



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 317 924**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01957295 .7**

96 Fecha de presentación : **27.07.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1303293**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.2003**

54

Título: **Administración secuencial de CPT-11 y polipéptido Apo-2L.**

30

Prioridad: **27.07.2000 US 221256 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.05.2009**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.05.2009**

73

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

72

Inventor/es: **Escandon, Enrique;**  
**Fox, Judith, A.;**  
**Kelley, Sean, K. y**  
**Xiang, Hong**

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 317 924 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

Administración secuencial de CPT-11 y polipéptido Apo-2L.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere de forma general a procedimiento para inducir la apoptosis en células de mamífero. En particular, se refiere al uso del CPT-11 y de agonistas del receptor Apo-2L para inducir sinérgicamente la apoptosis en células de mamíferos.

10 **Antecedentes de la invención**

Varias moléculas, tales como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  ("TNF- $\alpha$ "), el factor de necrosis tumoral- $\beta$  ("TNF- $\beta$ " o "linfotoxina- $\alpha$ "), la linfotoxina- $\beta$  ("LT- $\beta$ "), el ligando de CD30, el ligando de CD27, el ligando de CD40, el ligando de OX-40, el ligando de 4-1BB, el ligando de Apo-1 (también denominado ligando de Fas o ligando de CD95), el ligando de Apo-2 (también denominado TRAIL), el ligando de Apo-3 (también denominado TWEAK), la osteoprotegerina (OPG), APRIL, el ligando de RANK (también denominado TRANCE), y TALL-1 (también denominado B1yS, BAFF o THANK) se han identificado como miembros de la familia de citocinas del factor de necrosis tumoral ("TNF") [Consultar, por ejemplo, Gruss y Dower, *Blood*, 85:3378-3404 (1995); Pitti *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996); Wiley *et al.*, *Immunity*, 3:673-682 (1995); Browning *et al.*, *Cell*, 72:847-856 (1993); Armitage *et al.* *Nature*, 357:80-82 (1992), WO 97/01633 publicada el 16 de enero de 1997; WO 97/25428 publicada el 17 de julio de 1997, Marsters *et al.*, *Curr. Biol.*, 8:525-528 (1998); Simonet *et al.*, *Cell*, 89:309-319 (1997); Chicheportiche *et al.*, *Biol. Chem.*, 272:32401-32410 (1997); Hahne *et al.*, *J. Exp. Med.*, 188:1185-1190 (1998); WO98/28426 publicada el 2 de julio de 1998; WO98/46751 publicada el 22 de octubre de 1998; WO/98/18921 publicada el 7 de mayo de 1998, Moore *et al.*, *Science*, 285:260-263 (1999); Shu *et al.*, *J. Leukocyte Biol.*, 65:680 (1999); Schneider *et al.*, *J. Exp. Med.*, 189:1747-1756 (1999); Mukhopadhyay *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:15978-15981 (1999)]. De entre estas moléculas, se ha publicado que TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , el ligando de CD30, el ligando de 4-1BB, el ligando de Apo-1, el ligando de Apo-2 (Apo2L/TRAIL) y el ligando de Apo-3 (TWEAK) están implicadas en la muerte de la células apoptótica. Se ha publicado que tanto TNF- $\alpha$  como TNF- $\beta$  inducen la muerte apoptótica en células tumorales susceptibles [Schmid *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:1881 (1986); Dealtry *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 17:689 (1987)].

Recientemente se identificaron varias moléculas adicionales que se cree son miembros de la familia de citocinas del TNF, y se describió que estaban implicadas en la apoptosis. Por ejemplo, en Pitti *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996), se describe una molécula denominada como ligando de Apo-2. Consultar también, WO 97/25428 publicada el 17 de julio de 1997. Se ha descrito que el ligando de Apo-2 humano de longitud completa es un polipéptido de 281 aminoácidos que induce la apoptosis en varias células de mamífero. Otros investigadores han descrito polipéptidos relacionados denominados como TRAIL [Wiley *et al.*, *Immunity*, 3:673-682 (1995); WO 97/01633 publicada el 16 de enero de 1997] y AGP-1 [WO 97/46686 publicada el 11 de diciembre de 1997].

Varias moléculas en la familia TNF tienen también un papel o papeles aparentes en la función o desarrollo del sistema inmunitario [Gruss *et al.*, *Blood*, 85:3378 (1995)]. Zheng *et al.* han informado que el TNF- $\alpha$  está implicado en la apoptosis posterior a la estimulación de células T CD8-positivas [Zheng *et al.*, *Nature*, 377:348-351 (1995)]. Otros investigadores han publicado que el ligando de CD30 puede estar implicado en la supresión de las células T autorreactivas en el timo [Amakawa *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Programmed Cell Death, Resumen n° 10, (1995)]. El ligando de CD40 activa muchas funciones de las células B, incluyendo la proliferación, la secreción de inmunoglobulina, y la supervivencia [Renshaw *et al.*, *J. Exp. Med.*, 180:1889 (1994)]. Se ha publicado que otra citocina recientemente identificada de la familia del TNF, la TALL-1 (BlyS), en ciertas condiciones induce la proliferación de las células B y la secreción de inmunoglobulinas. [Moore *et al.*, ver más arriba; Schneider *et al.*, ver más arriba; Mackay *et al.*, *J. Exp. Med.*, 190:1697 (1999)].

Las mutaciones en los genes de ratón del receptor Fas/Apo-1 o su ligando (denominados respectivamente *lpr* y *gld*) se han asociado con ciertos trastornos autoinmunes, indicando que el ligando de Apo-1 puede desempeñar un papel en la regulación de la supresión clónica de los linfocitos autorreactivos en la periferia [Krammer *et al.*, *Curr. Op. Immunol.*, 6:279-289 (1994); Nagata *et al.*, *Science*, 267:1449-1456 (1995)]. También se ha publicado que el ligando de Apo-1 induce la apoptosis posterior a la estimulación en linfocitos T CD4-positivos y en linfocitos B, y puede estar implicado en la eliminación de los linfocitos activados cuando ya no se necesita su función [Krammer *et al.*, ver más arriba; Nagata *et al.*, ver más arriba]. Se ha publicado que los anticuerpos monoclonales agonistas de ratón que se unen específicamente al receptor de Apo-1 exhiben una actividad para matar células que es comparable o similar a la del TNF- $\alpha$  [Yonehara *et al.*, *J. Exp. Med.*, 169:1747-1756 (1989)].

Se cree que la inducción de varias respuestas celulares, mediadas por tales citocinas de la familia del TNF, se inicia a partir de su unión a receptores celulares específicos. Previamente, se habían identificado dos receptores distintos del TNF, de aproximadamente 55-kDa (TNFR1) y 75-kDa (TNFR2) [Hohman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:14927-14934 (1989); Brockhaus *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:3127-3131 (1990); EP 417,563, publicada el 20 de marzo de 1991; Loetscher *et al.*, *Cell*, 61:351 (1990); Schall *et al.*, *Cell*, 61:361 (1990); Smith *et al.*, *Science*, 248:1019-1023 (1990); Lewis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:2830-2834 (1991); Goodwin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 11:3020-3026 (1991)]. Se halló que esos TNFR compartían la estructura típica de los receptores de superficie celular, incluyendo las regiones extramembrana, transmembrana e intracelulares. Las porciones extracelulares de ambos receptores se hallaron también

de forma natural como proteínas solubles unidoras de TNF [Nophar, Y. *et al.*, EMBO J., 9:3269 (1990); and Kohno, T. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:8331 (1990); Hale *et al.*, J. Cell. Biochem. Supplement 15F, 1991, p. 113 (P424)].

5 La porción extracelular de los TNFR del tipo 1 y tipo 2 (TNFR1 y TNFR2) contiene un patrón de secuencia de aminoácidos repetitivos consistente en cuatro dominios ricos en cisteínas (CRD) denominados del 1 al 4, que empiezan a partir del extremo NH<sub>2</sub>-terminal. [Schall *et al.*, ver más arriba; Loetscher *et al.*, ver más arriba; Smith *et al.*, ver más arriba; Nophar *et al.*, ver más arriba; Kohno *et al.*, ver más arriba; Banner *et al.*, Cell, 73:431-435 (1993)]. Existe un patrón repetitivo similar de CDR en varias otras proteínas de la superficie celular, incluyendo el receptor del factor de crecimiento del nervio p75 (NGFR) [Johnson *et al.*, Cell, 47:545 (1986); Radeke *et al.*, Nature, 325:593 (1987)], el antígeno CD40 de las células B [Stamenkovic *et al.*, EMBO J., 8:1403 (1989)], el antígeno OX40 de las células T [Mallet *et al.*, EMBO J., 9: 1063 (1990)] y el antígeno Fas [Yonehara *et al.*, *supra*, e Itoh *et al.*, Cell, 66:233-243 (1991)]. Los CDR también se hallan en las proteínas solubles T2 similares al TNFR (sTNFR) de los virus de la viruela de Shope y mixoma [Upton *et al.*, Virology, 160:20-29 (1987); Smith *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 176:335 (1991); Upton *et al.*, Virology, 184:370 (1991)]. El alineamiento óptimo de estas secuencias indica que las posiciones de los residuos cisteína están bien conservadas. Estos receptores a menudo se denominan de forma conjunta como miembros de la superfamilia del receptor de TNF/NGF.

Los ligandos de la familia del TNF identificados hasta la fecha, con excepción de la linfotóxina- $\alpha$ , son proteínas transmembrana del tipo II, cuyo extremo C-terminal es extracelular. Por contra, la mayoría de los receptores identificados hasta la fecha en la familia del receptor del TNF (TNFR) son proteínas transmembrana del tipo I. No obstante, en ambas familias del ligando y del receptor del TNF, la homología identificada entre los miembros de la familia se ha hallado principalmente en el dominio extracelular ("ECD"). Varias de las citocinas de la familia del TNF, incluyendo el TNF- $\alpha$ , el ligando de Apo-1 y el ligando de CD40, son cortadas proteolíticamente a nivel de la superficie celular; la proteína resultante en cada caso típicamente forma una molécula homotrimérica que funciona como una citocina soluble. Las proteínas de la familia del receptor del TNF también son cortadas proteolíticamente a menudo para liberar ECD solubles del receptor que pueden funcionar como inhibidores de las citocinas cognadas.

Más recientemente, se han identificado otros miembros de la familia del TNFR. En von Bulow *et al.*, Science, 278:138-141 (1997), los investigadores describen un receptor de la membrana plasmática denominado como Activador Transmembrana e Interactor con CAML o "TACI". Se ha descrito que el receptor TACI contiene un motivo rico en cisteína característico de la familia del TNFR. En un ensayo *in vitro*, el entrecruzamiento de TACI, con anticuerpos específicos para TACI, sobre la superficie de células Jurkat transfectadas condujo a la activación del NF-KB. [Ver también, WO 98/39361 publicada el 18 de septiembre de 1998].

Laabi *et al.*, EMBO J., 11:3897-3904 (1992) publicaron la identificación de un nuevo gen denominado "BCM" cuya expresión se halló que coincidía con la maduración terminal de las células B. La pauta de lectura abierta del ADNc normal del BCM predijo un polipéptido de 184 aminoácidos de longitud con un único dominio transmembrana. Estos investigadores más tarde denominaron este gen "BCMA." [Laabi *et al.*, Nucleic Acids Res., 22:1147-1154 (1994)]. Se describió que la expresión del ARNm del BCMA estaba ausente en las líneas de células B humanas cancerosas, las cuales representan la etapa pro-linfocito B, y por tanto se cree que está vinculado a la etapa de diferenciación de los linfocitos [Gras *et al.*, Int. Immunology, 7:1093-1106 (1995)]. En Madry *et al.*, Int. Immunology, 10:1693-1702 (1998), se describió la clonación del BCMA murino. Se ha descrito que el ADNc del BCMA murino codifica un polipéptido de 185 aminoácidos de longitud que tiene un 62% de identidad con el polipéptido del BCMA humano. El alineamiento de las secuencias proteicas murina y humana reveló un motivo conservado de seis cisteínas en la región N-terminal, sugiriendo que la proteína BCMA pertenece a la superfamilia del TNFR [Madry *et al.*, ver más arriba].

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

Pan *et al.* han descrito otro miembro de la familia del receptor del TNF denominado como "DR4" [Pan *et al.*, Science, 276:111-113 (1997); ver también la WO98/32856 publicada el 30 de julio de 1998]. Se informó que el DR4 contenía un dominio de muerte citoplasmático capaz de involucrar el aparato de suicidio de la célula. Pan *et al.* describen que se cree que el DR4 es un receptor para el ligando conocido como Apo2L/TRAIL.

En Sheridan *et al.*, Science, 277:818-821 (1997) y Pan *et al.*, Science, 277:815-818 (1997), se describe otra molécula que se cree es un receptor para el Apo2L/TRAIL [ver también la WO98/51793 publicada el 19 de noviembre de 1998; la WO98/41629 publicada el 24 de septiembre de 1998]. Esa molécula se denomina como DR5 (alternativamente, también se ha denominado como Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 o KILLER [Screaton *et al.*, Curr. Biol., 7:693-696 (1997); Walczak *et al.*, EMBO J., 16:5386-5387 (1997); Wu *et al.*, Nature Genetics, 17:141-143 (1997); WO98/35986, publicada el 20 de agosto 1998; EP 870.827, publicada el 14 de octubre de 1998; WO98/46643, publicada el 22 de octubre de 1998; WO99/02653 publicada el 21 de enero de 1999; WO99/09165, publicada el 25

de febrero de 1999; WO99/11791, publicada el 11 de marzo de 1999]. Al igual que el DR4, se ha informado que el DR5 contiene un dominio de muerte citoplasmático y que es capaz de señalar la apoptosis. La estructura del cristal del complejo formado entre Apo-2L/TRAIL y DR5 se describe en Hymowitz *et al.*, *Molecular Cell*, 4:563-571 (1999).

5 Recientemente, todavía se ha identificado otro receptor que contiene un dominio de muerte, el DR6 [Pan *et al.*, *FEBS Letters*, 431: 351-356 (1998)]. Aparte de contener cuatro dominios extracelulares putativos ricos en cisteínas y un dominio de muerte citoplasmático, se cree que el DR6 contiene una secuencia putativa de cremallera de leucina que se solapa con un motivo rico en prolina en la región citoplasmática. El motivo rico en prolina se parece a secuencias que se unen a los dominios scr-homología-3, los cuales se hallan en muchas moléculas intracelulares transductoras de  
10 señal.

Un grupo adicional de receptores recientemente identificados se denomina como "receptores de señuelo", los cuales se cree que funcionan como inhibidores, en vez de como transductores de señal. Este grupo incluye el DCR1 (también denominado como TRID, LIT o TRAIL-R3) [Pan *et al.*, *Science*, 276:111-113 (1997); Sheridan *et al.*, *Science*, 277:818-821 (1997); McFarlane *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:25417-25420 (1997); Schneider *et al.*, *FEBS Letters*, 416:329-334 (1997); Degli-Esposti *et al.*, *J. Exp. Med.*, 186:1165-1170 (1997); y Mongkolsapaya *et al.*, *J. Immunol.*, 160:3-6 (1998)] y el DCR2 (también llamado TRUND o TRAIL-R4) [Marsters *et al.*, *Curr. Biol.*, 7:1003-1006 (1997); Pan *et al.*, *FEBS Letters*, 424:41-45 (1998); Degli-Esposti *et al.*, *Immunity*, 7:813-820 (1997)], ambos moléculas de la superficie celular; así como el OPG [Simonet *et al.*, *supra*; Emery *et al.*, *infra*] y el DCR3 [Pitti *et al.*,  
20 *Nature*, 396:699-703 (1998)], los cuales son ambas proteínas solubles, secretadas.

Los miembros adicionales recientemente identificados de la familia del TNFR incluyen el CAR1, HVEM, GITR, ZTNFR-5, NTR-1, and TNFL1 [Brojatsch *et al.*, *Cell*, 87:845-855 (1996); Montgomery *et al.*, *Cell*, 87:427-436 (1996); Marsters *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:14029-14032 (1997); Nocentini *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:6216-6221 (1997); Emery *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273:14363-14367 (1998); WO99/04001 publicada el 28 de enero de 1999; WO99/07738 publicada el 18 de febrero de 1999; WO99/33980 publicada el 8 de julio de 1999].

Tal como ha sido recientemente revisado por Tewari *et al.*, TNFR1, TNFR2 y CD40 modulan la expresión de las citocinas proinflamatorias y coestimuladoras, de los receptores de citocinas, y de las moléculas de adhesión de  
30 células, a través de la activación del factor de transcripción NF-KB [Tewari *et al.*, *Curr. Op. Genet. Develop.*, 6:39-44 (1996)]. El NF-KB es el prototipo de una familia de factores de transcripción dimericos cuyas subunidades contienen regiones Rel conservadas [Verma *et al.*, *Genes Develop.*, 9:2723-2735 (1996); Baldwin, *Ann. Rev. Immunol.*, 14:649-681 (1996)]. En su forma latente, el NF-KB está complejado con miembros de la familia de inhibidores IKB; a partir de la interacción del IKB en respuesta a ciertos estímulos, el NF-KB liberado se transloca al núcleo, en donde se une a  
35 secuencias de ADN específicas y activa la transcripción de genes. Tal como se ha descrito más arriba, los miembros de la familia del TNFR identificados hasta la fecha, o incluyen o carecen de una región dominio de muerte intracelular. Algunas moléculas TNFR que carecen de un dominio de muerte, tales como el TNFR2, CD40, HVEM y GITR, son capaces de modular la actividad del NF-KB. [Consultar, por ejemplo, Lotz *et al.*, *J. Leukocyte Biol.*, 60:1-7 (1996)].

40 Para una revisión de la familia de citocinas del TNF y sus receptores, consultar Ashkenazi y Dixit, *Science*, 281:1305-1308 (1998); Golstein, *Curr. Biol.*, 7:750-753 (1997); Gruss and Dower, ver más arriba, y Nagata, *Cell*, 88:355-365 (1997).

WO-A-00/75191, publicada el 14 de diciembre de 2000, describe procedimientos para usar agonistas del receptor del Apo-2L y el CPT-11 para inducir la apoptosis y suprimir el crecimiento de las células cancerosas.

Xiang *et al.*, "Proceedings of the American Association for Cancer Research", 42, 643, Resumen #3457, marzo de 2001, describe la apoptosis potenciada de células tumorales mediante Apo2L/TRAIL combinados y CPT-11.

## 50 **Resumen de la invención**

Los solicitantes han hallado sorprendentemente que la administración secuencia de CPT-11 y del polipéptido Apo-2L puede actuar sinérgicamente para inducir la apoptosis en células de mamífero, particularmente en células cancerosas de mamífero.

55 La invención proporciona varios usos médicos y procedimientos *in vitro* para el uso del ligando de Apo-2 y del CPT-11 para inducir la apoptosis en células de mamífero tal y como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, la invención proporciona procedimientos para inducir la apoptosis, los cuales comprenden exponer una célula de mamífero, tal como una célula cancerosa, al CPT-11 y a uno o más agonistas de receptores del ligando de Apo-2, en  
60 donde el CPT-11 se administra a células pretratadas antes del agonista o agonistas de ligando de Apo-2.

Las células pueden estar en un cultivo celular o en un mamífero, por ejemplo, un mamífero que padece de cáncer o de una enfermedad en los cuales es deseable la inducción de la apoptosis en las células. Por tanto, la invención incluye procedimientos para tratar un mamífero que padece cáncer, los cuales comprenden administrar una cantidad efectiva  
65 de ligando de Apo-2 y CPT-11, según se describe en la presente invención.

En realizaciones opcionales, se proporcionan usos médicos y procedimientos *in vitro* para potenciar la apoptosis en células cancerosas de mamífero, los cuales comprenden exponer células cancerosas de mamífero a una cantidad

efectiva de CTP-11 y agonista del receptor del ligando de Apo-2, en donde dichas células cancerosas de mamífero se exponen al CPT-11 de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 72 horas antes de la exposición a dicho agonista del receptor del ligando de Apo-2, tal y como se define en las reivindicaciones. Los procedimientos pueden comprender la exposición de dichas células de cáncer de mamífero a una cantidad efectiva de CTP-11, el cual induce la regulación al alza del receptor DR4 o del receptor DR5 en dichas células. Opcionalmente, las células cancerosas de mamífero se exponen al CPT-11 aproximadamente 24 o 48 horas antes de la exposición a dicho agonista del receptor del ligando de Apo-2. El agonista del receptor del ligando de Apo-2 incluye polipéptido Apo2L.

En realizaciones opcionales, se proporcionan usos médicos del CPT-11 y de los agonistas del receptor del ligando de Apo-2 en procedimientos para tratar el cáncer en un mamífero, los cuales comprenden administrar a un mamífero que tiene cáncer una cantidad efectiva del CPT-11 y del agonista del receptor del ligando de Apo-2, en donde dicho CPT-11 se administra desde aproximadamente 6 horas hasta aproximadamente 72 horas antes de la administración del agonista del receptor del ligando de Apo-2, tal y como se define en las reivindicaciones. El agonista del receptor del ligando de Apo-2 incluye polipéptido Apo2L.

Las composiciones que comprenden el ligando de Apo-2 y/o el CPT-11 se describen en la presente invención. Opcionalmente, las composiciones incluirán portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, las composiciones incluirán el ligando de Apo-2 y/o el CPT-11 en una cantidad que es efectiva para inducir sinérgicamente la apoptosis en células de mamífero.

También se describen en la presente invención artículos manufacturados y equipos que incluyen el ligando de Apo-2 y/o el CPT-11.

### Descripción resumida de las figuras

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

La Figura 2 muestra el efecto del Apo-2L (60 mg/kg) (cuadrados vacíos), CPT-11 (80 mg/kg) (triángulos rellenos), Apo-2L ("Apo2L.0") más CPT-11 (cuadrados rellenos), mAb 4H6 anti-DR4 (triángulos vacíos), mAb anti-DR4 más CPT-11 (triángulos rellenos) o vehículo solo (círculos vacíos) sobre el crecimiento de células de carcinoma de colon humano inyectadas subcutáneamente en ratones desnudos atímicos.

Las Figuras 3A-3H muestran la caracterización fluorescente de células tumorales muertas o vivas. Los cultivos de HCT116 se trataron con Apo2L/TRAIL, CPT-11, y Apo2L/TRAIL + CPT-11, respectivamente durante 2 y 24 horas. A continuación de su incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con los colorantes fluorescentes, se examinaron las células con un microscopio fluorescente. Las células positivas para calceína (marcadas en verde) indican células vivas, mientras que la tinción positiva con homodímero-1 de etidio (fluorescencia roja) representa células muertas o seriamente dañadas en las Figuras 3E, 3F, y 3G.

La Figura 4 muestra que el CPT-11 potenció *in vitro* la apoptosis mediada por Apo2L/TRAIL. Los cultivos de HCT116 se incubaron con CPT-11 (50  $\mu\text{g/ml}$ ), Apo2L/TRAIL (1  $\mu\text{g/ml}$ ), y Apo2L/TRAIL + CPT-11, durante 24 horas. El número de células vivas se determinó mediante un ensayo con Azul de Alamar (media + SD, n = 2). El porcentaje de células supervivientes en la muestra se normalizó respecto el tratamiento control.

Las Figuras 5A-5D muestran como la sensibilización con CPT-11 de la actividad caspasa-3 inducida por Apo2L/TRAIL depende del tiempo. Se trataron células HCT116 durante 2 y 24 horas con Apo2L/TRAIL (1  $\mu\text{g/ml}$ ), CPT-11 (50  $\mu\text{g/ml}$ ), y Apo2L/TRAIL + CPT-11. Se ensayó el procesado de pro-caspasa-3 en alícuotas equivalentes de lisados de células mediante análisis de transferencia Western (5A y 5B), y la actividad caspasa-3 mediante un ensayo fluorimétrico (5C y 5D).

Las Figuras 6A-6B muestran cambios de las HCT116 en la expresión de los genes de DR5 (6A) y DR4 (6B) a continuación del tratamiento con Apo2L/TRAIL y CPT-11 solos o en combinación. Los niveles de ARNm de DR5 y DR4 ARNm se determinaron mediante ensayo del ADNb a continuación de la incubación con Apo2L/TRAIL (1  $\mu\text{g/ml}$ ), CPT-11 (50  $\mu\text{g/ml}$ ), Apo2L/TRAIL + CPT-11 durante 2, 6 y 24 horas, respectivamente. Los valores relativos se calcularon como proporciones respecto el GAPDH, y se normalizaron respecto los cultivos control no tratados.

Las Figuras 7A-7B muestran que el Z-VAD no bloqueó la inducción del DR5 (7A) y DR4 (7B) en células HCT116 a continuación del tratamiento con Apo2L/TRAIL y CPT-11, solos o en combinación. Los niveles de ARNm de DR5 y DR4 ARNm se determinaron mediante ensayo del ADNb a continuación de la incubación con Apo2L/TRAIL (1  $\mu\text{g/ml}$ ), CPT-11 (50  $\mu\text{g/ml}$ ), Apo2L/TRAIL + CPT-11 durante 2, 6 y 24 horas, respectivamente. Los valores relativos se calcularon como proporciones respecto el GAPDH, y se normalizaron respecto los cultivos control no tratados.

La Figura 8 muestra que el CPT-11 (pero no el tratamiento con Apo2L/TRAIL) resulta en un incremento en los niveles de proteína p53 en células HCT116 y HUVEC. Los niveles de proteína p53 se caracterizaron mediante análisis de transferencia Western en cultivos celulares de HCT116 y HUVEC tratados durante 2 y 24 horas.

La Figura 9 muestra que el tratamiento con Apo2L/TRAIL suprime la inducción mediada por el CPT-11 de los niveles de proteína p21 en las células tumorales pero no en las células HUVEC. Se trataron células tumorales HCT116 de colon humano y células HUVEC normales durante 2 y 24 horas con Apo2L/TRAIL (1  $\mu\text{g/ml}$ ), CPT-11 (50  $\mu\text{g/ml}$ ), y Apo2L/TRAIL + CPT-11. Se ensayaron alícuotas equivalentes de lisados celulares (50  $\mu\text{g/carril}$ ) en busca de la expresión de la proteína p21 mediante análisis de transferencia Western.

La Figura 10 muestra que los niveles de proteína FLIP inhibidora de la caspasa-8 no cambian después del tratamiento. Se trataron células tumorales HCT116 humanas de colon durante 2 y 24 horas con Apo2L/TRAIL (1  $\mu\text{g/ml}$ ), CPT-11 (50  $\mu\text{g/ml}$ ), y Apo2L/TRAIL + CPT-11 (1  $\mu\text{g/ml}$ ). A continuación del tratamiento, se procesaron los cultivos celulares mediante análisis del ciclo celular con citometría de flujo.

