descrito también como un mediador del daño a tejidos en enfermedades reumáticas (Beutler y Cerami, 1987) y como un mediador importante del daño observado en reacciones de injerto frente a hospedador (Grau, G.E. *et al.*, 1989). Además, el TNF es conocido por estar implicado en el proceso de inflamación y en muchas otras enfermedades.

30 Dos receptores distintos expresados independientemente, los receptores de TNF p55 (CD120a) y p75 (CD120b), que se unen ambos a TNF-alfa y TNF-beta específicamente, inician y/o median los efectos biológicos anteriormente observados del TNF. Estos dos receptores tienen dominios intracelulares estructuralmente distintos, sugiriendo que señalizan diferentemente (véase Hohmann *et al.*, 1989; Engelman *et al.*, 1990; Brockhaus *et al.*, 1990; Loetscher *et al.*, 1990; Schall *et al.*, 1990; Nophar *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1990). Sin embargo, los mecanismos celulares, por
35 ejemplo, las diversas proteínas y posiblemente otros factores que están implicados en la señalización intracelular de CD120a y CD120b, todavía han de elucidarse. Es la señalización intracelular, que aparece habitualmente después de la unión del ligando, concretamente TNF (alfa o beta), al receptor, la responsable del inicio de la cascada de reacciones que da como resultado último la respuesta observada de la célula frente a TNF.

40 Con referencia al efecto citocida anteriormente citado del TNF, en la mayoría de las células estudiadas hasta ahora, este efecto se desencadena principalmente por CD120a. Los anticuerpos contra el dominio extracelular (dominio de unión a ligando) de CD120a pueden desencadenar por sí mismos el efecto citocida (véase el documento EP 412486), que se correlaciona con la eficacia de reticulación del receptor por los anticuerpos, que se cree que es la primera etapa
45 en la generación del proceso de señalización intracelular. Además, los estudios mutacionales (Brakebusch *et al.*, 1992; Tartaglia *et al.*, 1993) han mostrado que la función biológica de CD120a depende de la integridad de su dominio intracelular, y en consecuencia se ha sugerido que la iniciación de la señalización intracelular que conduce al efecto citocida del TNF aparece como consecuencia de la asociación de dos o más dominios intracelular de CD120a. Sin embargo, el TNF (alfa y beta) aparece como un homotrímero, y como tal, se ha sugerido que induce la señalización intracelular a
50 través de CD120a mediante su capacidad de unirse a y de reticular las moléculas de receptor, concretamente, de causar la agregación del receptor (Engelman H. *et al.*, 1990).

Es otro miembro de la superfamilia TNF/NGF de receptores el receptor FAS/APO1 (CD95). El CD95 media la muerte celular en forma de apoptosis (Itoh *et al.*, 1991) y parece servir como selector negativo de células T autorreactivas, concretamente durante la maduración de células T, CD95 media la muerte apoptótica de células T que reconocen autoantígenos. Se ha encontrado también que las mutaciones en el gen CD95 (*lpr*) causan un trastorno de linfoproliferación en ratones que se parece a la enfermedad autoinmune humana lupus eritematoso sistémico (LES) (Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992). El ligando de CD95 es una molécula asociada a la superficie celular portada por, entre otras,
55 células T asesinas (o linfocitos T citotóxicos, CTL), y por tanto cuando dichos CTL se ponen en contacto con células que portan CD95, son capaces de inducir la muerte celular apoptótica de las células portadoras de CD95. Además, se han preparado anticuerpos monoclonales que son específicos de CD95, siendo capaces estos anticuerpos monoclonales de inducir la muerte celular apoptótica en células portadoras de CD95, incluyendo células de ratón transformadas mediante ADNc que codifica CD95 humano (por ejemplo, Itoh *et al.*, 1991).

65 Se revisan con detalle por Wallach *et al.* (1999) los mecanismos de señalización de receptor de TNF y Fas, comprendiendo los diferentes receptores, su regulación y las moléculas de señalización identificadas cadena abajo.

Se ha encontrado que pueden utilizarse en ciertas células malignas y células infectadas por VIH que portan CD95 sobre su superficie, anticuerpos contra CD95 o el ligando de CD95 para desencadenar los efectos citotóxicos mediados por CD95 en estas células, y proporcionar así un medio para combatir dichas células malignas o células infectadas por VIH (véase Itoh *et al.*, 1991). Por lo tanto, encontrar aún otros modos para potenciar la actividad citotóxica de CD95 puede tener también potencial terapéutico.

Ha sido una necesidad sentida largo tiempo proporcionar un modo para modular la respuesta celular frente a TNF (alfa o beta) y ligando de CD95. Por ejemplo, en las situaciones patológicas citadas anteriormente, cuando se sobreexpresa TNF o ligando de CD95, es deseable inhibir los efectos citocidas inducidos por TNF o ligando de CD95, mientras que en otras situaciones, por ejemplo, aplicaciones de curación de heridas, es deseable potenciar el efecto de TNF, o en el caso de CD95, en células tumorales o células infectadas por VIH, es deseable potenciar el efecto mediado por CD95.

Se han realizado una serie de enfoques por los solicitantes (véanse, por ejemplo, las memorias descriptivas de patentes europeas nº EP 186.833, EP 308.378, EP 398.327 y EP 412.486) para regular los efectos dañinos del TNF inhibiendo la unión de TNF a sus receptores utilizando anticuerpos anti-TNF o utilizando receptores de TNF solubles (que son esencialmente los dominios extracelulares solubles de los receptores) para competir con la unión de TNF a los receptores de TNF unidos a la superficie celular (TNF-R). Además, basándose en que la unión de TNF a sus receptores es necesaria para los efectos celulares inducidos por TNF, se han realizado enfoques por los solicitantes (véase, por ejemplo, el documento EP 568.925) para modular el efecto de TNF modulando la actividad de los TNF-R.

El documento EP 568.925 se refiere a un método para modular la transducción de señal y/o la escisión en TNF-R mediante el cual péptidos u otras moléculas pueden interactuar con el receptor mismo o con proteínas efectoras que interactúan con el receptor, modulando así la función normal de los TNF-R. En el documento EP 568.925, se describe la construcción y caracterización de diversas formas mutantes de CD120a, que tienen mutaciones en sus dominios extracelular, transmembrana e intracelular. De este modo, se identificaron regiones dentro de los dominios anteriores de CD120a por ser esenciales para el funcionamiento del receptor, concretamente, la unión del ligando (TNF) y la posterior transducción de señal y señalización intracelular que da como resultado último el efecto observado del TNF sobre las células. Además, se describen también una serie de enfoques para aislar e identificar proteínas, péptidos u otros factores que son capaces de unirse a diversas regiones en los dominios anteriores de CD120a, pudiendo estar implicadas dichas proteínas, péptidos y otros factores en la regulación o modulación de la actividad de los TNF-R. Se indican también en el documento EPO 368.925 una serie de enfoques para aislar y clonar las secuencias de ADN que codifican dichas proteínas y péptidos; para la construcción de vectores de expresión para la producción de estas proteínas y péptidos y para la preparación de anticuerpos o fragmentos de los mismos que interactúan con CD120a o con las proteínas y péptidos anteriores que se unen a diversas regiones de CD120a. Sin embargo, el documento EP 568.925 no especifica las proteínas y péptidos reales que se unen a los dominios intracelulares de los TNF-R. De forma similar, en el documento EP 568.925 no hay descripción de proteínas o péptidos específicos capaces de unirse al dominio intracelular de CD95.

Por tanto, cuando se desea inhibir el efecto del TNF, o del ligando de CD95, sería deseable reducir la cantidad o la actividad de los TNF-R o CD95 en la superficie celular, mientras que sería deseable un aumento en la cantidad o la actividad de los TNF-R o CD95 cuando se busque un efecto potenciado de TNF o ligando de CD95. Con este fin, se han secuenciado y analizado los promotores tanto de CD120a como de CD120b, y se han encontrado una serie de motivos de secuencia clave que son específicos de diversos factores de regulación de la transcripción, y como tal, la expresión de estos TNF-R puede controlarse al nivel de su promotor, concretamente, la inhibición de la transcripción de los promotores para una reducción del número de receptores, y la potenciación de la transcripción de los promotores para un aumento del número de receptores (documentos EP 606.869 y WO 9531206).

Aunque es conocido que los receptores de factor de necrosis tumoral (TNF) y el receptor relacionado estructuralmente CD95 desencadenan en células, tras la estimulación mediante ligandos producidos por leucocitos, actividades destructivas que conducen a su propia muerte, los mecanismos de este desencadenamiento son todavía poco comprendidos. Los estudios mutacionales indican que en CD95 y CD120a la señalización de citotoxicidad implica regiones distintas en sus dominios intracelulares (Brakebusch *et al.*, 1992; Tartaglia *et al.*, 1993, Itoh y Nagata, 1993). Estas regiones (los "dominios de muerte") tienen similitud de secuencia. Los "dominios de muerte" tanto de CD95 como de CD120a tienden a autoasociarse. Su autoasociación promueve aparentemente la agregación de receptor, que es necesaria para la iniciación de la señalización (véanse Bigda *et al.*, 1994; Boldin *et al.*, 1995) y a altos niveles de expresión de receptor, puede dar como resultado el desencadenamiento de señalización independiente de ligando (Boldin *et al.*, 1995).

Algunos de los efectos citotóxicos de los linfocitos están mediados por la interacción de un ligando producido por linfocito con CD95 de la célula diana (véase también Nagata y Goldstein, 1995). La muerte celular por fagocitos mononucleares implica a TNF y a su receptor CD120a (véase también Vandenabeele *et al.*, 1995). Como otros efectos inducidos por receptor, la inducción de la muerte celular por los receptores de TNF y CD95 aparece mediante una serie de interacciones proteína-proteína que conducen desde la unión ligando-receptor hasta la activación eventual de funciones efectoras enzimáticas, que se ha mostrado que comprenden interacciones proteína-proteína no enzimáticas que inician la señalización para la muerte celular; la unión de TNF trimérico o moléculas de ligando de CD95 a los receptores, aumentadas las interacciones resultantes de sus dominios intracelulares (Brakebusch *et al.*, 1992; Tartaglia *et al.*, 1993; Itoh y Nagata, 1993) por una propensión de los motivos de dominio de muerte a autoasociarse (Boldin *et*

al., 1995a), y la unión inducida de dos proteínas citoplasmáticas (que pueden unirse también entre sí) a los dominios intracelulares de receptores: MORT-1 (o FADD) a CD95 (Boldin *et al.*, 1995b; Chinnaiyan *et al.*, 1995; Kischkel *et al.*, 1995) y TRADD a CD120a (Hsu *et al.*, 1996). Además de su unión a CD95 y CD120a, MORT-1 y TRADD son también capaces de unirse entre sí, así como a otras proteínas que contienen dominios de muerte tales como RIP (Stanger *et al.*, 1995), lo que proporciona una “intercomunicación” funcional entre CD95 y CD120a. Estas uniones aparecen a través de un motivo de secuencia conservada, el “módulo de dominio de muerte” común a los receptores y sus proteínas asociadas. Además, aunque en el ensayo de dos híbridos de levadura se mostró que MORT-1 se unía espontáneamente a CD95, en células de mamífero esta unión tiene lugar sólo después de la estimulación del receptor, sugiriendo que MORT-1 participa en los eventos iniciadores de la señalización de CD95. MORT-1 no contiene ningún motivo de secuencia característico de actividad enzimática y, por lo tanto, su capacidad de desencadenar la muerte celular parece no implicar una actividad intrínseca de MORT-1 misma, sino en lugar de ello, la activación de alguna(s) otra(s) proteína(s) que se une(n) a MORT-1 y actúa(n) adicionalmente cadena abajo en la cascada de señalización. Se ha mostrado que la expresión celular de mutantes de MORT-1 que carecen de la parte N-terminal de la molécula bloquea la inducción de citotoxicidad por CD95 o CD120a (Hsu *et al.*, 1996; Chinnaiyan *et al.*, 1996), indicando que esta región N-terminal transmite la señalización de la señal citocida de ambos receptores mediante interacciones proteína-proteína.

Se ha implicado un grupo de tiolproteasas citoplasmáticas, que están estructuralmente relacionadas con la proteasa CED3 de *Caenorhabditis elegans* y con la enzima convertidora beta de interleucina 1 de mamífero (ICE), en el inicio de diversos procesos de muerte celular fisiológica (revisado en Kumar, 1995 y Henkart, 1996). Ha habido también evidencias de que proteasa(s) de esta familia toma(n) parte en la citotoxicidad celular inducida por CD95 y TNF-R. Se ha encontrado que inhibidores peptídicos específicos de las proteasas y dos proteínas codificadas por virus que bloquean su función, la proteína crmA de viruela vacuna y la proteína p35 de baculovirus, proporcionan protección a las células frente a esta citotoxicidad celular (Enari *et al.*, 1995; Tewari *et al.*, 1995; Xue *et al.*, 1995; Beidler *et al.*, 1995). Pudo demostrarse la rápida escisión de ciertas proteínas celulares específicas en células, aparentemente mediada por proteasa(s) de la familia de CED3/ICE (caspasa), poco después de la estimulación de CD95 o TNF-R.

Una de dichas proteasas y diversas isoformas de la misma (incluyendo las inhibidoras) es conocida como MACH (ahora caspasa 8), que es una proteína de unión a MORT-1 que se ha aislado, clonado, caracterizado y también se han descrito sus posibles usos, como se indica con detalle y se incorpora a la presente memoria en su totalidad como referencia, en el documento de propiedad común con el presente PCT/US96/10521, y en una publicación de los presentes inventores (Boldin *et al.*, 1996). Otra de dichas proteasas y diversas formas de la misma (incluyendo las inhibidoras), designada Mch4 (también denominada caspasa 10), se ha aislado y caracterizado también por los presentes inventores (no publicado) y otros (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996; Srinivasula *et al.*, 1996). La caspasa 10 es también una proteína de unión a MORT-1. Por tanto, los detalles referentes a todos los aspectos, rasgos, características y usos de la caspasa 10 están indicados en las publicaciones anteriormente observadas.

Debe observarse también que las caspasas caspasa 8 y caspasa 10, que tienen prodominios similares (véanse Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996; Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996; Vincent y Dixit, 1997) interaccionan a través de sus prodominios con MORT-1, siendo esta interacción a través del “dominio efector de muerte”, DED, presente en la parte N-terminal de MORT-1 y presente por duplicado en caspasa 8 y caspasa 10 (véanse Boldin *et al.*, 1995b; Chinnaiyan *et al.*, 1995).

Las caspasas (proteinasas específicas de cisteína-aspartato) son una familia creciente de cisteinproteasas que comparten diversos rasgos comunes. Se ha encontrado que la mayoría de las caspasas participan en la iniciación y ejecución de la muerte celular programada o apoptosis, mientras que las otras parecen estar implicadas en la producción de citoquinas proinflamatorias (Nicholson D.W. *et al.*, 1997; Salvesen G.S. *et al.*, 1997, Cohen G.M., 1997). Se sintetizan en forma de precursores catalíticamente casi inactivos, y se activan generalmente mediante escisión después de residuos de aspartato internos específicos presentes en engarces interdominio. Los sitios de escisión de las caspasas se definen mediante secuencias tetrapeptídicas (X-X-X-D) y la escisión aparece siempre cadena abajo del ácido aspártico. Como resultado, ciertas caspasas activas maduras pueden procesar y activar sus propios precursores, así como otros inactivos (Fernandes-Alnemri T. *et al.*, 1996, Srinivasula S.M., *et al.*, 1996).

La activación del proceso de muerte celular programada es generalmente específico e implica el procesamiento secuencial de caspasas cadena abajo denominadas caspasas “ejecutoras” por las caspasas cadena arriba denominadas caspasas “iniciadoras”. Las características funcionales de las dos clases de caspasas se reflejan también en su estructura. De hecho, las “caspasas iniciadoras” contienen regiones de prodominio más largas comparadas con las caspasas “ejecutoras” (Salvesen G.S. *et al.*, 1997, Cohen, G.M., 1997). El prodominio largo permite a las caspasas iniciadoras o “apicales” activarse mediante el desencadenamiento de los receptores de muerte de la familia de receptor de TNF. Tras la trimerización inducida por ligando de los receptores de muerte, se agrupan las caspasas iniciadoras mediante su prodominio N-terminal largo para interaccionar con moléculas adaptadoras específicas, formando el complejo de señalización inductor de muerte (Cohen G.M., 1997; Kischkel F.C. *et al.*, 1995). Por ejemplo, la caspasa 8/MACH y probablemente la caspasa 10, que contienen dos DED, se agrupan en el complejo receptor mediante las moléculas adaptadoras FADD/MORT-1, mientras que la caspasa 2 se supone que se agrupa mediante CRADD/RAIDD y RIP (Nagata S. *et al.*, 1997; MacFarlane M. *et al.*, Ahmad M. *et al.*, 1997; Duan H. *et al.*, 1997). Debido a la naturaleza trimérica del complejo receptor activado, se cree que al menos dos moléculas de caspasa se ponen en estrecha proximidad entre sí, conduciendo así a su activación mediante procesamiento autocatalítico (Yang *et al.*, 1998, Muzio *et al.*, 1998).

Las caspasas se sintetizan en forma de proenzimas constituidas por tres subunidades principales, el prodominio N-terminal y dos subunidades, que a veces están separadas por un péptido de engarce. Las dos subunidades se han denominado subunidad “larga” o 1 (Sub-1), que contiene la mayor parte del sitio enzimático activo, y subunidad “corta” o 2 (Sub-2). Para la activación completa de la enzima, se procesa formando el prodominio y los dos subdominios. Las dos subunidades forman un heterodímero. Basándose en la estructura tridimensional deducida de la caspasa 3, parece que el extremo C-terminal del dominio largo, así como la terminación N del subdominio corto, tienen que liberarse y la terminación C de la subunidad corta tiene que ponerse en estrecha proximidad con la terminación N de la subunidad larga para proporcionar una enzima correctamente plegada y activa (Rotonda *et al.*, 1996, Mittl *et al.*, 1997; Srinivasula *et al.*, 1998).

Aunque se ha considerado siempre que las rutas que conducen a la apoptosis o necrosis son completamente distintas, descubrimientos recientes han sugerido que las caspasas, que representan los mediadores principales de la apoptosis, pueden estar implicadas también en la necrosis tanto de manera negativa como positiva. Es más, la sobreexpresión del inhibidor de caspasa CrmA en células L929 se mostró que aumentaba por un factor de 1.000 la sensibilidad de estas células ante la actividad necrótica del TNF (Vercammen *et al.*, 1998), indicando un papel inhibitorio de las caspasas sobre la actividad necrótica inducida por TNF. Además, se ha sugerido también recientemente que los dominios de muerte asociados a TNFR1 y Fas, que desempeñan un papel crucial en la inducción de la apoptosis por estos ligandos (revisado en Wallach *et al.*, 1999), desempeñan un papel importante en la inducción de necrosis (Boone *et al.*, 2000). De forma interesante, se ha mostrado que la necrosis hepática inducida por FasL se bloqueaba mediante inhibidores de caspasa (Kunzle *et al.*, 1997).

Debido a que la proteólisis mediada por caspasa es un elemento crítico y básico del proceso apoptótico [Nicholson, D.W. y Thornberry, N.A. (1997), Villa *et al.* (1997) y Salvesen, G.S. y Dixit, V.M. (1997)], la identificación de las dianas moleculares cadena abajo cruciales de estas proteasas es inevitable para comprender la transducción de señal apoptótica. Se ha mostrado que diversas proteínas estructurales y de señalización se escinden por las caspasas durante la muerte apoptótica [Nicholson, D.W. y Thornberry, N.A. (1997), Villa, P. *et al.*, (1997)] incluyendo ICAD, un inhibidor de ADNasa activada por caspasa, que es esencial para la degradación de ADN internucleosomal, pero no para la ejecución de la apoptosis (Enari, M. *et al.* (1998) y Sakahira *et al.*, (1998)). La gelsolina, una proteína reguladora de actina que modula la transformación en gelsol de actina citoplasmática (Yin, H.L. y Stossel, T.P. (1979)), está implicada en la apoptosis basándose en (i) su escisión durante la apoptosis *in vivo* [Kothakota, S. *et al.* (1997)], (ii) la prevención de la apoptosis mediante su sobreexpresión [Ohtsu, M. *et al.* (1997)] y (iii) la inducción de la apoptosis por uno de los productos escindidos [Kothakota, S. *et al.* (1997)].

La gelsolina tiene múltiples actividades activadas por Ca^{2+} , corta los filamentos de actina y encapsula los extremos de crecimiento rápido de filamentos, y también nuclea la polimerización de actina [Yin, H.L. y Stossel, T.P., (1980), Kurth, M. y Bryan, J. (1984), Janmey, P.A. y Stossel, T.P. (1987)].

La solicitud WO 0039160 da a conocer proteínas que interaccionan con caspasa 8 capaces de interaccionar con Sub-1 y/o Sub-2 de caspasa 8. Las proteínas que interaccionan con caspasa fueron descubiertas mediante examen de dos híbridos utilizando el constructo monocatenario de la caspasa 8.

Típicamente, la copurificación de caspasa 8 y proteínas unidas a caspasa 8 implica la modificación de los epítomos de marcaje de la caspasa 8 (por ejemplo, la fusión de HA con caspasa 8, Roth *et al.*) y el uso de anticuerpos específicos anti-marcaje. Sin embargo, el marcaje epitópico de proteínas puede afectar a la actividad de las proteínas marcadas.

Están disponibles anticuerpos específicos de caspasa 8:

Anti-Mach, nº de cat. 218777, es un anticuerpo policlonal de pollo de Calbiochem que reconoce tanto la pro-caspasa 8 como la caspasa 8 activa. El inmunógeno utilizado para obtener este anticuerpo fue la proteína caspasa 8 recombinante humana completa.

El 6B6 de caspasa 8 (D384) es un anticuerpo monoclonal de Cell Signaling Technology, generado inmunizando ratones con un péptido sintético acoplado a KLH, correspondiente a los residuos cartografiados en la terminación amino de Sub-2 de caspasa 8. Este anticuerpo detecta específicamente niveles endógenos de la subunidad pequeña de 10 kDa escindida de caspasa 8 mediante transferencia Western. Este mAb se recomienda para transferencia Western y no reacciona de forma cruzada con la caspasa 8 completa.

El anticuerpo B9-2 es un anticuerpo monoclonal de Pharmingen (una compañía de Becton Dickinson) que reconoce una banda de 55 kDa correspondiente a la caspasa 8. Se utilizó como inmunógeno un fragmento de proteína caspasa 8 humana recombinante correspondiente a los aminoácidos 335-469 de la caspasa 8 (Weaver *et al.*, 2000). Este anticuerpo monoclonal se recomienda para monitorizar los niveles de caspasa 8 en análisis de transferencia Western. La identificación de la caspasa 8 activa utilizando este mAb puede no funcionar debido a que el fragmento utilizado para generar los anticuerpos esté intacto sólo en la caspasa 8 no activa.

El p10(S-19):sc-6135 de caspasa 8 es un anticuerpo policlonal de cabra purificado por afinidad de Santa Cruz Biotechnology, creado contra un péptido cartografiado cerca de la terminación carboxi de Sub-2 de caspasa 8 de origen humano. Este anticuerpo policlonal reacciona con la subunidad p10 (Sub-2) y el precursor de caspasa 8 de

ES 2 265 511 T3

origen humano mediante transferencia Western, inmunoprecipitación e inmunohistoquímica. No reacciona de forma cruzada con p20 (Sub-1) de caspasa 8.

5 1C12 de caspasa 8 es un anticuerpo monoclonal de Cell Signaling Technology, generado inmunizando ratones con un péptido sintético, acoplado a KLH, correspondiente a los residuos cartografiados en la terminación carboxi de Sub-1 de caspasa 8. Este anticuerpo detecta específicamente la procaspasa 8 y la caspasa 8 activa mediante transferencia Western, pero no es capaz de coprecipitar p72.

10 La secuencia exacta del péptido utilizado para inmunizar ratones para la generación de este mAb es desconocida.

Se proporciona por Sigma otro anticuerpo específico de caspasa 8, designado GD-13, con el nombre de producto C2976. Es también un anticuerpo de conejo, generado inmunizando conejos con un péptido sintético similar a aquel según la SEC ID N° 4. Como con 1C12 de Cell Signaling, este anticuerpo es también incapaz de coprecipitar p72.

15 El p20 (H-134):sc-7890 de caspasa 8 es un anticuerpo policlonal de conejo de Santa Cruz Biotechnology, creado contra una proteína recombinante correspondiente a los aminoácidos 217-350 cartografiados en la Sub-1 de caspasa 8 de origen humano. Este anticuerpo policlonal reacciona con la caspasa 8 activa y precursora de origen de ratón, rata y humano mediante transferencia Western, inmunoprecipitación e inmunohistoquímica.

20 Sin embargo, no hay información en las hojas de datos técnicos sobre la eficacia con la que la caspasa 8 inmunoprecipita y si puede coprecipitar una proteína unida, y de si es posible entonces la recuperación de caspasa 8 y proteínas unidas a caspasa 8 a partir del complejo inmune.

25 Por tanto, no se han reseñado actualmente anticuerpos policlonales y monoclonales contra caspasa 8 que incluyan todos los siguientes rasgos: ser capaces de inmunoprecipitar eficazmente tanto procaspasa 8 como caspasa 8 activa y de disociarse de la caspasa 8 en el complejo inmunoprecipitado, permitiendo la copurificación de caspasa 8 y proteínas unidas a caspasa 8.

30 Por lo tanto, el método de la presente invención soluciona un problema a largo plazo en el área de la coprecipitación y purificación de caspasa 8 y proteínas unidas a caspasa 8.

Sumario de la invención

35 Un anticuerpo (policlonal, monoclonal, quimérico, totalmente humanizado, anticuerpo anti-anti Id o fragmento del mismo), obtenible mediante inmunización de un animal con un péptido del extremo C-terminal de la unidad Sub-1 de caspasa 8 (por ejemplo, CQGDNYQKGIPVETD) y fragmentos del mismo, en el que el péptido utilizado para inmunización tiene la secuencia aminoacídica CQGDNYQKGIPVETD (SEC ID N° 4), capaz de coimmunoprecipitar dicha caspasa (tanto caspasa 8 activa como procaspasa 8) junto con la proteína p72 asociada a procaspasa 8 (SEC ID N° 3) y de liberar eficazmente la caspasa y proteína asociada a partir del complejo inmune tras elución utilizando el péptido según la SEC ID N° 4. Más específicamente, el péptido utilizado para inmunización puede acoplarse preferiblemente a KLH.

En una realización, el anticuerpo según la invención es de isotipo IgG₁ de inmunoglobulina.

45 En otra realización, el anticuerpo de la invención desencadena el procesamiento de la caspasa 8.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que puede utilizarse para el desarrollo de un ensayo ELISA.

50 En otro aspecto, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo según la invención y el uso del anticuerpo para el método de aislamiento de proteínas asociadas a caspasa, más preferiblemente proteína asociada a caspasa que comprende la secuencia aminoacídica SEC ID N° 3, o una isoforma, variante alélica, fragmento, análogo funcional, proteína de fusión, mutante o derivado de la misma, presente en las muestras de célula, por ejemplo, extractos celulares, bibliotecas de ADNc de expresión y bibliotecas de péptidos genómicos o combinatorios. Más específicamente, la invención se refiere al uso de dicho anticuerpo para el aislamiento de proteínas asociadas a caspasa, en la que la caspasa es caspasa 8.

En una realización de la invención, el inmunógeno utilizado para inmunización está ligado a un vehículo, preferiblemente KLH.

60 La invención proporciona también un método para purificar una caspasa, preferiblemente caspasa 8, y proteínas asociadas a caspasa, que comprende poner en contacto un material que contiene caspasa humana con dicho anticuerpo monoclonal. Más específicamente, las proteínas asociadas a caspasa se eluyen, preferiblemente con el péptido utilizado para inmunización.

65 Además, la invención proporciona el uso del epítipo 179 (SEC ID N° 4) para obtener un anticuerpo según la invención, que comprende la inmunización de un animal con dicho epítipo.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la secuencia aminoacídica de la procaspasa 8. Las secuencias peptídicas de la caspasa 8 utilizadas para la preparación de mAb están en negrita y subrayadas.

Péptido 179- el péptido CQGDNYQKGIPVETD correspondiente a la terminación C de la subunidad grande de caspasa 8 (Sub-1).

Péptido 182- el péptido LSSPQTRYIPDEAD correspondiente a la terminación N de la subunidad pequeña de la caspasa 8 (Sub-2, residuos Lys385-Gly399).

Péptido 183- el péptido SESQTLDKVYQMKSKPR correspondiente a la terminación N de Sub-1 (residuos Ser217-Gly234).

La Figura 2 muestra la inmunoprecipitación eficaz de cantidades minúsculas de caspasa 8 encontrada en lisados de células BJAB utilizando un anticuerpo monoclonal contra el epítipo 179. Se muestra de izquierda a derecha el agotamiento de la caspasa 8 de los lisados de células BJAB (preparados antes, -, y después, +, de la estimulación del receptor Fas) mediante inmunoprecipitación con diversos anticuerpos:

Carriles 3 y 4, mAb 179: un anticuerpo monoclonal preparado contra un péptido correspondiente a la terminación C de Sub-1 (la subunidad grande de la caspasa 8, residuos Cys360-Asp374).

Carriles 5 y 6, mAb 183.1 y carriles 7 y 8, mAb 183.2, dos anticuerpos monoclonales preparados contra un péptido correspondiente a la terminación N de Sub-1 (residuos Ser217-Gly234).

Carriles 9 y 10, mAb182, un anticuerpo monoclonal preparado contra un péptido correspondiente a la terminación N de Sub-2 (la subunidad pequeña de la caspasa 8) (residuos Lys385-Asp399).

Carril 11, SNM, suero normal de ratón.

La figura muestra la evaluación por transferencia Western de las cantidades de caspasa 8 restantes en los lisados celulares después de inmunoprecipitación mediante los anticuerpos indicados y en lisados celulares totales no precipitados (carriles 1 y 2).

La Figura 3a muestra la elución de la caspasa 8 inmunoprecipitada como en la Figura 2 mediante competición con los péptidos contra los que se han creado los diversos anticuerpos. La caspasa 8 en los eluidos de los inmunoprecipitados producidos con los anticuerpos indicados se detecta mediante análisis de transferencia Western (como en la Fig. 2).

La Figura 3b muestra la elución de la caspasa 8 inmunoprecipitada como en la Figura 2 mediante competición con los péptidos contra los que se han creado los diversos anticuerpos. La caspasa 8 en los eluidos de los inmunoprecipitados producidos con los anticuerpos indicados se muestra mediante tinción con plata.

La Figura 4 muestra la inmunoprecipitación eficaz de cantidades minúsculas de caspasa 8 encontrada en lisados de células BJAB utilizando suero policlonal preparado mediante inmunización con un péptido correspondiente a la terminación C de Sub-1 (la subunidad grande de caspasa 8, residuos Cys360-Asp374). Se muestra de izquierda a derecha el agotamiento de la caspasa 8 de los lisados de células BJAB (preparados antes, -, y después, +, de la estimulación del receptor Fas) mediante inmunoprecipitación con diversos anticuerpos. La caspasa 8 restante en el lisado se detecta mediante análisis de transferencia Western después de inmunoprecipitación con los siguientes anticuerpos:

Carriles 3 y 4, SNM, suero normal de ratón.

Carriles 5 y 6, anticuerpo policlonal anti-179, un anticuerpo policlonal de conejo preparado contra la terminación C de Sub-1 (la subunidad grande de caspasa 8, residuos Cys360-Asp374).

Carriles 7 y 8, mAb 182.

TL- lisado celular total.

La Figura 5 muestra la caspasa 8 inmunoprecipitada y eluida a partir de lisados de células BJAB no estimuladas utilizando diversos anticuerpos. Se muestran de izquierda a derecha los niveles de caspasa 8 detectados mediante análisis de transferencia Western después de la elución de los inmunoprecipitados llevada a cabo con los siguientes anticuerpos:

Carril 1, suero policlonal anti-183 contra la terminación N de Sub-1 (residuos Ser217-Gly234).

Carril 2, mAb183.2, un anticuerpo monoclonal contra la terminación N de Sub-1 (residuos Ser217-Gly234).

Carril 3, mAb179, un anticuerpo monoclonal contra la terminación C de Sub-1 (la subunidad grande de caspasa 8, residuos Cys360-Asp374).

El fragmento pequeño (5,6 kDa) de la caspasa 8, producido mediante el nuevo modo de procesamiento impuesto por el mAb179, está marcado con una flecha.

La Figura 6 muestra la caspasa 8 y la proteína asociada (P72/Cari) que habían inmunoprecipitado por mAb179 a partir de lisados de células BJAB antes o después de una hora de estimulación con ligando de Fas y eluido con el péptido 179. Se eluyeron la caspasa 8 y proteínas asociadas inmunoprecipitadas con mAb179 (como en la Fig. 3b), se resolvieron mediante PAGE-SDS y se tiñeron con plata. Los carriles 1 y 2 muestran controles en los que los lisados celulares inmunoprecipitaron con MIgG1, inmunoglobulina IgG1 de ratón.

La Figura 7 muestra una representación esquemática de motivos de proteína P72. Un motivo de hélice enrollada (C) y dos "motivos SURP" localizados en tándem (S) están localizados cerca de la terminación N de la proteína, y un motivo de "parche G" está localizado en la terminación C de la proteína (motivo G). El residuo de ácido aspártico D600 presente dentro del motivo G está también indicado. D600-, un mutante en el que el residuo D600 de la proteína se reemplazó por el residuo de ácido glutámico.

La Figura 8 muestra una representación esquemática del enfoque utilizado para la preparación de ADNc de p72 completo. Se utilizó un clon EST IMAGE 2964545 adquirido en Incyte Genomics que carece de la secuencia de los 21 primeros nucleótidos (que codifican los 7 primeros aminoácidos) como molde para una primera reacción en cadena con polimerasa (PCR) junto con un par de cebadores: el cebador de codificación P2, que contiene ácidos nucleicos superpuestos con el clon 5' EST y 15 nucleótidos adicionales aparte de los 21 nucleótidos faltantes y el cebador inverso P3, que contiene secuencias superpuestas con la 3' EST. El producto de PCR resultante se utilizó como molde para una segunda PCR junto con un par de cebadores: el cebador de codificación P1, que contenía los 21 nucleótidos faltantes y 5 nucleótidos de EST y el cebador inverso P3, que contenía secuencias superpuestas con la 3' EST.

La Figura 9 muestra la coinmunoprecipitación de caspasa 8 y p72 por mAb179 a partir de los lisados de células BJAB a tiempo cero y después de 20 minutos de estimulación con ligando de Fas. Las proteínas eluidas después de inmunoprecipitación con mAb179 se resuelven en geles de PAGE-SDS y se detectan mediante tinción con plata. Coprecipita una banda de peso molecular aparente de aproximadamente 72,5 kDa con procaspasa 8 antes de la estimulación con ligando de Fas (carril 3). Después de 20 minutos de estimulación, el nivel de la banda a 72,5 kDa se reduce, y se detecta una nueva banda correspondiente a una proteína de menor peso molecular aparente de aproximadamente 68 kDa (carril 4).

Los carriles 1 y 2 muestran los controles negativos que comprenden inmunoprecipitación de lisados celulares con MIgG1, inmunoglobulina IgG1 de ratón.