La Figura 11 muestra que Apo2L/TRAIL suprime la detención del ciclo celular en G2/M inducida por el CPT-11. Se trataron células tumorales HCT116 durante 2, 6 y 24 horas con Apo2L/TRAIL (1  $\mu\text{g/ml}$ ), CPT-11 (50  $\mu\text{g/ml}$ ), y Apo2L/TRAIL + CPT-11. A continuación del tratamiento, se procesaron los cultivos celulares mediante análisis del ciclo celular con citometría de flujo.

La Figura 12 muestra que el inhibidor Z-VAD (I) de la caspasa tiene un efecto diferencial sobre los niveles de p53 y p21. Los cultivos celulares se trataron con o sin 20  $\mu\text{M}$  de Z-VAD durante 24 horas. Los lisados celulares se procesaron mediante análisis de transferencia Western de los niveles de las proteínas p53 y p21.

La Figura 13 muestra el tratamiento con Apo2L/TRAIL en presencia del inhibidor de caspasa ZVAD no consigue prevenir la detención en G2-M inducida por el CPT-11. Se trataron células tumorales HCT116 durante 24 horas con Apo2L/TRAIL (1  $\mu\text{g/ml}$ ), CPT-11 (50  $\mu\text{g/ml}$ ), y Apo2L/TRAIL + CPT-11, en presencia de 20  $\mu\text{M}$  de Z-VAD. A continuación del tratamiento, se procesaron los cultivos celulares mediante análisis del ciclo celular con citometría de flujo.

Las Figuras 14A-14B muestran que el tratamiento secuencial potencia la destrucción celular total en células tumorales. A. En el grupo de combinación, las células HCT116 se expusieron al CPT-11 (10 microgramos/ml) y a diferentes concentraciones de Apo2L/TRAIL (tal y como se indica en la figura) durante un total de 24 horas, seguidas por otras 24 horas de incubación en presencia del medio solo. En el grupo secuencial, las células se expusieron durante las 24 horas iniciales al CPT-11, a continuación se cambiaron a medio que contenía Apo2L/TRAIL durante otras 24 horas. La supervivencia celular se determinó mediante el ensayo del violeta cristal tal y como se describe en los Ejemplos (promedio  $\pm$  SD, n = 4). B. Las células HCT116 (en combinación) se expusieron al CPT-11 (10 microgramos/ml) y a diferentes concentraciones de Apo2L/TRAIL durante un total de 24 horas, seguidas por otras 120 horas de incubación en presencia del medio solo. En el grupo secuencial, las células se expusieron durante las 24 horas iniciales al CPT-11, a continuación se cambiaron a medio que contenía Apo2L/TRAIL durante otras 24 horas, seguidas por incubación en medio libre de fármacos durante 96 horas, y se ensayó la supervivencia celular como más arriba.

La Figura 15 muestra que la sustitución con SN-38 en vez de CPT-11 en los tratamientos en combinación y secuencial resulta en una destrucción potenciada similar de células tumorales. En el grupo de combinación, las células HCT116 se expusieron al SN-38 (0,05 microgramos/ml) y a dos concentraciones de Apo2L/TRAIL (tal y como se indica en la figura) durante un total de 24 horas, seguidas por otras 24 horas de incubación en presencia del medio solo. En el grupo secuencial, las células se expusieron durante las 24 horas iniciales al SN-38, a continuación se cambiaron a medio que contenía Apo2L/TRAIL durante otras 24 horas. La supervivencia celular se determinó mediante el ensayo del violeta cristal tal y como se describe en los Ejemplos (promedio  $\pm$  SD, n = 4).

## Descripción detallada de la invención

### I. Definiciones

Los términos “apoptosis” y “actividad apoptótica” se usan en un sentido amplio y se refieren a la forma ordenada o controlada de muerte celular en mamíferos que está acompañada típicamente por uno o más cambios característicos, incluyendo la condensación del citoplasma, la pérdida de las microvellosidades de la membrana plasmática, la segmentación del núcleo, la degradación del ADN cromosómico, o la pérdida de la función mitocondrial. Esta actividad puede determinarse y medirse usando técnicas conocidas en el estado de la tecnología, por ejemplo, los ensayos de viabilidad celular, los análisis de FACS o de electroforesis de ADN, y más específicamente, mediante la unión de anexina V, la fragmentación del ADN, la segmentación con PARP, la contracción celular, la dilatación del retículo endoplasmático, y/o la formación de vesículas de la membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). Estas técnicas y ensayos se describen en la técnica, por ejemplo, en WO97/25428 y WO97/01633. Opcionalmente, la actividad apoptótica puede medirse usando los ensayos descritos en los Ejemplos.

Tal y como se utiliza en la presente invención, los términos “sinergia” o “cooperación” o “sinérgicamente” se refieren a la interacción de dos o más agentes de forma que su efecto combinado es mayor que la suma de sus efectos individuales.

Los términos “ligando de Apo-2”, “Apo-2L”, o “TRAIL” se usan en la presente invención para referirse a un polipéptido que incluye los residuos aminoácidos 95-281, ambos inclusive, 114-281, ambos inclusive, residuos 91-281, ambos inclusive, residuos 92-281, ambos inclusive, residuos 41-281, ambos inclusive, residuos 15-281, ambos

inclusive, o residuos 1-281, ambos inclusive, de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1A de Pitti *et al.*, J. Biol. Chem., 271:12687-12690 (1996) (mostrada en la presente invención en el Listado de Secuencia como la SEC. N° ID.: 1), así como los fragmentos biológicamente activos (por ejemplo, que tienen actividad apoptótica), y variantes de las secuencias anteriores por supresión, inserción o sustitución. En una realización, la secuencia polipeptídica comprende los residuos 114-281 de la SEC. N° ID.: 1. Opcionalmente, la secuencia polipeptídica comprende al menos los residuos 91-281 o los residuos 92-281 de la SEC. N° ID.: 1). En otra realización preferida, los fragmentos o variantes biológicamente activos tienen al menos aproximadamente un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente aproximadamente al menos el 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, y aún más preferiblemente, al menos aproximadamente el 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con una cualquiera de las secuencias anteriores. La definición abarca las variantes por sustitución del ligando de Apo2 que comprenden los aminoácidos 91-281 de la Figura 1A de Pitti *et al.*, J. Biol. Chem., 271:12687-12690 (1996) (SEC. N° ID.: 1), en la cual al menos unos de los aminoácidos en las posiciones 203, 218 o 269 (usando la numeración de la secuencia proporcionada en Pitti *et al.*, ver más arriba (SEC. N° ID.: 1)) están sustituidos por un residuo alanina. La definición abarca el ligando de Apo-2 aislado a partir de una fuente de ligando de Apo-2, tal como a partir de tipos de tejidos humanos, o a partir de otra fuente, o preparados mediante procedimientos recombinantes y/o sintéticos. El término ligando de Apo-2 se refiere también a los polipéptidos descritos en WO 97/25428, ver más arriba, y WO97/01633, ver más arriba. Se contempla que el polipéptido de ligando de Apo-2 pueda estar unido a una o más moléculas poliméricas, tales como el polietilenglicol.

El término “CPT-11” se usa en un sentido general, y se refiere al agente quimioterapéutico o de quimioterapia que es de la clase inhibidores de la topoisomerasa I. El término “CPT-11” tal y como se utiliza en la presente invención incluye los agentes quimioterapéuticos que tienen el nombre químico (4S)-4,11-dietil-4-hidroxi-9-[(4-piperidino-piperidino)carboniloxil]-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino [1,2-β]quinolina-3,14(4H,12H)diona hidrocloreto trihidrato, y los nombres irinotecán, camptotecina, topotecán, o Camptosar<sup>®</sup>, así como los derivados solubles en agua de los mismos, o las sales farmacéuticamente aceptable de tales agentes. El hidrocloreto de irinotecán tiene la fórmula empírica C<sub>33</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>\*HCl\*3H<sub>2</sub>O y un peso molecular de aproximadamente 677,19. Tales nombres químicos y fórmulas químicas serán fácilmente familiares a los especialistas en la técnica. Camptosar<sup>®</sup> está disponible comercialmente de Pharmacia & Upjohn y su comercialización en los Estados Unidos está aprobada por la FDA. El prospecto del producto del Camptosar<sup>®</sup> indica que la molécula puede usarse para el tratamiento de pacientes humanos con carcinoma colorrectal metastático cuya enfermedad haya recurrido o progresado a continuación de una terapia basada en 5-FU. Se contempla que el CPT-11 pueda estar unido a una o más moléculas poliméricas, tales como el polietilenglicol.

“Porcentaje (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos”, en relación a las secuencias polipeptídicas de Apo-2L identificadas en la presente invención, se define como el porcentaje de residuos aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácidos en una secuencia de Apo-2L, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máxima porcentaje de identidad de la secuencia, y no considerando ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de la secuencia. Los alineamientos para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de varias formas que se hallan dentro de los conocimientos del campo, por ejemplo, usando programas de ordenador disponibles públicamente, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los especialistas en la técnica pueden terminar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualesquier algoritmos necesarios para conseguir el alineamiento máximo a lo largo de las secuencias de longitud completa que se están comparando. Opcionalmente, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se obtienen usando el programa de ordenador ALIGN-2 para comparación de secuencias. El programa de ordenador ALIGN-2 para comparación de secuencias fue escrito por Genentech, Inc., y el código fuente se ha registrado con la documentación para el usuario en la U.S. Copyright Office, Washington, DC, 20559, en donde se halla registrado con el n° de U.S. Copyright Registration TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 debería compilarse para ser usado en un sistema operativo UNIX, preferiblemente el UNIX V4,0D de Digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían. Sin embargo, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos podría haberse determinado también usando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 puede descargarse de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, en donde todos esos parámetros de búsqueda se ajustan a valores por defecto, incluyendo, por ejemplo, desenmascarar = yes, hebra = all, acontecimientos esperados = 10, longitud mínima para la baja complejidad = 15/5, valor e para “multi-pass” = 0,01, constante para “multi-pass” = 25, disminución para el alineamiento final espaciado = 25, y matriz de puntuación = BLOSUM62.

El término “anticuerpo”, cuando se usa en referencia a un “anticuerpo agonista anti-receptor del ligando de Apo-2” se usan en el sentido más amplio y abarca específicamente, sin limitación, los anticuerpos monoclonales intactos, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y los fragmentos de anticuerpos a condición de que unan uno o más receptores de ligando de Apo-2, y/o sean capaces de activar la vía de señalización de la apoptosis de la célula de mamífero que expresa uno o más de los receptores de ligando de Apo-2, o imitar (por ejemplo, ser comparable o al menos igual a) la actividad apoptótica del ligando de Apo-2, o tener una actividad apoptótica mayor que la del ligando de Apo-2.

“Receptor del ligando de Apo-2” incluye los receptores conocidos en el campo como “DR4” y “DR5”. Pan *et al.* han descrito el miembro de la familia del receptor del TNF conocido como “DR4” [Pan *et al.*, Science, 276:111-113

(1997); consultar también WO98/32856 publicada el 30 de julio de 1998]. Se informó que el receptor DR4 contenía un dominio de muerte citoplasmático capaz de involucrar el aparato de suicidio de la célula. Pan *et al.* describen que se cree que el DR4 es un receptor para el ligando conocido como Apo2L/TRAIL. La secuencia de aminoácidos del receptor DR4 de longitud completa se proporciona en la presente invención en la SEC. N° ID.: 2. Sheridan *et al.*, Science, 277:818-821 (1997) y Pan *et al.*, Science, 277:815-818 (1997) describen otro receptor para el Apo2L/ TRAIL [ver también, WO98/51793 publicada el 19 de noviembre de 1998; WO98/41629 publicada el 24 de septiembre de 1998]. Este receptor se denomina como DR5 (alternativamente, el receptor también se ha denominado como Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 o KILLER; Sreaton *et al.*, Curr. Biol., 7:693-696 (1997); Walczak *et al.*, EMBO J., 16:5386-5387 (1997); Wu *et al.*, Nature Genetics, 17:141-143 (1997); WO98/35986, publicada el 20 de agosto 1998 (correspondiente a la Patente estadounidense concedida n° 6.072.047); EP 870.827, publicada el 14 de octubre de 1998; WO98/46643, publicada el 22 de octubre de 1998; WO99/02653 publicada el 21 de enero de 1999; WO99/09165, publicada el 25 de febrero de 1999; WO99/11791, publicada el 11 de marzo de 1999]. Al igual que el DR4, se ha informado que el DR5 contiene un dominio de muerte citoplasmático y que es capaz de señalar la apoptosis. La secuencia de longitud completa del receptor DR5 en WO98/35986 (correspondiente a la Patente estadounidense n° 6.072.047) se describe que es un polipéptido de 440 aminoácidos, y esa secuencia de aminoácidos se proporciona en la SEC. N° ID.: 3. La secuencia de longitud completa del receptor DR5 en WO98/51793 se describe que es un polipéptido de 411 aminoácidos, y esa secuencia de aminoácidos se proporciona en la SEC. N° ID.: 4. Como se ha descrito más arriba, otros receptores para el Apo-2L incluyen el DcR1, DcR2, y OPG [ver, Sheridan *et al.*, ver más arriba; Marsters *et al.*, ver más arriba; y Simonet *et al.*, ver más arriba]. El término “receptor del Apo-2L” cuando se usa en la presente invención abarca el receptor de secuencia nativa y las variantes del receptor. Estos términos abarcan el receptor del Apo-2L expresado en una variedad de mamíferos, incluyendo los humanos. El receptor del Apo-2L puede expresarse endógenamente, tal como ocurre de forma natural en una variedad de líneas de tejidos humanos, o puede expresarse mediante procedimientos recombinantes o sintéticos. Una “secuencia nativa del receptor del Apo-2L” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un receptor Apo-2L derivado de la naturaleza. Por tanto, un receptor del Apo-2L de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos de un receptor del Apo-2L que ocurra de forma natural procedente de cualquier mamífero. Tal receptor del Apo-2L de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse mediante medios recombinantes o sintéticos. El término “receptor del Apo-2L de secuencia nativa” abarca específicamente las formas truncadas o secretadas del receptor que ocurren de forma natural (por ejemplo, una forma soluble que contiene, por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas variantes que ocurren de forma natural (por ejemplo, formas ajustadas de forma alternativa), y variantes alélicas que ocurren de forma natural. Las variantes del receptor pueden incluir fragmentos o mutantes por supresión de la secuencia nativa del receptor del Apo-2L.

El término “anticuerpo monoclonal” tal como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que ocurren de forma natural que podrían estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y están dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales, las cuales típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que se sintetizan en cultivos de hibridomas, sin contaminación por parte de otras inmunoglobulinas. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo en el sentido que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe limitarse en el sentido de requerir la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento determinado. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonados para ser usado de acuerdo con la presente invención podrían prepararse mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975), o podrían prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, patente estadounidense n° 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también podrían aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en la presente incluyen específicamente los anticuerpos (inmunoglobulinas) “quiméricos”, en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a, u homóloga de, las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de una especie determinada, o pertenecientes a una determinada clase o subclase de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena o cadena son idénticas con, u homólogas de, las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de otra especie, o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, con tal que exhiban la actividad biológica deseada (Patente Estadounidense n° 4.816.567; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)).

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedor) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas (tales como los Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, u otras subsecuencias unidoras de antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales se reemplazan residuos procedentes de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor con residuos procedentes de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como el ratón, la rata o conejo, que tienen especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructura (FR) Fv se reemplazan con residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados podrían comprender residuos que no se hallan ni en el anticuerpo receptor ni en el CDR ni en las secuencias estructurales importadas. Estas modificaciones se hacen para refinar aún más y maximizar las prestaciones del anticuerpo. En general, el anticuerpo

humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos un, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado, óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, consultar Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, Nature, 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo PRIMATIZED™, en donde la región unidora de antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido inmunizando monos macacos con el antígeno de interés.

Los anticuerpos son típicamente proteínas o polipéptidos que exhiben especificidad de unión para un antígeno específico. Los anticuerpos nativos son usualmente glicoproteínas heterotetraméricas compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Típicamente, cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera tiene también puentes disulfuro intracatenarios espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V<sub>H</sub>) seguido por un cierto número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variables en un extremo (V<sub>L</sub>), y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineada con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que determinados residuos aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de la cadenas ligera y pesada [Clothia *et al.*, J. Mol. Biol., 186:651-663 (1985); Novotny y Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-4596 (1985)]. Las cadenas ligeras de los anticuerpos de cualquier especie vertebrada pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencias de aminoácidos del dominio constantes de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3, e IgG-4; IgA-1 e IgA-2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan respectivamente alfa, delta, épsilon, lambda, y mu.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, generalmente la región variable o unidora de antígeno del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y Fv, los diacuerpos, las moléculas de anticuerpo de cadena simple, y los anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término "variable" se usa en la presente invención para describir ciertas porciones de los dominios variables que difieren en su secuencia entre los anticuerpos, y que se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo concreto por su antígeno concreto. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas, comprenden cada uno de ellos cuatro regiones FR, que mayoritariamente adoptan una configuración de hoja-β, conectadas por tres CDR, los cuales forman bucles de conexión, y en algunos casos forman parte de la estructura de hoja-β. Los CDR en cada cadena se mantienen juntos en estrecha proximidad por las regiones FR y, con los CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión de antígeno de los anticuerpos [ver Kabat, E.A. *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987)]. Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales en la presente invención incluyen los anticuerpos quiméricos, híbridos y recombinantes producidos mediante el ajuste de un dominio variable (incluyendo el hipervariable) de un anticuerpo anti-receptor del Apo-2L, con un dominio constante (por ejemplo, anticuerpos "humanizados"), o una cadena ligera con una cadena pesada, o una cadena procedente de una especie con una cadena procedente de otra especie, o fusiones con proteínas heterólogas, sin importar la especie de origen o la clasificación de clase o subclase de la inmunoglobulina, así como los fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, y Fv), con tal que exhiban las deseadas actividad o propiedades biológicas. Ver, por ejemplo, la Patente Estadounidense n° 4.816.567 y Mage *et al.*, en "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications", pp. 79-97 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987).

Un "anticuerpo humano" es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un humano, y/o que se ha construido usando cualquiera de las técnicas para construir anticuerpos humanos según se describe en la presente invención. Esta definición de un anticuerpo humano específicamente excluye un anticuerpo humanizado que comprende residuos unidores de antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando varias técnicas conocidas en el campo. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona a partir de una biblioteca de fagos, en donde la biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan *et al.* Nature Biotechnology, 14:309-314 (1996); Sheets *et al.* PNAS, (USA) 95:6157-6162 (1998); Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). Los anticuerpos humanos pueden prepararse también mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo ratones, en los que los genes de la inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. A partir de su desafío, se observa la producción de anticuerpo humano, el cual se parece mucho al observado en humanos en todos los

aspectos, incluyendo la reordenación del gen, el ensamblado y el repertorio del anticuerpo. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825 ; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, Bio/Technology, 10:779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature, 368:856-859 (1994); Morrison, Nature, 368:812-813 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology, 14:845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14:826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995). Alternativamente, el anticuerpo humano puede prepararse a través de la inmortalización de linfocitos B humanos que produzcan un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (tales linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o pueden haberse inmunizado *in vitro*). Consultar, por ejemplo, Cole *et al.*, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, J. Immunol., 147 (1):86-95 (1991); y la patente estadounidense n° 5.750.373.

El término "región Fc" se usa para definir la región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, la cual puede generarse mediante digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina puede variar, la región Fc de la cadena pesada de una IgG humana se define usualmente para abarcar desde un residuo aminoácido en aproximadamente la posición Cys226, o desde aproximadamente la posición Pro230, hasta el extremo carboxilo terminal de la región Fc (usando en la presente invención el sistema de numeración según Kabat *et al.*, ver más arriba). La región Fc de una inmunoglobulina generalmente comprende dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y opcionalmente comprende un dominio CH4.

Por "cadena de la región Fc" en la presente invención se quiere indicar una de las dos cadenas polipeptídicas de una región Fc.

El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana (también conocida como dominio "C $\gamma$ 2") usualmente se extiende desde un residuo aminoácido en aproximadamente la posición 231 hasta un residuo aminoácido en aproximadamente la posición 340. El dominio CH2 es único en tanto que no está estrechamente emparejado con otro dominio. Al contrario, hay dos cadenas de carbohidratos ramificadas unidas a N interpuestas entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta. Se ha especulado que los carbohidratos pueden proporcionar un sustituto para el emparejamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, Molec. Immunol., 22:161-206 (1985). El dominio CH2 en la presente invención puede ser un dominio CH2 de secuencia nativa o un dominio CH2 variante.

El "dominio CH3" comprende la extensión de residuos C-terminales respecto un dominio CH2 en una región Fc (es decir, desde un residuo aminoácido en aproximadamente la posición 341 hasta un residuo aminoácido en aproximadamente la posición 447 de una IgG). La región CH3 en la presente invención puede ser dominio CH3 de secuencia nativa o un dominio CH3 variante (por ejemplo, un dominio CH3 con una "protuberancia" introducida en una cadena del mismo, y una "cavidad" correspondiente en la otra cadena del mismo; consultar la patente estadounidense n° 5.821.333).

La "región gozne" se define generalmente como la extensión desde aproximadamente Glu216, o aproximadamente Cys226, hasta aproximadamente Pro230 de la IgG1 humana (Burton, Molec. Immunol., 22:161-206 (1985)). Las regiones goznes de otros isotipos de la IgG puede alinearse con la secuencia de la IgG1 colocando el primero y último residuos cisteína, que forman enlaces S-S entre cadenas pesadas, en las mismas posiciones. La región gozne en la presente invención puede ser una región gozne nativa o una región gozne variante. Las dos cadenas polipeptídicas de una región gozne variante generalmente retienen al menos un residuo cisteína por cadena polipeptídica, de forma que las dos cadenas polipeptídicas de la región gozne variante pueden formar un puente disulfuro entre las dos cadenas. La región gozne preferida en la presente invención es una región gozne humana de secuencia nativa, por ejemplo, una región gozne de IgG1 humana de secuencia nativa.

Una "región Fc funcional" posee al menos una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" ilustrativas incluyen la unión al C1q; la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); la unión al receptor de Fc; la citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpo (ADCC); la fagocitosis; la regulación a la baja de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de las células B; BCR), etcétera. Tales funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc esté combinada con un dominio unidor (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo), y puede evaluarse usando varios ensayos conocidos en el estado de la técnica para evaluar tales funciones efectoras de anticuerpo.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc hallada en la naturaleza. Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Preferiblemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido cuando se compara con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido matriz, por ejemplo, desde aproximadamente una hasta diez sustituciones de aminoácidos, y preferiblemente desde aproximadamente una hasta cinco sustituciones de aminoácidos, en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido matriz. La región Fc variante en la presente invención preferiblemente posee al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencia con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido matriz, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia con la misma, más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia con la misma.

Los términos “receptor de Fc” y “FcR” se usan para describir un receptor que une la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Más aún, un FcR preferido es uno que une un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye los receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo las variantes alélicas y las formas ajustadas alternativamente de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen el FcγRIIA (un “receptor activador”) y el FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), los cuales tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de las mismas. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático (revisado en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). Los FcR se han revisado en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-492 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-341 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identificarán en el futuro, se hallan abarcados por el término “FcR” en la presente invención. El término incluye también el receptor neonatal, FcRn, el cual es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.*, 117:587 (1976); y Kim *et al.*, *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

Un anticuerpo “de afinidad madurada” es uno con una o más alteraciones en una o más de las CDR del mismo, la cuales resultan en una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo matriz que no posea esas alteraciones. Los anticuerpos de afinidad madurada tendrán afinidades nanomolares, o incluso picomolares, por el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madurada se producen mediante procedimientos conocidos en el estado de la técnica. Marks *et al.* *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992) describe la maduración de la afinidad mediante barajadura de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de los residuos de la CDR y/o estructurales ha sido descrita por: Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci. USA*, 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.* *Gene*, 169:147-155 (1995); Yelton *et al.* *J. Immunol.*, 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.*, 154(7):3310-3319 (1995); y Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992).

Los términos “agonista” y “agonístico” cuando se usan en la presente invención se refieren o describen una molécula que es capaz de, directa o indirectamente, inducir, promover o potenciar sustancialmente la actividad biológica o la activación de un receptor del ligando de Apo-2. Opcionalmente, un “anticuerpo agonista contra el receptor de Apo-2L” es un anticuerpo que tiene actividad que imita o es comparable a la del ligando de Apo-2. Preferiblemente, el agonista es una molécula que es capaz de inducir la apoptosis en una célula de mamífero, preferiblemente en una célula cancerosa de mamífero. Aún más preferiblemente, el agonista es un anticuerpo dirigido contra un receptor de Apo-2L, y dicho anticuerpo tiene actividad apoptótica que es igual o mayor de la del polipéptido Apo-2L descrito en el Ejemplo 1. Opcionalmente, la actividad agonista de tal molécula puede determinarse ensayando la molécula, sola o en una forma entrecruzada usando la Fc de inmunoglobulina o complemento (descrito más abajo), en un ensayo descrito en el Ejemplo 2 para examinar la apoptosis de células 9D o de otras células que expresan un receptor para el Apo-2L, tal como el DR4 o DR5. Se contempla que el agonista pueda estar unido a una o más moléculas poliméricas, tales como el polietilenglicol.

“Aislado”, cuando se usa para describir las diversas proteínas descritas en la presente, significa una proteína que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que típicamente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos de la proteína, y podrían incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En las realizaciones preferidas, la proteína se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa rotatoria, o (2) hasta su homogeneidad según SDS-PAGE, en condiciones reductoras o no reductoras, usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. La proteína aislada incluye la proteína *in situ* dentro de células recombinantes, puesto que al menos uno componente del entorno natural de la proteína no estará presente. Sin embargo, ordinariamente, la proteína aislada se preparará mediante al menos un paso de purificación.

“Biológicamente activo” o “actividad biológica” para los propósitos en la presente invención significa (a) que tiene la capacidad de inducir o estimular o inhibir la apoptosis en al menos un tipo de célula de mamífero (tal como una célula cancerosa) o célula infectada viralmente, *in vivo* o *ex vivo*; (b) es de elicitar un anticuerpo, es decir, es inmunogénico; o (c) retiene la actividad de un polipéptido de ligando de Apo-2 nativo o que ocurre de forma natural.

Un “agente inhibidor del crecimiento”, cuando se usa en la presente, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula *in vitro* o *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células en la fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en una etapa distinta de la fase S), tales como los agentes que inducen la detención en G1 y en la fase M. Los bloqueadores clásicos de la fase M incluyen el vincas (vincristina y vinblastina), el TAXOL®, y los inhibidores de la topo II tales como la doxorubicina, la epirubicina, la daunorubicina, el etopósido y la bleomicina. Aquellos agentes que detienen en G1 también rebasan hacia la detención en la fase S, por ejemplo, los agentes alquilantes del ADN tales como el tamoxifén, la prednisona, la dacarbazina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo y el Ara-C. Puede hallarse información adicional en “The Molecular Basis of Cancer”, editores Mendelsohn e Israel, capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs” por Murakami *et al.*, (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente en la p. 13.