La Figura 10 muestra la escisión de p72 por la caspasa 8 activa. Se expresó *in vitro* una proteína codificada por el ADNc de P72 en lisados de reticulocito en presencia de ³⁵S-metionina utilizando el sistema de lisado de reticulocito TnT acoplado a T7, y se ensayó después de incubación de 1 hora a 37°C en presencia o ausencia de caspasa 8 activa recombinante. Además, se estudió la escisión de p72 con los productos TnT codificados por dos mutantes de ADNc de p72 diferentes: uno que codifica p72 en el que el residuo D600, sospechoso de ser el residuo diana para la caspasa 8, estaba mutado a E [p72 (D600E)] y otro en el que el gen está eliminado y la proteína truncada resultante carece de los residuos cadena abajo [D600 p72 (1-600)]. Las proteínas resultantes se separaron en PAGE-SDS y los resultados se visualizaron mediante formación de imágenes por fosforescencia.

La Figura 11 muestra la caspasa 8 y p72, que coinmunoprecipitaron por mAb179 a partir de lisados de células BJAB antes (0 min) o después de 5, 10, 20, 40 y 60 minutos de estimulación con ligando de Fas. Se resolvieron los péptidos eluidos en geles de PAGE-SDS y se detectaron mediante tinción con plata. Se detecta un péptido de peso molecular aparente de 72,5 kDa antes de la estimulación (0 min). Después de 5 y 10 minutos de estimulación, aparece una nueva proteína con un peso molecular aparente menor de aproximadamente 68 kDa. Después de 40 minutos de estimulación, desaparece completamente la banda de 72,5 kDa y sólo se detecta la de 68 kDa. A los 60 minutos, ninguna de las proteínas citadas anteriormente coprecipitó con caspasa 8.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos dirigidos contra el dominio C-terminal de Sub-1 de caspasa 8. Se encontró que estos anticuerpos dirigidos a este dominio son excepcionales por su capacidad de inmunoprecipitar caspasa 8 (procaspasa 8 y caspasa activa) con alta eficacia, incluso cuando la caspasa está presente a concentración muy baja. Estos anticuerpos pueden utilizarse también para coprecipitar y aislar eficazmente una proteína unida a la caspasa 8.

Los anticuerpos según la invención pueden ser policlonales o, más preferiblemente, monoclonales. Se utilizó un péptido derivado del extremo C-terminal de Sub-1 de caspasa 8, que comprende los residuos Cys360-Asp374 y la secuencia CQGDNYQKGIPVETD (péptido 179, SEC ID N° 4) para inmunización para generar el anticuerpo.

El péptido utilizado para la inmunización puede sintetizarse y purificarse mediante HPLC inversa y acoplarse a cualquier vehículo tal como KLH, preferiblemente a través de su cisteína natural o a través de una cisteína fusionada artificialmente, para exponer el péptido a la superficie del vehículo, y se utiliza para inmunizar, por ejemplo, ratones para la preparación de anticuerpos monoclonales y conejos para anticuerpos policlonales.

En una realización, la coimmunoprecipitación de caspasa 8 y proteínas unidas a caspasa 8 se lleva a cabo utilizando un anticuerpo de caspasa 8 específico del epítipo 179 encontrado en el dominio C-terminal de Sub-1.

La coimmunoprecipitación según la invención se lleva a cabo en muestras seleccionadas a partir de lisados celulares a partir de células en reposo o estimuladas, o a partir de bibliotecas de expresión de ADNc, de bibliotecas genómicas o combinatorias de péptidos.

Las células pueden estimularse, antes del análisis e inmunoprecipitación, utilizando diferentes agentes inductores de la apoptosis tales como tratamiento con linfocinas, por ejemplo ligando de Fas, TNF o mediante factores ambientales tales como ayuno, shock térmico, etc.

Al usar los anticuerpos en la coimmunoprecipitación según la invención, la caspasa 8 y la proteína unida a caspasa podrían eluir eficazmente a partir del complejo inmunoprecipitado y recuperarse en el sobrenadante mediante competición con el péptido derivado de caspasa 8, CQGDNYQKGIPVETD, el mismo péptido utilizado para inmunización.

Se utiliza el péptido 179 o epítipo 179 de la caspasa 8 de secuencia CQGDNYQKGIPVETD y SEC ID N° 4, o una muteína, fragmento del mismo, proteína de fusión o derivado del mismo, para inmunizar y generar anticuerpos según la invención. El péptido para inmunización puede producirse mediante síntesis química como se describe anteriormente, o mediante tecnología de ADN recombinante en células de mamífero, o mediante escisión de una proteína purificada. La proteína puede producirse también en células bacterianas o de insecto como se detalla en *Current Protocols in Molecular Biology*, por F.M. Ausubel, ISBN: 047150338X, 1988, capítulo 16.

No están comprendidas en la invención muteínas del epítipo 179 anterior (SEC ID N° 4) de la invención, reteniendo dichas muteínas esencialmente las mismas propiedades que el péptido que tiene esencialmente sólo las secuencias de origen natural del péptido. Dichas "muteínas" pueden ser aquellas en las que los residuos aminoácidos pueden eliminarse, añadirse o sustituirse por otros en el péptido, de tal modo que las modificaciones de este tipo no cambien sustancialmente las propiedades biológicas de la muteína peptídica con respecto al péptido mismo.

Estas muteínas se preparan mediante síntesis conocidas y/o mediante técnicas de mutagénesis dirigida a sitio o cualquier otra técnica conocida adecuada para ello.

Los cambios preferidos para muteínas son lo que se conocen como sustituciones "conservativas". Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen aminoácidos sinónimos en un grupo que tienen propiedades físico-químicas suficientemente similares para que la sustitución entre miembros del grupo conserve la función biológica de la molécula, Grantham, *Science* vol. 185, pág. 862-864 (1974). Resulta evidente que pueden hacerse también inserciones y deleciones de aminoácidos en las secuencias definidas anteriormente sin alterar su función, particularmente si las inserciones o deleciones implican sólo unos pocos aminoácidos, por ejemplo menos de 3, y preferiblemente menos de 2, y no eliminan ni desplazan aminoácidos que sean críticos para una conformación funcional.

Preferiblemente, los grupos aminoácidos sinónimos son aquellos definidos en la Tabla I. Más preferiblemente, los grupos aminoácidos sinónimos son aquellos definidos en la Tabla II; y lo más preferiblemente, los grupos aminoácidos sinónimos son aquellos definidos en la Tabla III.

ES 2 265 511 T3

TABLA I

Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos

5	Aminoácido	Grupo sinónimo
	Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
	Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
10	Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
	Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
	Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
	Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
15	Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
	Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
	Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
	Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
20	Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
	Cys	Ser, Thr, Cys
	His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
	Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
25	Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
	Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
	Asp	Glu, Asn, Asp
	Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
	Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
30	Trp	Trp

TABLA II

Los grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

35	Aminoácido	Grupo sinónimo
	Ser	Ser
40	Arg	His, Lys, Arg
	Leu	Ile, Phe, Met, Leu
	Pro	Ala, Pro
	Thr	Thr
45	Ala	Pro, Ala
	Val	Met, Ile, Val
	Gly	Gly
	Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
50	Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
	Tyr	Phe, Tyr
	Cys	Ser, Cys
	His	Arg, Gln, His
55	Gln	Glu, His, Gln
	Asn	Asp, Asn
	Lys	Arg, Lys
	Asp	Asn, Asp
60	Glu	Gln, Glu
	Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
	Trp	Trp

65

TABLA III

Los grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

5	Aminoácido	Grupo sinónimo
	Ser	Ser
	Arg	Arg
10	Leu	Ile, Met, Leu
	Pro	Pro
	Thr	Thr
	Ala	Ala
15	Val	Val
	Gly	Gly
	Ile	Ile, Met, Leu
	Phe	Phe
20	Tyr	Tyr
	Cys	Ser, Cys
	His	His
	Gln	Gln
25	Asn	Asn
	Lys	Lys
	Asp	Asp
	Glu	Glu
	Met	Ile, Leu, Met
30	Trp	Trp

Los ejemplos de producción de sustituciones aminoacídicas en proteínas que pueden utilizarse para obtener mu-
 teínas de la proteína incluyen cualquier etapa de un método conocido, tales como los presentados en las patentes de
 EE.UU. RE 33.653, 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462 de Mark *et al.*; 5.116.943 de Koths *et al.*, 4.965.195 de Namen
et al., 4.879.111 de Chong *et al.* y 5.017.943 de Lee *et al.*; y proteínas sustituidas con lisina presentadas en la patente
 de EE.UU. n° 4.904.584 (Straw *et al.*).

La proteína o péptido se purifica después a partir de la mezcla sintética o a partir de las células en las que se ha
 producido. Los métodos de purificación de proteínas son conocidos por el experto en la técnica y se detallan, por
 ejemplo, en “Current Protocols in Molecular Biology”, capítulo 16 y en “Current Protocols in Protein Science”, Wiley
 and Sons Inc., capítulos 5 y 6, citados anteriormente. Ventajosamente, el péptido puede producirse en forma de una
 fusión con KLH o glutathion-S-transferasa o similares, o un marcaje de secuencia tal como la secuencia de marcaje
 de histidina. El uso de proteínas de fusión o marcadas simplifica el procedimiento de purificación, como se detalla
 en “Current Protocols in Molecular Biology”, capítulo 16, citado anteriormente, y en las instrucciones para el kit de
 expresión y purificación Qiagen de proteína marcada con His anteriormente citado.

Si la proteína o péptido se ha expresado en forma de una proteína de fusión, el asociado de fusión podría escin-
 dirse antes utilizando la proteína para la generación de anticuerpos, para evitar la generación de anticuerpos contra
 el asociado de fusión. La escisión de los asociados de fusión y el aislamiento de la proteína deseada se describen en
 “Current Protocols in Molecular Biology”, capítulo 16, anteriormente citado. Están también disponibles comercial-
 mente vectores, protocolos y reactivos para expresar y purificar proteínas recombinantes fusionadas con proteína de
 unión a maltosa.

Cuando se produce un péptido, puede ser deseable no eliminar el asociado de fusión, ya que la proteína de fusión
 puede estimular la producción de anticuerpos contra el péptido.

Como se observó anteriormente, el péptido puede sintetizarse también mediante métodos químicos conocidos en
 la técnica química.

La generación de anticuerpos policlonales contra proteínas se describe en el capítulo 2 de “Current Protocols in
 Immunology”, Wiley and Sons, Inc. La generación de anticuerpos contra péptidos puede necesitar algunos cambios
 en el protocolo, debido a la antigenicidad generalmente menor de los péptidos en comparación con las proteínas. La
 generación de anticuerpos policlonales contra péptidos se describe en “Current Protocols in Immunology” capítulo 9,
 citado anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse a partir de células B tomadas del bazo o nódulos linfáticos de animales inmunizados, en particular ratas o ratones, mediante fusión con células B inmortalizadas en condiciones que favorezcan el crecimiento de células híbridas. Para la fusión de células B de murido, se prefiere la estirpe celular Ag-8.

La técnica de generación de anticuerpos monoclonales se describe en muchos artículos y libros de texto, tales como "Current Protocols in Immunology", Wiley and Sons Inc., capítulo 2. El capítulo 9 del mismo describe la inmunización con péptidos de animales. Pueden utilizarse células de bazo o nódulos linfáticos de estos animales, del mismo modo que las células de bazo o nódulos linfáticos de animales inmunizados con proteína, para la generación de anticuerpos monoclonales como se describe en el capítulo 2 del mismo.

Las técnicas utilizadas en la generación de anticuerpos monoclonales se describen adicionalmente en Kohler y Milstein (1975) y en el documento USP 4.376.110.

Se describe en el documento USP 5.840.479 la preparación de anticuerpos a partir de un banco génico de anticuerpos humanos cuyas regiones hipervariables están reemplazadas por secuencias casi aleatorias. Se prefieren dichos anticuerpos si es difícil inmunizar un animal con un péptido o proteína dado. Algunas estructuras son pobremente inmunogénicas y pueden permanecer así a pesar de la adición de coadyuvantes y del ligamiento de otras proteínas en constructos de fusión. Se prefieren adicionalmente los anticuerpos descritos en el documento USP 5.840.479, si se desea utilizar anticuerpos con una estructura similar a los anticuerpos humanos, por ejemplo, cuando se desean anticuerpos que tienen una baja inmunogenicidad en seres humanos.

Una vez se ha identificado un anticuerpo adecuado, puede desearse cambiar las propiedades del mismo. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede conseguir rendimientos de producción más altos. Se desean adicionalmente anticuerpos quiméricos en los que las regiones constantes están reemplazadas por regiones constantes de anticuerpos humanos cuando se desea que el anticuerpo sea de baja inmunogenicidad en seres humanos. Se describe la generación de anticuerpos quiméricos en una serie de publicaciones, tales como Cabilly *et al.*, 1984, Morrison *et al.*, 1984, Boulianne *et al.*, 1984, los documentos EP 125023, EP 171496, EP 173494, EP 184187, WO 86/01533, WO 87/02671 y Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

Los "anticuerpos totalmente humanizados" son moléculas que contienen tanto la región variable como constante de la inmunoglobulina humana. Los anticuerpos totalmente humanizados pueden utilizarse potencialmente para uso terapéutico cuando se requieren tratamientos repetidos para trastornos crónicos y recidivantes tales como enfermedades autoinmunes. Un método para la preparación de anticuerpos totalmente humanos consiste en la "humanización" del sistema inmune humoral de ratón, concretamente, la producción de cepas de ratón capaces de producir Ig humanas (xenorratones) mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana (Ig) en ratones en los que se han inactivado los genes Ig endógenos. Los loci de Ig son enormemente complejos en términos tanto de su estructura física como de la redistribución génica y los procesos de expresión necesarios para producir en última instancia una amplia respuesta inmune. La diversidad de anticuerpos está generada principalmente por la redistribución combinatoria entre diferentes genes V, D y J presentes en los loci de Ig. Estos loci contienen también los elementos reguladores intercalados, que controlan la expresión de anticuerpo, la exclusión alélica, el cambio de clase y la maduración por afinidad. La introducción de transgenes Ig humanos no redistribuidos en ratones ha demostrado que la maquinaria de recombinación de ratón es compatible con los genes humanos. Además, pueden obtenerse hibridomas que secretan hu-mAb específicos de antígeno de diversos isotipos mediante inmunización de xenorratones con antígeno.

Los anticuerpos totalmente humanizados y los métodos para su producción son conocidos en la técnica (Méndez *et al.*, *Nature Genetics* 15: 146-156 (1997); Buggemann *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 21: 1323-1326 (1991); Tomizuka *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727 (2000), patente WO 98/24893.

Es otro tipo de anticuerpo el anticuerpo anti-idiotípico. Un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos asociados generalmente al sitio de unión de antígeno de un anticuerpo. Un anticuerpo Id puede prepararse mediante inmunización de un animal de la misma especie y tipo genético (por ejemplo, cepa de ratón) que la fuente del mAb para el que se está preparando un anti-Id. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante produciendo un anticuerpo contra estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.699.880.

El anticuerpo anti-Id puede utilizarse también como "inmunógeno" para introducir una respuesta inmune en aún otro animal, produciendo el denominado anticuerpo anti-anti-Id. El anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al mAb original que indujo el anti-Id. Por tanto, utilizando anticuerpos contra los determinantes idiotípicos de un mAb, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de idéntica especificidad.

En consecuencia, pueden utilizarse mAb generados contra la subunidad C-terminal de la caspasa 8, análogos, fragmentos o derivados de los mismos de la presente invención para inducir anticuerpos anti-Id en animales adecuados, tales como ratones BALB/c. Se utilizan las células de bazo de dichos ratones inmunizados para producir hibridomas anti-Id que secretan mAb anti-Id. Además, los mAb anti-Id pueden acoplarse a un vehículo tal como hemocianina de lapa bocallave (KLH) y utilizarse para inmunizar ratones BALB/c adicionales. Los sueros de estos ratones contendrán anticuerpos anti-anti-Id que tienen las propiedades de unión del mAb original específico de un epítipo de la caspasa 8 anterior, o análogos, fragmentos y derivados de los mismos.

Los mAb anti-Id tienen así sus propios epítomos idiotípicos, o “idiotipos” estructuralmente similares al epítomo que está evaluando.

El término “anticuerpo” pretende incluir también tanto moléculas intactas como fragmentos de las mismas tales como, por ejemplo, Fab y F(ab')₂, que son capaces de unirse a antígeno. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión no específica a tejido que un anticuerpo intacto (Wahl *et al.*, 1983).

Se apreciará que Fab y F(ab')₂ y otros fragmentos de los anticuerpos útiles en la presente invención pueden utilizarse para la detección y cuantificación de la proteína p72 según los métodos dados a conocer en la presente memoria para moléculas de anticuerpo intactas. Dichos fragmentos se producen típicamente mediante escisión proteolítica, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂).

Se dice que un anticuerpo es “capaz de unirse” a una molécula si es capaz de reaccionar específicamente con la molécula, uniéndose así la molécula al anticuerpo. El término “epítomo” pretende designar aquella porción de cualquier molécula capaz de unirse a un anticuerpo, que puede reconocerse también por ese anticuerpo. Los epítomos o “determinantes antigénicos” consisten habitualmente en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activa tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

Un “antígeno” es una molécula o una porción de una molécula capaz de unirse a un anticuerpo, que es adicionalmente capaz de inducir a un animal a producir anticuerpos capaces de unirse a un epítomo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más de un epítomo. La reacción específica designada anteriormente pretende indicar que el antígeno reaccionará de manera altamente selectiva con su correspondiente anticuerpo, y no con la multitud de otros anticuerpos que pueden ser provocados por otros antígenos.

El epítomo 179 de la invención puede utilizarse para desarrollar anticuerpos policlonales y monoclonales específicos para una notable inmunoprecipitación y elución de caspasa 8 y proteínas asociadas a caspasa 8. Los anticuerpos pueden utilizarse también para inducir un nuevo procesamiento de la caspasa 8.