El término “profármaco” tal y como se utiliza en esta solicitud se refiere a una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células cancerosas en comparación con el fármaco original, y que es capaz de ser activada o convertida enzimáticamente en la forma original más activa. Consultar, por ejemplo, Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy” Bio-chemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615ª Reunión, Belfast (1986), y Stella *et al.*, “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery”, Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, los profármacos que contienen sulfato, los profármacos que contienen fosfato, los profármacos que contienen tiofosfato, los profármacos que contienen sulfato, los profármacos que contienen péptido, los profármacos modificados con D-aminoácidos, los profármacos glicosilados, los profármacos que contienen beta-lactamos, los profármacos que contiene fenoxiacetamida opcionalmente sustituida, o los profármacos que contiene fenilacetamida opcionalmente sustituida, la 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina, los cuales pueden convertirse en el más activo fármaco libre citotóxico. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma profármaco para su uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a los agentes quimioterapéuticos descritos más abajo.

El término “agente citotóxico”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa la destrucción de las células. Se pretende que el término incluya los isótopos radiactivos (por ejemplo, 131I, 125I, 90Y, 186Re, 188Re, 153Sm, 212Bi, 32P, y los isótopos radiactivos de Lu), los agentes quimioterapéuticos, y las toxinas tales como las toxina de molécula pequeña o las toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo los fragmentos y/o variantes de las mismas.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen los agentes alquilantes tales como la tiotepa y la ciclofosfamida (CYTOXAN™); los alquilsulfonatos tales como el busulfán, el improsulfán y el piposulfán; las aziridinas tales como la benzodopa, carboquone, meturedopa, y uredopa; las etileniminas y metilamelaminas, incluyendo la altretamina, trietilenemelamina, trietienefosforamida, trietilenetiofosforamida y trimetilolomelamina; las acetogeninas (especialmente la bullatacina y la bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); la briostatina; la calistatina; el CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); las criptoficinas (particularmente la criptoficina 1 y la criptoficina 8); la dolastatina; la duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); la eleuterobina; la pancratistatina; una sarcodictina; la espongiestatina; las mostazas nitrogenadas tales como el clorambucilo, la clornafacina, la colofosfamida, la estramustina, la ifosfamida, la mecloretamina, el hidrocloreto del óxido de mecloretamina, el melfalán, la novembichina, la fenesterina, la prednimustina, la trofosfamida, la mostaza de uracilo; las nitrosureas tales como la carmustina, la clorozotocina, la fotemustina, la lomustina, la nimustina, la ranimustina; los antibióticos tales como los antibióticos enedinos (por ejemplo, la caliqueamicina, especialmente la caliqueamicina gammaII y la caliqueamicina phiII, consultar, por ejemplo, Angew. Chem. Intl. Engl., 33:183-186 (1994); la dinemicina, incluyendo la dinemicina A; una esperamicina; así como el cromóforo de la neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enedina cromoproteínas), aclacinomisinas, carabicina, carminomicina, carzinoflina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo la morfolino-doxorrubicina, la cianomorfolino-doxorrubicina, la 2-pirrolino-doxorrubicina y la desoxidoxorrubicina), la epirubicina, la esorubicina, la idarrubicina, la marcelomicina, las mitomicinas, el ácido micofenólico, la nogalamicina, las olivomicinas, la peplomicina, la potfiromicina, la puromicina, la quelamicina, la rodorrubicina, la estreptonigrina, la estreptozocina, la tubercidina, el ubenimex, la zinostatina, la zorubicina; los anti-metabolitos tales como el metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); los análogos del ácido fólico tales como la denopterina, el metotrexato, la pteropterina, el trimetrexato; los análogos de purina tales como la fludarabina, la 6-mercaptopurina, la tiamiprina, la tioguanina; los análogos de pirimidina tales como la ancitabina, la azacitidina, la 6-azauridina, el carmofur, la citarabina, la didesoxiuridina, la doxifluridina, la encitabina, la floxuridina; 5-FU; los andrógenos tales como la calusterona, el propionato de dromostanolona, el epitiostanol, la mepitiostana, la testolactona; los anti-adrenales tales como la aminoglutetimida, el mitotano, el trilostano; los rellenos de ácido fólico tales como el ácido frolnico; la aceglatona; el glicósido de aldofosfamida; el ácido aminolevulínico; la amsacrina; el bestrabucilo; el bisantreno; el edatraxato; la defofamina; la demecolcina; la diaziquona; la elfornitina; el acetato de eliptinio; una epitolona; el etoglúcido; el nitrato de galio; la hidroxiaurea; el lentinano; la lonidamina; los maytansinoides tales como la maytansina y las ansamitocinas; la mitoguazona; la mitoxantrona; el mopidamol; la nitracrina; la pentostatina; el fenameto; la pirarrubicina; el ácido podofilínico; la 2-etilhidrazida; la procarbazona; el PSK®; la razoxana; la rizoxina; el sizofirano; el espirogermanio; el ácido tenuazónico; la triaziquna; la 2,2',2"-trichlorotrietilamina; las tricotecenas (especialmente la toxina T-2, la verracurina A, la roridina A y la anguidina); el uretano; la vindesina; la dacarbazina; la manomustina; el mitobronitol; el mitolactol; el pipobromano; la gacitosina; el arabinósido (“Ara-C”); la ciclofosfamida; la tiotepa; los taxoides, por ejemplo, el paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y el doxetaxelo (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); el clorambucilo; la gemcitabina; la 6-tioguanina; la mercaptopurina; el metotrexato; los análogos de platino tales como el cisplatino y carboplatino; la vinblastina; el platino; el etopósido (VP-16); la ifosfamida; la mitomicina C; la mitoxantrona; la vincristina; la vinorelbina; la navelbina; la novantrona; el tenipósido; la daunomicina; la aminopterina; la xeloda; el ibandronato; el CPT-11; el inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; la difluorometilornitina (DMFO); el ácido retinoico; la capecitabina; y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de la hormona sobre los tumores, tales como los antiestrógenos, incluyendo, por ejemplo, el tamoxifeno, el raloxifeno, los 4(5)-imidazoles inhibidores de la aromatasa, el 4-hidroxitamoxifeno, el trioxifeno, el keoxifeno, el LY117018, la onapristona, y el toremifeno (Fareston); y los antiandrógenos tales como la flutamida, la nilutamida, la bicalutamida, el leuprolido, y la goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptes de los anteriores.

El término “citocina” es un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de tales citocinas incluyen las linfocinas, las monocinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen las hormonas del crecimiento, tales como la hormona del crecimiento humana, la N-metionil hormona del crecimiento humana, y la hormona del crecimiento bovina; la hormona paratiroidea; la tiroxina; la insulina; la proinsulina; la relaxina; la prorrelaxina; las hormonas glicoproteicas tales como la hormona estimuladora del folículo (FSH), la hormona estimuladora de la tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento de fibroblastos; la prolactina; el lactógeno placentario; el factor- $\alpha$  y - $\beta$  de la necrosis tumoral; la sustancia inhibidora de mullerian; el péptido asociado a la gonadotropina de ratón; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento endotelial vascular; la integrina; la trombopoyetina (TPO); los factores de crecimiento del nervio tales como el NGF- $\alpha$ ; el factor de crecimiento de las plaquetas; los factores de crecimiento transformadores (TGF) tales como el TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; el factor-I y -II de crecimiento similar a la insulina; la eritropoyetina (EPO); los factores osteoinductivos; los interferones tales como el interferón- $\alpha$ , - $\beta$ , y - $\gamma$ ; los factores estimuladores de colonias (CSF), tales como el CSF de macrófagos (M-CSF); el CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y el CSF de granulocitos (G-CSF); las interleucinas (IL), tales como las IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13; un factor de necrosis tumoral tal como el TNF- $\alpha$  o el TNF- $\beta$ ; y otros factores polipeptídicos tales como el LIF y el ligando kit (KL). Tal como se usa en la presente, el término citocina incluye las proteínas procedentes de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes, y los equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

Los términos “pretratamiento” o “pretratar” tal y como se utilizan en la presente invención se refieren a la exposición de la célula o células de mamífero al CPT-11 (u otro agente quimioterapéutico) antes de la exposición al agonista o agonistas del receptor del Apo-2L. El pretratamiento de las células de mamífero, particularmente de las células cancerosas, con el CPT-11 se cree que sensibiliza las células cancerosas al agonista del receptor del ligando de Apo-2 mediante la potenciación o la regulación al alza de la expresión del receptor o receptores DR4 o DR5 dentro o sobre dichas células cancerosas. Preferiblemente, la cantidad de CPT-11 empleada para pretratar las células será una cantidad suficiente para potenciar o regular al alza la expresión de los receptores DR4 o DR5, en o sobre dichas células de mamífero, en aproximadamente de 0,5 a aproximadamente 5 veces, más preferiblemente, en aproximadamente de 1 a aproximadamente 4 veces, y más preferiblemente, en aproximadamente de 2 a aproximadamente 4 veces, en comparación con las mismas células de mamífero que no hayan sido expuestas al CPT-11 en las mismas condiciones. “Tratamiento” o “terapia” se refiere a ambos, al tratamiento terapéutico y profiláctico o a las medidas preventivas.

El término “cantidad efectiva” se refiere a una cantidad de un fármaco efectiva para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, retrasar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la infiltración de las células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, retrasar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la metástasis del tumor; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. En la medida en que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o matar las células cancerosas existentes, éste puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia *in vivo* puede medirse, por ejemplo, evaluando la dimensión o volumen del tumor, el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TPP), y/o determinar las velocidades de respuesta (RR).

Mamífero, para los propósitos de tratamiento o terapia, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo los humanos, los animales domésticos y de granja, de zoológicos y de deportes, o los animales de compañía, tales como los perros, los caballos, los gatos, las vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es un humano.

Los términos “cáncer”, “canceroso” o “maligno” se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular descontrolado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan al carcinoma, el linfoma, el blastoma, el sarcoma y la leucemia. Los ejemplos más concretos de tales cánceres incluyen el cáncer de colon, el cáncer colorrectal, el cáncer rectal, carcinoma de célula escamosa, el cáncer pulmonar de célula pequeña, el cáncer pulmonar de células no pequeñas, el linfoma de Hodgkin o no Hodgkin, el cáncer testicular, el mieloma, el cáncer de esófago, el cáncer gastrointestinal, el cáncer renal, el cáncer de páncreas, el glioblastoma, el cáncer de cuello de útero, el cáncer de ovarios, el glioma, el carcinoma hepático, el cáncer de vejiga, el hepatoma, el cáncer de mama, el carcinoma de endometrio, el carcinoma de la glándula salivar, el cáncer de riñón, el cáncer de hígado, el cáncer de próstata, el cáncer de vulva, el cáncer de tiroides, el carcinoma hepático, y varios tipos de cánceres de cabeza y cuello.

## II. Procedimientos y materiales

### A. Procedimientos

Generalmente, los usos médicos y los procedimientos *in vitro* de la invención, para inducir la apoptosis en células de mamífero, comprenden exponer las células a una cantidad efectiva de ligando de Apo-2 y de CPT-11, en donde dichas células se exponen al CPT-11 antes de exponerse a dicho Apo-2L. Opcionalmente, la cantidad de Apo-2L empleada será una cantidad efectiva para inducir la apoptosis. Opcionalmente, la cantidad de CPT-11 empleada será una cantidad efectiva para potenciar la expresión del receptor DR4 o DR5 (a) en o sobre dichas células. Esto puede conseguirse *in vivo* o *ex vivo* de acuerdo, por ejemplo, con los procedimientos descritos más adelante en los Ejemplos. Los enfermedades o trastornos ilustrativos a ser tratados con el anticuerpo agonista del ligando de Apo2 y el CPT-11 incluyen el cáncer benigno o maligno.

### 1. Elementos de la maquinaria apoptótica

Una mayor comprensión de ciertos elementos de la maquinaria apoptótica, que se correlacionan con un incremento en la actividad destructora, puede facilitar la práctica de los procedimientos para inducir la apoptosis en las células de mamífero. En este contexto, los datos proporcionados en el Ejemplo 3 identifican los elementos en la maquinaria apoptótica que se correlacionan con una actividad destructora incrementada el tratamiento con Apo2L/TRAIL más CPT-11.

Tal y como se discute con más detalle más abajo, el tratamiento con Apo2L/TRAIL de células tumorales sensibles, pero no de células normales, puede inducir una regulación transitoria al alza de los receptores DR5. De igual modo, la exposición al CPT-11 puede resultar en la regulación al alza de los receptores DR5 y/o de los receptores CDR4. El tratamiento combinado Apo2L/TRAIL más CPT-11 durante aproximadamente 24 horas resultó también en una expresión aumentada de DR4 y DR5 en comparación con los controles. Además, el pro-tratamiento de varias células con CPT11 durante 20-22, seguido por dos horas con Apo2L/TRAIL produjo la inducción máxima de ARNm de DR5 y DR4, así como el corte/activación parecido a la caspasa-3, y la apoptosis. Se halló que la adición del inhibidor Z-VAD de la caspasa intensificaba adicionalmente los niveles de expresión del ARNm del DR5 y DR4.

Los datos proporcionados en el Ejemplo 3 proporcionan evidencia de que el CPT-11 y Apo2L/TRAIL inducen la apoptosis mediante vías distintas, respectivamente dependiente de la p53 e independiente de la p53. Específicamente, el tratamiento con Apo2L/TRAIL de células HCT-116 solas no indujo la expresión de la p53, mientras que el CPT-11 y el CPT-11 en combinación con Apo2L/TRAIL resultaron en una intensa inducción de la proteína p53. Además, el Apo2L/TRAIL medió la regulación al alza de la expresión del ARNm de DR5, mientras que el CPT-11 incrementó la expresión de ARNm de ambos, el DR5 y el DR4. El CPT-11 solo indujo una regulación al alza sustancial de la proteína p21, un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, inducible por la p53, que ha sido relacionada con la detención del ciclo celular. La acumulación de la p21 inducida por el CPT-11 fue impedida por el tratamiento simultáneo con Apo2L/TRAIL de forma dependiente de caspasa. Además, en vez de presentar una acumulación en la fase G2-M, las células tratadas simultáneamente con Apo2L/TRAIL experimentaron apoptosis. Por tanto, el tratamiento combinado con Apo2L/TRAIL y CPT-11 condujo a la degradación de la p21 y la regulación al alza del DR4 y DR5, dirigiendo las células cancerosas hacia una vía apoptótica en vez de hacia la detención del ciclo celular y posible reparación del ADN. Esto está claramente de acuerdo con la actividad antitumoral potenciada observada *in vivo* con el tratamiento de combinación (Ashkenazi, *et. al.*, J. Clinical Investigation, 104:155-162 (1999); Gliniak *et al.*, Cancer Research, 59:6153-6158 (1999)), y estos datos proporcionan un mecanismo potencial mediante el cual el tratamiento con Apo2L/TRAIL y CPT-11 media la actividad antitumoral potenciada.

Los datos presentados en el Ejemplo 3 no muestran cambios en la expresión de la proteína FLICE inhibidora de proteína (FLIP) en células HCT116 que están experimentando apoptosis, descartando una implicación antiapoptótica significativa de la FLIP en este sistema experimental, datos que concuerdan con estudios en tumores de melanoma (Griffith *et al.*, Current Opinion in Immunology, 10:559-563 (1998); Leverkus *et al.*, Cancer Research, 60:553-559 (2000); Zhang *et al.*, Cancer Research, 59:2747-2753 (1999)). Además, la presencia del inhibidor general de caspasa, ZVAD, bloqueó efectivamente la apoptosis mediada por Apo2L/TRAIL, la degradación de la p21, y la alteración de la detención celular en la fase G2-M mediada por el CPT-11, lo que proporciona evidencia de que la p21 desempeña un papel regulador en la apoptosis mediada por Apo2L/TRAIL (consultar también, Xu *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 269:179-190 (2000)). Sin embargo, la inducción de la sobreexpresión de la p21 en estas condiciones impidió la apoptosis mediante la inhibición de la activación proximal de la caspasa.

Los datos presentados en la presente invención describen un mecanismo novedoso mediante el cual el CPT-11 y el Apo2L/TRAIL, dos agentes que median la apoptosis a través de vías distintas, respectivamente el daño del ADN y los receptores señalizadores de muerte, pueden actuar de forma concertada. A saber, la inhibición con Apo2L/TRAIL de la inducción de la p21 por parte del CPT-11 puede impedir la acumulación de células en la detención del ciclo celular en G2/M, y por tanto promueve una apoptosis incrementada. Además, la regulación al alza de los receptores de muerte por la combinación de estos agentes puede contribuir también a la actividad apoptótica potenciada observada.

### 2. Modulando la apoptosis inducida por el agonista del receptor del Apo-2L

Tal y como se describe en la presente invención, es posible modular y aumentar la apoptosis en células cancerosas de mamífero, lo cual sucede cuando las células se exponen a una cantidad efectiva de CPT-11 y de un agonista del receptor del Apo-2L, mediante la administración del CPT-11 antes de la administración del agonista del receptor de ligando de Apo-2. Específicamente, como se muestra en el Ejemplo 3 y en la Figura 5, el pretratamiento de células con CPT-11 durante 20-22 horas, seguido por dos horas con Apo2L/TRAIL produjo la inducción máxima del ARNm de DR5 y DR4, así como un corte/activación parecido a la caspasa 3, y la apoptosis. Por tanto, un aspecto importante de la invención son los procedimientos mejorados de uso de los agonistas del receptor de Apo-2L, y de un agente quimioterapéutico tal como el CPT-11 para inducir la apoptosis en células de mamífero, en donde el procedimiento comprende pretratar las células con el agente quimioterapéutico antes de su tratamiento con el agonista del receptor del Apo-2L.

Los procedimientos para pretratar células de mamífero con un agente quimioterapéutico tal como el CPT-11, antes de su tratamiento con el agonista o agonistas del receptor del Apo-2L, pueden tener un cierto número de ventajas respecto la administración simultánea de estos agentes. En particular, como se ha destacado más arriba, estos pro-

cedimientos pueden facilitar modalidades de tratamiento mediante la identificación de las condiciones óptimas para la administración combinada de estos agentes. En consecuencia, identificando procedimiento para optimizar una respuesta apoptótica, los médicos generales pueden ser capaces de suministrar estos agentes en un formato más apropiado y práctico para el paciente. Específicamente, empleando procedimientos que optimizan una respuesta apoptótica, los médicos generales pueden administrar estos agentes en una única embolada en vez de en múltiples inyecciones, administrar concentraciones más bajas de estos agentes, o administrar estos agentes durante un período de tiempo más corto.

También pueden usarse en los procedimientos descritos en la presente invención agentes quimioterapéuticos que tienen efectos fisiológicos que son similares a los del CPT-11. Específicamente, la exposición a diferentes agentes químicos de estrés genotóxicos anticáncer, tales como los tratamientos con doxorubicina, el etopósido, el CDDP y la irradiación gamma, pueden resultar también en una regulación al alza selectiva, dependiente de la p53, del receptor de muerte DR5 de Apo2/TRAIL en un cierto número de líneas celulares tumorales (consultar, por ejemplo, Kim *et al.*, Clin. Cancer Res., 6(2):335-346 (2000); Gibson *et al.*, Mol. Cell Biol., 20(1):205-212 (2000); Keane *et al.*, Cancer Res., 59(3):734-741 (1999); Nagane *et al.*, Cancer Res., 60(4):847-853 (2000); Wu *et al.*, Nature Genetics, 17:141-143 (1997); y Wu *et al.*, Oncogene, 18:6411-6418 (1999)). La regulación al alza del DR5 de forma dependiente de la p53 se ha demostrado también mediante el tratamiento de células tumorales con TNF- $\alpha$  (Sheikh *et al.*, Cancer Research, 58:1593-1598 (1998)) para varios agentes quimioterapéuticos en diferentes líneas celulares de glioma humanas (Nagane *et al.*, Cancer Research, 60:847-853 (2000)). Además, la regulación al alza del DR5 se correlacionó en la mayoría de los casos con una respuesta incrementada a la apoptosis dependiente de caspasa y mediada por Apo2L/TRAIL (Chinnaiyan *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 97:1754-1759 (2000)).

Tal y como se describe en la presente invención, se puede potenciar la apoptosis mediada por agonista del receptor del Apo-2L, en células cancerosas de mamífero, pretratando las células con un agente que modula la maquinaria apoptótica celular asociada con una actividad destructora incrementada. Por ejemplo, en la presente invención se describe un procedimiento para sensibilizar las células a la apoptosis mediada por el agonista del receptor de Apo-2L pretratando las células con un agente que afecta uno o más sucesos fisiológicos, incluyendo la regulación al alza del DR4, la regulación al alza del DR5, y/o la inducción de la proteína p53. Preferiblemente, el agente se selecciona de entre el grupo consistente en CPT-11, doxorubicina, 5-fluorouracilo, interferón (por ejemplo, interferón alfa o interferón gamma), etopósido, cis-diaminodicloroplatino(II) (CDDP), TNF- $\alpha$  e irradiación gamma. Es muy preferido que el agente sea el CPT-11.

De acuerdo con una realización de la invención, se proporciona un uso médico y un procedimiento *in vitro* de inducción de la apoptosis en células cancerosas de mamífero, el cual comprende exponer las células a una cantidad efectiva de CPT-11 y a un agonista del receptor del ligando de Apo-2, en donde las células se exponen al CPT-11 antes de al agonista del receptor del ligando de Apo-2. Preferiblemente, en estos procedimientos, la cantidad de CPT-11 administrado resulta en una regulación al alza del DR4 y/o DR5 en o sobre dichas células. La regulación al alza o la expresión potenciada del DR4 y/o DR5 puede ensayarse y medirse, en comparación con células control no expuestas al CPT-11, usando técnicas conocidas tales como midiendo la expresión del ARNm del DR4 y DR5, incluyendo las técnicas descritas en los Ejemplos. Tales ensayos pueden realizarse en momentos seleccionados, a continuación de la exposición de las células al CPT-11, para determinar el período de tiempo deseado óptimo para el pretratamiento que puede inducir la regulación al alza deseada u óptima del DR4 o DR5. Usando procedimientos de ensayo *in vitro*, los solicitantes han hallado que la inducción de la expresión del DR5 por parte del CPT-11 puede observarse después de dos horas de exposición o incubación, y particularmente, que la expresión del DR5 puede inducirse *in vitro* a continuación de la exposición de las células a 50 microgramos/ml de CPT-11 durante 6 horas. Opcionalmente, las células pueden exponerse al CPT-11 desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 5 días, preferiblemente desde aproximadamente 2 horas hasta aproximadamente 24, 48 o 72 horas, y más preferiblemente desde aproximadamente 6 horas hasta aproximadamente 24 o 48 horas antes de la exposición al agonista o agonistas del receptor de Apo-2L. En los procedimientos, el agonista del receptor del ligando de Apo-2 típicamente comprende Apo2L/TRAIL. Las realizaciones adicionales de la invención incluyen variaciones de estos procedimientos, tales como los que emplean modalidades terapéuticas adicionales, tales como exponer las células cancerosas a uno o más agentes inhibidores del crecimiento o a la radiación. En realizaciones preferidas de los procedimientos, las células cancerosas comprenden las células de cáncer colorrectal.

Típicamente, una dosis efectiva del CPT-11 es una cantidad suficiente para regular al alza el DR4 o el DR5, o ambos, el DR4 y el DR5, en o sobre las células de mamífero expuestas al CPT-11. Además, una dosis efectiva de CPT-11 típicamente induce la proteína p53. Las dosis típicas de CPT-11 empleadas incluyen las dosis clínicas estándares según la "Physician's Desk Reference" (PDR), y pueden incluir un rango desde aproximadamente 1 microgramo/ml hasta aproximadamente 100 microgramos/ml, y opcionalmente desde aproximadamente 2 microgramos/ml hasta aproximadamente 50 microgramos/ml, y para su uso clínico, puede incluir preferiblemente un rango desde aproximadamente 0,05 mg/kg hasta aproximadamente 2,5 mg/kg, mientras que las dosis típicas de ligando de Apo-2 puede incluir un rango desde 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 12,0 mg/kg.

## B. Materiales

El Apo-2L que puede emplearse en los usos médicos y en los procedimientos *in vitro* incluye los polipéptidos de Apo-2L descritos en Pitti *et al.*, ver más arriba, WO 97/25428, ver más arriba, y WO97/01633, ver más arriba (los polipéptidos denominados como TRAIT). Se contempla que pueden usarse varias formas del Apo-2L, tales como el

polipéptido de longitud completa, así como las formas solubles del Apo-2L, las cuales comprenden una secuencia del dominio extracelular (ECD). Los ejemplos de tales secuencias de ECD solubles incluyen los polipéptidos que comprenden los aminoácidos 114-281, 95-281, 91-281 ó 92-281 de la secuencia de Apo-2L mostrada en la Figura 1A de Pitti *et al.*, J. Biol. Chem., 271:12687-12690 (1996) y en la SEC. N° ID.: 1 en la presente invención. Actualmente se cree que el polipéptido que comprende los aminoácidos 92-281 es una forma cortada naturalmente del Apo-2L. Los solicitantes ha expresado el Apo-2L humano en células CHO y han hallado que el polipéptido 92-281 es la forma expresada del Apo-2L. Se incluyen las formas modificadas del Apo-2L, tales como las formas modificadas covalentemente descritas en WO 97/25428. En particular, se incluye el Apo-2L unido a un polímero no proteico, tal como el polietilenglicol, para su uso en los presentes procedimientos. El polipéptido Apo-2L puede prepararse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos en WO 97/25428.

Las variantes del ligando de Apo-2 que tienen actividad apoptótica que pueden usarse incluyen, por ejemplo, las identificadas mediante técnicas de barrido de alanina. Las variantes concretas por sustitución comprenden los aminoácidos 91-281 de la Figura 1A de Pitti *et al.*, J. Biol. Chem., 271:12687-12690 (1996), en la cual al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 203, 218 o 269 están sustituidos por un residuo alanina. Opcionalmente, las variantes de ligando de Apo-2 pueden incluir una o más de estas tres sustituciones.