Los anticuerpos desarrollados contra el dominio C-terminal de Sub-1 tales como mAb 179 pueden utilizarse en combinación con anticuerpos desarrollados contra el dominio N-terminal de Sub-1 tales como mAb 183 para aislar específicamente proteínas reguladoras de caspasa 8. El dominio C-terminal de Sub-1 es conocido por ser parte del sitio activo de la caspasa 8 y, por lo tanto, las proteínas reguladoras pueden unirse a él (Thornberry *et al.*, 1997). Al coprecipitar primero la caspasa 8 y las proteínas reguladoras asociadas al mAb 183 y aplicar después el mAb 179, pueden liberarse las proteínas reguladoras a partir de la caspasa 8 al medio y conducir a la identificación de las proteínas clave implicadas en la regulación de la apoptosis.

En una realización, se aisló Cari (pág. 72, SEC ID N° 3), una proteína de unión a procaspasa 8, utilizando la inmunoprecipitación de la invención con mAb 179. Se encontró que Cari se escindía por la caspasa 8 activa y que estaba implicada en la activación y apoptosis de la caspasa 8.

Los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) útiles en la presente invención pueden emplearse histológicamente, como en microscopía de inmunofluorescencia o de inmunoelectrónica, para la detección *in situ* de caspasa 8. La detección *in situ* puede conseguirse retirando una muestra histológica de un paciente y proporcionando el anticuerpo marcado de la presente invención a dicha muestra. El anticuerpo (o fragmento) se proporciona preferiblemente aplicando o superponiendo el anticuerpo marcado (o fragmento) a una muestra biológica. Utilizando la presente invención, los expertos percibirán fácilmente que puede modificarse cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tales como procedimientos de tinción) para conseguir dicha detección *in situ*.

La muestra biológica puede tratarse con un soporte en fase sólida o vehículo tal como nitrocelulosa, u otro soporte sólido o vehículo que sea capaz de inmovilizar células, partículas celulares o proteínas solubles. El soporte o vehículo puede lavarse después con tampones adecuados seguido de tratamiento con un anticuerpo marcado detectablemente según la presente invención, como se observa anteriormente. El soporte en fase sólida o vehículo puede lavarse después con el tampón una segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de marcaje unido sobre dicho soporte sólido o vehículo puede detectarse después por medios convencionales.

Por “soporte en fase sólida”, “vehículo en fase sólida”, “soporte sólido”, “vehículo sólido”, “soporte” o “vehículo” se pretende cualquier soporte o vehículo capaz de unirse a antígeno o anticuerpos. Los soportes o vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, amilasas de nailon, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, gabros y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble en cierta medida o insoluble con los fines de la presente invención. El material de soporte puede tener virtualmente cualquier configuración estructural posible a condición de que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un antígeno o anticuerpo. Por tanto, la configuración del soporte o vehículo puede ser esférica, como en una perla, cilíndrica como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o la superficie exterior de una barra. Como alternativa, la superficie puede ser plana tal como una lámina, tira reactiva, etc. Los soportes o vehículos preferidos incluyen perlas de poliestireno. Los expertos en la técnica conocerán muchos otros vehículos adecuados para unirse a anticuerpo o antígeno, o serán capaces de determinar los mismos mediante el uso de experimentación rutinaria.

La actividad de unión de un lote dado de anticuerpos de la invención como se observa anteriormente puede determinarse según métodos bien conocidos. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar las condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando experimentación rutinaria.

- 5 Pueden añadirse a los ensayos otras etapas tales como lavado, agitación mecánica, agitación, filtración y similares como sea habitual o necesario para la situación particular.

Uno de los modos en que un anticuerpo según la presente invención puede marcarse detectablemente es ligando el mismo a una enzima y utilizándolo en un inmunoensayo enzimático (EIA). Esta enzima, a su vez, cuando se expone después a un sustrato apropiado, reaccionará con el sustrato de tal manera que produzca un resto químico que puede detectarse, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Las enzimas que pueden utilizarse para marcar detectablemente el anticuerpo incluyen, pero sin limitación, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. La detección puede conseguirse por métodos colorimétricos, que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La detección puede conseguirse también mediante comparación visual de la extensión de la reacción enzimática de un sustrato en comparación con patrones preparados similarmente.

La detección puede conseguirse utilizando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, marcando radiativamente los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, es posible detectar R-PTPasa mediante el uso de un radioinmunoensayo (RIA). Puede encontrarse una buena descripción del RIA en "Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology", por Work, T.S. *et al.*, North Holland Publishing Company, NY (1978) con referencias particulares al capítulo titulado "An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques" por Chard, T. El isótopo radiactivo puede detectarse por medios tales como el uso de un contador g o un contador de centelleo o mediante autorradiografía.

También es posible marcar un anticuerpo según la presente invención con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado fluorescente se expone a luz de longitud de onda apropiada, su presencia puede detectarse entonces debido a la fluorescencia. Entre los compuestos de marcaje fluorescente más habitualmente utilizados están isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, picocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

El anticuerpo puede marcarse detectablemente también utilizando metales emisores de fluorescencia tales como ¹⁵²Eu u otros de la serie lantánida. Estos metales pueden unirse al anticuerpo utilizando grupos quelantes de metal tales como ácido dietilentriaminopentaacético (ETPA).

El anticuerpo puede marcarse detectablemente también acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado quimioluminiscente se determina después detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos de marcaje quimioluminiscente particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster oxalato.

Igualmente, puede utilizarse un compuesto bioluminiscente para marcar el anticuerpo de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia encontrada en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Son compuestos bioluminiscentes importantes con fines de marcaje luciferina, luciferasa y aecuorina.

Una molécula de anticuerpo de la presente invención puede adaptarse para utilización en un ensayo inmunométrico, también conocido como un ensayo de "dos sitios" o "sándwich". En un ensayo inmunométrico típico, se une una cantidad de un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo) no marcado a un soporte sólido o vehículo y se añade una cantidad de anticuerpo soluble marcado detectablemente para permitir la detección y/o cuantificación del complejo ternario formado entre anticuerpo en fase sólida, antígeno y anticuerpo marcado.

Los ensayos inmunométricos típicos y preferidos incluyen ensayos "directos" en los que el anticuerpo unido a la fase sólida se pone en contacto primero con la muestra que se está ensayando para extraer el antígeno de la muestra mediante la formación de un complejo binario anticuerpo-antígeno en fase sólida. Después de un periodo de incubación adecuado, se lava el soporte sólido o vehículo para retirar el residuo de la muestra fluida, incluyendo el antígeno no reaccionado, si lo hubiera, y después se pone en contacto con la solución que contiene una cantidad desconocida de anticuerpo marcado (que funciona como "molécula informadora"). Después de un segundo periodo de incubación para permitir al anticuerpo marcado que compleje con el antígeno unido al soporte sólido o vehículo a través del anticuerpo no marcado, se lava el soporte sólido o vehículo una segunda vez para retirar el anticuerpo marcado no reaccionado.

En otro tipo de ensayo "sándwich", que puede ser también útil con los antígenos de la presente invención, se utilizan los denominados ensayos "simultáneo" y "inverso". Un ensayo simultáneo implica una sola etapa de incubación en la que el anticuerpo unido al soporte sólido o vehículo y el anticuerpo marcado se añaden ambos al mismo tiempo a la muestra que se está ensayando. Después de completarse la incubación, se lava el soporte sólido o vehículo para retirar el residuo de muestra fluida y anticuerpo marcado no complejo. La presencia de anticuerpo marcado asociado al soporte sólido o vehículo se determina después como se haría en un ensayo sándwich "directo" convencional.

En el ensayo “inverso”, se utiliza la adición por etapas primero de una solución de anticuerpo marcado a la muestra fluida, seguido de la adición de anticuerpo no marcado unido a un soporte sólido o vehículo después de un periodo de incubación adecuado. Después de una segunda incubación, se lava la fase sólida de manera convencional para liberarla del residuo de la muestra que se está ensayando y de la solución de anticuerpo marcado no reaccionado.

5 La determinación del anticuerpo marcado asociado a un soporte sólido o vehículo se determina después como en los ensayos “simultáneo” y “directo”.

La creación de inmunoensayos, tales como RIA o ELISA, se ha descrito en muchos artículos, libros de texto y otras publicaciones. Se hace referencia al documento WO 97/03998, pág. 48, línea 4 a pág. 52, línea 27. Los inmunoensayos de la invención pueden ser de dos tipos generales: en primer lugar, pueden utilizarse en la cuantificación de la caspasa 8

10 inmunoensayos que utilizan una caspasa inmovilizada, o un péptido equivalente. En segundo lugar, pueden utilizarse para cuantificar las proteínas de caspasa inmunoensayos que utilizan anticuerpos inmovilizados dirigidos contra un epítipo de una caspasa.

Dichos ensayos pueden encontrar uso en el diagnóstico, ya que puede necesitar evaluarse el nivel de caspasa y de otras proteínas implicadas en las rutas apoptóticas en una serie de enfermedades o síndromes en los que la implicación de dichas rutas es una posibilidad.

En una realización, se aisló una proteína que interacciona con procaspasa 8, designada Cari (p72, SEC ID N° 3) con la ayuda de anticuerpos según la invención. Sin embargo, si se desea inmunoprecipitar proteínas unidas a una caspasa diferente, utilizando el método de inmunoprecipitación anterior, puede utilizarse un anticuerpo específico del dominio C-terminal de Sub-1 de una caspasa distinta de la caspasa 8.

20

Puesto que los anticuerpos según la invención son capaces de precipitar procaspasa 8 y caspasa 8, las proteínas de unión a caspasa podrían coprecipitarse conjuntamente con caspasa activa o procaspasa mediante coimmunoprecipitación.

25

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

30 Ejemplos

Ejemplo 1

Inmunización de ratones para la generación de anticuerpos monoclonales específicos de caspasa 8

35

Después de la activación, se escinde la caspasa 8 y se ensambla en dos subunidades (Sub-1 y Sub-2).

Para la generación de anticuerpos específicos de nuevos posibles epítopos formados después de la activación de caspasa 8, se utilizaron péptidos sintéticos derivados de la terminación C de Sub-1 y la terminación N de Sub-1 y Sub-2 para inmunizar ratones.

40

Se utilizaron los siguientes péptidos para inmunizar ratones para la generación de anticuerpos monoclonales:

Péptido 179. Se sintetizó el péptido CQGDNYQKGIPVETD (SEC ID N° 4) correspondiente a la terminación C de la subunidad grande de la caspasa 8 (Sub-1) (epítipo correspondiente a los residuos Cys360-Asp374, Fig. 1), se purificó mediante HPLC inversa y se acopló a la KLH vehículo a través de su cisteína natural, para exponer el péptido en la superficie del vehículo.

45

Péptido 182. Se sintetizó el péptido LSSPQTRYIPDEADC (SEC ID N° 5) correspondiente a la terminación N de la subunidad pequeña de la caspasa 8 (Sub-2, residuos Lys385-Gly399), se purificó mediante HPLC inversa y se acopló a KLH vehículo a través de la C que no deriva de la secuencia de Sub-2.

50

Péptido 183. Se sintetizó el péptido SESQTLDKVYQMKSAPRC (SEC ID N° 6) correspondiente a la terminación N de Sub-1 (residuos Ser217-Gly234), se purificó mediante HPLC inversa y se acopló a KLH vehículo a través de la C que no deriva de la secuencia de Sub-1.

55

Se administraron a ratones cuatro inmunizaciones y dos dosis de recuerdo con la misma cantidad de antígeno (péptido-KLH) del modo siguiente:

En la primera inmunización, se disolvieron 50 µg de péptido-KLH en 50 µl de PBS, se homogeneizaron con 50 µl de coadyuvante completo de Freund y se inyectaron en la almohadilla de la pata de cada uno de cinco ratones Balb/C hembra de 7 semanas de edad.

60

Para la segunda inmunización, llevada a cabo 2 semanas después de la primera inmunización, se administró una dosis de recuerdo por vía intramuscular a los ratones con la misma cantidad del péptido en una solución al 50% (v/v) de coadyuvante incompleto de Freund.

65

ES 2 265 511 T3

Para la tercera inmunización, llevada a cabo dos semanas después de la segunda inmunización, se inyectaron los ratones por vía intraperitoneal con 50 μ g de péptido-KLH en 50 μ l de PBS.

Se ensayaron los sueros de los ratones inyectados 10 días después de la segunda y la tercera inmunizaciones.

La cuarta inmunización (llevada a cabo sólo para los péptidos 182 y 183), se realizó un mes después de modo similar a la tercera inmunización.

Un mes después de la cuarta inmunización (o la tercera inmunización para ratones infectados con el péptido 179), se llevaron a cabo dos dosis de recuerdo (de modo similar a las tercera y cuarta inmunizaciones) en un intervalo de dos días.

Cuatro días después, se tomaron el bazo y los nódulos linfáticos inguinales de los dos ratones que exhibían la inmunoreactividad específica más alta para fusión con células de mieloma (Eshhar Z., 1985).

Ejemplo 2

Inmunización de conejos para la generación de anticuerpos policlonales específicos de caspasa 8

Se inmunizaron conejos con 179-KLH y 183-KLH para la generación de anticuerpos policlonales específicos.

La primera inmunización se llevó a cabo con 100 μ g de péptido-KLH, que se disolvió en 50 μ l de PBS, se homogeneizó con 50 μ l de coadyuvante completo de Freund y se inyectó por vía subcutánea. Se llevó a cabo una segunda inmunización dos semanas después con la misma cantidad de péptido-KLH, y se inyectaron por vía intramuscular dos semanas después con coadyuvante incompleto de Freund. Estas dos inmunizaciones fueron seguidas por dos dosis de recuerdo de la misma cantidad de péptido-KLH disuelto en PBS y administradas por vía subcutánea en un intervalo de dos semanas.

Ejemplo 3

Preparación de hibridoma, selección de clones productores de anticuerpo y purificación de anticuerpos a partir de líquido ascítico

Se realizó el proceso de fusión y la selección de células de hibridoma según los protocolos de Eshhar, Z., 1985. Brevemente, se fusionaron una mezcla de células de bazo y nódulo linfático de dos ratones reactivos, 110×10^6 , con 32×10^6 células de mieloma variantes de mieloma NSO/1 mediante una incubación corta con PEG. Se diluyó primero lentamente el PEG con DMEM y después se eliminó completamente mediante centrifugación. Se resuspendieron las células en medio DMEM-HAT, se distribuyeron en placas de 96 pocillos a una concentración de aproximadamente $2,5 \times 10^4$ células/pocillo y se incubaron en un incubador con CO₂ al 8% a 37°C. Se cambió el medio en todos los pocillos de hibridoma a DMEM suplementado con suero de caballo (SC) al 10%. Se examinó en las muestras de sobrenadante de cultivo de hibridoma la presencia de mAb específicos dos semanas después de la fusión mediante ELISA (descrita en el ejemplo 12 siguiente). Se transfirieron las células desde los pocillos en los que se detectó la presencia de anticuerpos específicos en el sobrenadante de cultivo hasta placas de 24 pocillos. Se subclonaron dos veces las células positivas; en esta etapa, se encontró que eran positivos todos los subclones. Se expandieron los clones en 24 pocillos y después en matraces T de 25 cm². Se monitorizó en los cultivos expandidos la secreción de mAb específicos. Se congelaron ampollas de células de cultivos positivos y se almacenaron en nitrógeno líquido.

De aproximadamente 700 clones examinados para detectar anticuerpos específicos contra el péptido 179, sólo se encontró un clon positivo (mAb 179), de 700 clones examinados para detectar anticuerpos específicos contra el péptido 182, sólo se encontró un clon positivo (mAb 182), y de 1.100 clones examinados para detectar anticuerpos específicos contra el péptido 183, sólo se encontraron dos clones positivos (mAb 183.1 y 183.2). Los clones positivos se subclonaron mediante dilución limitante en placas de 96 pocillos. Se ensayaron varias veces los anticuerpos específicos mediante ELISA en los sobrenadantes de los clones en crecimiento (descrito en el ejemplo 12).

Se hicieron crecer los clones de hibridoma positivos en matraces de cultivo de tejido en DMEM que contenía suero de caballo al 15%, y se congelaron ampollas de parte de los cultivos. En paralelo, se inyectaron células de diferentes clones de hibridoma, a 2-4 ratones cada uno, para obtener líquido ascítico. Se purificaron los anticuerpos a partir de líquido ascítico mediante purificación de afinidad utilizando perlas de Affigel (Affigel 15 Biorad) reticuladas con BSA (nº de cat. Pierce 77116) acopladas al péptido sintético utilizado para inmunización de ratones (péptidos 179, 182 ó 183).

Para la purificación de anticuerpos, se dializó la ascitis precipitada con sulfato de amonio al 50% frente a PBS durante 16 horas a 0°C. Después de la diálisis, se incubaron alícuotas con 1 ml de perlas de Affigel-BSA-péptido durante 16 horas a 0°C, y se utilizaron las perlas preincubadas para empaquetar una columna de 1 ml. Inicialmente, se lavó la columna con 10 ml de PBS, seguido de un lavado con Tris 10 mM, pH 7,5 que contenía NaCl 1 M y un lavado con PBS. Se eluyeron los anticuerpos de la columna con una solución que contenía glicina-HCl 100 mM, pH 2,7, y NaCl 0,5 M. Se recogieron fracciones de 1 ml en tubos que contenían 40 μ l de base Tris para la neutralización del eluyente. Se obtuvieron a partir de 25 ml de ascitis, 5-13,6 mg de anticuerpos purificados.

Ejemplo 4

Isotipo de anticuerpos monoclonales

- 5 Se determinó el isotipo de anticuerpos monoclonales utilizando un kit de isotipado comercial (Southern Biotechnology Associates, INC, n° cat. 5300-05) según el procedimiento de ensayo del fabricante. Los mAb 183 y 179 se identificaron como IgG1, mientras que el mAb 182 se encontró que estaba en la clase IgM.