Se contempla que una molécula que imita la actividad apoptótica del Apo-2L puede emplearse alternativamente en los usos médicos y procedimientos *in vitro* descritos ahora. Los ejemplos de tales moléculas incluyen los anticuerpos agonistas que pueden inducir la apoptosis en al menos una manera comparable o similar al Apo-2L. En particular, esos anticuerpos agonistas comprenderán anticuerpos que pueden unir uno o más de los receptores del Apo-2L. Preferiblemente, el anticuerpo agonista está dirigido contra un receptor del Apo-2L, el cual incluye un dominio de muerte citoplasmático, tal como el DR4 o DR5. Aún más preferiblemente, el agonista es un anticuerpo que se une a semejante receptor, y la unión puede determinarse, por ejemplo, usando análisis FACS o ELISA, tal como se describe en el Ejemplo 3. Los anticuerpos agonistas dirigidos contra el receptor denominado DR5 (o Apo-2) se han preparado usando técnicas de fusión tales como las descritas más abajo. Uno de los anticuerpos agonistas del receptor DR5 o Apo-2 se ha denominado como 3F11.39.7 y se ha depositado con la ATCC como el depósito n° HB-12456, el 13 de enero de 1998. Otros anticuerpos contra el receptor DR5 incluyen el 3H3.14.5, depositado con la ATCC tal y como se muestra en la presente invención. La actividad agonista de los anticuerpos contra el receptor del Apo-2L puede determinarse usando varios procedimientos para ensayar la actividad apoptótica, y opcionalmente, la actividad apoptótica de semejante anticuerpo puede determinarse ensayando el anticuerpo, solo, o en una forma entrecruzada usando la Fc de inmunoglobulina o complemento (descrito más abajo), en un ensayo descrito en el Ejemplo 2 para examinar la apoptosis de células 9D o de otras células que expresan un receptor para el Apo-2L, tal como el DR4 o DR5.

Adicionalmente, se han preparado también anticuerpos agonistas dirigidos contra otro receptor del Apo-2L, denominado DR4. Uno de los anticuerpos agonistas del DR4 se ha denominado como 4H6.17.8 y se ha depositado con la ATCC como el depósito n° HB-12455 el 13 de enero de 1998. Aún otros anticuerpos agonistas del DR4 incluyen los anticuerpos 4E7.24.3, 1H5.25.9, 4G7.18.8, y 5G11.17.1, los cuales se han depositado con la ATCC, tal como se muestra más abajo. La actividad agonista de los anticuerpos contra el receptor del Apo-2L puede determinarse usando varios procedimientos para ensayar la actividad apoptótica, y opcionalmente, la actividad apoptótica de semejante anticuerpo puede determinarse ensayando el anticuerpo, solo, o en una forma entrecruzada usando la Fc de inmunoglobulina o complemento (descrito más abajo), en un ensayo descrito en el Ejemplo 2 para examinar la apoptosis de células 9D o de otras células que expresan un receptor para el Apo-2L, tal como el DR4 o DR5.

Los anticuerpos agonistas incluyen los anticuerpos que se unen a un único receptor del Apo-2L o a más de un receptor del Apo-2L. Un anticuerpo que se une a más de un receptor del Apo-2L puede caracterizarse como un anticuerpo que "reacciona de forma cruzada" con dos o más antígenos diferentes, y es capaz de unirse a cada uno de los diferentes antígenos, por ejemplo, según se determina mediante ELISA o FACS como en los ejemplos siguientes. Opcionalmente, un anticuerpo que "reacciona de forma cruzada específicamente" con dos o más antígenos diferentes es uno que se une a un primer antígeno y se une además a un segundo antígeno diferente, en donde la capacidad de unión del anticuerpo por el segundo antígeno, a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 10 µg/mL, es desde aproximadamente el 50% hasta aproximadamente el 100% (preferiblemente desde aproximadamente el 75% hasta aproximadamente el 100%) de la capacidad de unión del primer antígeno, según se determina en un ELISA de captura (tal como en los ejemplos siguientes). Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse específicamente al DR5 (el "primer antígeno") y reaccionar de forma cruzada específicamente con otro receptor del Apo-2L tal como el DR4 (el "segundo antígeno"), en donde el nivel de unión de aproximadamente 10 µg/mL del anticuerpo al DR4 es de aproximadamente el 50% hasta aproximadamente el 100% de la capacidad de unión del anticuerpo al DR5 en el ELISA de captura en la presente invención. Varios anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con receptores del Apo-2L se describen con más detalle en la solicitud de patente internacional número PCT/US99/13197.

Tal y como se describe más abajo, las formas de ejemplo de tales anticuerpos incluyen los anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos, y heteroconjugados.

#### 1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos pueden comprender anticuerpos policlonales. Los procedimientos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos por el especialista capacitado. Los anticuerpos policlonales pueden generarse en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, de un adyuvante. Típicamente,

el agente inmunizante y/o el adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizador puede incluir un polipéptido DR4 o DR5 (o un ECD de DR4 o DR5) o una proteína de fusión de los mismos. Puede ser útil conjugar el agente inmunizador con una proteína que se sabe es inmunogénica en el mamífero que se está inmunizando. Los ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a la hemocianina de lapa californiana, la albúmina de suero, la tiroglobulina bovina, y el inhibidor de la tripsina de la semilla de soja. Los ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil-Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización puede ser seleccionado por un experto en la materia sin experimentación excesiva. El mamífero puede sangrarse a continuación, y se puede ensayar el título de anticuerpo en el suero. Si se desea, los animales pueden reforzarse hasta que el título incrementa o se estabiliza.

## 2. Anticuerpos monoclonales

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

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

Generalmente, o se usan linfocitos de la sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o células de nódulo linfático si se desean fuentes de mamífero no humano. A continuación, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión apropiado, tal como el polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. [Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", Academic Press, (1986) pp. 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas son usualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen humano, bovino o de roedor. Usualmente se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma podrían cultivarse en un medio de cultivo apropiado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células progenitoras carecen del enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina ("medio HAT"), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son las que se fusionan eficientemente, soportan la expresión estable del anticuerpo con niveles elevados por parte de las células productoras del anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son las líneas de mieloma del ratón, las cuales pueden obtenerse, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Un ejemplo de una línea celular de mieloma múrido es la P3X63AgU.1 descrita en el Ejemplo 2 de más abajo. También se han descrito líneas celulares de mieloma humanas y de heteromieloma de ratón-humanas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications", Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) pp. 51-63].

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede ensayarse entonces en busca de la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor del Apo-2L. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo inmunosorbente unido a enzima (ELISA). Tales técnicas y ensayos son conocidos en el estado de la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Una vez se han identificado las células hibridomas deseadas, los clones podrían subclonarse mediante procedimientos de dilución limitada y hacerse crecer mediante procedimientos estándares [Goding, ver más arriba]. Los medios de cultivo apropiados para este propósito incluyen, por ejemplo, el medio de Eagle modificado por Dulbecco o el medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridomas pueden hacerse crecer *in vivo* como ascitis en un mamífero.

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

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse también mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente estadounidense n° 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos múridos). Las células de hibridoma de la invención sirven como fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, los cuales se transfectan a continuación a células huéspedes

tales como las células COS de mono, las células de ovario de hámster chino (CHO), o las células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huéspedes recombinantes. El ADN también podría modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante con dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias homólogas murinas (patente estadounidense n° 4.816.567; Morrison, *et al.*, ver más arriba), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es de inmunoglobulina. Tal polipéptido que no es de inmunoglobulina puede sustituirse en el lugar de los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse en lugar de los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico. Opcionalmente, pueden construirse anticuerpos quiméricos que incluyen al menos un dominio variable o hipervariable de un anticuerpo anti-receptor del Apo-2L seleccionado de entre los anticuerpos 4H6.17.8, 3F11.39.7, 4E7.24.3, 1H5.25.9, 4G7.18.8, 5G11.17.1, y 3H3.14.5 descritos en la presente invención.

Opcionalmente, los anticuerpos agonistas se unirán al mismo o mismos epítomos como cualquiera de los anticuerpos 4H6.17.8, 3F11.39.7, 4E7.24.3, 1H5.25.9, 4G7.18.8, 5G11.17.1, y 3H3.14.5 descritos en la presente invención. Esto puede determinarse llevando a cabo varios ensayos, tales como los descritos en la presente invención. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo monoclonal tiene la misma especificidad que los anticuerpos contra DR4 o DR5 citados específicamente en la presente invención, se puede comparar su actividad en ensayo de bloqueo o en ensayos de inducción de la apoptosis.

Los anticuerpos incluyen los anticuerpos “entrecruzados”. El término “entrecruzado” tal como se usan en la presente invención se refiere al menos a dos moléculas de IgG juntas para formar una molécula (o molécula simple). Los anticuerpos contra el receptor del Apo-2L pueden entrecruzarse usando varias moléculas de engarce, opcionalmente los anticuerpos contra el DR4 se entrecruzan usando una molécula anti-IgG, el complemento, o la modificación química o la ingeniería molecular. Los especialistas en la técnica apreciarán que el complemento tiene una afinidad relativamente elevada por moléculas de anticuerpo una vez que los anticuerpos se unen a la membrana de la superficie celular. En consecuencia, se cree que el complemento puede usarse como una molécula entrecruzadora para unir dos o más anticuerpos unidos a la membrana de la superficie celular. Entre los varios isotipos de Ig murina, se sabe que IgM, IgG2a, e IgG2b fijan el complemento.

Los anticuerpos pueden comprender opcionalmente anticuerpos diméricos, así como formas multivalentes de anticuerpos. Los especialistas en el campo pueden construir tales dímeros o formas multivalentes mediante técnicas conocidas en el campo, y usando los anticuerpos anti-receptor del Apo-2L de la presente invención.

Los anticuerpos pueden comprender también anticuerpos monovalentes. Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en el campo. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de la cadena ligera y de la cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc con objeto de impedir el entrecruzamiento de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos cisteína relevantes se sustituyen con otro residuo aminoácido o se suprimen con objeto de impedir el entrecruzamiento.

Los procedimientos *in vitro* son también apropiados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab, puede conseguirse usando técnicas rutinarias conocidas en el campo. Por ejemplo, la digestión puede realizarse usando papaína. Los ejemplos de digestión con papaína se describen en WO 94/29348, publicada el 12/22/94, y en la patente estadounidense n° 4.342.566. La digestión con papaína de los anticuerpos típicamente produce dos fragmentos idénticos unidores de antígeno, denominados fragmentos Fab, cada uno con un único sitio de unión de antígeno, y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina rinde un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación con antígeno, y que es todavía capaz de entrecruzar el antígeno.

Los fragmentos Fab producidos en la digestión del anticuerpo también contienen el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos al extremo carboxi terminal del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas procedentes de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente invención para un Fab' en el cual el residuo o residuos cisteína de los dominios constantes son portadores de un grupo tiol libre. Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpo se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas como bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

También pueden producirse fragmentos Fv de cadena simple, tal como se describe en Iliades *et al.*, FEBS Letters, 409:437-441 (1997). El acoplamiento de tales fragmentos de cadena simple usando varios engarces se describe en Kortt *et al.*, Protein Engineering, 10:423-433 (1997).

Además de los anticuerpos descritos más arriba, se contempla que pueden prepararse *in vitro* anticuerpos quiméricos o híbridos usando procedimientos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes entrecruzadores. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro, o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos apropiados para este propósito incluyen el iminotiolato y el metil-4-mercaptobutirimidato.

Los anticuerpos contra el receptor del Apo-2L pueden comprender además los anticuerpos humanizados o los anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas (tales como los Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, u otras subsecuencias unidoras de antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen las inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se sustituyen residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor con residuos de una CDR de una especie que no es humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los residuos estructurales del Fv de la inmunoglobulina humana se remplazan con los correspondientes residuos no humanos. Los anticuerpos humanizados podrían comprender también residuos que no se hallan ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la CDR o estructurales importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad o al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina que no es humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquéllas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado, óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en estado de la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoácidos introducidos en él procedentes de una fuente que no es humana. Estos residuos aminoácidos no humanos se denominan a menudo como residuos "importados", los cuales se toman típicamente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)], sustituyendo CDR o secuencias de CDR en lugar de las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente estadounidense n° 4.816.567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente procedente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR, y posiblemente algunos residuos de FR, se sustituyen con residuos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedores. Las fuentes de tales residuos importados o dominios variables (o CDR) importados incluyen los anticuerpos anti-receptor del Apo-2L depositados: 4H6.17.8, 3F11.39.7, 4E7.24.3, 1H5.25.9, 4G7.18.8, 5G11.17.1, y 3H3.14.5 descritos en la presente invención.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a usarse en la preparación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el procedimiento del "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se examina respecto la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que es la más próxima a la del roedor se acepta entonces como armazón (FR) humano del anticuerpo humanizado [Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296-2308 (1993); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)]. Otro procedimiento usa un armazón determinado derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos de un subgrupo determinado de cadenas ligeras o pesadas. El mismo armazón puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes [Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285-4289 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623-2632 (1993)].

Es importante además que los anticuerpos sean humanizados con retención de la elevada afinidad por el antígeno y de otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias progenitoras, y de varios productos humanizados conceptuales, usando modelos tridimensionales de las secuencias progenitoras y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están disponibles comúnmente y son familiares a los especialistas en el campo. Hay disponibles programas de ordenador que ilustran y muestran estructuras de conformación tridimensional probable de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unir su antígeno. De esta forma pueden seleccionarse y combinarse residuos de FR procedentes de las secuencias consenso e importada del receptor, de tal forma que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como una afinidad incrementada por el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos CDR están directa y sustancialmente implicados en influenciar la unión del antígeno [consultar, WO 94/04679 publicada el 3 de marzo de 1994].

Los anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse a través de una adaptación del procedimiento del hibridoma, descrito por primera vez por Kohler y Milstein, mediante el uso de linfocitos B humanos como la pareja de fusión. Los linfocitos B humanos productores de un anticuerpo de interés pueden aislarse, por ejemplo, a partir de un individuo humano, después de obtener su consentimiento informado. Por ejemplo, el individuo puede producir anticuerpos contra un autoantígeno, tal como ocurren en ciertos trastornos como el lupus sistémico eritematoso (Shoenfeld *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 70:205 (1982)), en la púrpura trombocitopénica inmunomediada (ITP) (Nugent *et al.* *Blood*, 70(1):16-22 (1987)), o en el cáncer. Alternativa, o adicionalmente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Por ejemplo, se pueden exponer *in vitro* linfocitos aislados de la sangre periférica humana a un agente lisomotrófico (por ejemplo, el L-leucina-O-metiléster, el dimetiléster del ácido L-glutámico, o el L-leucil-L-leucina-O-metiléster) (patente estadounidense n° 5.567.610, Borrebaeck *et al.*); y/o pueden tratarse *in vitro* linfocitos de sangre periférica humana desprovista de células T con adyuvantes tales como el 8-mercaptopguanosina y citocinas (patente estadounidense n° 5.229.275, Goroff *et al.*).

Los linfocitos B recuperados de un sujeto o inmunizado *in vitro*, generalmente se immortalizan a continuación con objeto de generar un anticuerpo monoclonal humano. Las técnicas para immortalizar el linfocito B incluyen, pero no se limitan a: (a) la fusión del linfocito B humano con células de mielomas humanos, múridos, o de heteromielomas de ratón-humanos; (b) la transformación vírica (por ejemplo, con un virus de Epstein-Barr; consultar Nugent *et al.*, ver más arriba, por ejemplo); (c) la fusión con una línea celular de linfoblastoide; o (d) la fusión con células de linfoma.

Los linfocitos se pueden fusionar con células de mieloma usando un agente de fusión apropiado, tal como el polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]. Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo apropiado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma progenitoras no fusionadas. Por ejemplo, si la célula de mieloma progenitora carece del enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente contendrá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que impiden el crecimiento de las células deficientes en HGPRT. Se han descrito líneas celulares apropiadas de mieloma humanas y de heteromieloma de ratón-humanas [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications", pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987)]. El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se ensaya en busca de la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo inmunosorbente unido a enzima (ELISA).

Una vez se han identificado células de hibridoma que producen anticuerpos con la especificidad, afinidad, y/o actividad deseada, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitada y cultivarse mediante procedimientos estándares [Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", pp.59-103 (Academic Press, 1986)]. Los medios de cultivo apropiados para este propósito incluyen, por ejemplo, el D-MEM o el medio RPMI-1640. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de manera adecuada del medio de cultivo, del fluido de ascites, o del suero, mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, la cromatografía con Proteína A, la electroforesis en gel, la diálisis o la cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos humanos pueden generarse también usando un huésped no humano, tal como un ratón, el cual es capaz de producir anticuerpos humanos. Tal como se ha destacado más arriba, actualmente hay ratones transgénicos que son capaces, a partir de su inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada (JH) en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal resulta en la completa inhibición de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del conjunto de genes de la línea germinal de inmunoglobulinas humanas en tales ratones mutantes de la línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos a partir del desafío con antígenos. Consultar, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, Year in Immunol., 7:33 (1993); patente estadounidense n° 5.591.669; patente estadounidense n° 5.589.369; y patente estadounidense n° 5.545.807. Los anticuerpos humanos pueden prepararse también usando ratones SCID-hu (Duchosal *et al.*, Nature 355:258-262 (1992)).

El anticuerpo humano puede seleccionarse a partir de una biblioteca de exhibición de anticuerpos humanos sobre fagos. La preparación de bibliotecas de anticuerpos o de de fragmentos de los mismos es bien conocida en el estado de la técnica, y puede usarse cualquiera de los procedimientos conocidos para construir una familia de vectores de transformación, los cuales pueden introducirse en células huéspedes. Las bibliotecas de cadenas ligeras y pesadas de anticuerpo en fagos (Huse *et al.*, Science, 246:1275 (1989)), o de proteínas de fusión en fagos o fagómidos, pueden prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos. Consultar, por ejemplo, Vaughan *et al.*, Nature Biotechnology, 14:309-314 (1996); Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Roogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992); Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457-4461 (1992); Griffiths *et al.*, EMBO Journal, 13:3245-3260 (1994); de Kruif *et al.*, J. Mol. Biol., 248:97-105 (1995); WO 98/05344; WO 98/15833; WO 97/47314; WO 97/44491; WO 97/35196; WO 95/34648; patente estadounidense n° 5.712.089; patente estadounidense n° 5.702.892; patente estadounidense n° 5.427.908; patente estadounidense n° 5.403.484; patente estadounidense n° 5.432.018; patente estadounidense n° 5.270.170; WO 92/06176; WO 99/06587; patente estadounidense n° 5.514.548; WO97/08320; y la patente estadounidense n° 5.702.892. El antígeno de interés se criba frente a una biblioteca de fagos usando procedimientos conocidos en el campo para seleccionar fagos-anticuerpos que se unen al antígeno diana.

Los anticuerpos contra el receptor del Apo-2L, tal y como se describe en la presente invención, poseen opcionalmente una o más actividades o propiedades biológicas deseadas. Tales anticuerpos pueden incluir, pero no se limitan a los anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos, y los de afinidad madurada. Tal como se describió más arriba, los anticuerpos pueden construirse o diseñarse usando varias técnicas para conseguir estas actividades o propiedades deseadas. El anticuerpo contra el receptor del Apo-2L puede tener una afinidad de unión al receptor DR4 o DR5 de al menos  $10^5$  M<sup>-1</sup>, preferiblemente al menos en el rango de  $10^6$  M<sup>-1</sup> a  $10^7$  M<sup>-1</sup>, más preferiblemente al menos en el rango de  $10^8$  M<sup>-1</sup> a  $10^{12}$  M<sup>-1</sup>, e incluso más preferiblemente al menos en el rango de  $10^9$  M<sup>-1</sup> a  $10^{12}$  M<sup>-1</sup>. La afinidad de unión del anticuerpo puede determinarse, sin experimentación innecesaria, ensayando el anticuerpo de acuerdo con técnicas conocidas en el estado de la técnica, incluyendo el análisis de Scatchard (consultar, Munson *et al.*, ver más arriba). Por ejemplo, puede ensayarse la afinidad de unión de un anticuerpo contra DR4 por la construcción DR4-receptor de IgG, tal como se describe en el Ejemplo 2.

El anticuerpo contra el receptor del Apo-2L puede unirse al mismo epítopo sobre el DR4 o DR5 al cual se une el Apo-2L, o puede unirse a un epítopo sobre el DR4 o DR5 que coincide o se solapa respectivamente con el epítopo sobre el DR4 o el DR5 al cual se une el Apo-2L. El anticuerpo puede interactuar también de tal forma que crea una conformación estérica que impide la unión de ligando de Apo-2 al DR4 o DR5. La propiedad de unión al epítopo del anticuerpo de la presente invención puede determinarse usando técnicas conocidas en el estado de la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede ensayarse en un ensayo *in vitro* tal como un ensayo de inhibición competitiva, para determinar la capacidad del anticuerpo para bloquear o inhibir la unión del Apo-2L al DR4 o DR5. Opcionalmente el anticuerpo puede ensayarse en un ensayo de inhibición competitiva para determinar la capacidad de, por ejemplo, el anticuerpo contra el DR4, para inhibir la unión de un polipéptido Apo-2L (tal como se describe en el Ejemplo 1) a una construcción DR4-IgG (tal como se describe en el Ejemplo 2), o a una célula que expresa el DR4. Opcionalmente, el anticuerpo será capaz de bloquear o inhibir la unión del Apo-2L al receptor en al menos el 50%, preferiblemente al menos en el 75%, e incluso más preferiblemente en al menos el 90%, lo que puede determinarse, a modo de ejemplo, en un ensayo *in vitro* de inhibición competitiva usando una forma soluble de ligando de Apo-2 (TRAIL) y una DR4 Eco-IgG (tal como se describe en el Ejemplo 2).

El anticuerpo puede comprender un anticuerpo agonista que tiene actividad que imita o es comparable al ligando de Apo-2 (TRAIL). Preferiblemente, semejante anticuerpo agonista de DR4 o DR5 inducirá la apoptosis en al menos un tipo de línea celular de cáncer o tumoral, o de tumor primario. La actividad apoptótica de un anticuerpo agonista de DR4 o DR5 puede determinarse usando ensayos *in vitro* o *in vivo* conocidos. Los ejemplos de tales ensayos *in vitro* e *in vivo* se describen más adelante en detalle en la sección de Ejemplos. *In vitro*, la actividad apoptótica puede determinarse usando técnicas conocidas tales como la unión de Anexina V. *In vivo*, la actividad apoptótica puede determinarse, por ejemplo, midiendo la reducción en las dimensiones o volumen del tumor.

### 3. Anticuerpos biespecíficos

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

Los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos son bien conocidos en el estado de la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes [Milstein y Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)]. Debido al surtido aleatorio de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (quadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura bioespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se consigue usualmente mediante pasos de cromatografía de afinidad. Se describieron procedimientos similares en WO 93/08629, publicada el 13 de mayo de 1993, y en Trauneker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse con secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, comprendiendo al menos parte de las regiones gozne, CH2 y CH3. Es preferible tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión distintos, y se cotransfectan en un organismo huésped apropiado. Para detalles adicionales sobre la generación de anticuerpos biespecíficos consultar, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

### 4. Anticuerpos heteroconjugados

En la presente invención también se describen anticuerpos heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune hacia células no deseadas (patente estadounidense n° 4.676.980), y para el tratamiento de la infección con VIH [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos podrían prepararse *in vitro* usando procedimientos conocidos en la química de proteínas sintética, incluyendo aquellos que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro, o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos apropiados para este propósito incluyen el iminotiolato y el metil-4-mercaptobutirimidato, y aquellos descubiertos en la patente estadounidense n° 4.676.980.

### 5. Triacuerpos

En la presente invención también se describen triacuerpos. Tales anticuerpo se describen por ejemplo en Iliades *et al.*, ver más arriba, y en Kortt *et al.*, ver más arriba.

## 6. Otras modificaciones

En la presente invención se contemplan otras modificaciones de los anticuerpos contra el receptor del Apo-2L. Los anticuerpos pueden modificarse conjugando el anticuerpo con un agente citotóxico (como una molécula de toxina) o con un enzima activador de profármaco, el cual convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, ver WO81/01145) en un fármaco anticáncer activo. Consultar, por ejemplo, WO 88/07378 y la patente estadounidense n° 4.975.278. Esta tecnología se denomina también como "Terapia con Profármaco Mediada por Enzima y Dependiente de Anticuerpo" (ADEPT).

El componente enzimático del inmunoc conjugado útil para la ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal forma que lo convierte en su forma más activa citotóxica. Los enzimas que son útiles incluyen, pero no se limitan, a la fosfatasa alcalina, útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; la arilsulfatasa, útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; la citosina deaminasa, útil para convertir la 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticáncer 5-fluorouracilo; las proteasas, tales como la proteasa de Serratia, la termolisina, la subtilisina, las carboxipeptidasas y las catepsinas (tales como la catepsina B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; las caspasas tales como la caspasa-3; las D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes D-aminoácidos; los enzimas que rompen carbohidratos, tales como la beta-galactosidasa y la neuraminidasa, útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; la beta-lactamasa, útil para convertir fármacos derivados con beta-lactamos en fármacos libres; y las penicilina amidasas, tales como la penicilina V amidasa o la penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivados en sus nitrógenos de amina, respectivamente con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, en fármacos libres. Alternativamente, pueden usarse anticuerpos con actividad enzimática, conocidos también en el campo como "abzimas", para convertir los profármacos de la invención en fármacos libres activos (consultar, por ejemplo, Massey, Nature 328:457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima pueden prepararse como se describe en la presente invención para suministro del abzima a una población de células tumorales.

Los enzimas pueden unirse covalentemente a los anticuerpos mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica, tales como el uso de reactivos entrecruzadores heterobifuncionales. Alternativamente, usando técnicas de ADN recombinante, bien conocidas en el estado de la técnica, se pueden construir proteínas de fusión que comprenden al menos la región unidora de antígeno de un anticuerpo de la invención, unida al menos a una porción funcionalmente activa de un enzima de la invención (consultar, por ejemplo, Neuberger *et al.*, Nature, 312:604-608 (1984)).

Se contemplan otras modificaciones de anticuerpos. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, el polietilenglicol, el polipropilenglicol, los polioxialquilenos, o a copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo puede atraparse también en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, respectivamente microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), es sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16ª edición, editor A. Osol (1980). Para incrementar la vida media del anticuerpo en el suero, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor de rescate al anticuerpo (especialmente a un fragmento de anticuerpo) según se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n° 5.739.277. Tal y como se utiliza en la presente invención, el término "epítipo unidor del receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, la IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) que es responsable de incrementar la vida media en el suero de la molécula de IgG.

## 7. Procedimientos recombinantes

También se describen en la presente invención ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos según se describen en la presente invención, vectores y células huéspedes que comprenden el ácido nucleico, y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo.

Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para su ulterior clonación (amplificación del ADN) o para su expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican el anticuerpo). Hay muchos vectores disponibles. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

Los procedimientos en la presente invención incluyen procedimientos para la producción de anticuerpos quiméricos o recombinantes anti-receptor del Apo-2L, lo cual comprende los pasos de proporcionar un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica una cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo anti-receptor del Apo-2L (o ambas, una cadena ligera y una cadena pesada), transfectar o transformar una célula huésped con el vector, y cultivar la célula o células huéspedes en condiciones suficientes para producir el producto anticuerpo anti-receptores del Apo-2L.