Ejemplo 5

10

Inmunoprecipitación de caspasa 8 con los mAb 179, 182 y 183

- Se ensayó en los diferentes anticuerpos monoclonales anti-caspasa 8 descritos en el ejemplo 3 anterior su capacidad de inmunoprecipitar caspasa 8 (véase el ejemplo 12 a continuación) a partir de lisados de células BJAB en reposo y 15 activadas. La estirpe BJAB es una estirpe celular continua de linfoma derivada del caso africano de linfoma de Burkitt (Clements, G.B. *et al.*, 1975).

- Se estimularon células BJAB con ligando de Fas durante una hora. Se prepararon lisados celulares a partir de células BJAB antes y después de estimulación. Después de inmunoprecipitación con los mAb 179, 182 y 183 (como 20 se describe en el ejemplo 12), se analizaron el "lisado agotado" y la caspasa 8 eluida con los correspondientes péptidos mediante PAGE-SDS y tinción con plata, o mediante análisis de transferencia Western utilizando anticuerpo anti-Sub-1 como primer anticuerpo (caspasa 8 de Cell Signaling Technology, n° cat ICI2 9746).

- La Figura 2 muestra un análisis de transferencia Western (realizado como se describe en el ejemplo 10 a continuación) de los extractos celulares totales y "lisados agotados" obtenidos después de inmunoprecipitación con los mAb 25 179, 183.1, 183.2 y 182.

- En células no estimuladas (carriles 2, 4, 6, 8 y 10), se detectó un doblete de bandas correspondiente a las isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de procaspasa 8 (procaspasa 8, 53/55 kDa) en los extractos celulares totales (carril 2) y en los lisados agotados 30 obtenidos con anticuerpos anti-183 y anti-182 (carriles 6, 8 y 10), en contraposición, no se detectó procaspasa 8 en los lisados agotados obtenidos con mAb 179 (carril 4).

- En células estimuladas, los niveles de procaspasa 8 en el extracto celular total fueron menores (carril 1). Aparecieron 35 bandas menores adicionales correspondientes a fragmentos de caspasa 8 activada tras la activación, concretamente, un doblete de caspasa 8 parcialmente procesada correspondiente a las isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (caspasa 8 parcialmente procesada, p41/43, que carece de Sub-2) y una banda menor correspondiente a Sub-1 (p20). Se ensayó el agotamiento de las minúsculas cantidades de procaspasa 8 y fragmentos de caspasa 8 activada mediante los mAb en lisados de células estimuladas con ligando de Fas (Fig. 2, carriles 3, 5, 7, 9 y 11).

- 40 Debe observarse que se ensayó también el agotamiento de Sub-1 por mAb 182, específico de Sub-2, ya que la caspasa 8 activada comprende Sub-1 unida a Sub-2, y por lo tanto, la retirada de Sub-2 mediante inmunoprecipitación con mAb 182 debería conducir por consiguiente al agotamiento de Sub-1.

- La inmunoprecipitación de la caspasa 8 a partir de lisados celulares estimulados muestra que los mAb 182, 183.1 y 45 183.2, de forma similar al control de suero normal de ratón (Fig. 2, carril 11), no eliminaban las pequeñas cantidades de procaspasa 8 o los fragmentos de caspasa 8 activa restantes (carriles 9, 7, 5 y 11, respectivamente). En contraposición con estos resultados, el tratamiento de los lisados celulares con el mAb 179 (carril 3), eliminó eficazmente toda la procaspasa 8 así como los fragmentos de caspasa 8 activa.

- 50 Las Figuras 3a (análisis de transferencia Western) y 3b (detección de proteína por tinción con plata) muestran que la procaspasa 8 y los fragmentos de caspasa 8 activa inmunoprecipitados por los anticuerpos mAb 179, 182 y 183.1 y 183.2 podían recuperarse eficazmente en el sobrenadante mediante competición con los péptidos respectivos contra los que se han creado diversos anticuerpos (ejemplo 12).

- 55 En células no estimuladas (Fig. 3a, carriles 2, 4, 6, 8 y 10 y Fig. 3b, carriles 2, 3, 6, 8 y 10), la procaspasa 8 se recupera eficazmente mediante inmunoprecipitación con el mAb 179 y competición con el péptido 179 (Fig. 3a y 3b, carril 8). En células estimuladas, a pesar de la pequeña cantidad de procaspasa 8 restante después de la activación de la inmunoprecipitación con el mAb 179, dio como resultado una recuperación eficaz de la proteína (Fig. 3a y 3b, carril 9). Pudo observarse cierta recuperación de la procaspasa 8 en células no activadas por el mAb 183.2 (Fig. 3a, carril 6) y en células 60 activadas por el mAb 183.1 (Fig. 3a, carril 5), en las que podían recuperarse fragmentos activos de caspasa 8 en lisados de células activadas por los mAb 182 (Fig. 3a, carril 3), 183.1 (Fig. 3a, carril 5) y 183.2 (Fig. 3a, carril 7 sólo p20).

- Los resultados obtenidos indicaron que el mAb 179 desarrollado contra el péptido correspondiente a la terminación C de Sub-1 (epítipo 179) es muy eficaz para la inmunoprecipitación y purificación de procaspasa 8, incluso presente 65 en cantidades traza, así como para la caspasa 8 activada.

Se generó un anticuerpo policlonal específico del mismo epítipo 179 (preparado como se describe en el ejemplo 1 anterior) para investigar si el epítipo 179 tiene la capacidad única de desencadenar anticuerpos que puedan utili-

zarse en general para la inmunoprecipitación y purificación eficaz de procaspasa 8 y caspasa 8 activa. Se compararon los "lisados agotados" obtenidos mediante inmunoprecipitación con anticuerpo policlonal específico del epítipo 179 (carriles 5 y 6 para células activadas y no activadas, respectivamente) o mediante anticuerpo monoclonal específico del epítipo 182 (carriles 7 y 8 para células activadas y no activadas, respectivamente). Los resultados en la Figura 4 muestran claramente que, realmente, la procaspasa 8 y los fragmentos de caspasa 8 de lisados celulares estimulados se eliminan más eficazmente del lisado celular por el anticuerpo policlonal anti-179 que por el anticuerpo monoclonal anti-182.

Se compararon en paralelo la inmunoprecipitación y recuperación de procaspasa 8 a partir de lisados celulares en reposo llevadas a cabo con mAb 183 y anticuerpo policlonal específico del epítipo 183 (descrito en el ejemplo 1) con las obtenidas con el mAb 179. La figura 5 muestra que la inmunoprecipitación de la procaspasa 8 por el mAb 183 y el poli 183 es ineficaz, mientras que la inmunoprecipitación de la procaspasa 8 por el mAb 179 es notablemente superior.

Se observa un fragmento derivado de caspasa 8 adicional de aproximadamente 5,6 kDa sólo en inmunoprecipitados llevados a cabo con el mAb 179 (carril 3). Los anticuerpos desarrollados contra la región de la caspasa 8 que corresponde a la terminación C de la Sub-1 grande de caspasa tienen la capacidad única de imponer a la caspasa un nuevo modo de procesamiento.

Los resultados observados anteriormente indican que el epítipo 179 de la caspasa 8, al contrario que otros epítopos, tiene la capacidad especial de desencadenar anticuerpos específicos que son muy eficaces para la inmunoprecipitación de la procaspasa 8 y la caspasa 8 activada, y son capaces de inducir el autoprocesamiento de la procaspasa 8.

Ejemplo 6

25 *Aislamiento e identificación de una proteína de unión a caspasa 8 (p72)*

Debido a su capacidad de inmunoprecipitar eficazmente caspasa 8, se explotó el mAb 179 para coimmunoprecipitar caspasa 8 y proteínas asociadas a caspasa 8.

Se estimularon células BJAB (Steinitz M., Klein G., 1975) con ligando de Fas durante una hora y se prepararon lisados celulares a partir de células antes y después de la estimulación. Después de la inmunoprecipitación y elución, como se describe en el ejemplo 12, se resolvieron las proteínas recuperadas por PAGE-SDS y se detectaron mediante tinción con plata. La inmunoprecipitación con IgG1 de ratón sirvió como control negativo. Los resultados en la Fig. 6 muestran que una proteína de peso molecular aparente de aproximadamente 72,5 kDa (denominada en la presente memoria p72) coprecipita con la procaspasa 8 (p53/55) en lisados a partir de células en reposo (carril 3), pero no con caspasa 8 activa en lisados a partir de células estimuladas (carril 4).

Además, se encontró que una proteína p72 coimmunoprecipitaba con procaspasa 8 también en lisados preparados a partir de células HeLa, Raji, H9, K562, HL-60, CEM y Hut78 no estimuladas (ATCC).

Estos resultados sugieren que una proteína, p72, está generalmente unida a la procaspasa 8, pero no a la caspasa 8 activa.

Se extrajo la banda en la PAGE-SDS correspondiente a p72, se digirió con tripsina y se sometió a análisis de secuencia limitada y a análisis de espectroscopía de masas. Se utilizaron 7 péptidos obtenidos mediante digestión con tripsina para buscar en una base de datos de proteína deducida de las secuencias nucleotídicas (o EST). La secuencia proteica coincidía con parte de una secuencia proteica predicha de un clon de EST humana (SEC ID N° 1) encontrado en el banco de genes (número de acceso gi/2988397/gbAAC08052.1/(AC004475), cuya función era desconocida.

50 Ejemplo 8

Generación del ADNc completo que codifica p72

Se generó el ADNc completo que codifica p72 de la siguiente manera:

Se utilizó la EST del (ejemplo 7) para examinar un índice genético humano TIGR, y se obtuvo el informe THC (THC510568 SEC ID N° 1) que contiene el consenso de todas las EST que se ajustan a esta secuencia.

Se adquirió un clon de ADN que codifica parte de la proteína predicha en Incyte Genomics (IMAGE n° 2964545). El clon carecía de las secuencias nucleotídicas que codifican la primera metionina y los 6 aminoácidos subsiguientes (concretamente, 21 nucleótidos). Se encontró que las secuencias de ratón y humana de estas proteínas eran altamente similares (aproximadamente 90% de identidad), por tanto, se compararon las secuencias nucleotídicas que codifican la primera metionina y los 6 aminoácidos subsiguientes de la proteína de ratón que no faltaban en las EST de ratón con la secuencia de trabajo preliminar del genoma humano para completar la secuencia humana faltante. Se obtuvo una coincidencia correspondiente a la secuencia del cromosoma 19 de *Homo sapiens*, clon LLNLR-232E12. Este clon confirmó la secuencia nucleotídica que codifica los 7 aminoácidos faltantes de p72. El ADNc completo de p72 se obtuvo mediante dos rondas de PCR (se utilizó Takara ExTaq, Takara, n° cat. R001A), que se representan esquemáticamente en la Fig. 8.

En la primera PCR, se utilizó como molde el clon obtenido de Incyte Genomics con el cebador de codificación: CT CAAGATGGACAACCGGGATGTTGCAGGAAAGG sintetizado que contiene 15 (subrayados) de los 21 nucleótidos faltantes junto con la secuencia existente de p72 (Fig. 8, cebador 2) y el cebador inverso: CCACTCGAGTCAGTAG TAAGGCCGTCTGGGATT que contiene la región 3' que finaliza con el codón de paro (Fig. 8, cebador 3).

La segunda PCR comprende como molde el producto de PCR de la primera ronda de PCR y el cebador de codificación: AATGGATCCATGAGTCTCAAGATGGACAACCGGGA que contiene los 21 nucleótidos faltantes totales y 5 nucleótidos existentes (Fig. 7, cebador 1) y el mismo cebador inverso (Fig. 7, cebador 3). Se recuperó todo el ADNc que codifica p72 y se secuenció (SEC ID N° 2), y se predijo la secuencia aminoacídica a partir de la secuencia nucleotídica (SEC ID N° 3).

La comparación de la secuencia obtenida en el informe THC (THC510568 SEC ID N° 1) que contiene el consenso de todas las EST y la proteína predicha por el ADNc completo generado (SEC ID N° 3) en la Figura 13 muestra que los 7 primeros aminoácidos faltantes en las EST, la secuencia de 25 aminoácidos faltantes en las EST y la inexactitud del aminoácido 397 (prolina en lugar de leucina).

Se encontró que la proteína p72 contiene tres motivos conservados (Figura 7): el motivo C, un motivo arrollado, dos "SURP" localizados en tándem (también denominados motivos "SWAP", designados como S, Figura 7) (Denhez F. y Lafyatis R., 1994) cerca de la terminación N de la proteína, y un "parche G" localizado C-terminal (Figura 8, designado como G) (Aravind L. y Koonin E.V., 1999). Tanto los motivos SURP como el parche G se cree que contribuyen a la unión a ARN, sugiriendo que la diana de p72 puede ser una molécula de ARN.

Ejemplo 9

Escisión de p72 por caspasa 8

Como se muestra en el ejemplo 8, p72 se une sólo a procaspasa 8, y no a caspasa 8 activa, ensayada después de una hora de estimulación. Puede detectarse algo de procaspasa 8 aún después de 20 minutos de estimulación. Para determinar si p72 puede coprecipitar con caspasa 8 a tiempos de estimulación más cortos, se lisaron células BJAB activadas durante sólo 20 minutos y se inmunoprecipitaron con el mAb 179. Después de inmunoprecipitación y elución, se resolvieron la caspasa 8 y las proteínas unidas mediante PAGE-SDS y se detectaron las proteínas mediante tinción con plata. Inmunoprecipitó una banda de 72,5 kDa (Fig. 9, carril 3) correspondiente a p72 en lisados a partir de células antes de estimulación, mientras que después de 20 minutos de estimulación, se detectó una proteína con un peso molecular aparente menor de aproximadamente 68 kDa (Fig. 9, carril 4). Ambas proteínas, de 72,5 y 68 kDa, inmunoprecipitadas a partir de células BJAB, se sometieron a análisis de espectroscopía de masas. Después de tripsinación, ambas proteínas exhibieron un perfil peptídico similar excepto por una clara diferencia, estaba presente un péptido adicional de secuencia FRPNPLNPR (residuos 632-641) en la proteína de 72,5 kDa C-terminal, pero ausente en la proteína de 68 kDa.

Este resultado sugiere que tras la estimulación celular se retira un fragmento de aproximadamente 4,5 kDa de la terminación C de p72, probablemente por la caspasa 8 activada, dando como resultado una proteína menor con un peso molecular aparente de 68 kDa que sigue unida a la procaspasa 8 restante.

Es concebible que el residuo D600 localizado en la terminación C de p72 (Fig. 8) pudiera ser un residuo candidato para escisión, porque los supuestos fragmentos resultantes de dicha escisión exhiben un peso molecular similar a los fragmentos de p72 detectados *in vivo* después de 20 minutos de estimulación.

Para ensayar si, como se ha sugerido, p72 es un sustrato de caspasa 8 y D600 es el residuo diana para escisión, se sometió una (S³⁵) p72 transcrita-traducida *in vitro* y marcada con radioisótopo (sistema TnT) a la acción de caspasa 8 activa recombinante. Se expresó *in vitro* la proteína codificada por el ADNc de P72 en lisados de reticulocito en presencia de ³⁵S-metionina utilizando el sistema de lisado de reticulocito acoplado a T7 TnT, y se sometió a escisión por caspasa 8 activa recombinante (cada subunidad 1 y 2 preparada separadamente en *E. coli*, mezclada y replegada conjuntamente *in vitro*). Brevemente, se incubaron proteínas p72 marcadas con ³⁵S sintetizadas *in vitro* durante 30 min en tampón de proteasa (Hepes 25 mM, pH 7,5, 0,1% de CHAPS, EDTA 5 mM y DTT 2 mM) a 37°C en presencia de caspasa 8 producida por bacterias. Se separaron las proteínas y sus fragmentos en PAGE-SDS y se visualizaron los resultados mediante formación de imágenes por fosforescencia. Los resultados (Fig. 10) muestran que en ausencia de caspasa 8, sólo se detecta la banda de 72,5 correspondiente a p72 (carril 1). Esta banda desaparece después de la adición de caspasa 8 activada durante 1 hora, y aparece un nuevo fragmento menor correspondiente a 68 kDa (carril 4). Este resultado indica que la proteína codificada por ADNc de p72 utilizada como sustrato se escinde eficazmente por la caspasa 8. Además, se utilizó también el sistema de transcripción-traducción TnT para producir *in vitro* dos p72 mutantes diferentes: p72 en la que el residuo D600, sospechoso por los experimentos *in vivo* de ser el residuo diana para la caspasa 8, mutó a E (D600E) y una p72 eliminada en la que faltaban los residuos cadena abajo de D600 (concretamente, la proteína expresada exhibirá los residuos 1-600).

Se ensayó la escisión de los dos mutantes de p72 anteriores en presencia (Fig. 10, carriles 5 y 6, respectivamente) o en ausencia (carriles 2 y 3, respectivamente) de caspasa 8 recombinante activada. Como se muestra en la Fig. 10 (carriles 3 y 6, respectivamente), se observa el mismo perfil proteico de p72 mutante D600E en presencia o ausencia de caspasa 8, indicando que la caspasa 8 no escinde el mutante D600E de p72. El mutante p72 1-600 comigra con el

ES 2 265 511 T3

fragmento de 68 kDa producido después de la escisión de p72 de tipo silvestre, y no se escinde adicionalmente por la adición de caspasa 8 (carriles 2 y 5). Estos resultados muestran que, tras la activación, la caspasa 8 escinde p72 en el residuo D600.

Los estudios llevados a cabo *in vivo* sugieren que la escisión de p72 ocurre rápidamente en las células, al cabo de 5-20 minutos después del tratamiento con ligando de Fas (Fig. 11) y que la proteína escindida (o en lugar de ello su fragmento mayor) puede permanecer asociada a la procaspasa 8.