## ES 2 317 924 T3

### (i) *Componente secuencia señalizadora*

El anticuerpo anti-receptores del Apo-2L puede producirse de forma recombinante, no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, el cual es preferiblemente una secuencia de señal u otro polipéptido que tiene un sitio de corte específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia de señal heteróloga seleccionada preferiblemente es una que es reconocida y procesada (es decir, cortada por una peptidasa de señal) por la célula huésped. En el caso de las células huésped procariotas que no reconocen y procesa la secuencia señal nativa del anticuerpo, la secuencia de señal se sustituye con una secuencia de señal procariota seleccionada por ejemplo, del grupo formado por los líderes de la fosfatasa alcalina, la penicilinas, 1 pp, o la enterotoxina II estable al calor. Para la secreción en levaduras, la secuencia de señal puede ser sustituida, por ejemplo, por el líder de la invertasa de la levadura, un líder de factor (incluyendo los líderes de los factores- $\alpha$  de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en WO 90/13646. En la expresión en células de mamífero están disponibles las secuencias de señal de mamíferos, así como los líderes secretorios víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simplex. El ADN para semejante región precursora se liga en pauta de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

### (ii) *Componente origen de replicación*

Ambos vectores, el de expresión y el de clonación, contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células huéspedes seleccionadas. Generalmente, en los vectores de clonación esta secuencia es una que permite al vector replicarse independientemente del ADN cromosómico del huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencia que se replican de forma autónoma. Tales secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es apropiado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido  $2\mu$  es apropiado para levaduras, y varios orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos. Generalmente, el componente origen de replicación no se necesita para vectores de expresión en mamíferos (el origen del SV40 puede usarse típicamente sólo porque contiene el promotor temprano).

### (iii) *Componente gen de selección*

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

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco de detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que han sido transformadas exitosamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y, por tanto, sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de tal selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico, y la higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables apropiados para las células de mamífero son los que permiten la identificación de las células competentes para captar el ácido nucleico que codifica el antibiótico, tales como la DHFR, la quinasa de timidina, la metalotioneína I y II, preferiblemente los genes de la metalotioneína de primate, la adenosina desaminasa, la ornitina descarboxilasa, etcétera.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de la DHFR se identifican primero cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de la DHFR. Una célula huésped apropiada, cuando se emplea la DHFR del tipo salvaje, es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad DHFR.

Alternativamente, pueden seleccionarse células huéspedes (particularmente huéspedes del tipo salvaje que contienen DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican el anticuerpo anti-receptor del Apo-2L, la proteína DHFR del tipo salvaje, y otro marcador seleccionable, tales como la aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH), haciendo crecer las células en un medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, la kanamicina, neomicina, o la G418. Ver la patente estadounidense n° 4.965.199.

Un gen de selección apropiado para su uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido YRp7 de levadura (Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador seleccionable para una cepa mutante de levadura que carezca de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, la ATCC n° 44076 o la PEP4-1. Jones, Genetics, 85:12 (1977). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona entonces un entorno efectivo para detectar la transformación mediante el cultivo en ausencia de triptófano. De forma similar, las cepas de levaduras deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementada con plásmidos conocidos portadores del gen *Leu2*.

Además, los vectores derivados del plásmido circular de 1,6  $\mu$ m pKD1 pueden usarse en la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, se describió un sistema de expresión para la producción a gran escala de

## ES 2 317 924 T3

quimosina bovina recombinante en *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). También se han descrito vectores de expresión estable de múltiples copias para la secreción de albúmina del suero humana recombinante por parte de cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991).

### 5 (iv) *Componente promotor*

Los vectores de clonación y expresión usualmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped, y que está unido operativamente al ácido nucleico del anticuerpo. Los promotores apropiados para uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor de *phoA*, los sistemas promotores de la  $\beta$ -lactamasa y de la lactosa, de la fosfatasa alcalina, un sistema promotor del triptófano (*trp*), y los promotores híbridos tal como el promotor *tac*. No obstante, son apropiados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el anticuerpo anti-receptor del Apo-2L.

15 Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Virtualmente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT ubicada aproximadamente de 25 a 30 bases cadena arriba respecto el sitio de inicio de la transcripción. Otra secuencia que se halla de 70 a 80 bases cadena arriba respecto el inicio de transcripción de muchos genes es una región CNCAAT, en donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli-A al extremo 3' de la secuencia codificante. 20 La totalidad de estas secuencias se insertan apropiadamente en vectores de expresión eucariotas.

Los ejemplos de secuencias promotoras apropiadas para usarlas con huéspedes de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa, u otros enzimas glicolíticos, tales como la enolasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la hexoquinasa, la piruvato descarboxilasa, la fosfofructoquinasa, la glucosa-6-fosfato isomerasa, la 25 3-fosfoglicerato mutasa, la piruvato quinasa, la triosafosfato isomerasa, la fosfoglucosa isomerasa y la glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, los cuales son promotores inducibles que tienen las ventajas adicionales de la transcripción controlada por las condiciones de cultivo, son las regiones promotoras de la alcohol deshidrogenasa 2, el isocitocromo C, la fosfatasa ácida, los enzimas de degradación asociados con el metabolismo del nitrógeno, la metalotioneína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y los enzimas responsables de la utilización de la maltosa y galactosa. Los vectores y promotores apropiados para uso en la expresión en levadura se describen adicionalmente en EP 73.657. Los potenciadores de levadura se usan ventajosamente con promotores de levadura.

La transcripción del anticuerpo anti-receptor del Apo-2L, a partir de vectores en células huésped de mamífero, está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus tales como el virus del poliovirus, el virus de la viruela aviar, el adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma de las aves, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y el virus 40 del mono (SV40), a partir de promotores heterólogos de mamífero, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, y a partir de promotores de choque térmico, a condición de que tales promotores sean compatibles con los sistemas de la célula huésped. 40

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción del SV40 que también contiene el origen de replicación vírico del SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. En la patente estadounidense n° 4.419.446 se describe un sistema de expresión del ADN en huéspedes mamíferos usando el virus del papiloma bovino como un vector. Una modificación de este sistema se describe en la patente estadounidense n° 4.601.978. Consultar también Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982) sobre la expresión de ADNc del interferón- $\beta$  humano en células de ratón bajo el control de un promotor de la timidina quinasa procedente del virus herpes simplex. Alternativamente, puede usarse la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor. 50

### (v) *Componente elemento potenciador*

La transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo anti-receptor del Apo-2L por parte de eucariotas superiores a menudo se incrementa insertando una secuencia potenciadora en el vector. Se conocen muchas secuencias potenciadores procedentes de genes de mamíferos (de globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína, e insulina). Sin embargo, típicamente se usará un potenciador procedente de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador del SV40 en el lado tardío del origen de replicación (p.b. 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del poliovirus en el lado tardío del origen de replicación, y los potenciadores de los adenovirus. Consultar también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede ajustarse en el vector en una posición 5' o 3' respecto la secuencia codificante del anticuerpo, pero preferiblemente se ubica en un sitio 5' respecto el promotor. 60

### (vi) *Componente de terminación de la transcripción*

65 Los vectores de expresión usados en las células huésped eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanas, o células nucleadas procedentes de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están disponibles comúnmente de las regiones 5', y ocasionalmente 3', no traducidas de los ADN o ADNc víricos eucariotas. Estas

## ES 2 317 924 T3

regiones contienen segmentos de nucleótidos que se transcriben como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo multivalente. Un componente útil de terminación de la transcripción es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Consultar WO94/11026 y los vectores de expresión descritos en la misma.

5

### (vii) Selección y transformación de células huéspedes

Las células huéspedes apropiadas para clonar o expresar el ADN en los vectores de la presente son las células de procariota, de levadura o de eucariota superior. Las procariotas apropiadas para este propósito incluyen las eubacterias, tales como los organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, enterobacterias tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266.710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un huésped de clonación *E. coli* opcional es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son apropiadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos en vez de limitantes.

15

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos o las levaduras, son huéspedes de clonación o expresión apropiados para los vectores que codifican el anticuerpo contra el receptor del Apo-2L. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de panadería, es el más usado entre los microorganismos huéspedes que son eucariotas inferiores. No obstante, hay un cierto número de géneros, especies y cepas que son comúnmente accesibles y útiles en la presente invención, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y huéspedes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

20

25

Las células huéspedes apropiadas para la expresión del anticuerpo glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen las células de insectos y plantas. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas y células huéspedes de insecto permisivas variantes y correspondientes procedentes de huéspedes, tales como las células huéspedes de *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Una variedad de tales cepas víricas están disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-1 del NPV de *Autographa californica*, y tales virus pueden usarse como los virus en la presente invención, de acuerdo con la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

30

35

Los cultivos de células vegetales del algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco pueden usarse como huéspedes.

40

Sin embargo, ha sido mayor el interés por las células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) ha devenido un procedimiento rutinario. Los ejemplos de líneas celulares huéspedes de mamífero útiles son la línea CV1 renal de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea renal embrionaria humana (células 293 ó 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); las células renales de crías de hámster (BHK, ATCC CCL 10); las células ováricas de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); las células sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); las células renales de mono (CV1, ATCC CCL 70); las células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); las células del carcinoma del cuello de útero humanas (HELA, ATCC CCL 2); las células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); las células hepáticas de ratas Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); las células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); las células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); las tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); las células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)); las células MRC; las células FS4; una línea de hepatoma humana (Hep C2); y las células de mieloma o linfoma (por ejemplo, las células Y0, J558L, P3 y NS0) (consultar la patente estadounidense n° 5.807.715).

55

Las células huéspedes se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos más arriba para la producción del anticuerpo, y se cultivan en medios nutritivos convencionales, modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

60

### (viii) Cultivo de las células huéspedes

Las células huéspedes usadas para producir el anticuerpo pueden cultivarse en una variedad de medios. Los medios de cultivo disponibles comercialmente tales como el F10 de Ham (Sigma), el Medio Esencial Mínimo (MEM), Sigma, el RPMI-1640 (Sigma), y el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Sigma son apropiados para cultivar las células huéspedes. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, *Meth. Enz.*, 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.*, 102:255 (1980), patentes estadounidenses n° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; WO 90/03430; WO 87/00195; o en la solicitud de patente estadounidense n° 30.985, puede usarse como medio de cultivo para las células huéspedes. Cualquiera de estos medios podría suplementarse según

65

fuera necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como la insulina, la transferrina o el factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como el cloruro sódico, el calcio, el magnesio, y el fosfato), tampones (tales como el HEPES), nucleósidos (tales como la adenosina y la timidina), antibióticos (tales como el fármaco Gentamicina™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes usualmente en concentraciones finales del orden micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualesquier otros suplementos necesarios podrían incluirse también en las concentraciones apropiadas, las cuales serán conocidas por los especialistas en el campo. Las condiciones del cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son aquéllas usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el especialista ordinariamente capacitado.

#### 10 (ix) Purificación

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primer paso, los restos de partículas, sean células huéspedes o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se han secretado al espacio periplásmico de *E. coli*. De forma resumida, la pasta de células se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA, y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Los restos celulares pueden eliminarse mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes procedentes de tales sistemas de expresión generalmente se concentran primero usando un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasas, tal como el PMSF, puede incluirse en cualquiera de los pasos precedentes para inhibir la proteólisis, y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La conveniencia de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier región Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basen en las cadenas pesadas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ , o  $\gamma 4$  humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth., 62:1-13 (1983)). La proteína G está recomendada para todos los isotipos de ratón y para la  $\gamma 3$  humana (Guss *et al.*, EMBO J., 5:15671575 (1986)). La matriz a la cual está unido el ligando de afinidad es mayoritariamente agarosa, pero hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tales como los vidrios de poro controlado o el poli(estirenodivinil)benceno, permiten velocidades de flujo más elevadas y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, la precipitación con etanol, la HPLC en fase inversa, la cromatografía sobre sílice, la cromatografía sobre heparina-SEPHAROSE™ la cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), el cromatofoco, la SDS-PAGE, y la precipitación con sulfato amónico, están disponibles también dependiendo del anticuerpo que deba recuperarse.

#### C. Formulaciones

El ligando de Apo-2 o el anticuerpo contra el receptor del Apo-2L y el CPT-11 se administran preferiblemente en un portador. Las moléculas pueden administrarse en un único portador o, alternativamente, pueden incluirse en portadores separados. Los portadores apropiados y sus formulaciones se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16ª edición, 1980, Mack Publishing Co., editado por Osol *et al.* Típicamente, en el portador se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable para hacer que la formulación sea isotónica. Los ejemplos del portador incluyen la solución salina, la solución de Ringer y la solución de dextrosa. El pH de la solución va preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8, y más preferiblemente desde aproximadamente 7,4 hasta aproximadamente 7,8. Será evidente para las personas formadas en el campo que ciertos portadores podrían ser más preferibles dependiendo de, por ejemplo, la ruta de administración y la concentración del agente que se está administrando. El portador podría estar en forma de una formulación liofilizada o en solución acuosa.

Los portadores, excipientes o estabilizantes preferiblemente no son tóxicos para las células y/o los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como el fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (tales como el cloruro de octadecildimetilbencilamonio; el cloruro de hexametonio; el cloruro de benzalconio, el cloruro de bencetonio; el fenol, el alcohol butílico o bencilico; los alquilparabenos tales como el metil o propilparaben; el catecol; el resorcinol; el ciclohexanol; el 3-pentanol; y el m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como la albúmina del suero, la gelatina, o las inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como la polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como la glicina, la glutamina, la asparagina, la arginina o la lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, incluyendo la glucosa, la manosa, o las dextrinas; agentes quelantes tales como el EDTA; azúcares tales como la sacarosa, el manitol, la trehalosa o el sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como el sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como el TWEEN™, el PLURONICS™ o el polietilenglicol (PEG).

La formulación podrían contener también más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación concreta que se está tratando, preferiblemente aquéllas que complementan actividades que no se afectan desfavorablemente entre ellas. Alternativamente, o además, la composición podría comprender un agente citotóxico, citocina o agente inhibidor del crecimiento. Tales moléculas están convenientemente presentes en combinación, en cantidades que son efectivas para el propósito pretendido.

El Apo-2L o el anticuerpo agonista y el CTP-11 también pueden estar atrapado en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, respectivamente microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), es sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16ª edición, editor A. Osol (1980).

Las formulaciones que van a usarse para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estéril.

Pueden prepararse preparaciones de liberación continua. Los ejemplos apropiados de preparaciones de liberación continua incluyen las matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación continuada incluyen los poliésteres, los hidrogeles (por ejemplo, el poli(2-hidroxietil-metacrilato), o el poli(alcohol vinílico)), los polilácticos (patente estadounidense n° 3.773.919), los copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$ -etil-L-glutamato, el etilvinilacetato no degradable, los copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólido), y el ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Mientras que los polímeros tales como el etilvinilacetato y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos.

#### D. Modos de administración

El Apo-2L o el anticuerpo agonista del receptor del Apo-2L y el CPT-11 pueden administrarse de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como la administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continuada a lo largo de un período de tiempo, por rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intra-articular, intrasinoval, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. Opcionalmente, la administración podría realizarse a través de la infusión con mini-bomba, usando varios dispositivos disponibles comercialmente.

Las dosis efectivas para administrar el ligando de Apo-2, o el anticuerpo agonista del receptor del Apo-2L, y el CTP-11 pueden determinarse empíricamente, y hacer tales determinaciones se halla dentro de los conocimientos del estado de la técnica. Se cree actualmente que una dosis o cantidad efectiva de ligando de Apo-2 usado solo puede oscilar desde aproximadamente 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  hasta aproximadamente 100  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal o más por día. Una dosis o cantidad efectiva de CPT-11 usado solo puede oscilar desde 1  $\text{mg}/\text{m}^2$  hasta aproximadamente 150  $\text{mg}/\text{m}^2$ . El escalado de las dosis entre especies puede realizarse de una forma conocida en el campo, por ejemplo, tal como se describe en Mordenti *et al.*, Pharmaceut. Res., 8:1351 (1991). Los especialistas en el campo apreciarán que la dosis de ligando de Apo-2, o anticuerpo agonista del receptor del Apo-2L, y de CPT-11 que debe administrarse variará dependiendo, por ejemplo, del mamífero que recibirá el ligando de Apo-2, o el anticuerpo agonista del receptor del Apo-2L, y el CPT-11, de la ruta de administración, y de otros fármacos o terapias que se estén administrando al mamífero.

Dependiendo del tipo de células y/o de la gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 15  $\text{mg}/\text{kg}$  (por ejemplo, 0,1-20  $\text{mg}/\text{kg}$ ) de anticuerpo agonista es una dosis candidata inicial para la administración, sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continuada. Una dosis diaria típica puede oscilar desde aproximadamente 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  hasta 100  $\text{mg}/\text{kg}$  o más, dependiendo de los factores antes mencionados. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantiene hasta que ocurre una supresión deseada de los síntomas. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación.

Se cree que el pretratamiento de las células con CTP-11 puede reducir la cantidad de agonista del receptor del Apo-2L requerido para inducir la apoptosis en una población seleccionada de células. Por ejemplo, el pretratamiento de las células con CTP-11 puede reducir la cantidad de agonista del receptor del Apo-2L requerido para inducir (una cantidad equivalente o grado de) la apoptosis en una población de células de mamífero, en al menos el 25% y preferiblemente en la menos el 50%.

Se contempla que una o más moléculas agonistas del receptor del Apo-2L pueden emplearse en los usos médicos y procedimientos *in vitro*. Por ejemplo, el médico puede emplear el ligando de Apo-2, el anticuerpo agonista del DR4, el anticuerpo agonista del DR5, o combinaciones de los mismos. Opcionalmente, el anticuerpo agonista del receptor de Apo-2L comprenderá un anticuerpo de reacción cruzada que se une a ambos, el DR4 y el DR5.

Se contempla que incluso pueden emplearse terapias adicionales en los usos médicos y procedimientos *in vitro*. La terapia o terapias adicionales pueden incluir, pero no se limitan a, otras quimioterapias (o agentes quimioterapéuticos) y/o radioterapia, inmunoadyuvantes, agentes inhibidores del crecimiento, citocinas, y otras terapias basadas en anti-

cuerpo non-Her-2. Los ejemplos incluyen las interleucinas (por ejemplo, las IL-1, IL-2, IL-3, IL-6), el factor inhibidor de leucemia, los interferones, el TGF-beta, la eritropoyetina, la trombopoyetina, y el anticuerpo anti-VEGF. También pueden emplearse otros agentes que se sabe inducen la apoptosis en células de mamífero, y tales agentes incluyen el TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  (linfotóxina- $\alpha$ ), el ligando de CD30, el ligando de 4-1BB, y el ligando de Apo-1.

Las quimioterapias adicionales contempladas por la invención incluyen sustancias químicas o fármacos que son conocidos en el estado de la técnica y que están disponibles comercialmente, tales como la adriamicina, la doxorubicina, el 5-fluorouracilo, el arabinósido de citosina ("Ara-C"), la ciclofosfamida, la leucovorina, la tiotepa, el busulfán, la citoxina, el taxol, el toxotero, el metotrexato, el cisplatino, el melfalán, la vinblastina, la bleomicina, el etopósido, la ifosfamida, la mitomicina C, la mitoxantrona, la vincristina, la vinorelbina, el carboplatino, la tenipósida, la daunomicina, la carminomicina, la aminopterina, la dactinomicina, las mitomicinas, las esperamicinas (ver patente estadounidense n° 4.675.187), el melfalán, y otras mostazas de nitrógeno relacionadas. También se incluyen los agentes que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre los tumores, tales como el tamoxifén y la onapristona.

La preparación y programación de las dosis para semejantes quimioterapia puede hacerse de acuerdo con las instrucciones del fabricante, o según sea determinado empíricamente por el médico capacitado. La preparación y los programas de dosificación para semejante quimioterapia se describen también en "Chemotherapy Service", Ed. M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder, o seguir la administración del Apo-2L, o del anticuerpo agonista, y/o del CPT-11, o puede administrarse simultáneamente con ellos.

La quimioterapia se administra preferiblemente en un portador, tal como los descritos más arriba. El modo de administración de la quimioterapia puede ser el mismo que se ha empleado para el ligando de Apo-2, o el anticuerpo agonista, o el CPT-11, o puede administrarse a través de un modo diferente.

La radioterapia puede administrarse de acuerdo con los protocolos comúnmente empleados en el campo y conocidos por el especialista capacitado. Semejante terapia puede incluir la radiación con cesio, iridio, yodo, o cobalto. La terapia de radiación puede ser irradiación del cuerpo entero, o puede estar dirigida localmente a un sitio o tejido específico, dentro o sobre el cuerpo. Típicamente, la radioterapia se administra en pulsos a lo largo de un período de tiempo desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 2 semanas. No obstante, la radioterapia puede administrarse a lo largo de períodos de tiempo más prolongados. Opcionalmente, la radioterapia puede administrarse como una dosis simple o como múltiples dosis secuenciales.

A continuación de la administración del ligando de Apo-2, o del anticuerpo agonista, y del CPT-11, las células tratadas *in vitro* pueden analizarse. Cuando ha habido un tratamiento *in vivo*, el mamífero tratado puede monitorizarse de varias formas bien conocidas por el médico capacitado. Por ejemplo, la masa tumoral puede observarse físicamente, mediante biopsia, o mediante técnicas estándares de visualización con rayos-X.

### III. Artículos manufacturados

Se proporciona un artículo manufacturado que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos más arriba. El artículo manufacturado comprende un contenedor y una marca. Los contenedores apropiados incluyen, por ejemplo, las botellas, los viales, las jeringas y los tubos de ensayo. Los contenedores podrían estar formados por una variedad de materiales, tales como el vidrio o el plástico. El contenedor contiene una composición que es efectiva para tratar la condición, y podría tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor podría ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Los agentes activos en la composición son el ligando de Apo-2, o el anticuerpo agonista, y el CPT-11. La marca sobre, o asociada al contenedor indica que la composición se usa para tratar la enfermedad escogida. El artículo manufacturado puede comprender además un segundo contenedor que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina tamponada con fosfato, una solución de Ringer, y una solución de dextrosa. Además, podría incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, e insertos del paquete con instrucciones para su uso.

Los ejemplos siguientes se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

#### Ejemplo 1

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

La línea celular de carcinoma de colon COLO205 (disponible de NCI) se cultivó y mantuvo de acuerdo con los procedimientos del suministrador. De forma resumida, las células COLO205 se cultivaron en medio DMEM con glucosa elevada/F12 (50:50) que contenía un 10% de suero fetal bovino y L-Glutamina 2,0 mM. El ligando de Apo-2 que comprende los aminoácidos 114-281 (SEC. N° ID.: 1) se preparó en *E. coli*. La porción extracelular del Apo-2L humano (aminoácidos 114-281; consultar Pitti *et al.*, ver más arriba) se subclonó en el plásmido de expresión pS1346 (Scholtissek *et al.*, Gene, 62:55-64 (1988)) con un codón iniciador de metionina añadido, y se expresó bajo control del promotor *trp* en la cepa W3110 de *E. coli*, en fermentadores de 10L ó 100L. La pasta de células que contenía el Apo-2L soluble humano recombinante se extrajo con un tampón que contenía Tris 0,1 M/NaCl 0,2 M/EDTA 50 mM, pH 8,0. El extracto se precipitó con sulfato amónico al 40%. La purificación hasta >98% de homogeneidad se

## ES 2 317 924 T3

consiguió mediante dos pasos de separación cromatográfica consecutivos sobre columnas de hidroxipatito y Ni-NTA. (Aunque carece de cola de polihistidina, se cree que el fragmento de Apo-2L de los aminoácidos 114-281, soluble, recombinante, se une a la columna de Ni-NTA a través de los residuos de histidina endógenos). La pureza se determinó mediante electroforesis en gel de docecilsulfato sódico-poliacrilamida y tinción con nitrato de plata o azul Coomassie, mediante análisis de la secuencia de aminoácidos, y mediante cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC). El CPT-11 (Camptosar®) se obtuvo de Pharmacia & Upjohn.

Los ratones desnudos atímicos (Jackson Laboratories) se inyectaron subcutáneamente con 5 millones de células COL0205 de carcinoma de colon, y los tumores se dejaron crecer hasta aproximadamente 120 mm<sup>3</sup>. Los ratones portadores de tumor se repartieron aleatoriamente en 4 grupos de 9 ratones por grupo, y se trataron bien con vehículo (Tris 20 mM, trehalosa al 8%, 0,01 de Tween-20, pH 7,5), Apo-2L (30 mg/kg/día en los días 0-4 y 7-11), o CPT-11 (80 mg/kg/día en los días 0, 4, y 8), o una combinación de Apo-2L (30 mg/kg/día en los días 0-4 y 7-11) más CPT-11 (80 mg/kg/día en los días 0, 4, y 8). Los volúmenes de los tumores se determinaron en los días indicados a lo largo de 34 días.

Como se muestra en la Figura 1, tanto el Apo-2L (triángulos vacíos) como el CPT-11 (cuadrados vacíos) suprimieron el crecimiento tumoral durante el período de tratamiento, aunque el crecimiento tumoral se reanudó varios días más tarde en la totalidad de los 9 animales de cada grupo. Por contra, la combinación del Apo-2L con el CPT-11 (triángulos rellenos) causó una contracción sustancial del tumor, resultando en la completa eliminación del tumor en 8 de los 9 animales en el grupo de tratamiento.

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

### Ejemplo 2

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

El anticuerpo agonista se preparó como sigue. Se preparó una construcción soluble de inmunoadhesina del ECD de DR4. Una secuencia del ECD de DR4 madura (aminoácidos 1-218, mostrados en Pan *et al.*, ver más arriba) se clonó en un vector pCMV-1 Flag (Kodak), cadena abajo respecto la secuencia de señal Flag, y se fusionó al CH1, gozne y región Fc de la cadena pesada de la inmunoglobulina G1 humana, según se ha descrito previamente [Aruffo *et al.*, Cell, 61:1303-1313 (1990)]. La inmunoadhesina se expresó mediante transfección transitoria en células 293 humanas, y se purificó a partir de los sobrenadantes de las células mediante cromatografía de afinidad con Proteína A, según describieron Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 88:10535-10539 (1991).

Se inmunizaron ratones Balb/c (obtenidos de los Charles River Laboratories) inyectándoles 0,5 µg/50 µl de una proteína inmunoadhesina del ECD del DR4 (como se describió más arriba) (diluida en adyuvante MPL-TDM comprado a Ribi Immunochemical Research, Hamilton, Mont.) 11 veces en cada planta de los pies de la patas traseras a intervalos de 3-4 días.

Tres días después del recuerdo final, se extrajeron los nódulos linfáticos poplíteos de los ratones, y se preparó una única suspensión celular en medio DMEM (obtenido de Biowhitaker Corp.) suplementado con un 1% de penicilina-estreptomicina. Las células de los nódulos linfáticos se fusionaron con células de mieloma múrido P3X63AgU.1 (ATCC CRL 1597) usando polietilenglicol al 35%, y se cultivaron en placas de cultivo de 96 pocillos. Los hibridomas resultantes de la fusión se seleccionaron en medio HAT. Diez días después de la fusión, los sobrenadantes del cultivo de hibridomas se examinaron en un ELISA para ensayar la presencia de anticuerpos monoclonales que se unieran a la proteína inmunoadhesina del ECD del DR4.

En el ELISA, se recubrieron placas de microvaloración de 96 pocillos (Maxisorb; Nunc, Kamstrup, Dinamarca) añadiendo 50 µl de 2 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG humana (comprado a Cappel Laboratories) en PBS a cada pocillo, e incubando a 4°C durante la noche. A continuación se lavaron las placas tres veces con tampón de lavado (PBS conteniendo un 0,05% de Tween 20). Los pocillos en las placas de microvaloración se bloquearon entonces con 200 µl de albúmina de suero bovina al 2,0% en PBS, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se lavaron de nuevo las placas tres veces con tampón de lavado.

Después del paso de lavado, se añadieron a cada pocillo 50 µl de 0,4 µg/ml de la proteína inmunoadhesina del ECD del DR4 en tampón de ensayo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora sobre un agitador, y se lavaron a continuación tres veces con tampón de lavado.

A continuación de los pasos de lavado, se añadieron 100 µl de los sobrenadantes de hibridoma, o del anticuerpo (10 µg/ml) purificado en columna de Proteína G-Sepharose, a los pocillos designados. Se añadieron 100 µl de medio condicionado con células de mieloma P3X63AgU.1 a otros pocillos designados como controles. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en un aparato agitador y se lavaron a continuación tres veces con tampón de lavado.

## ES 2 317 924 T3

A continuación, se añadieron a cada pocillo 50  $\mu$ l de anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG de ratón (comprado a Cappel Laboratories), conjugado con HRP, diluido 1:1000 en tampón de ensayo (0,5% de albúmina de suero bovino, 0,05% de Tween-20 en PBS), y se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente sobre un agitador. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado, seguido por la adición de 50  $\mu$ l de sustrato (sustrato de peroxidasa TMB Microwell, Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, Md.) a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 50  $\mu$ l de solución de detención "TMB 1-Component" (dietilglicol, Kirkegaard & Perry) a cada pocillo, y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector automatizado de placas de microvaloración.

Los sobrenadantes de hibridomas inicialmente examinados en el ELISA se evaluaron por su capacidad para unir el DR4-IgG pero no el CD4-IgG. Los sobrenadantes que dieron positivos en el ELISA se analizaron adicionalmente mediante análisis FACS usando células 9D (una línea de células linfoides B humanas que expresan el DR4; Genentech, Inc.) y anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC. Para este análisis, se añadieron 25  $\mu$ l de células suspendidas (a  $4 \times 10^6$  células/ml) en un tampón de clasificación de células (PBS conteniendo un 1% de FCS y 0,02% de  $\text{NaN}_3$ ) a pocillos de microvaloración con fondo en U, se mezclaron con 100  $\mu$ l de sobrenadante de cultivo o anticuerpo purificado (10  $\mu$ g/ml) en tampón de clasificación de células, y se incubaron durante 30 minutos sobre hielo. Las células se lavaron a continuación y se incubaron con 100  $\mu$ l de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con FITC, durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron a continuación dos veces, se resuspendieron en 150  $\mu$ l de tampón clasificador de células, y se analizaron a continuación mediante FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

La tinción del FACS de las células 9D reveló que los anticuerpos, 4E7.24.3 y 4H6.17.8, reconocían el receptor DR4 sobre las células 9D. Los sobrenadantes de los hibridomas y los anticuerpos se ensayaron a continuación por su actividad para inducir la apoptosis de células 9D mediada por el DR4. Las células 9D ( $5 \times 10^5$  células/0,5 ml) se incubaron con 5  $\mu$ g de mAAb contra el DR4 (4E7.24.3 ó 4H6.17.8), o anticuerpos control de IgG, en 200  $\mu$ l de medio RPMI completo, a 4°C durante 15 minutos. Las células se incubaron a continuación durante 5 minutos a 37°C con o sin 10  $\mu$ g de anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG de ratón (ICN Pharmaceuticals) en 300  $\mu$ l de RPMI completo. En este punto, las células se incubaron durante la noche a 37°C y en presencia de 7% de  $\text{CO}_2$ . Las células se recolectaron entonces y se lavaron una vez con PBS. La apoptosis de las células se determinó mediante tinción de la unión de FITC-anexina V a fosfatidilserina según las recomendaciones del fabricante (Clontech). Las células se lavaron en PBS y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de tampón de unión. Se añadieron diez  $\mu$ l de anexina-V-FITC (1  $\mu$ g/ml) y 10  $\mu$ l de yoduro de propidio a las células. Después de incubarlas durante 15 minutos a oscuras, las células 9D se analizaron mediante FACS.

Ambos anticuerpos contra el DR4 (en ausencia del anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG de ratón) indujeron apoptosis en las células 9D en comparación con los anticuerpos control. Sin embargo, la actividad agonista de ambos anticuerpos contra el DR4 fue potenciada por el entrecruzamiento del receptor DR4 en presencia del anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG de ratón. Esta apoptosis potenciada por parte de ambos anticuerpos contra el DR4 es comparable a la actividad apoptótica del Apo-2L en las células 9D.

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

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

### Ejemplo 3

Este ejemplo describe los efectos fisiológicos del CPT-11 y Apo2L/TRAIL, y demuestra cómo el pretratamiento de células con CPT-11 antes de su exposición al Apo2L/TRAIL produce la máxima inducción de ARNm del DR5 y DR4, así como la corte/activación parecido a la caspasa 3, y la apoptosis.

Las abreviaturas usadas en la presente invención incluyen: Apo2L/TRAIL, ligando de Apo2/ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de la necrosis tumoral (preparado según se describen en los Ejemplos 1 y 2); DR, receptor de muerte; DcR, receptor de señuelo; FADD, proteína con dominio de muerte que se asocia con Fas; CPT, Camptotecina; CPT-11, Irinotecán; HUVEC, células endoteliales de la vena umbilical humana; TNF, factor de necrosis tumoral; FLIP, proteína inhibidora del FLICE; CDDP, cis-diaminodicloroplatino (II); CDK, quinasa dependiente de ciclina.

## ES 2 317 924 T3

Para los cultivos celulares, la línea celular HCT116 de cáncer de colon de tumor humano se obtuvo de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 con un 10% de suero fetal bovino, glutamina 1 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomycin. Las células se subcultivaron en placas de 150 cm 24 horas antes de tratamiento con fármacos. Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) se obtuvieron de Cell Systems (#2V0-C75; Kirkland, WA) y se incubaron en medio completo CS-C™ (#4Z0-500, Cell Systems).

Se usó un ensayo AlamarBlue™ para determinar la viabilidad celular. Las células HCT116 de cáncer de colon (-10000 células/pocillo) se incubaron durante la noche en medio RPMI 1640 con un 10% de FBS, en placas de cultivos celulares de 96 pocillos. El medio se retiró al día siguiente, y las células se incubaron durante 24 horas en medio sin suero con Apo2L/TRAIL solo (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), CPT-11 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), o Apo2L/TRAIL + CPT 11. Se añadió AlamarBlue™ a los pocillos para las últimas 6 horas del tiempo de incubación de 24 horas. La fluorescencia se leyó usando un fluorímetro lector de placas de 96 pocillos, con una excitación de 530 nm y una emisión de 590 nm. (CytoFluor Serie 4000, lector de placas multipocillos, PerSeptive Biosystems; Framingham, MA). Además, se usó el equipo de viabilidad/citotoxicidad Live/Dead<sup>R</sup> de Molecular Probes (Eugene, OR) para evaluar la presencia de células vivas o muertas. En estos ensayos, se añadieron Calceína-Am (4  $\mu\text{M}$ ) y homodímero-1 de etidio (2  $\mu\text{M}$ ) a las células tratadas, 15 minutos antes de inspeccionar los cultivos con un microscopio de fluorescencia Axiovert 25 (Zeiss; Thornwood, NY) equipado con filtros para fluoresceína (calceína) y rodamina (homodímero-1 de etidio).

También se usó un ensayo con cristal violeta. Las células HCT116 de cáncer de colon (aproximadamente 20.000 células/pocillo) se incubaron durante la noche en medio RPMI 1640 con un 10% de suero fetal bovino (FBS), en placas de cultivos celulares de 96 pocillos. El medio se retiró al día siguiente, y las células se incubaron durante 24 ó 48 horas en el medio fresco que contenía los diferentes agentes mencionados más arriba. Al final de cada tratamiento, se eliminó el medio y se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de solución de cristal violeta al 0,5% a cada pocillo, y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de lavarlos con agua. Una vez los pocillos estuvieron secos, se añadieron a cada pocillo 100  $\mu\text{l}$  de etanol conteniendo HCl 0,5 N. Las placas se leyeron a continuación a 540 nm usando un lector de placas de 96 pocillos (Spectra Max 340pc, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA).

La actividad caspasa se determinó mediante equipos de ensayo de la caspasa-3 (Clontech; Palo Alto, CA). El ensayo se realizó según las instrucciones del fabricante. Las células HCT116 se cultivaron en medio RPMI que contenía un 10% de FCS, glutamina 1 mM, 100 unidades/ml de penicilina, y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomycin, y se sometieron a varios tratamientos según se describe en los pies de figura. Después del tratamiento, se recolectaron las células, se lavaron con PBS frío una vez, y se congelaron a -20°C hasta el momento del ensayo. Los precipitados de células se congelaron y lisaron sobre hielo durante 10 minutos mediante el tampón de lisis celular proporcionado en el equipo. Los lisados se incubaron con el sustrato fluorogénico para caspasa (Z-DEVD-AFE, 100  $\mu\text{M}$ ) en tampón de reacción, a 37°C, durante una hora. Las muestras se analizaron en un lector de placas de múltiples pocillos CytoFluor (PerSeptive Biosystems), con un filtro de excitación de 400/30 nm y un filtro de emisión de 508/20 nm. Los niveles de fluorescencia relativa se normalizaron respecto la concentración de proteína de cada muestra.

El ARN total se aisló usando la solución de ARN Stat-60™ (Tel-Test, Inc., Friendsweed, TX) según las instrucciones del fabricante. El equipo de amplificación de señal Quantigene bDNA™ (Chiron Diagnostics; East Walpole, MA) se usó para evaluar los niveles de ARNm. La secuencia de los conjuntos de sondeo de GADPH fue como recomendaba el fabricante. Los conjuntos de sondas del DR4 se alinearon dentro de la región de los residuos de ácido nucleico 9 a 582. Había 5 sondas de captura, 16 sondas de etiquetado, y 8 sondas de bloqueo. Los conjuntos de sondas del DR5 se alinearon dentro de la región de los residuos de ácido nucleico 13 a 581. Había 5 sondas de captura, 17 sondas de etiquetado, y 5 sondas de bloqueo. La especificidad de las sondas se ensayó usando ARN procedente de la transcripción *in vitro* usando construcción de los DcR1, DcR2, DR4 y DR5. Ambos conjuntos de sondas, para el DR4 y el DR5, eran altamente específicos para sus propios transcritos de ARN. La señal procedente de cada conjunto de sondas era lineal con la concentración ensayada. Los ensayos de ADNb se realizaron, según las instrucciones del fabricante, usando aproximadamente 2  $\mu\text{g}$  de ARN total/pocillo.

Para la transferencia Western, las células se lisaron en Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, que contenía un 10% de glicerol, 1% de Triton-x100, NaCl 150 mM, e inhibidores de proteasa (PMSF 1 mM, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Aprotinina, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Leupeptina, Sigma). Se separaron alícuotas de 50  $\mu\text{g}$  de proteína total por pocillo en un gel NuPAGE 4-12% Bis-Tris, con tampón móvil NuPAGE MES SDS (Novex; San Diego, CA). Los geles se transfirieron a membrana de nitrocelulosa pura 0,2  $\mu\text{M}$  (Bio-Rad) mediante una celda de transferencia semiseca (Bio-dad; Hercules, CA) con tampón de transferencia NuPAGE. Las membranas se bloquearon con PBS que contenía un 5% de leche en polvo desnatada, y se incubaron con anticuerpos primarios contra las proteínas de interés, seguidos por un anticuerpo secundario acopado a peroxidasa de rábano silvestre Amersham; Braunschweig, Alemania). Las bandas inmunorreactivas se visualizaron mediante el sistema de quimioluminiscencia potenciada (Amersham; Braunschweig, Alemania). Los anticuerpos usados en este estudio fueron: anti-caspasa-3 (Stratagene, #200021; La Jolla, CA), anti-p53 y anti-p21 (Oncogene, #OP43 y #OP64; Cambridge, MA), y anti-FLIP (#343002, Calbiochem, San Diego, CA). Los anticuerpos se usaron en las concentraciones recomendadas por los fabricantes.

El análisis del ciclo celular se realizó mediante análisis FACS. Las células HCT116 y HUVEC se incubaron y trataron como se describe en el pie de figura. Después de los tratamientos, se recolectaron tanto las células flotantes en el medio como las células vivas en la placa. El equipo de reactivo "Cycle TEST PLUS DNA™" (Beckon Dickinson; San Jose, CA) se usó para teñir las células de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células teñidas se analizaron

en un clasificador FACS (Becton Dickinson). El porcentaje de células apoptóticas que contenían un contenido de ADN sub-G1 se cuantificó usando el programa CellQuest. El porcentaje de células vivas en cada fase del ciclo celular se cuantificó usando el programa ModFit LT.

5 La Figura 5 proporciona un perfil de tiempo apoptótico, el cual muestra que la sensibilización con CPT-11 de la apoptosis *in vitro* de células HCT116 mediada por Apo2L/TRAIL dependía del tiempo. Las células tumorales se tiñeron con calceína-AM y homodímero-1 de etidio (respectivamente, fluorescencia verde y roja) a continuación de su incubación con Apo2L/TRAIL o CPT-11 solos, y en combinaciones. En estas condiciones las fluorescencia verde indica células vivas; y la tinción roja es indicativa de células muertas. Después de 2 horas de tratamiento, el  
10 Apo2L/TRAIL y la combinación Apo2L/TRAIL + CPT-11 indujeron cambios celulares característicos de la apoptosis, incluyendo el encogimiento de las células y el desprendimiento de las células de la monocapa. Sin embargo, en ese instante no hubo diferencias apreciables en la muerte celular entre Apo2L/TRAIL and y Apo2L/TRAIL + CPT-11. Por contra, la combinación de Apo2L/TRAIL + CPT-11 resultó en un incremento claro en la muerte celular a las 24 horas, tal como se demuestra mediante la captación de homodímero de etidio y por la disminución evidente en la densidad celular total. La incubación con CPT-11 solo no mostró ningún cambio morfológico a las 2 horas. Sin embargo, había  
15 unas pocas células muertas claramente presentes transcurridas 24 horas de tratamiento. Los resultados de un análisis cuantitativo de la supervivencia celular (Figura 4) son consistentes con los datos fluorescentes morfológicos. A las 24 horas de tratamiento, la combinación de Apo2L/TRAIL + CPT-11 resultó en un incremento del 26% en la apoptosis en comparación con el Apo2L solo.

20 En el ensayo con cristal violeta llevado a cabo, algunas células HCT116 se expusieron al tratamiento de combinación Apo2L/ TRAIL (100 ng/ml) y CPT-11 (50 microgramos/ml) durante un total de 24 horas, seguidas por otras 24 horas de incubación en presencia de medio solo. En el grupo de células tratadas secuencialmente, las células HCT116 se expusieron durante las 24 horas iniciales al CPT-11, a continuación, habiéndose cambiado el medio, se expusieron a  
25 medio que contenía Apo2L/TRAIL durante otras 24 horas. En estas condiciones, la destrucción de células total en las células tratadas secuencialmente estaba potenciada en aproximadamente un 6% por encima de las muestras de células tratadas con el tratamiento de combinación ( $p < 0,001$ , Test t). Además, comparando los tratamientos secuencial y de combinación, la actividad de supervivencia relativa disminuyó tanto como el 54%. Este efecto se observó a diferentes concentraciones de CPT-11 y Apo2L/TRAIL (no se muestran los datos).

30 Puesto que se ha descrito previamente que la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL implica la actividad caspasa-3 (consultar, por ejemplo, Muhlenbeck *et al.*, J. Biol. Chem., 273:33091-33098 (1998)), los niveles de activación de caspasa-3 se midieron en esas condiciones. Específicamente, la evaluación de la actividad caspasa-3 a lo largo del tiempo se monitorizó mediante análisis fluorimétrico y de transferencia Western, como se ha descrito más arriba. El  
35 análisis de transferencia Western de la activación de la caspasa-3 mostró que transcurridas 2 horas de tratamiento, el Apo2L/TRAIL inducía un corte significativo de la caspasa-3 en sus formas p24, p20, y p17 (Figura 5). La activación de la caspasa-3 se confirmó independientemente mediante un ensayo fluorimétrico (Figura 5). De forma interesante, la combinación de Apo2L/TRAIL + CPT-11 indujo un grado similar de corte y actividad de la caspasa-3 después de 2 horas de tratamiento. El CPT-11 solo indujo una pequeña, pero apreciable, actividad similar a la caspasa-3, pero el corte fue indetectable en las transferencias Western. A las 24 horas, la incubación combinada de Apo2L/TRAIL + CPT-11 causó un incremento claro en el procesamiento y actividad de la caspasa-3 en comparación con el Apo2L/TRAIL o el CPT-11 solos. Además, una variación del tratamiento de combinación, en la cual las células se incubaron durante  
40 la noche con CPT-11 solo, seguido por 2 horas de tratamiento con Apo2L/TRAIL además de CPT-11, resultó en el máximo grado de corte y actividad de la caspasa-3. Específicamente, el pretratamiento de las células con CPT11 durante 20-22 horas, seguido por dos horas con Apo2L/TRAIL produjo la inducción máxima de ARNm de DR5 y DR4, así como el corte/activación parecido a la caspasa-3, y la apoptosis. Tomados conjuntamente, estos resultados muestran un potenciación en la activación de la caspasa-3 después del tratamiento combinado con Apo2L/TRAIL + CPT-11, lo cual conduce a una apoptosis tumoral incrementada. Para investigar los efectos del Apo2L/TRAIL y del CPT-11 sobre la expresión de los receptores DR5 y DR4 del Apo2L/TRAIL, se usó un ensayo de ADNb. Las  
45 células HCT116 se analizaron antes y después del tratamiento con Apo2L/TRAIL o CPT-11 solos y en combinación. El Apo2L/TRAIL indujo un incremento transitorio de dos veces en la expresión del ARNm del DR5, en comparación con los controles, después de 2 horas de tratamiento (Figura 6). Los cambios inducidos por el Apo2L/TRAIL en la expresión del DR5 volvieron a los niveles control después de 24 horas de tratamiento. Por contra, el CPT-11 solo resultó en un incremento de 2,5 veces en ambos, el ARNm de DR4 y DR5, después de 24 horas de tratamiento,  
50 pero no a las 2 horas (Figura 6). El tratamiento con CPT-11 solo durante 22 horas, seguido por el tratamiento con Apo2L/TRAIL + CPT-11 durante otras 2 horas resultó en la máxima regulación al alza de la expresión del DR5 (de 3 a 4 veces). La totalidad de los tratamiento de 30 minutos no resultó en cambio alguno en la expresión del receptor. El perfil temporal de los niveles de corte/activación de la caspasa-3 siguió la regulación al alza del DR5 y/o DR4 respectivamente a las 2 y 24 horas (Figura 5). Por contra, la expresión de DR5 y DR4 en células HUVEC no fue afectada por ninguno de estos tratamientos. Estos resultados sugieren que la regulación al alza del DR5 en células tumorales por parte del Apo2L/TRAIL puede servir para potenciar su propia actividad apoptótica. La regulación al alza adicional de ambos, el DR5 y el DR4, por parte del tratamiento combinado Apo2L/TRAIL + CPT-11 apoya esta observación. Además, se realizó un conjunto de experimentos similares en presencia de un inhibidor general de caspasa, el Z-VAD, para analizar la población celular entera en vez de las células supervivientes a las 24 horas.  
55 La combinación Apo2L/TRAIL + CPT-11 con Z-VAD resultó en un incremento adicional (1,7 veces respecto 2,7 veces para el DR5, y 1,9 veces respecto un incremento de 3,0 veces para el DR4) en comparación con los controles respectivos sin Z-VAD (Figura 7). Estos resultados concuerdan con la idea de que la regulación al alza de estos receptores de muerte contribuye a la muerte celular potenciada.

## ES 2 317 924 T3

Para determinar la implicación de la p53 en la regulación al alza del DR5 por parte del Apo2L/TRAIL y CPT-11, se midieron los niveles de expresión de la proteína p53 mediante análisis de transferencia Western. Las alícuotas se analizaron después de que las células tumorales HCT116 y las células normales HUVEC se trataron con Apo2L/TRAIL o CPT-11 solos y en combinación. De forma consistente con informes previos que indicaban que la apoptosis mediada por el Apo2L/TRAIL es independiente de la p53 (consultar, por ejemplo, Ashkenazi *et al.*, *Current Opinion in Cell Biology*, 11:255-260 (1999) y Rieger *et al.*, *FEBS Letters* 427:124-128 (1998)). El Apo2L/TRAIL no incrementó el nivel de proteína p53 en ningún momento analizado (Figura 8). Por contra, tal y como se había publicado previamente (McDonald *et al.*, *British Journal of Cancer* 78:745-751 (1998)), la incubación con CPT-11 resultó en una inducción intensa y sostenida de la expresión de la p53 tan temprano como después de 2 horas de tratamiento tanto en células tumorales como en células normales. La inducción de la p53 por el CPT-11 persistió durante al menos 24 horas, y esta inducción no se vio afectada por la adición de Apo2L/TRAIL.

También se examinó el papel de la p21 en la apoptosis respecto la detención celular. Se analizaron en alícuotas en paralelo los niveles de las proteínas p21 y p53 mediante transferencia Western. Tal y como se ha mostrado previamente, el CPT-11 solo indujo intensamente la p53 en ambos tipos de células (Figura 8). El CPT-11 también medió un gran inducción de la proteína p21 a las 24 horas, tanto en células tumorales como en células normales (Figura 9). El Apo2L/TRAIL solo no tuvo efecto alguno sobre la expresión de la p53 o del p21. El tratamiento de combinación de Apo2L/TRAIL + CPT-11 también indujo una expresión intensa de la p53 y la p21 después de 24 horas de tratamiento en células normales. De forma sorprendente, en el tratamiento de combinación de las células tumorales HCT116 los niveles de proteína p21 permanecieron en niveles basales con independencia de un incremento en la expresión de la p53 similar en magnitud al del CPT-11 solo. Estos datos proporcionan evidencia de que el Apo2L/TRAIL suprime la acumulación de p21 asociada con el incremento en p53 después del tratamiento con CPT-11.

También se investigó la posible implicación de la FLIP en el modelo experimental de la apoptosis tumoral *in vitro*. Las células HCT116 se trataron tal como se ha descrito previamente durante 2 y 24 horas. Se obtuvieron los lisados celulares y se procesaron mediante análisis de transferencia Western usando anticuerpos anti-FLIP. La Figura 10 muestra que los niveles de proteína de FLIP no se vieron afectados por ningún tratamiento experimental. (Esto indica que FLIP no era un factor en la regulación de la apoptosis usando esta línea celular de carcinoma de colon).

Para determinar una correlación directa entre la inducción de la p21 y los cambios en el perfil del ciclo celular, en particular de las células tratadas, la aparición de la detención del ciclo celular, las células HCT116 se sometieron a análisis del ciclo celular después de 2, 6 y 24 horas de tratamiento con Apo2L/TRAIL o CPT-11 solos y en combinación. A las 6 horas (Figura 11), el CPT-11 solo inducía un desplazamiento significativo en el perfil del ciclo celular, resultando en una detención del ciclo celular en G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> (76%). Este cambio estaba también presente, aunque en menor grado (55%) en el tratamiento de combinación con Apo2L/TRAIL + CPT-11, y no fue inducido por el Apo2L/TRAIL solo (43% en comparación con el 30% del control). A las 24 horas, el tratamiento con CPT-11 resultó en un perfil completamente diferente, caracterizado por la aparición de una detención en la fase G<sub>2</sub>-M (43% en comparación con el 19% del control) y una reducción manifiesta en la fase G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>. De forma más importante, la combinación de Apo2L/TRAIL + CPT-11 impidió completamente la aparición de esta detención en G<sub>2</sub>-M (17% en comparación con el 19% del control) después de 24 horas de tratamiento. Estos datos son consistentes con la supresión mediada por el Apo2L/TRAIL de la inducción de la p21 por el CPT-11.

El análisis del ciclo celular de células normales durante 24 horas en condiciones experimentales similares no mostró diferencias entre los tratamientos. Estos análisis del ciclo celular también proporcionaron confirmación de la actividad apoptótica incrementada del tratamiento de combinación con Apo2L/TRAIL + CPT-11. Apo2L/TRAIL + CPT-11 (24 horas) resultaron en un 42% de apoptosis, 19% con el Apo2L/TRAIL solo, y 9% con el tratamiento con CPT-11, en comparación con el 1% de las células control (Figura 11). Estos resultados apoyan además el concepto de que el tratamiento combinado con Apo2L/TRAIL + CPT-11 media la supresión del tumor impidiendo la inducción de la p21 y dirigiendo las células cancerosas hacia la vía apoptótica en vez de hacia la detención del ciclo celular. Un perfil temporal más detallado de los cambios en los niveles de la proteína p21 por parte de la incubación con CPT-11 indicaron incremento tan temprano como a las 4 horas de tratamiento, que incrementaban aún más después de 18 horas de tratamiento.

Estudios recientes han indicado roles opuestos para la p21 en el proceso apoptótico, bien como sustrato de caspasa (consultar, por ejemplo, Zhang *et al.*, *Oncogene* 18:1131-1138 (1999); Levkau *et al.*, *Molecular Cell* 1:553-563 (1998); Gervais *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* 273:19207-19212 (1998)), o como un inhibidor de la activación de la caspasa (consultar, por ejemplo, Suzuki *et al.*, *Oncogene* 17:931-939 (1998); Suzuki *et al.*, *Oncogene* 18:1239-44 (1999); Suzuki *et al.*, *Molecular & Cellular Biology* 19:3842-3847 (1999); Suzuki *et al.*, *Oncogene* 19:1346-1353 (2000)). Para determinar el papel de la caspasa Apo2L/TRAIL en los niveles de proteína de la p21, se trataron células HCT116 como se ha descrito previamente, pero también en presencia del inhibidor general de caspasa Z-VAD. La inhibición de la caspasa resultó en un incremento apreciable en los niveles celulares de la p21 en el grupo de la combinación Apo2L/TRAIL + CPT-11 en comparación con el mismo tratamiento sin Z-VAD (Figura 12). No se observaron diferencias importantes con el resto de grupos de tratamiento. De forma interesante, cuando las células tumorales se preincubaron con CPT-11 durante la noche y se trataron a continuación durante 2 horas con Apo2L/TRAIL antes del análisis, hubo una disminución similar en los niveles de p21 a la detectada en el tratamiento de combinación regular durante 24 horas. La degradación de la p21 fue confirmada por la presencia de un fragmento cortado de aproximadamente 15 kD en estas condiciones. Este experimento demostró que la inhibición de la actividad caspasa impedía la de otro modo intensa degradación de la p21 inducida por el Apo2L/TRAIL. Para mostrar adicionalmente una correlación

## ES 2 317 924 T3

funcional entre la activación de la caspasa, los niveles de la p21, y la detención del ciclo celular, se realizó el análisis del ciclo celular, y se mostró que, en presencia del inhibidor de caspasa Z-VAD, el Apo2L/TRAIL no impedía la detención en G<sub>2</sub>-M inducida por el CPT-11 (Figura 13).