Ejemplo 10

Análisis de transferencia Western para la detección de suero inmunoreactivo con caspasa 8

Se utilizó una mezcla de Sub-1 y Sub-2 purificadas recombinantes para análisis de transferencia Western de anticuerpos desarrollados contra péptidos sintéticos. Brevemente, se cargó un gel de poliacrilamida-SDS al 12% con 100 ng/carril de una mezcla de Sub-1 y Sub-2 en condiciones reductoras (DTT 40 mM). Se cargó un carril con marcadores de bajo peso molecular (LMW). Se transfirieron las proteínas separadas en los geles mediante electroelución a membranas de PVDF High Bond-P (Amersham). Se incubaron las membranas en PBS que contenía 5% de leche desnatada, 0,05% de Tween-20, durante 16 h. Se cortaron las membranas en tiras y se incubó cada tira durante 1 hora a temperatura ambiente con el antisuero de ratón (diluido 1-1/2.000). Se lavaron las tiras de membrana con PBS que contenía 0,05% de Tween 20 (3 x 15 min) y se incubaron durante 1 hora con el segundo anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (diluido 1:10.000, Jakson) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Se lavaron las tiras con PBS que contenía 0,1% de Tween 20 (3 x 15 min). Se detectaron las bandas positivas mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL, Amersham).

Para las transferencias Western realizadas en el ejemplo 5, se utilizaron anticuerpos específicos de Sub-1 (caspasa 8 de Cell Signaling Technology, cat ICI2 9746).

Ejemplo 11

ELISA para examen de clones de hibridoma

Se realizó la ELISA directa para examen de hibridoma productor de anticuerpo específico del modo siguiente: se recubrieron placas de 96 pocillos con 50 μ l/pocillo de BSA-péptido (o BSA sola para las placas control) a una concentración de 2,5 μ g/ml en solución de unión (Na_2HPO_4 0,1 M, pH 9) durante 1 hora a 37°C o 16 horas a 4°C. Posteriormente, se lavaron las placas 3 veces con PBS-T (PBS con 0,05% de Tween-20) y se cargaron con 200 μ l/pocillo de solución de bloqueo (1% de hemoglobina en PBS) durante 1 hora a 37°C y se lavaron tres veces con PBS. Se cargaron 50 μ l de sobrenadante de cultivo de hibridoma o patrones diluidos (con PBS-T) por pocillo y se incubaron durante 1 hora a 37°C o 4 horas a 22°C. Después de este periodo de incubación, se lavaron los pocillos 6 veces con PBS-T. Se diluyó 1:5.000 en PBS-T un segundo anticuerpo, anticuerpo anti-ratón conjugado a HRP (Jackson 115-025-100), se incubó durante 1 hora a 37°C y se retiró por lavado lavando 6 veces con PBS-T. Se preparó reciente el sustrato para HRP (2,2 ml de Na_2HPO_4 0,2 M, pH 9,2, 1,4 ml de ácido cítrico 0,2 M, pH 4,35, 6,4 ml de H_2O , 10 mg de ABTS y 1 μ l de H_2O_2), se cargaron 50 μ l/pocillo y se incubaron a 22°C hasta que se desarrolló color (aproximadamente 5-80 minutos). Se detuvo la reacción de color añadiendo 50 μ l/pocillo de ácido cítrico 0,2 M. Se leyeron las placas a 405 nm.

Como anticuerpo de control positivo, se utilizaron antisueros de ratón positivos diluidos 1:1.000 y como control negativo medios.

Ejemplo 12

Inmunoprecipitación de caspasa 8

Se utilizaron 10^8 células por cada inmunoprecipitación. Se recogieron las células y se lisaron mediante incubación en tampón de lisis NP-40 al 1% e inhibidor de proteasa completo (comprimidos de cóctel inhibidor de proteasa completo de Roche Molecular Biochemicals) a 0°C durante 40 min. Se dividieron en alícuotas los lisados celulares en tubos Eppendorf, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo. Se sometieron los lisados celulares a una etapa de preeliminación, que se pretende que retire las proteínas que se unen no específicamente a la proteína G-Sefarosa. Para la preeliminación, se preincubó el lisado celular con proteína G-Sefarosa prelavada con PBS (Pharmacia) y con IgG de ratón durante 2-3 horas a 4°C. Después de esta incubación, se centrifugaron los lisados en tubos Eppendorf a 14.000 rpm durante 30 segundos, se desechó la proteína G-Sefarosa y se recogió el sobrenadante preeliminado. Se mezclaron el anticuerpo monoclonal purificado (o IgG1 kappa de ratón para controles negativos) y proteína G-Sefarosa prelavada con PBS y se incubaron con el sobrenadante preeliminado durante 4 a 16 horas a 4°C. Después de este periodo de incubación, se recogió el material no unido designado como "lisado agotado" mediante centrifugación (30 segundos a 14.000 rpm) y se eluyó el material unido mediante lavado de las perlas de Sefarosa 6 veces con tampón de lisis y mediante incubación con una "solución de elución" que contenía tampón de lisis NP-40 al 0,2%, inhibidores de proteasa y 400 μ g/ml del péptido utilizado para inmunización (300 μ l

de solución de elución/100 μ l de Sefarosa) durante 2 horas a 22°C. Se agitaron los tubos durante 5 minutos a 5.000 rpm y se transfirió el sobrenadante designado “eluido de caspasa 8” a un nuevo tubo.

Referencias

- 5 **Adelman J.P. et al.**, 1983, *DNA* 2: 183.
- Ahmad M. et al.**, *Cancer Res*, 1997; 57(4): 615-619.
- 10 **Akagi Y. et al.**, 1997, *Kidney Int.* 51, pág. 1265-1269.
- Aravind L. y Koonin E.V.**, 1999, *TIBS* 24: 342-344.
- 15 **Artelt P. et al.**, 1988, *Gene* 68, 213-219.
- Barnikol-Watanabe S. et al.**, *Biol. Chom. Hoppe Seyler*, 1994; 375(8): 497-512.
- Beidler D.R. et al.**, 1995, *J. Biol. Chem.*, 14 de julio de 1995; 270(28): 16526-16528.
- 20 **Beutler y Cerami**, 1987, *N. Engl. J. Med.*, 12 de febrero de 1987; 316(7): 379-385.
- Bigda J. et al.**, 1994, *J. Exp. Med.*, 1 de agosto; 180(2): 445-460.
- 25 **Boldin M.P. et al.**, 1995, *J. Biol. Chem.*, 7 de abril; 270(14): 7795-7798.
- Boldin M.P. et al.**, 1995a, *Biol. Chem.*, 6 de enero de 1995; 270(1): 387-391.
- Boldin M.P. et al.**, 1995b, *FEBS Lett.*, 19 de junio de 1995; 367(1): 39-44.
- 30 **Boldin M.P. et al.**, 1996, *Cell*, 14 de junio de 1996; 85(6): 803-815.
- Boone, E. et al.**, *J. Biol. Chem.* 275; 37596-37603.
- 35 **Boulianne G.L. et al.**, 1984, *Nature*, 13-19 de diciembre de 1984; 312(5995): 643-646.
- Brakesbuch C. et al.**, 1992, *EMBO J.*, 11 de marzo de 1992; 11(3): 943-950.
- Brockhaus S. et al.**, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 8 de abril de 1990; 87(8): 3127-3131.
- 40 **Cabilly S. et al.**, 1984, *PNAS*, 81, 3273.
- Cantor et al.**, 1993, *PNAS*, 90, 109-132.
- 45 **Cao X. et al.**, 1998, *J. Immunol.* 161, 6238-6244.
- Chen C.J. et al.**, 1992, *Ann. NY Acad. Sci.* 660, 271-273.
- Chinnaiyan A.M. et al.**, 1995, *Cell*, 19 de mayo; 81(4): 505-512.
- 50 **Chinnaiyan A.M. et al.**, 1996, *J. Biol. Chem.*, 1 de marzo; 271(9): 4961-4965.
- Clements G.B. et al.**, 1975, *Int. J. Cancer*, 16; 125-133.
- 55 **Cohen O.M.**, 1997, *Biochem. J.*: 326 (parte 1), 1-16.
- Daniel R. et al.**, 1998, *J. Biomed. Sci.* 5, 383-394.
- Denhez, F. y Lafyatis R.**, 1994, *J. Biol. Chem.* 269: 16170-16179.
- 60 **Dirks, Wirth y Hauser**, 1983, *Gene* 128, 247-249.
- Duan H. y Dixit V.M.**, *Nature* 1997; 385(6611): 86-89.
- 65 **Durfee T. et al.**, *Genes Dev.* 1993; 7(4), SSS-69.
- Edamatsu H., Kaziro Y., Itoh H.**, 1997, *Gene* 187, 289-294.
- Edinger A.L. et al.**, 1998, *Virology* 249, pág. 367-378.

Enari M. et al., 1995, *Nature*, 4 de mayo; 375(6526): 78-81.

Enari M. et al., 1998, *Nature (Londres)* 391, 43-50.

Engelmann H. et al., 1990, *J. Biol. Chem.*, 25 de enero; 265(3): 1531-1536.

Engelmann H. et al., 1990, *J. Biol. Chem.*, 265, pág. 14497-14504.

Eshhar Z., 1985 en "Hybridoma technology in the bioscience and medicine", editado por Timothy A. Springer (Plenum Publishing Corporation, 1985, capítulo 1).

Everett R.D. et al., 1983, *Nucleic Acids Res.* 11, 2447-2464.

Fernandes-Alnemri T. et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 93(15): 7464-7469.

Fields S. et al., 1989; *Nature* 340(6230): 245-246.

Flanagan, 1998, *Cancer Metastasis Rev.* 17, 169-176.

Furth P.A. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 9302-9306.

Gerster M. et al., 1998, *Anal. Biochem.* 262, 177-184.

Graham A. et al., 1991, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 8-16.

Grau G.E., 1989, *Schweiz Med. Wochenschr.*, 9 de diciembre; 119(49): 1756-1761.

Griscelli F. et al., 1998, *Hum. Gene Ther.* 9, 1919-1928.

Guang-Li M. et al., 1998, *Transplant Proc.* 30, 2923-2924.

Guinot y Tamsamani, 1998, *Pathol. Biol. (París)*, 46, pág. 347-354.

Haendler B. et al., *E. EMBO J.* 1987; 6(4): 947-950.

Hemmi S. et al., 1998, *Hum. Gene Ther.*, 9, pág. 2363-2773.

Henkart P.A., 1996, *Immunity*, marzo; 4(3): 195-201.

Hohmann H.P. et al., 1989, *J. Biol. Chem.*, 5 de septiembre; 264(25): 14927-14934.

Hsu H. et al., 1996, *Cell*, 26 de enero; 84(2): 299-308.

Huang M.T. y Gorman C.M., 1990, *Nucleic Acids Res.* 18, 937-947.

Ihle J.N., *Cell* 1996; 84(3), 331-334.

Itoh N. et al., 1991, *Cell*, 26 de julio; 66(2): 233-243.

Itoh y Nagata, 1993, *J. Biol. Chem.*, 25 de mayo; 268(15): 10932-10937.

Janmey P.A. y Stossel T.P., 1987, *Nature (Londres)* 352, 362-364.

Joseph y Burke, 1993, *J. Biol. Chem.* 268, 24515.

Kamine J. et al., 15 de febrero; 216(2): 357-366.

King P. y Goodbourn S., *J. Biol. Chem.* 1998; 273(15), 8699-8704.

Kischkel F.C. et al., *EMBO J.*, 1995; 14(22); 5579-5588.

Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256, 495-497.

Kondo S. et al., 1998, *Oncogene* 17, 2585-2591.

Kothakota S. et al., 1997, *Science* 278, 294-298.

Kozak M., 1984, *Nucleic Acids Res.* 12, pág. 857-872.

- Kumar**, 1995, *Trends Biochem. Sci.*, mayo; 20(5): 198-202.
- Kumar**, 1997, *Science* 278(5343): 1630-1632.
- 5 **Kunstle G. et al.**, 1997, *Immunol. Lett.* 55, 5-10.
- Kurth M. y Bryan J.**, 1984, *J. Biol. Chem.* 259, 10895-10903.
- Loetscher H. et al.**, 1990, *J. Biol. Chem.* 1990, 25 de noviembre; 265(33): 20131-20138.
- 10 **MacFarlane M. et al.**, *J. Biol. Chem.* 1997; 272(41); 25417-25420.
- Meinkoth et al.**, (1984).
- 15 **Meiri N. et al.**, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15037-15042.
- Mittl P.R. et al.**, *J. Biol. Chem.* 1997; 272(10): 6539-6547.
- Miura K. et al.**, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1992; 1 87(1); 3, 75-80.
- 20 **Morrison et al.**, 1984, *PNAS* 81, 6851.
- Muranishi et al.**, 1991, *Pharm. Research* 8, 649.
- 25 **Muzio et al.**, 1996, *Cell*, 14 de junio; 85(6): 817-827.
- Muzio M. et al.**, *J. Biol. Chem.* 1998, 273(5): 2926-2930.
- Nagata y Goldstein**, 1995.
- 30 **Nagata S. et al.**, *Cell* 1997; 88(3): 355-365.
- Nakashima A. et al.**, *J. Biol. Chem.* 1997; 272(14): 9567-9572.
- 35 **Narumi et al.**, 1998, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 19, 936-941.
- Nicholson D.W. y Thornberry, N.A.**, 1997, *Trends Biochem. Sci.* 22, 299-306.
- Nishida et al.**, 1998, *Spine* 23, 2437-2442.
- 40 **Nophar et al.**, 1990.
- Ohtsu M. et al.**, 1997, *EMBO J.* 16, 4650-4656.
- 45 **Pederson et al.**, 1998, *J. Gastrointest. Surg.* 2, 283-291.
- Quelle F.W. et al.**, *J. Biol. Chem.* 1995; 270(35): 20775-20780.
- Rotonda J. et al.**, *Nat. Struct. Biol.* 1996; 3(7): 619-625.
- 50 **Ruzicka et al.**, 1993, *Science* 260: 487.
- Sakahira H. et al.**, (1998) *Nature (Londres)* 391, 96-99.
- 55 **Salvesen G.S. y Dixit V.M.** (1997) *Cell* 91, 443-446.
- Sambrook et al.**, 1989.
- Sano et al.**, (1991) *Biotechniques* 9: 1378.
- 60 **Sano et al.** (1992) *Science* 258: 120.
- Schall et al.**, 1990.
- 65 **Schek et al.**, *Mol. Cell. Biol.*, pág. 5386-5393, 1992.
- Schwarzenberger et al.**, 1998, *J. Immunol.* 161, 6383-6389.

ES 2 265 511 T3

Shevchenko A., et al., 1997, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11, pág. 1015-1024.

Shimayama et al., 1993, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 29, 177.

Shoji et al., 1998, *J. Drug. Target* 5: 261-273.

Shore et al., 1993, *Oncogene* 8, 3183.

Smith et al., 1990, *J. Infect. Dis.*, diciembre; 162(6): 1349-1353.

Soukchareun et al., 1998, *Bioconjug. Chem.* 9, 466-475.

Srinivasula S.M. et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 93(25); 14486-14491.

Srinivasula S.M. et al., *J. Biot. Chem.* 1998; 273(17), 10107-10111.

Stanger et al., 1995, *Cell*, 19 de mayo; 81(4): 513-523.

Steinitz M. y Klein G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, septiembre de 1975; 72(9): 3518-3520.

Stix, 1998, *Sci. Am.*, 279, 46-50.

Surinya et al., *J. Biol. Chem.* 273, pág. 16798-16809, 1998.

Tartaglia et al., 1993, *Cell*, 10 de septiembre; 74(5); 845-853.

Teoh et al., 1998, *Blood* 92, 4591-4601.

Tewari et al., 1995, *Cell*, 2 de junio; 81(5): 801-809.

Thomsen et al., 1984, *PNAS* 81, 659-663.

Thornberry N.A., et al., *J. Biol. Chem.* 1997; 272(29): 17907-17911.

Tirode F. et al., *J. Biol. Chem.* 1997; 272(37); 22995-22999.

Tokushige et al., 1997, *J. Virol. Methods* 64, pág. 73-80.

Tracey et al., 1986, *Annu. Rev. Med.* 45: 491-503.

Vandenabeele et al., 1995, *J. Immunol.*, 15 de marzo; 154(6): 2904-2913.

Vercammen D., et al., 1998, *J. Exp. Med.* 4, 1477-1485.

Vielkind y Swierenga, 1989, *Histochemistry*; 91(1): 81-88.

Villa, P. et al., (1997), *Trends Biochem. Sci.* 22, 388-393.

Vincenz C. y Dixit V.M., 1997, *J. Biol. Chem.*, 7 de marzo; 272(10): 6578-6583.

Wahl et al., 1983, *J. Nuc. Med.* 24: 316-325.

Wallach D. et al., 1999, *Annu. Rev. Immunol.* 17, 331-367.

Wang J., 1998, *Controlled Release* 53, 39-48.

Weaver et al., 2000, *Hybridoma*, abril; 19(2): 167-169.

Xue et al., 1995, *Nature*, 21 de septiembre; 377(6546): 248-251.

Yamamoto et al., 1980, *Cell*, 22, 787-797.

Yamamoto. T. et al., *J. Biol. Chem.* 1997; 272(49): 30595-30598.

Yang X. et al., *Mol. Cell* 1998; 1(2): 319-325.

Yeh et al., 1998, *J. Bone Miner Res.* 13, pág. 1870-1879.

Yin H.L. y Stossel T.P. (1979), *Nature (Londres)* 281, 583-586.

Yin H.L. y Stossel T.P. (1980), *J. Biol. Chem.* 255, 9490-9493.

5 **Zacharia et al., 1991, *Eur. J. Pharmacol.* 203, 353.**

Zhang et al., 1998, *Clin. Cancer Res.* 4, 2669-2676.

10 **Zhao y Pick, 1993, *Nature* 365, 448.**

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo obtenido mediante inmunización de un animal con un péptido del extremo C-terminal de la unidad Sub-1 de caspasa 8 y fragmentos del mismo, en el que el péptido utilizado para inmunización tiene la secuencia aminoacídica CQGDNYQKGIPVETD (SEC ID N° 4), capaz de coimmunoprecipitar dicha caspasa (tanto caspasa 8 activa como procaspasa 8) junto con la proteína p72 asociada a caspasa 8 (SEC ID N° 3) y de liberar eficazmente la caspasa y proteína asociada a partir del complejo inmune tras elución utilizando el péptido según la SEC ID N° 4.
- 10 2. Un anticuerpo según la reivindicación 1, que es un anticuerpo policlonal o fragmento del mismo.
3. Un anticuerpo según la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo.
4. Un anticuerpo según la reivindicación 1, que es un anticuerpo quimérico o fragmento del mismo.
- 15 5. Un anticuerpo según la reivindicación 1, que es un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo.
6. Un anticuerpo según la reivindicación 1, que es un anticuerpo anti-anti-Id o fragmento del mismo.
- 20 7. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el péptido utilizado para inmunización está acoplado a KLH.
8. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que es del isotipo de inmunoglobulina IgG₁.
- 25 9. Un anticuerpo según la reivindicación 8, en el que el anticuerpo desencadena el procesamiento de la caspasa 8.
10. El uso de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para el desarrollo de un ensayo ELISA.
- 30 11. Un método para preparar un anticuerpo según las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende inmunizar un animal con un péptido del extremo C-terminal de Sub-1 de caspasa 8, en el que el péptido utilizado para inmunización tiene la secuencia aminoacídica CQGDNYQKGIPVETD (SEC ID N° 4).
12. Un método según la reivindicación 11, en el que el anticuerpo es monoclonal.
- 35 13. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en el que el inmunógeno está ligado a un vehículo.
14. Un método según la reivindicación 13, en el que el vehículo es KLH.
- 40 15. Un método para la purificación de una caspasa y proteína unida a caspasa, que comprende poner en contacto una muestra que contiene una caspasa y la proteína unida a caspasa con un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, coimmunoprecipitar la caspasa y proteína unida a caspasa, lavar el complejo inmune producido y recuperar la caspasa y la proteína unida a caspasa a partir del complejo inmune utilizando CQGDNYQKGIPVETD (SEC ID N° 4) en forma de péptido competitivo.
- 45 16. Un método según la reivindicación 15, en el que la muestra se selecciona de fluidos corporales, extractos celulares y bibliotecas de expresión de ADN.
17. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 15 y 16, en el que el péptido competitivo comprende la secuencia aminoacídica CQGDNYQKGIPVETD (SEC ID N° 4).
- 50 18. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 15-17, en el que las células en la muestra se estimulan antes de la extracción.
- 55 19. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en el que la caspasa es caspasa 8.
20. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 15-19, en el que se utiliza adicionalmente un anticuerpo obtenible mediante inmunización de un animal con el péptido según la SEC ID N° 6.
- 60 21. El uso del epítipo 179 (SEC ID N° 4) para obtener un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende la inmunización de un animal con dicho epítipo.

MDFSRNLYDIGEQLDSEDLASLKFLSLDYIPQRKQEFIKDALMLFORLQEKRMLEESNLS
FLKELLFRINRLDLLITYLNTRKEEMERELQTPGRAQISAYRFHFCRMSWAEANSQCQTQ
SVPFWRRVDHLLIRVMLYQISEEVSRSSELRSEKFLQEEISKCKLDDMNLLDIFIEMEK
RVILGEGKLDILKRVCAQINKSLLKIINDYEEFSKGEELCGVMTISDSPREQDSESQTLID
KVYQMKSKPRGYCLINNNHFAKAREKVPKLHSIRDNRNGTHLDAGALTTTFEELHFEIKP
HHDCTVEQIYEILKIYQLMDHSNMDCFICILSHGDKGIIYGTGQEAPIYELTSQFTGL
KCPSLAGKPKVFFIQACQGDNYQKGIPVETDSEEQPYLEMDLSSPOTRYIPDEADFLGGM
ATVNNCVSYRNPAGETWYIQSLCQSLRERCPRGDDILTILTEVNYEVS NKDDKKNMGKQM
PQPTFTLRKKLVFSPD

Figura 1

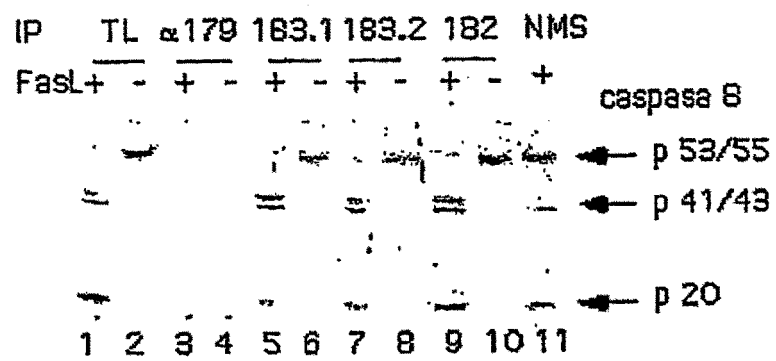


Figura 2

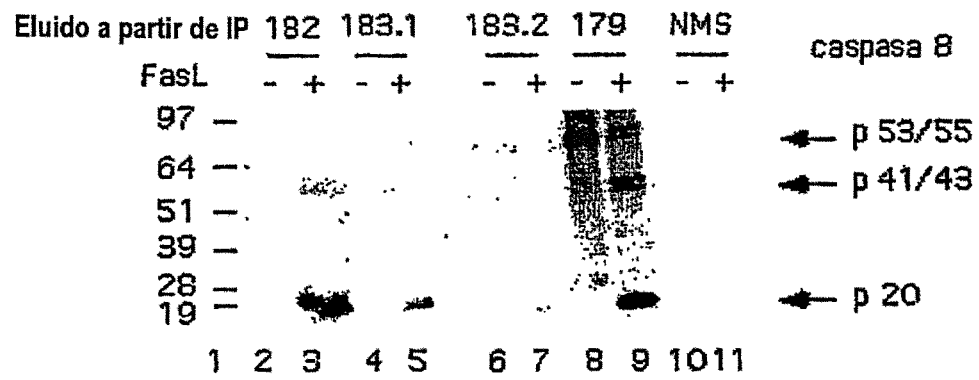


Figura 3a

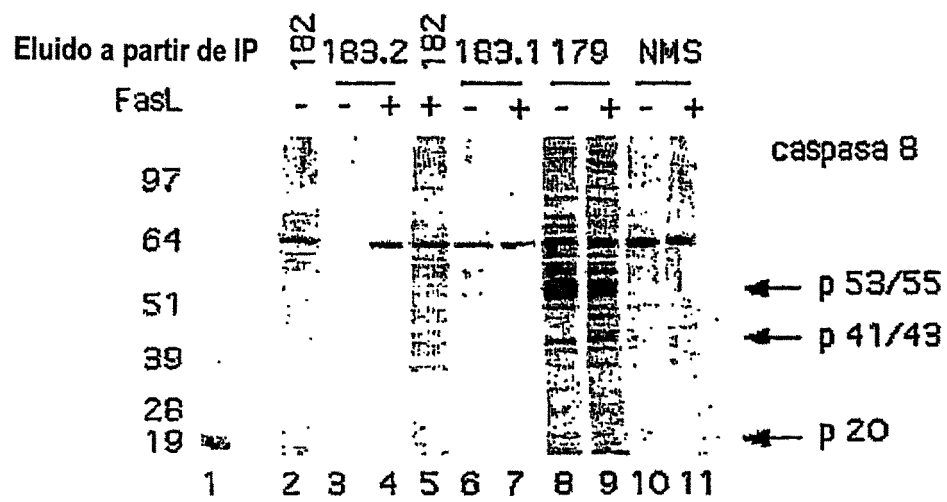


Figura 3b

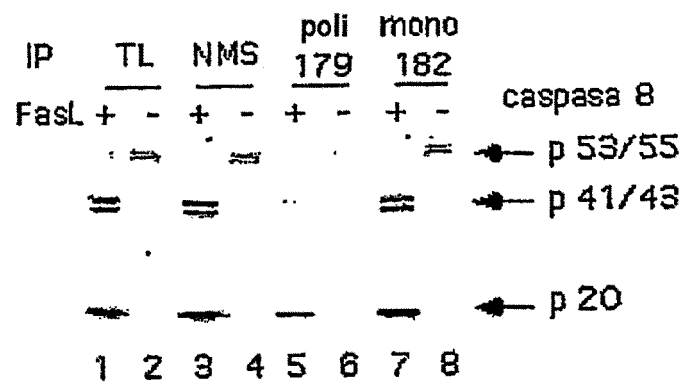


Figura 4

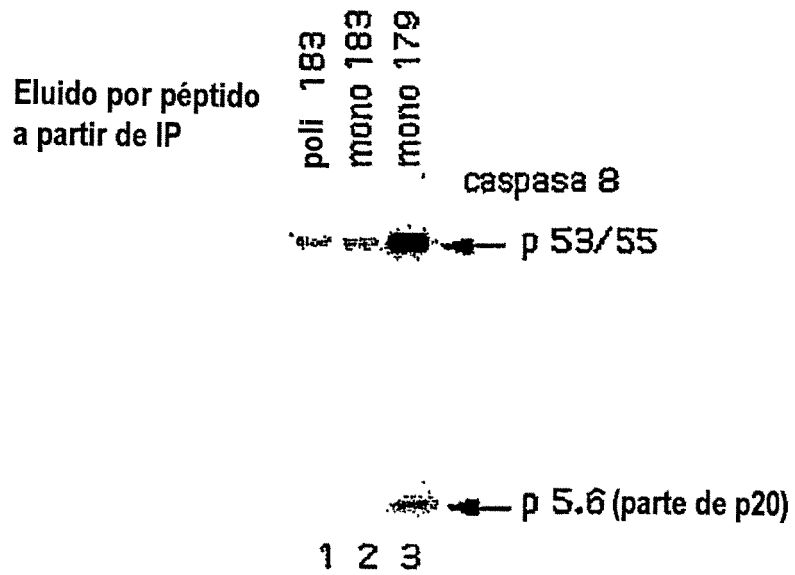


Figura 5

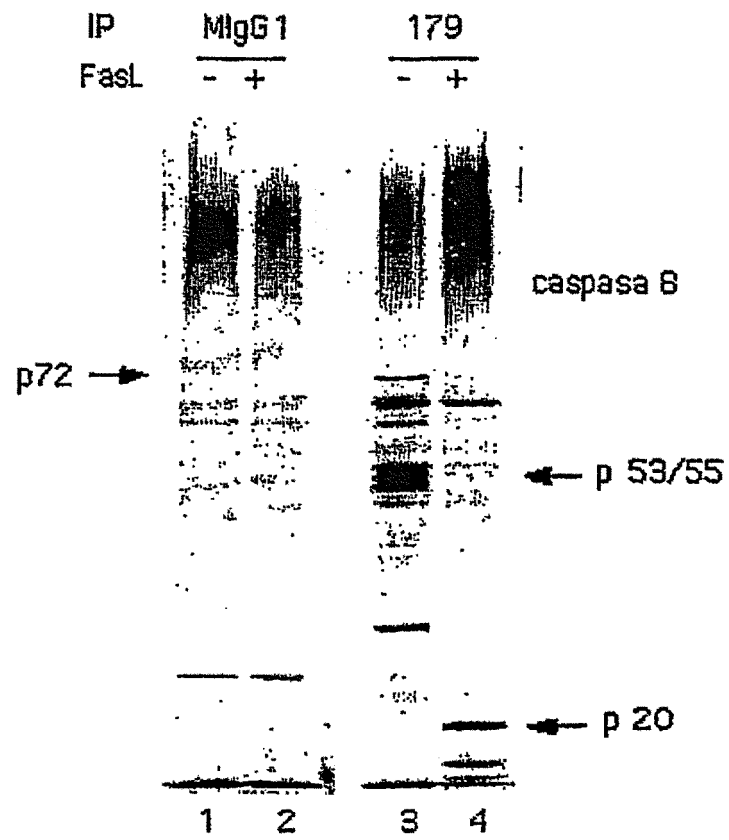


Figura 6

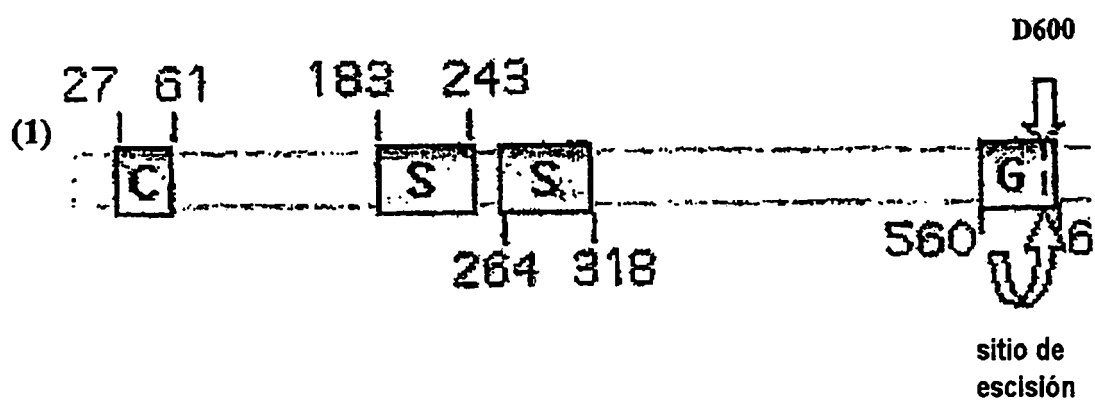


Figura 7

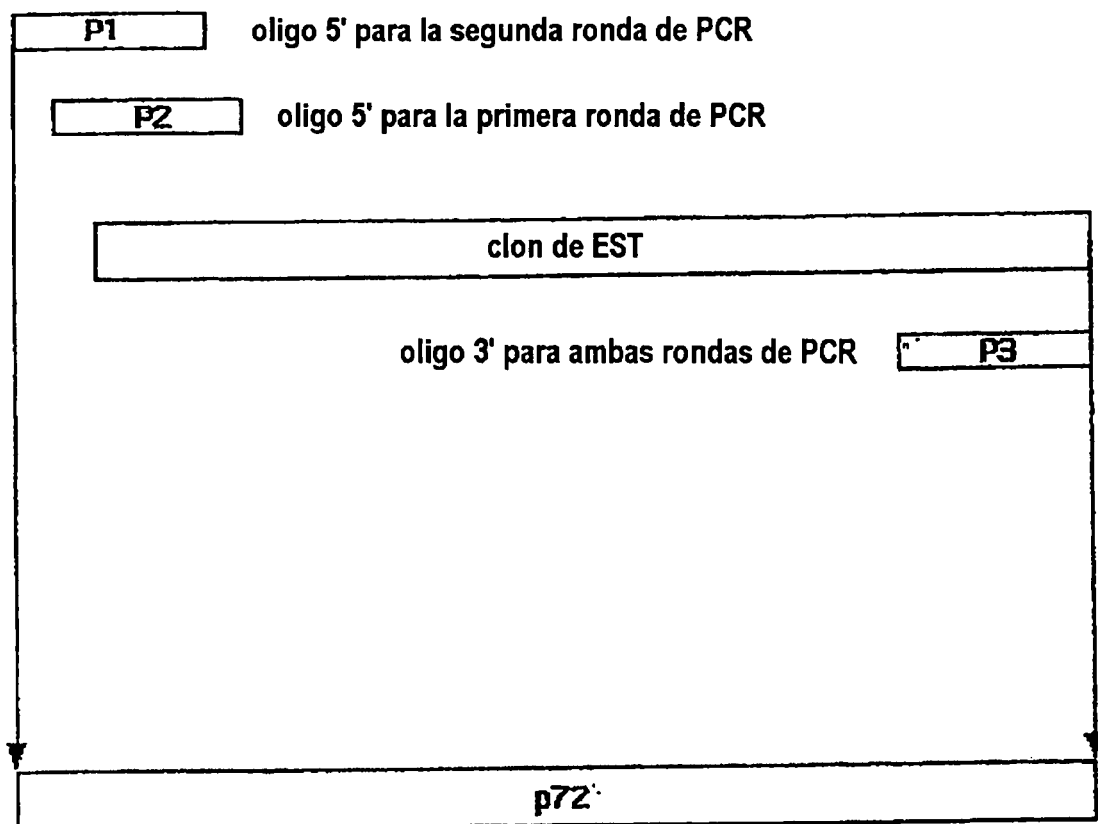


Figura 8

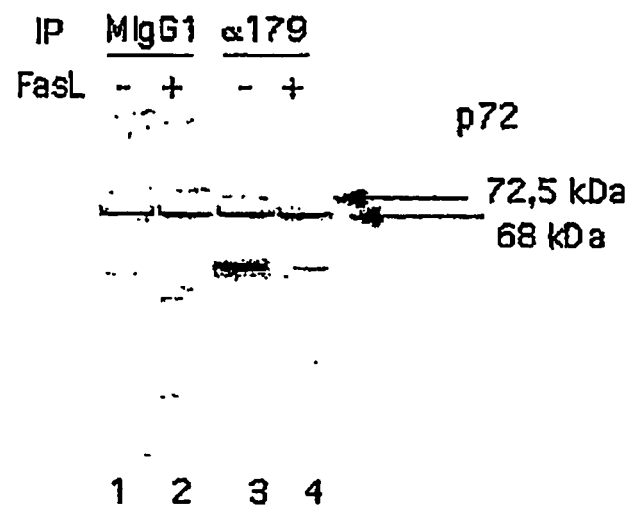


Figura 9

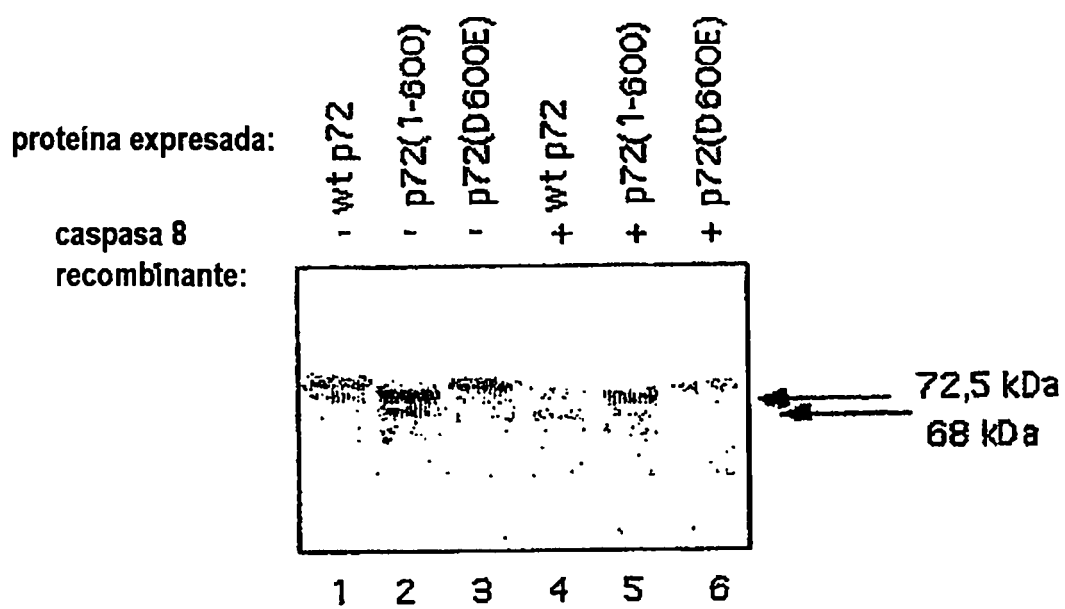


Figura 10

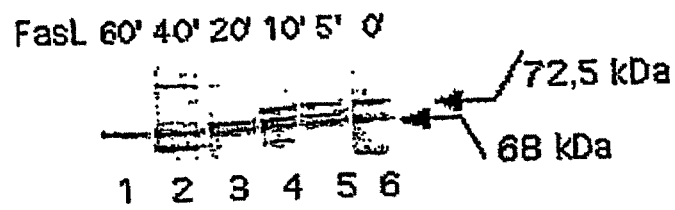


Figura 11

ES 2 265 511 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Yeda Research and Development Co. Ltd.
Wallach, David
Goncharov, Tanya
Kolumam, Ganesh