5 Se realizaron experimentos adicionales para examinar los regímenes de combinación para Apo2L/TRAIL y CPT-11, y se compararon dos condiciones diferentes del tratamiento de combinación. En la primera condición (combinación), las células tumorales se expusieron al Apo2L/TRAIL y CPT-11 *in vitro* durante un total de 24 horas, seguidas por otras 24 horas de incubación en presencia del medio solo. En el segundo grupo (secuencial), las células se expusieron durante las 24 horas iniciales al CPT-11, a continuación se cambiaron a medio que contenía Apo2L/TRAIL  
10 durante otras 24 horas. La Figura 14A muestra que la destrucción celular total en el tratamiento secuencia estaba potenciada aproximadamente un 6% más que en el grupo de combinación ( $p < 0,001$ , ensayo de t). Además, comparando los tratamientos secuencial y de combinación, la actividad de destrucción relativa incrementó tanto como el 54%. Este efecto se observó a diferentes concentraciones de Apo2L/TRIAL (Figura 14A). Además, este efecto apoptótico incrementado del tratamiento secuencial respecto al combinado fue potenciado adicionalmente tanto como un 68% cuando  
15 las células se incubaron durante cuatro días adicionales en medio sin fármaco, a continuación de 2 días de exposición al fármaco (Figura 14B).

La muerte celular incrementada también se observó en los tratamientos de combinación y secuencial cuando se usó el metabolito activo del CTP-11, el SN38 (Figura 15), indicando que el incremento en la apoptosis tumoral no refleja cambios en el metabolismo del compuesto CPT-11.  
20

### Depósito de material

Los siguientes materiales se han depositado con la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard,  
25 Manassas, Virginia, EE.UU. (ATCC):

Material	Nº del depósito ATCC	Fecha del depósito
4E7.24.3	HB-12454	13 de enero de 1998
4H6.1.7.8	HB-12455	13 de enero de 1998
35 1H5.25.9	EB-12695	1 de abril de 1999
4G7.18.8	PTA-99	21 de mayo de 1999
40 5G11.17.1	HB-12694	1 de abril de 1999
3F11.39.7	HB-12456	13 de enero de 1998
3H3.14.5	HB-12534	2 de junio de 1998

45 Este depósito se hizo bajo las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes, y las Regulaciones bajo el mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. El depósito se hará asequible por parte de la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y sometido a un acuerdo entre Genentech, Inc. y la ATCC, que asegura una disponibilidad permanente y no restringida de la progenie del cultivo del depósito al público a partir de la concesión de la pertinente patente estadounidense o a partir de la exposición al público de cualquier solicitud de patente estadounidense o de país extranjero, cualquiera que suceda primero, y asegura la disponibilidad de la progenie para alguien determinado por el U.S. Commissioner of Patents and Trademarks como con derecho a la misma de acuerdo con los artículos 35 y 112 de la USC y las normas del Commissioner en relación a lo mismo (incluyendo el 37 CFR 1.14, con particular referencia a 886 OG 638).  
50  
55

El cesionario de la presente aplicación ha aceptado que, si un cultivo de los materiales en depósito muriese o se perdiera o fuera destruido cuando se cultiva en condiciones apropiadas, los materiales serán reemplazados con prontitud, a partir de la notificación, con otros del mismo tipo. La disponibilidad del material de depósito no debe considerarse  
60 como una licencia para practicar la invención en contravención de los derechos garantizados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

La descripción escrita precedente se considera que es suficiente para permitir que un especialista en el campo practique la invención. La presente invención no debe ser limitada en su ámbito por los ejemplos presentados en la presente.  
65

## Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante sólo es para provecho del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha tenido sumo cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones, y la EPO rechaza cualquier responsabilidad en este aspecto.

## Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 9701633 A [0002] [0003] [0043] [0045] [0091]
- WO 9725428 A [0002] [0003] [0043] [0045] [0091] [0091] [0091]
- WO 9828426 A [0002]
- WO 9846751 A [0002]
- WO 9818921 A [0002]
- WO 9746686 A [0003]
- EP 417563 A [0006]
- WO 9839361 A [0009]
- WO 9832856 A [0012] [0049]
- WO 9851793 A [0013] [0049] [0049]
- WO 9841629 A [0013] [0049]
- WO 9835986 A [0013] [0049] [0049]
- EP 870827 A [0013] [0049]
- WO 9846643 A [0013] [0049]
- WO 9902653 A [0013] [0049]
- WO 9909165 A [0013] [0049]
- WO 9911791 A [0013] [0049]
- WO 9904001 A [0016]
- WO 9907738 A [0016]
- WO 9933980 A [0016]
- WO 0075191 A [0019]
- US 6072047 A [0049] [0049]
- US 4816567 A [0050] [0051] [0056] [0105] [0105] [0115]
- US 5545807 A [0057] [0122]
- US 5545806 A [0057]
- US 5569825 A [0057]
- US 5625126 A [0057]
- US 5633425 A [0057]
- US 5661016 A [0057]
- US 5750373 A [0057]

## ES 2 317 924 T3

- US 5821333 A [0061]
- US 9913197 W [0095]
- 5 • WO 9429348 A [0110]
- US 4342566 A [0110]
- WO 9404679 A [0117]
- 10 • US 5567610 A, Borrebaeck [0118]
- US 5229275 A, Goroff [0118]
- 15 • US 5591669 A [0122]
- US 5589369 A [0122]
- WO 9805344 A [0123]
- 20 • WO 9815833 A [0123]
- WO 9747314 A [0123]
- 25 • WO 9744491 A [0123]
- WO 9735196 A [0123]
- WO 9534648 A [0123]
- 30 • US 5712089 A [0123]
- US 5702892 A [0123] [0123]
- 35 • US 5427908 A [0123]
- US 5403484 A [0123]
- US 5432018 A [0123]
- 40 • US 5270170 A [0123]
- WO 9206176 A [0123]
- 45 • WO 9906587 A [0123]
- US 5514548 A [0123]
- WO 9708320 A [0123]
- 50 • WO 9308629 A [0128]
- US 4676980 A [0130] [0130]
- 55 • WO 9100360 A [0130]
- WO 92200373 A [0130]
- EP 03089 A [0130]
- 60 • WO 8101145 A [0132]
- WO 8807378 A [0132]
- 65 • US 4975278 A [0132]
- US 5739277 A [0135]

## ES 2 317 924 T3

- WO 9013646 A [0139]
- US 4965199 A [0145]
- 5 • EP 73657 A [0151]
- US 4419446 A [0153]
- US 4601978 A [0153]
- 10 • WO 9411026 A [0155]
- DD 266710 [0156]
- 15 • EP 402226 A [0157]
- EP 183070 A [0157]
- EP 244234 A [0157]
- 20 • US 5807715 A [0160]
- US 4767704 A [0162]
- 25 • US 4657866 A [0162]
- US 4927762 A [0162]
- US 4560655 A [0162]
- 30 • US 5122469 A [0162]
- WO 9003430 A [0162]
- 35 • WO 8700195 A [0162]
- US RE30985 E [0162]
- US 3773919 A [0170]
- 40 • US 4675187 A [0177]
- US 0123691 W [0226]
- 45 • US 60221256 B [0226]

### Literatura, que no son patentes, citada en la descripción

- **GRUSS; DOWER.** *Blood*, 1995, vol. 85, 3378-3404 [0002]
- 50 • **PITTI et al.** *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 12687-12690 [0002] [0003] [0045] [0045] [0091]
- **WILEY et al.** *Immunity*, 1995, vol. 3, 673-682 [0002] [0003]
- 55 • **BROWNING et al.** *Cell*, 1993, vol. 72, 847-856 [0002]
- **ARMITAGE et al.** *Nature*, 1992, vol. 357, 80-82 [0002]
- **MARSTERS et al.** *Curr. Biol.*, 1998, vol. 8, 525-528 [0002]
- 60 • **SIMONET et al.** *Cell.*, 1997, vol. 89, 309-319 [0002]
- **CHICHEPORTICHE et al.** *Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 32401-32410 [0002]
- 65 • **HAHNE et al.** *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 188, 1185-1190 [0002]
- **MOORE et al.** *Science*, 1999, vol. 285, 260-263 [0002]

## ES 2 317 924 T3

- SHU. *J. Leukocyte Biol.*, 1999, vol. 65, 680 [0002]
- SCHNEIDER *et al. J. Exp. Med.*, 1999, vol. 189, 1747-1756 [0002]
- 5 • MUKHOPADHYAY *et al. J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 15978-15981 [0002]
- SCHMID *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1986, vol. 83, 1881 [0002]
- DEALTRY *et al. Eur. J. Immunol.*, 1987, vol. 17, 689 [0002]
- 10 • GRUSS *et al. Blood*, 1995, vol. 85, 3378 [0004]
- ZHENG *et al. Nature*, 1995, vol. 377, 348-351 [0004]
- 15 • AMAKAWA *et al. Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Programmed Cell Death*, 1995 [0004]
- RENSHAW *et al. J. Exp. Med.*, 1994, vol. 180, 1889 [0004]
- MACKAY *et al. J. Exp. Med.*, 1999, vol. 190, 1697 [0004]
- 20 • KRAMMER *et al. Curr. Op. Immunol.*, 1994, vol. 6, 279-289 [0005]
- NAGATA *et al. Science*, 1995, vol. 267, 1449-1456 [0005]
- 25 • YONEHARA *et al. J. Exp. Med.*, 1989, vol. 169, 1747-1756 [0005]
- HOHMAN *et al. J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 14927-14934 [0006]
- BROCKHAUS *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990, vol. 87, 3127-3131 [0006]
- 30 • LOETSCHER *et al. Cell*, 1990, vol. 61, 351 [0006]
- SCHALL *et al. Cell*, 1990, vol. 61, 361 [0006]
- 35 • SMITH *et al. Science*, 1990, vol. 248, 1019-1023 [0006]
- LEWIS *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1991, vol. 88, 2830-2834 [0006]
- GOODWIN *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1991, vol. 11, 3020-3026 [0006]
- 40 • NOPHAR, Y. *et al. EMBO J.*, 1990, vol. 9, 3269 [0006]
- KOHNO, T. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1990, vol. 87, 8331 [0006]
- 45 • HALE *et al. J. Cell. Biochem.*, 1991, vol. 15F, 113 [0006]
- BANNER *et al. Cell*, 1993, vol. 73, 431-435 [0007]
- JOHNSON *et al. Cell*, 1986, vol. 47, 545 [0007]
- 50 • RADEKE *et al. Nature*, 1987, vol. 325, 593 [0007]
- STAMENKOVIC *et al. EMBO J.*, 1989, vol. 8, 1403 [0007]
- 55 • MALLET *et al. EMBO J.*, 1990, vol. 9, 1063 [0007]
- ITOH *et al. Cell*, 1991, vol. 66, 233-243 [0007]
- UPTON *et al. Virology*, 1987, vol. 160, 20-29 [0007]
- 60 • SMITH *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, vol. 176, 335 [0007]
- UPTON *et al. Virology*, 1991, vol. 184, 370 [0007]
- 65 • VON BULOW *et al. Science*, 1997, vol. 278, 138-141 [0009]
- LAABI *et al. EMBO J.*, 1992, vol. 11, 3897-3904 [0010]

## ES 2 317 924 T3

- **LAABI** *et al. Nucleic Acids Res.*, 1994, vol. 22, 1147-1154 [0010]
- **GRAS** *et al. Int. Immunology*, 1995, vol. 7, 1093-1106 [0010]
- 5 • **MADRY** *et al. Int. Immunology*, 1998, vol. 10, 1693-1702 [0010]
- **MARSTERS** *et al. Curr. Biol.*, 1996, vol. 6, 750 [0011]
- **MARSTERS** *et al. Curr. Biol.*, 1996, vol. 6, 1669 [0011]
- 10 • **CHINNAIYAN** *et al. Science*, 1996, vol. 274, 990 [0011]
- **KITSON** *et al. Nature*, 1996, vol. 384, 372 [0011]
- 15 • **BODMER** *et al. Immunity*, 1997, vol. 6, 79 [0011]
- **SCREATON** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, vol. 94, 4615-4619 [0011]
- **PAN** *et al. Science*, 1997, vol. 276, 111-113 [0012] [0015] [0049]
- 20 • **SHERIDAN** *et al. Science*, 1997, vol. 277, 818-821 [0013] [0015] [0049]
- **PAN** *et al. Science*, 1997, vol. 277, 815-818 [0013] [0049]
- 25 • **SCREATON** *et al. Curr. Biol.*, 1997, vol. 7, 693-696 [0013] [0049]
- **WALCZAK** *et al. EMBO J.*, 1997, vol. 16, 5386-5387 [0013] [0049]
- **WU** *et al. Nature Genetics*, 1997, vol. 17, 141-143 [0013] [0049]
- 30 • **HYMOWITZ** *et al. Molecular Cell*, 1999, vol. 4, 563-571 [0013]
- **PAN** *et al. FEBS Letters*, 1998, vol. 431, 351-356 [0014]
- 35 • **MCFARLANE** *et al. J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 25417-25420 [0015]
- **SCHNEIDER** *et al. FEBS Letters*, 1997, vol. 416, 329-334 [0015]
- **DEGLI-ESPOSTI** *et al. J. Exp. Med.*, 1997, vol. 186, 1165-1170 [0015]
- 40 • **MONGKOLSAPAYA** *et al. J. Immunol.*, 1998, vol. 160, 3-6 [0015]
- **MARSTERS** *et al. Curr. Biol.*, 1997, vol. 7, 1003-1006 [0015]
- 45 • **PAN** *et al. FEBS Letters*, 1998, vol. 424, 41-45 [0015]
- **DEGLI-ESPOSTI** *et al. Immunity*, 1997, vol. 7, 813-820 [0015]
- **PITTI** *et al. Nature*, 1998, vol. 396, 699-703 [0015]
- 50 • **BROJATSCH** *et al. Cell*, 1996, vol. 87, 845-855 [0016]
- **MONTGOMERY** *et al. Cell*, 1996, vol. 87, 427-436 [0016]
- 55 • **MARSTERS** *et al. J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 14029-14032 [0016]
- **NOCENTINI** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 6216-6221 [0016]
- **EMERY** *et al. J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 14363-14367 [0016]
- 60 • **TEWARI** *et al. Curr. Op. Genet. Develop.*, 1996, vol. 6, 39-44 [0017]
- **VERMA** *et al. Genes Develop.*, 1996, vol. 9, 2723-2735 [0017]
- 65 • **BALDWIN**. *Ann. Rev. Immunol.*, 1996, vol. 14, 649-681 [0017]
- **LOTZ** *et al. J. Leukocyte Biol.*, 1996, vol. 60, 1-7 [0017]

## ES 2 317 924 T3

- **ASHKENAZI; DIXIT.** *Science*, 1998, vol. 281, 1305-1308 [0018]
- **GOLSTEIN.** *Curr. Biol.*, 1997, vol. 7, 750-753 [0018]
- 5 • **NAGATA.** *Cell*, 1997, vol. 88, 355-365 [0018]
- **XIANG et al.** *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, March 2001, vol. 42, 643 [0020]
- **ALTSCHUL et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389-3402 [0047]
- 10 • **KOHLER et al.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0050]
- **CLACKSON et al.** *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0050]
- 15 • **MARKS et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0050] [0123]
- **MORRISON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0051]
- **JONES et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0052] [0114] [0115]
- 20 • **REICHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0052]
- **PRESTA.** *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0052] [0114]
- 25 • **CHOTHIA et al.** *J. Mol. Biol.*, 1985, vol. 186, 651-663 [0053]
- **NOVOTNY; HABER.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 4592-4596 [0053]
- **KABAT, E.A. et al.** *Sequences of Proteins of Immunological Interest.* National Institutes of Health, 1987 [0055]
- 30 • **MAGE et al.** *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications.* *Marcel Dekker, Inc.*, 1987, 79-97 [0056]
- **VAUGHAN et al.** *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 309-314 [0057] [0123]
- 35 • **SHEETS et al.** *PNAS, (USA)*, 1998, vol. 95, 6157-6162 [0057]
- **HOOGENBOOM; WINTER.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0057]
- 40 • **MARKS et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0057]
- **MARKS et al.** *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0057] [0066]
- **LONBERG et al.** *Nature*, 1994, vol. 368, 856-859 [0057]
- 45 • **MORRISON.** *Nature*, 1994, vol. 368, 812-813 [0057]
- **FISHWILD et al.** *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-851 [0057]
- 50 • **NEUBERGER.** *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 826 [0057]
- **LONBERG; HUSZAR.** *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0057]
- **COLE et al.** *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy.* Alan R. Liss, 1985, 77 [0057]
- 55 • **BOERNER et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0057]
- **BURTON.** *Molec. Immunol.*, 1985, vol. 22, 161-206 [0060] [0062]
- 60 • **DAËRON.** *Annu. Rev. Immunol.*, 1997, vol. 15, 203-234 [0065]
- **RAVETCH; KINET.** *Annu. Rev. Immunol.*, 1991, vol. 9, 457-492 [0065]
- **CAPEL et al.** *Immunomethods*, 1994, vol. 4, 25-34 [0065]
- 65 • **HAAS et al.** *J. Lab. Clin. Med.*, 1995, vol. 126, 330-341 [0065]

## ES 2 317 924 T3

- **GUYER** *et al. J. Immunol.*, 1976, vol. 117, 587 [0065]
- **KIM** *et al. J. Immunol.*, 1994, vol. 24, 249 [0065]
- 5 • **BARBAS** *et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA*, 1994, vol. 91, 3809-3813 [0066]
- **SCHIER** *et al. Gene*, 1995, vol. 169, 147-155 [0066]
- **YELTON** *et al. J. Immunol.*, 1995, vol. 155, 1994-2004 [0066]
- 10 • **JACKSON** *et al. J. Immunol.*, 1995, vol. 154 (7), 3310-9 [0066]
- **HAWKINS** *et al. J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 226, 889-896 [0066]
- 15 • Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs. **MURAKAMI** *et al. The Molecular Basis of Cancer.* WB Saunders, 1995, 13 [0070]
- **WILMAN**. Prodrugs in Cancer Chemotherapy. *Biochemical Society Transactions*, 1986, vol. 14, 375-382 [0071]
- 20 • Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery. **STELLA** *et al. Directed Drug Delivery. Humana Press*, 1985, 247-267 [0071]
- *Agnew Chem Intl. Ed. Engl.*, 1994, vol. 33, 183-186 [0073]
- 25 • **ASHKENAZI**. *J. Clinical Investigation*, 1999, vol. 104, 155-162 [0082]
- **GLINIAK** *et al. Cancer Research*, 1999, vol. 59, 6153-6158 [0082]
- **GRIFFITH** *et al. Current Opinion in Immunology.*, 1998, vol. 10, 559-563 [0083]
- 30 • **LEVERKUS** *et al. Cancer Research*, 2000, vol. 60, 553-559 [0083]
- **ZHANG** *et al. Cancer Research*, 1999, vol. 59, 2747-2753 [0083]
- 35 • **XU** *et al. Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2000, vol. 269, 179-190 [0083]
- **KIM** *et al. Clin. Cancer Res.*, 2000, vol. 6 (2), 335-346 [0087]
- **GIBSON** *et al. Mol. Cell Biol.*, 2000, vol. 20 (1), 205-212 [0087]
- 40 • **KEANE** *et al. Cancer Res.*, 1999, vol. 59 (3), 734-741 [0087]
- **NAGANE** *et al. Cancer Res.*, 2000, vol. 60 (4), 847-853 [0087]
- 45 • **WU** *et al. Nature Genetics.*, 1997, vol. 17, 141-143 [0087]
- **WU** *et al. Oncogene*, 1999, vol. 18, 6411-6418 [0087]
- **SHEIKH** *et al. Cancer Research*, 1998, vol. 58, 1593-1598 [0087]
- 50 • **NAGANE** *et al. Cancer Research*, 2000, vol. 60, 847-853 [0087]
- **CHINNAIYAN** *et al. Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2000, vol. 97, 1754-1759 [0087]
- 55 • **PITTI**. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 12687-12690 [0092]
- **KOHLER; MILSTEIN**. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0098]
- **GODING**. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. *Academic Press*, 1986, 59-103 [0100] [0120] [0121]
- 60 • **KOZBOR**. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0101] [0120]
- **BRODEUR** *et al. Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. Marcel Dekker, Inc*, 1987, 51-63 [0120]
- 65 • **MUNSON; POLLARD**. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0102]
- **ILIADES** *et al. FEBS Letters*, 1997, vol. 409, 437-441 [0112]

## ES 2 317 924 T3

- **KORTT** *et al. Protein Engineering*, 1997, vol. 10, 423-433 [0112]
- **RIECHMANN** *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0114]
- 5 • **RIECHMANN** *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0115]
- **VERHOEYEN** *et al. Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0115]
- **SIMS** *et al. J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2296-2308 [0116]
- 10 • **CHOTHIA; LESK.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0116]
- **CARTER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285-4289 [0116]
- 15 • **PRESTA** *et al. J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2623-2632 [0116]
- **SHOENFELD** *et al. J. Clin. Invest.*, 1982, vol. 70, 205 [0118]
- **NUGENT** *et al. Blood*, 1987, vol. 70 (1), 16-22 [0118]
- 20 • **JAKOBOVITS** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551 [0122]
- **JAKOBOVITS** *et al. Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0122]
- 25 • **BRUGGERMANN** *et al. Year in Immuno.*, 1993, vol. 7, 33 [0122]
- **DUCHOSAL** *et al. Nature*, 1992, vol. 355, 258-262 [0122]
- **HUSE** *et al. Science*, 1989, vol. 246, 1275 [0123]
- 30 • **BARBAS** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1991, vol. 88, 7978-7982 [0123]
- **ROOGENBOOM; WINTER.** *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 227, 381-388 [0123]
- 35 • **BARBAS** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1992, vol. 89, 4457-4461 [0123]
- **GRIFFITHS** *et al. EMBO Journal*, 1994, vol. 13, 3245-3260 [0123]
- **DE KRUIF** *et al. J. Mol. Biol.*, 1995, vol. 248, 97-105 [0123]
- 40 • **MILSTEIN; CUELLO.** *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0128]
- **TRAUNECKER** *et al. EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0128]
- 45 • **SURESH** *et al. Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0129]
- **MASSEY.** *Nature*, 1987, vol. 328, 457-458 [0133]
- **NEUBERGER** *et al. Nature*, 1984, vol. 312, 604-608 [0134]
- 50 • **STINCHCOMB** *et al. Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0146]
- **JONES.** *Genetics*, 1977, vol. 85, 12 [0146]
- 55 • **VAN DEN BERG.** *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 135 [0147]
- **FLEER** *et al. Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 968-975 [0147]
- **REYES** *et al. Nature*, 1982, vol. 297, 598-601 [0153]
- 60 • **YANIV.** *Nature*, 1982, vol. 297, 17-18 [0154]
- **GRAHAM** *et al. J. Gen Virol.*, 1977, vol. 36, 59 [0160]
- 65 • **URLAUB** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0160]
- **MATHER** *et al. Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1982, vol. 383, 44-68 [0160]

## ES 2 317 924 T3

- **HAM** *et al. Meth. Enz.*, 1979, vol. 58, 44 [0162]
- **BARNES** *et al. Anal. Biochem.*, 1980, vol. 102, 255 [0162]
- 5 • **CARTER** *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 163-167 [0163]
- **LINDMARK** *et al. J. Immunol. Meth.*, 1983, vol. 62, 1-13 [0164]
- **GUSS** *et al. EMBO J.*, 1986, vol. 5, 1567-1575 [0164]
- 10 • *Remington's Pharmaceutical Sciences*. 1980 [0168]
- **MORDENTI** *et al. Pharmaceut. Res.*, 1991, vol. 8, 1351 [0172]
- 15 • *Chemotherapy Service. Williams & Wilkins*, 1992 [0178]
- **SCHOLTISSEK** *et al. Gene*, 1988, vol. 62, 55-64 [0185]
- **ARUFFO** *et al. Cell*, 1990, vol. 61, 1303-1313 [0190]
- 20 • **ASHKENAZI** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1991, vol. 88, 10535-10539 [0190]
- **MUHLENBECK** *et al. J.B.C.*, 1998, vol. 273, 33091-8 [0213]
- 25 • **ASHKENAZI** *et al. Current Opinion in Cell Biology*, 1999, vol. 11, 255-260 [0214]
- **RIEGER** *et al. FEBS Letters*, 1998, vol. 427, 124-128 [0214]
- **MCDONALD** *et al. British Journal of Cancer*, 1998, vol. 78, 745-51 [0214]
- 30 • **ZHANG** *et al. Oncogene*, 1999, vol. 18, 1131-1138 [0219]
- **LEVKAU** *et al. Molecular Cell*, 1998, vol. 1, 553-563 [0219]
- 35 • **GERVAIS** *et al. Journal of Biological Chemistry*, 1998, vol. 273, 19207-19212 [0219]
- **SUZUKI** *et al. Oncogene*, 1998, vol. 17, 931-939 [0219]
- 40 • **SUZUKI** *et al. Oncogene*, 1999, vol. 18, 1239-44 [0219]
- **SUZUKI** *et al. Molecular & Cellular Biology*, 1999, vol. 19, 3842-3847 [0219]
- **SUZUKI** *et al. Oncogene*, 2000, vol. 19, 1346-1353 [0219]

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización del CPT-11 y del polipéptido ligando de Apo-2 en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer en un mamífero, en el cual el CTP-11 es para administrarlo desde aproximadamente 6 horas hasta aproximadamente 72 horas antes de dicho de polipéptido ligando de Apo-2.
- 10 2. CPT-11 y polipéptido ligando de Apo-2 para su uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero, en el cual el CTP-11 es para administrarlo desde aproximadamente 6 horas hasta aproximadamente 72 horas antes de dicho de polipéptido ligando de Apo-2.
- 15 3. Procedimiento para potenciar la apoptosis en células de mamífero *in vitro*, el cual comprende exponer las células de mamífero a una cantidad efectiva de CPT-11 y polipéptido ligando de Apo-2, en el cual dichas células de mamífero se exponen al CPT-11 desde aproximadamente 6 horas hasta aproximadamente 72 horas antes de la exposición a dicho polipéptido ligando de Apo-2.
- 20 4. La utilización del procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el cual el CPT-11 induce la regulación al alza del receptor DR4.
- 25 5. La utilización del procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el cual el CPT-11 induce la regulación al alza del receptor DR5.
- 30 6. La utilización de la reivindicación 1 ó 2, en la cual el CTP-11 es para administrarlo aproximadamente 24 o 48 horas antes de dicho polipéptido ligando de Apo-2.
- 35 7. El procedimiento de la reivindicación 3, en el cual dichas células de mamífero se exponen al CPT-11 aproximadamente 24 o 48 horas antes de la exposición a dicho polipéptido ligando de Apo-2.
- 40 8. La utilización de la reivindicación 1 ó 2, en la cual el CPT-11 y el polipéptido ligando de Apo-2 son para administrarlos conjuntamente con uno o más agentes inhibidores del crecimiento.
- 45 9. El procedimiento de la reivindicación 3, el cual comprende además exponer las células de mamífero a uno o más agentes inhibidores del crecimiento.
- 50 10. La utilización de la reivindicación 1 ó 2, en las cuales el CPT-11 y el polipéptido ligando de Apo-2 son para administrarlos conjuntamente con radiación.
- 55 11. El procedimiento de la reivindicación 3, el cual comprende además exponer las células de mamífero a radiación.
- 60 12. El procedimiento de la reivindicación 3, en el cual las células de mamífero son células cancerosas.
- 65 13. El uso o procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 12, en el cual el cáncer es cáncer colorrectal o las células de mamífero son células de cáncer colorrectal.
14. La utilización o procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 12 ó 13, en la cuales dicho polipéptido ligando de Apo-2 comprende los residuos aminoácidos 114-281 de la SEC. N° ID.: 1.
15. La utilización o procedimiento de la reivindicación 14, en la cual el CPT-11 induce la regulación al alza del receptor DR4.
16. La utilización o procedimiento de la reivindicación 14, en la cual el CPT-11 induce la regulación al alza del receptor DR5.
17. La utilización o procedimiento de la reivindicación 14, en la cual dicho polipéptido de ligando de Apo-2 consiste en los residuos aminoácidos 114-281 de la SEC. N° ID.: 1.