<120> Anticuerpos contra caspasa 8, su preparación y uso

<130> 484

<150> 145279

<151> 09-04-2001

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 616

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Ala Arg Gly Arg Asp Val Ala Gly Lys Ala Asn Arg Trp Phe Gly Val
1 5 10 15

Ala Pro Pro Lys Ser Gly Lys Met Asn Met Asn Ile Leu His Gln Glu
20 25 30

Glu Leu Ile Ala Gln Lys Lys Arg Glu Ile Glu Ala Lys Met Glu Gln
35 40 45

Lys Ala Lys Gln Asn Gln Val Ala Ser Pro Gln Pro Pro His Pro Gly
50 55 60

Glu Ile Thr Asn Ala His Asn Ser Ser Cys Ile Ser Asn Lys Phe Ala
65 70 75 80

ES 2 265 511 T3

Asn Asp Gly Ser Phe Leu Gln Gln Phe Leu Asn Ala Gly Lys Arg Ser
 85 90 95
 5 Leu Leu Ile Ser Arg Arg Thr Gly Leu Gly Leu Ala Ser Leu Pro Gly
 100 105 110
 10 Pro Val Lys Ser Tyr Ser His Ala Lys Gln Leu Pro Val Ala His Arg
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Gln Ser Pro Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Tyr Glu
 130 135 140
 15 Gln Trp Leu Glu Ile Lys Val Ser Pro Pro Glu Gly Ala Glu Thr Arg
 145 150 155 160
 20 Lys Val Ile Glu Lys Leu Ala Arg Phe Val Ala Glu Gly Gly Pro Glu
 165 170 175
 Leu Glu Lys Val Ala Met Glu Asp Tyr Lys Asp Asn Pro Ala Phe Ala
 180 185 190
 25 Phe Leu His Asp Lys Asn Ser Arg Glu Phe Leu Tyr Tyr Arg Lys Lys
 195 200 205
 30 Val Ala Glu Ile Arg Lys Glu Ala Gln Lys Ser Gln Ala Ala Ser Gln
 210 215 220
 Lys Val Ser Pro Pro Glu Asp Glu Glu Val Lys Asn Leu Ala Glu Lys
 225 230 235 240
 35 Leu Ala Arg Phe Ile Ala Asp Gly Gly Pro Glu Val Glu Thr Ile Ala
 245 250 255
 40 Leu Gln Asn Asn Arg Glu Asn Gln Ala Phe Ser Phe Leu Tyr Glu Pro
 260 265 270
 Asn Ser Gln Gly Tyr Lys Tyr Tyr Arg Gln Lys Leu Glu Glu Phe Arg
 275 280 285
 45 Lys Ala Lys Ala Ser Ser Thr Gly Ser Phe Thr Ala Pro Asp Pro Gly
 290 295 300
 50 Leu Lys Arg Lys Ser Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gly Ser Leu Pro Pro
 305 310 315 320
 Ala Thr Thr Cys Pro Ala Ser Ser Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ile Pro
 325 330 335
 55 Ala Pro Ala Ala Pro Gly Lys Pro Ala Ser Ala Ala Thr Val Lys Arg
 340 345 350
 60
 65

ES 2 265 511 T3

5 Lys Arg Lys Ser Arg Trp Gly Pro Glu Glu Asp Lys Val Glu Leu Pro
 355 360 365
 Pro Ala Glu Leu Val Gln Arg Asp Val Asp Ala Ser Pro Ser Pro Leu
 370 375 380
 10 Ser Val Gln Asp Leu Lys Gly Leu Gly Tyr Glu Lys Gly Lys Pro Val
 385 390 395 400
 Gly Leu Val Gly Val Thr Glu Leu Ser Asp Ala Gln Lys Lys Gln Leu
 405 410 415
 15 Lys Glu Gln Gln Glu Met Gln Gln Met Tyr Asp Met Ile Met Gln His
 420 425 430
 20 Lys Arg Ala Met Gln Asp Met Gln Leu Leu Trp Glu Lys Ala Val Gln
 435 440 445
 Gln His Gln His Gly Tyr Asp Ser Asp Glu Glu Val Asp Ser Glu Leu
 450 455 460
 25 Gly Thr Trp Glu His Gln Leu Arg Arg Met Glu Met Asp Lys Thr Arg
 465 470 475 480
 30 Glu Trp Ala Glu Gln Leu Thr Lys Met Gly Arg Gly Lys His Phe Ile
 485 490 495
 35 Gly Asp Phe Leu Pro Pro Asp Glu Leu Glu Lys Phe Met Glu Thr Phe
 500 505 510
 Lys Ala Leu Lys Glu Gly Arg Glu Pro Asp Tyr Ser Glu Tyr Lys Glu
 515 520 525
 40 Phe Lys Leu Thr Val Glu Asn Ile Gly Tyr Gln Met Leu Met Lys Met
 530 535 540
 45 Gly Trp Lys Glu Gly Glu Gly Leu Gly Ser Glu Gly Gln Gly Ile Lys
 545 550 555 560
 Asn Pro Val Asn Lys Gly Thr Thr Thr Val Asp Gly Ala Gly Phe Gly
 565 570 575
 50 Ile Asp Arg Pro Ala Glu Leu Ser Lys Glu Asp Asp Glu Tyr Glu Ala
 580 585 590
 55 Phe Arg Lys Arg Met Met Leu Ala Tyr Arg Phe Arg Pro Asn Pro Leu
 595 600 605
 60 Asn Asn Pro Arg Arg Pro Tyr Tyr
 610 615

<210> 2

<211> 1938

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 265 511 T3

<400> 2

	atgagtctca agatggacaa ccgggatgtt gcaggaaagg ctaaccggtg gtttgggggtt	60
5	gctcccccta aatctggaaa aatgaacatg aacatccttc accaggaaga gctcatcgct	120
	cagaagaaac gggaaattga agccaaaatg gaacagaaag ccaagcagaa tcaggtggcc	180
	agccctcagc cccacatcc tggcgaaatc acaaatgcac acaactcttc ctgcatttcc	240
10	aacaagtttg ccaacgatgg tagcttcttg. cagcagtttc tgaagttgca gaaggcacag	300
	accagcacag acgccccgac cagtgcgccc agcgcccctc ccagcacacc cccccccagc	360
	gctgggaaga ggtccctgct catcagcagg cggacaggcc tggggctggc cagcctgccg	420
15	ggccctgtga agagctactc ccacgccaaag cagctgcccg tggcgaccg cccgagtgtc	480
	ttccagtccc ctgacgagga cgaggaggag gactatgagc agtggctgga gatcaaagtt	540
	tcacccccag agggagccga gactcggaaa gtgatagaga aattggcccg ctttgtggca	600
20	gaaggaggcc ccgagttaga aaaagtagct atggaggact acaaggataa cccagcattt	660
	gcatttttgc acgataagaa tagcagggaa ttcctctact acaggaagaa ggtggctgag	720
25	ataagaaagg aagcacagaa gtcgcaggca gcctctcaga aagtttcacc cccagaggac	780
	gaagaggtca agaacccttg agaaaagttg gccaggttca tagcggacgg gggctccgag	840
	gtggaaacca ttgccctcca gaacaaccgt gagaaccagg cattcagctt tctgtatgag	900
30	cccaatagcc aaggggtacaa gtactaccga cagaagctgg aggagttccg gaaagccaag	960
	gccagctcca caggcagctt cacagcacct gatcccggcc tgaagcgcaa gtccccctct	1020
	gaggccctgt cagggtcctt acccccagcc accacctgcc ccgcctcgtc caccgtgag	1080
35	cccactatca tccctgctcc agctgcccc gggaaagccag cctccgcagc caccgtgaag	1140
	aggaagcgga agagccggtg ggggcctgaa gaggataagg tagagctcct acctgctgaa	1200
	ctggtgcaga gggacgtgga tgcctctccc tcgcctctgt cagttcagga cctcaagggg	1260
40	ctcggctatg agaaggggaa gcctgtgggt ctagtggcg tcacagagct ttcagacgcc	1320
	cagaagaagc agctgaagga gcagcaggag atgcagcaga tgtacgacat gatcatgcag	1380
	cacaagcggg ccatgcagga catgcagctg ctgtgggaga aggcagtcca acagcaccag	1440
45	cacggctatg acagtgatga ggaggtggac agcgagctgg gcacctggga gcaccagctg	1500
	cggcgcatgg agatggataa gaccagggaa tgggcccagc agctgacaaa gatgggcccg	1560
50	ggcaagcact tcatcgagga ctctctgcct ccagacgagc tggaaaagtt tatggagacc	1620
	ttcaaggccc tgaaggagg ccgtgagcct gactactcag agtacaagga gttcaagctg	1680
	actgtggaga acatcggtta ccagatgctg atgaagatgg gctggaagga gggcgagggg	1740
55	ctgggctcag agggccaggg catcaagaac ccagtgaaca agggcaccac cacagtggac	1800
	ggcgctggct tcggcattga ccggccggcg gagctctcca aggaggacga cgagtatgag	1860
60	gcgttccgca agaggatgat gctggcctac cgcttccggc ccaaccccc gaacaatccc	1920
	agacggcctt actactga	1938

<210> 3

65 <211> 645

<212> PRT

ES 2 265 511 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

5	Met Ser Leu Lys Met Asp Asn Arg Asp Val Ala Gly Lys Ala Asn Arg
	1 5 10 15
10	Trp Phe Gly Val Ala Pro Pro Lys Ser Gly Lys Met Asn Met Asn Ile
	20 25 30
15	Leu His Gln Glu Glu Leu Ile Ala Gln Lys Lys Arg Glu Ile Glu Ala
	35 40 45
20	Lys Met Glu Gln Lys Ala Lys Gln Asn Gln Val Ala Ser Pro Gln Pro
	50 55 60
25	Pro His Pro Gly Glu Ile Thr Asn Ala His Asn Ser Ser Cys Ile Ser
	65 70 75 80
30	Asn Lys Phe Ala Asn Asp Gly Ser Phe Leu Gln Gln Phe Leu Lys Leu
	85 90 95
35	Gln Lys Ala Gln Thr Ser Thr Asp Ala Pro Thr Ser Ala Pro Ser Ala
	100 105 110
40	Pro Pro Ser Thr Pro Thr Pro Ser Ala Gly Lys Arg Ser Leu Leu Ile
	115 120 125
45	Ser Arg Arg Thr Gly Leu Gly Leu Ala Ser Leu Pro Gly Pro Val Lys
	130 135 140
50	Ser Tyr Ser His Ala Lys Gln Leu Pro Val Ala His Arg Pro Ser Val
	145 150 155 160
55	Phe Gln Ser Pro Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Tyr Glu Gln Trp Leu
	165 170 175
60	Glu Ile Lys Val Ser Pro Pro Glu Gly Ala Glu Thr Arg Lys Val Ile
	180 185 190

ES 2 265 511 T3

Glu Lys Leu Ala Arg Phe Val Ala Glu Gly Gly Pro Glu Leu Glu Lys
 195 200 205
 5 Val Ala Met Glu Asp Tyr Lys Asp Asn Pro Ala Phe Ala Phe Leu His
 210 215 220
 10 Asp Lys Asn Ser Arg Glu Phe Leu Tyr Tyr Arg Lys Lys Val Ala Glu
 225 230 235 240
 Ile Arg Lys Glu Ala Gln Lys Ser Gln Ala Ala Ser Gln Lys Val Ser
 245 250 255
 15 Pro Pro Glu Asp Glu Glu Val Lys Asn Leu Ala Glu Lys Leu Ala Arg
 260 265 270
 20 Phe Ile Ala Asp Gly Gly Pro Glu Val Glu Thr Ile Ala Leu Gln Asn
 275 280 285
 Asn Arg Glu Asn Gln Ala Phe Ser Phe Leu Tyr Glu Pro Asn Ser Gln
 290 295 300
 25 Gly Tyr Lys Tyr Tyr Arg Gln Lys Leu Glu Glu Phe Arg Lys Ala Lys
 305 310 315 320
 30 Ala Ser Ser Thr Gly Ser Phe Thr Ala Pro Asp Pro Gly Leu Lys Arg
 325 330 335
 Lys Ser Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gly Ser Leu Pro Pro Ala Thr Thr
 340 345 350
 35 Cys Pro Ala Ser Ser Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ile Pro Ala Pro Ala
 355 360 365
 40 Ala Pro Gly Lys Pro Ala Ser Ala Ala Thr Val Lys Arg Lys Arg Lys
 370 375 380
 Ser Arg Trp Gly Pro Glu Glu Asp Lys Val Glu Leu Leu Pro Ala Glu
 385 390 395 400
 Leu Val Gln Arg Asp Val Asp Ala Ser Pro Ser Pro Leu Ser Val Gln
 405 410 415
 50 Asp Leu Lys Gly Leu Gly Tyr Glu Lys Gly Lys Pro Val Gly Leu Val
 420 425 430
 Gly Val Thr Glu Leu Ser Asp Ala Gln Lys Lys Gln Leu Lys Glu Gln
 435 440 445
 55 Gln Glu Met Gln Gln Met Tyr Asp Met Ile Met Gln His Lys Arg Ala
 450 455 460
 60
 65

ES 2 265 511 T3

Met Gln Asp Met Gln Leu Leu Trp Glu Lys Ala Val Gln Gln His Gln
 465 470 475 480
 5 His Gly Tyr Asp Ser Asp Glu Glu Val Asp Ser Glu Leu Gly Thr Trp
 485 490 495
 10 Glu His Gln Leu Arg Arg Met Glu Met Asp Lys Thr Arg Glu Trp Ala
 500 505 510
 15 Glu Gln Leu Thr Lys Met Gly Arg Gly Lys His Phe Ile Gly Asp Phe
 515 520 525
 20 Leu Pro Pro Asp Glu Leu Glu Lys Phe Met Glu Thr Phe Lys Ala Leu
 530 535 540
 25 Lys Glu Gly Arg Glu Pro Asp Tyr Ser Glu Tyr Lys Glu Phe Lys Leu
 545 550 555 560
 Thr Val Glu Asn Ile Gly Tyr Gln Met Leu Met Lys Met Gly Trp Lys
 565 570 575
 30 Glu Gly Glu Gly Leu Gly Ser Glu Gly Gln Gly Ile Lys Asn Pro Val
 580 585 590
 35 Asn Lys Gly Thr Thr Thr Val Asp Gly Ala Gly Phe Gly Ile Asp Arg
 595 600 605
 Pro Ala Glu Leu Ser Lys Glu Asp Asp Glu Tyr Glu Ala Phe Arg Lys
 610 615 620
 40 Arg Met Met Leu Ala Tyr Arg Phe Arg Pro Asn Pro Leu Asn Asn Pro
 625 630 635 640
 Arg Arg Pro Tyr Tyr
 645

45 <210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido 179

55 <400> 4

Cys Gln Gly Asp Asn Tyr Gln Lys Gly Ile Pro Val Glu Thr Asp
 1 5 10 15

60 <210> 5
 <211> 15
 <212> PRT

65 <213> Secuencia artificial

ES 2 265 511 T3

<220>

<223> Péptido 182

5 <400> 5

Leu	Ser	Ser	Pro	Gln	Thr	Arg	Tyr	Ile	Pro	Asp	Glu	Ala	Asp	Cys
1				5					10					15

10 <210> 6

<211> 18

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido 183

20 <400> 6

Ser	Glu	Ser	Gln	Thr	Leu	Asp	Lys	Val	Tyr	Gln	Met	Lys	Ser	Lys
1				5					10					15

25 Pro Arg Cys

30

35

40

45

50

55

60

65