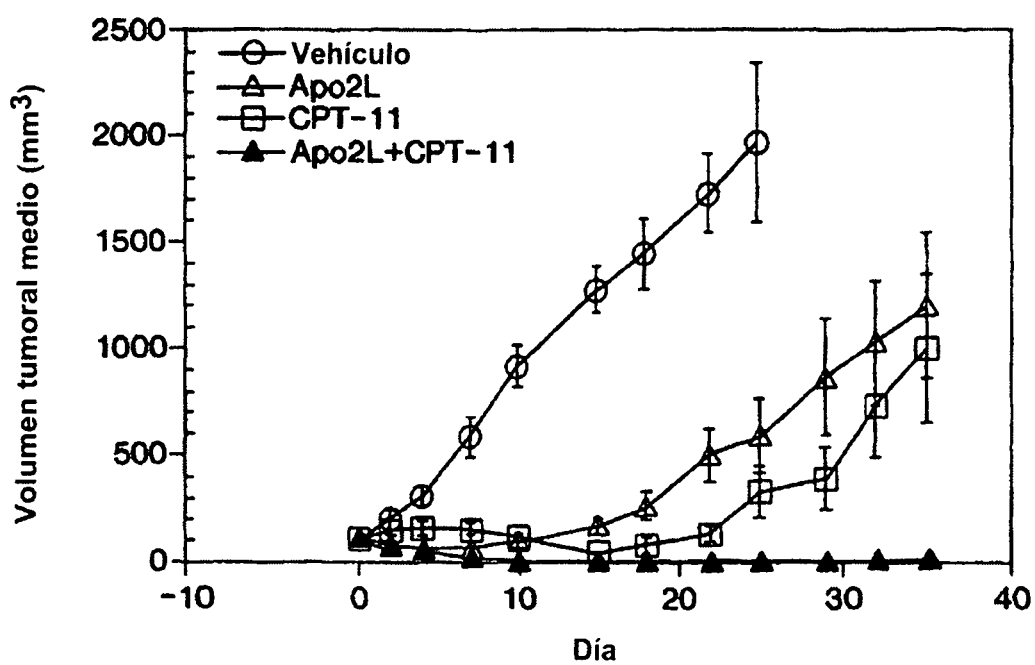


FIG. 1

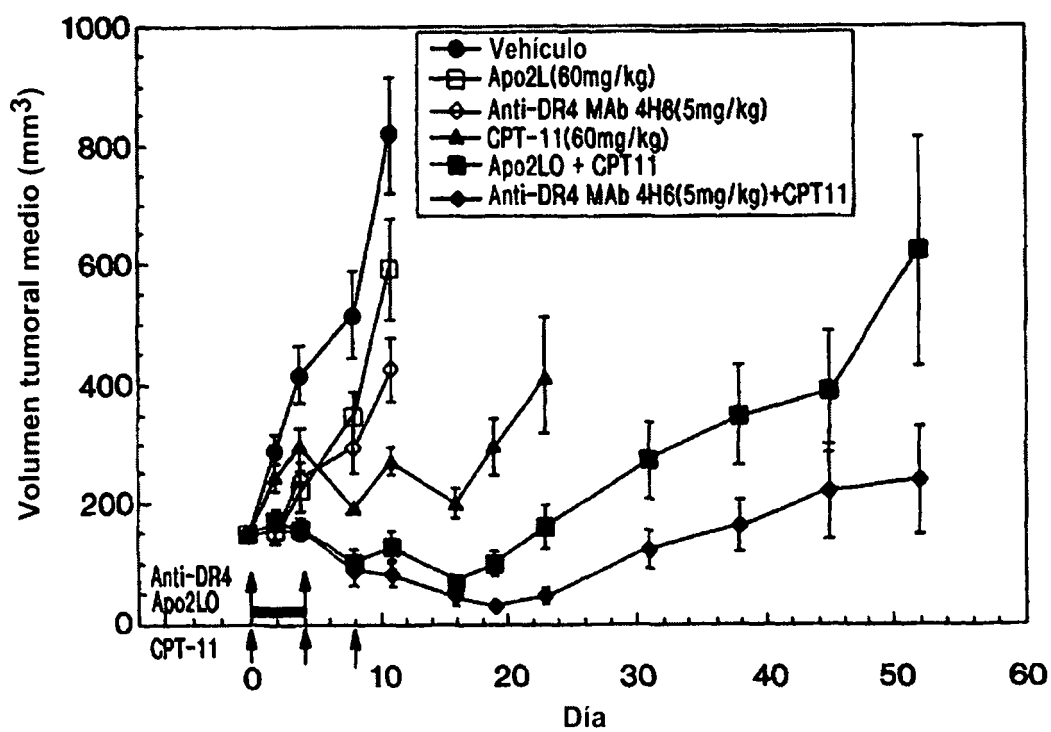
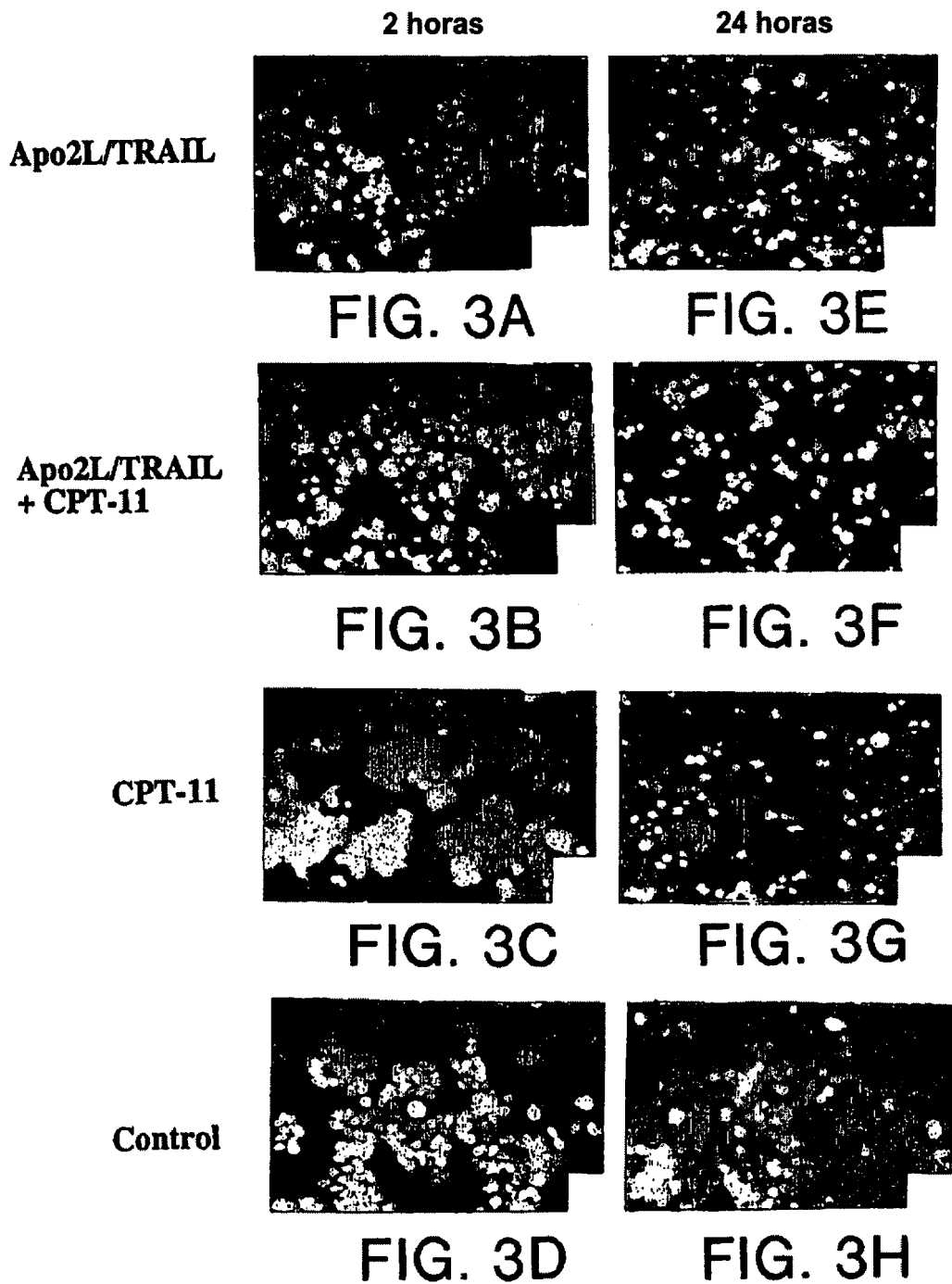


FIG. 2



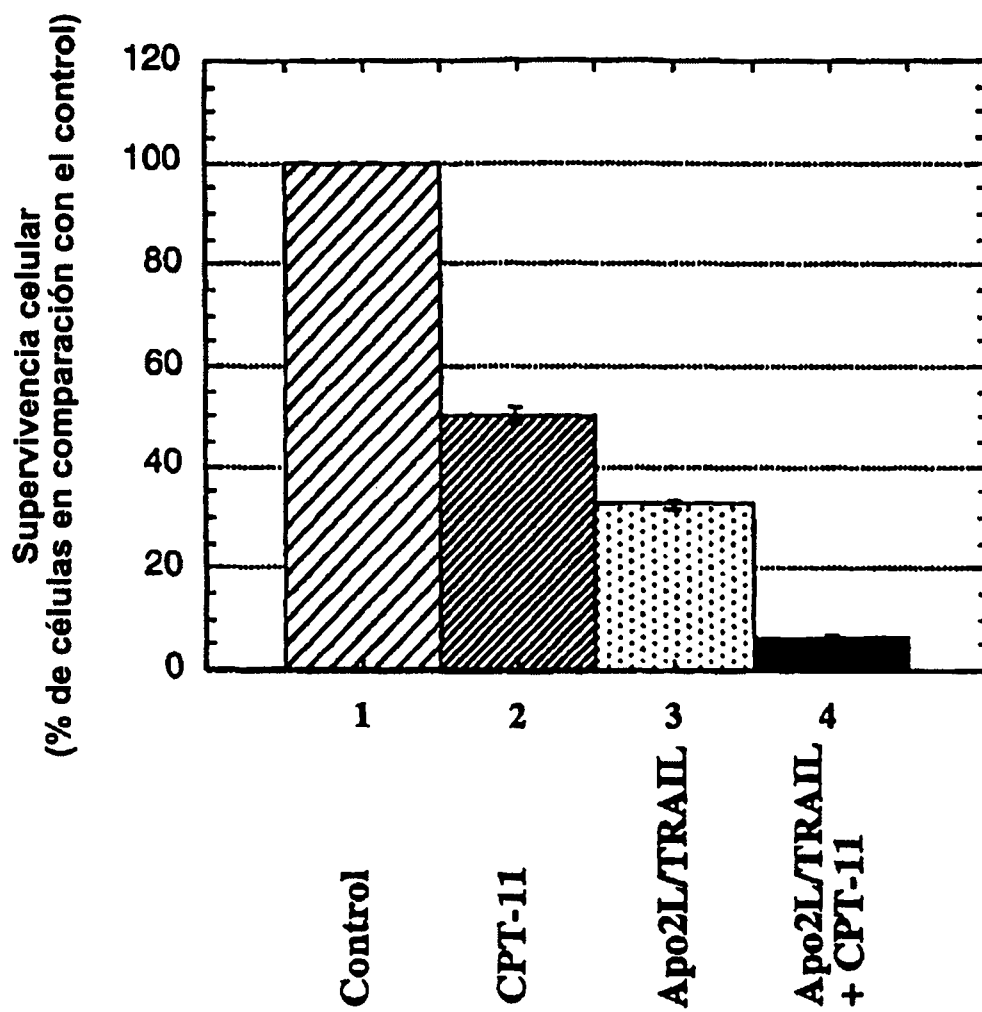


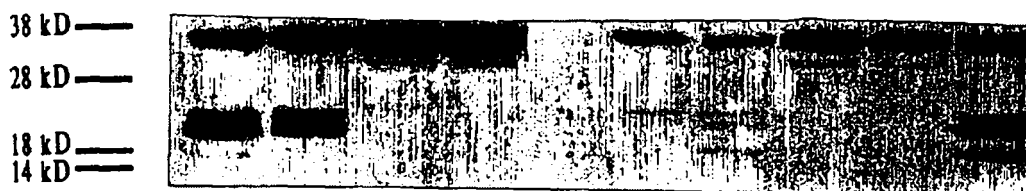
FIG. 4

FIG. 5A

FIG. 5B

2 horas

24 horas



Apo2L/TRAIL  
Apo2L/TRAIL + CPT-11  
CPT-11  
Control  
Apo2L/TRAIL  
Apo2L/TRAIL + CPT-11  
CPT-11  
Control  
CPT-11+ 2h  
Apo2L/TRAIL

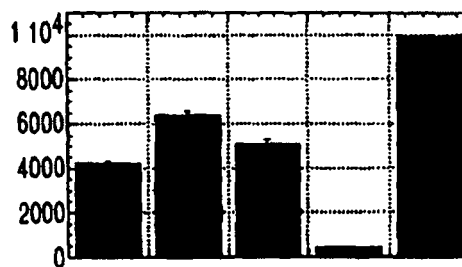
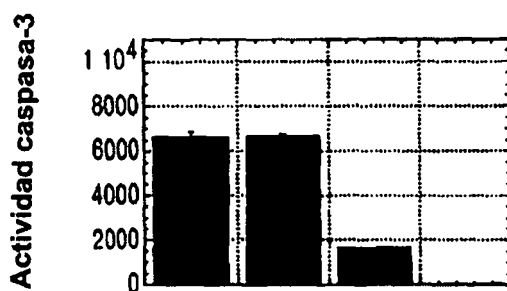
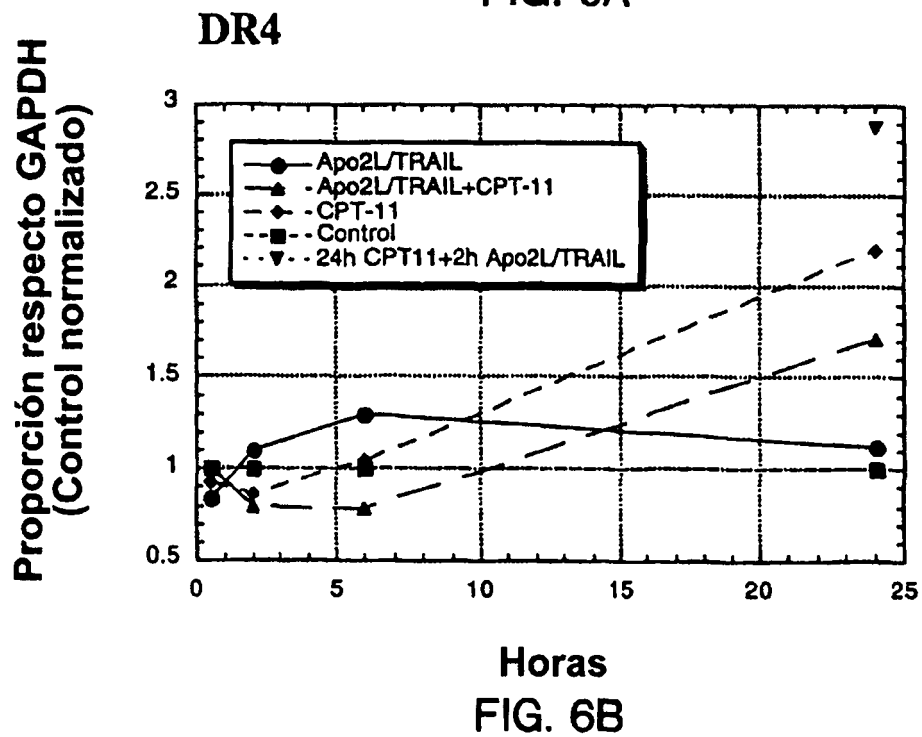
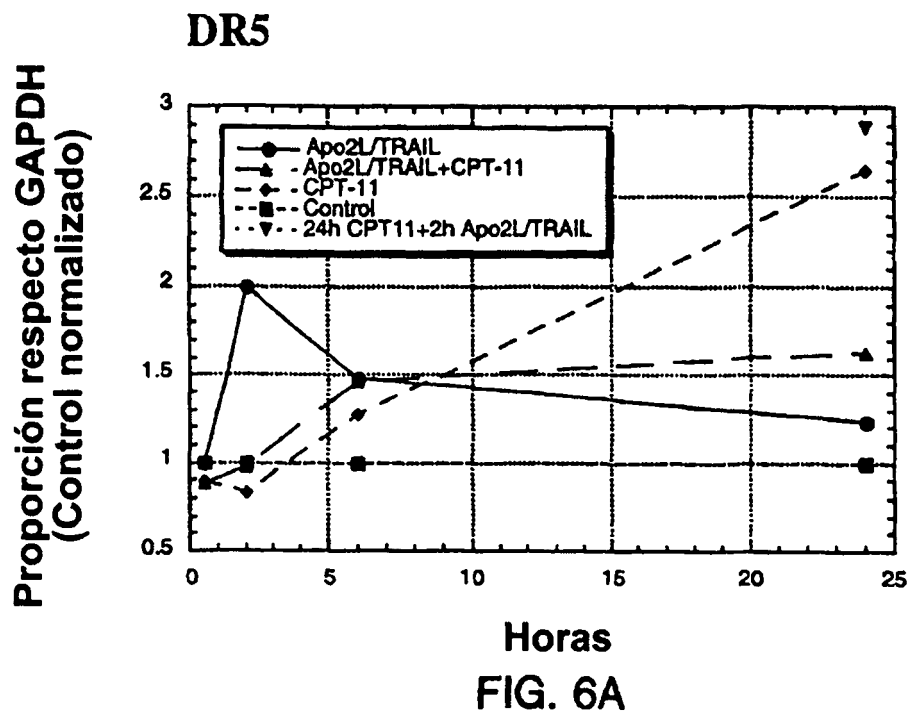


FIG. 5C

FIG. 5D



Proporción respecto GAPDH  
(Control normalizado)

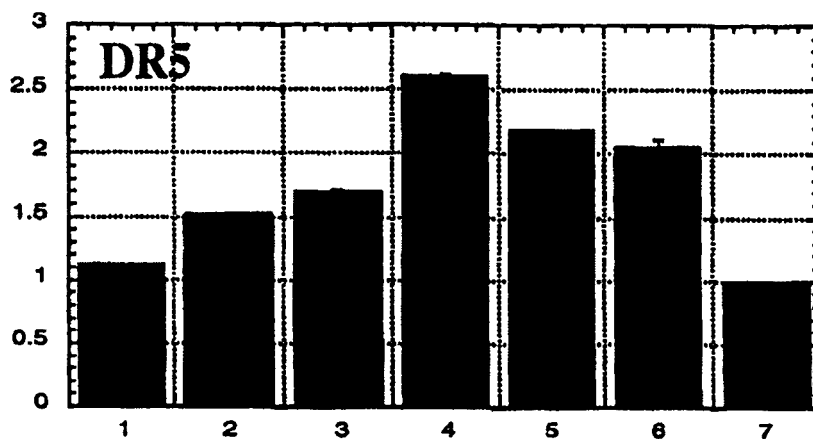


FIG. 7A

Apo2L/TRAIL  
Apo2L/TRAIL + ZVAD  
Apo2L/TRAIL + CPT-11  
Apo2L/TRAIL + CPT-11 + ZVAD  
CPT-11  
CPT-11 + ZVAD  
Control

Proporción respecto GAPDH  
(Control normalizado)

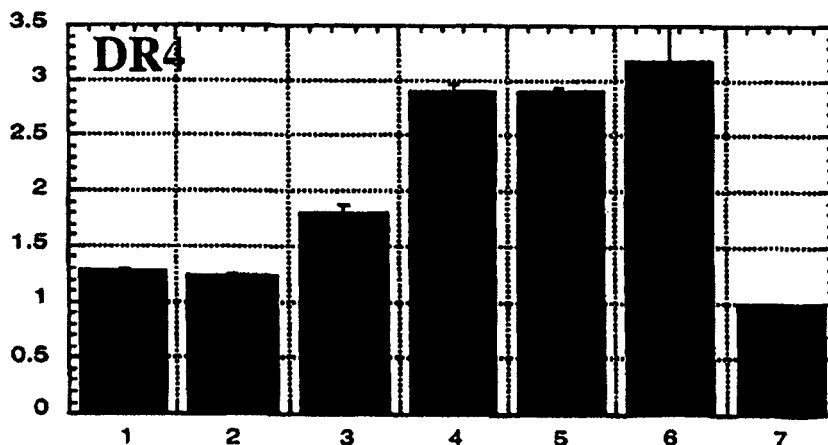
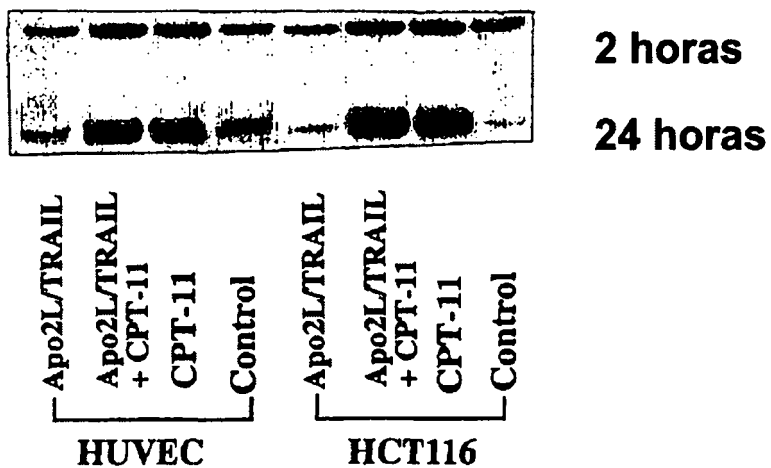
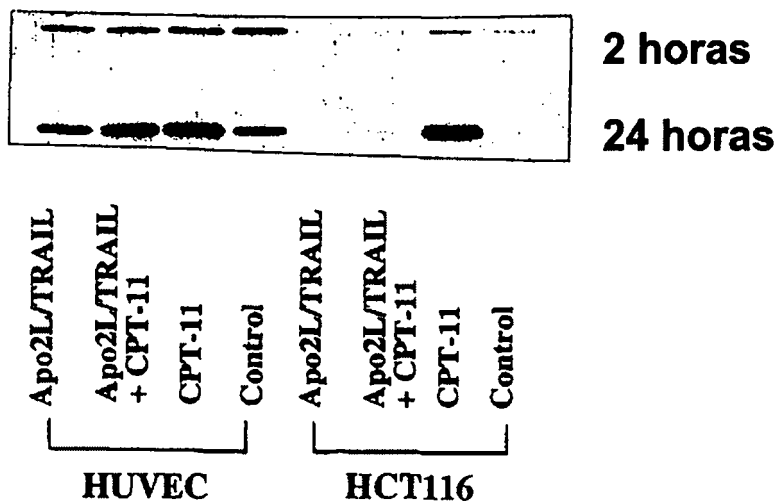


FIG. 7B

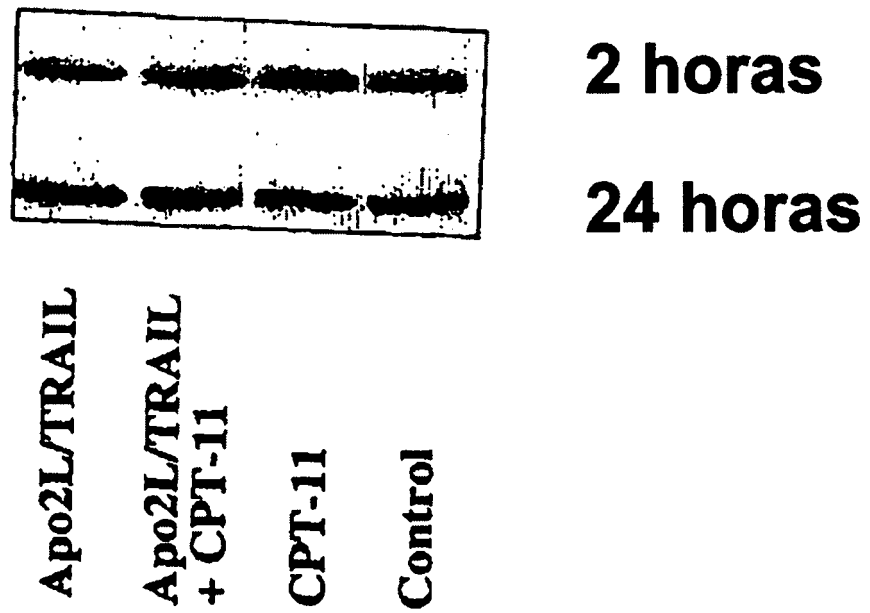
**FIG. 8**



**FIG. 9**



**FIG. 10**



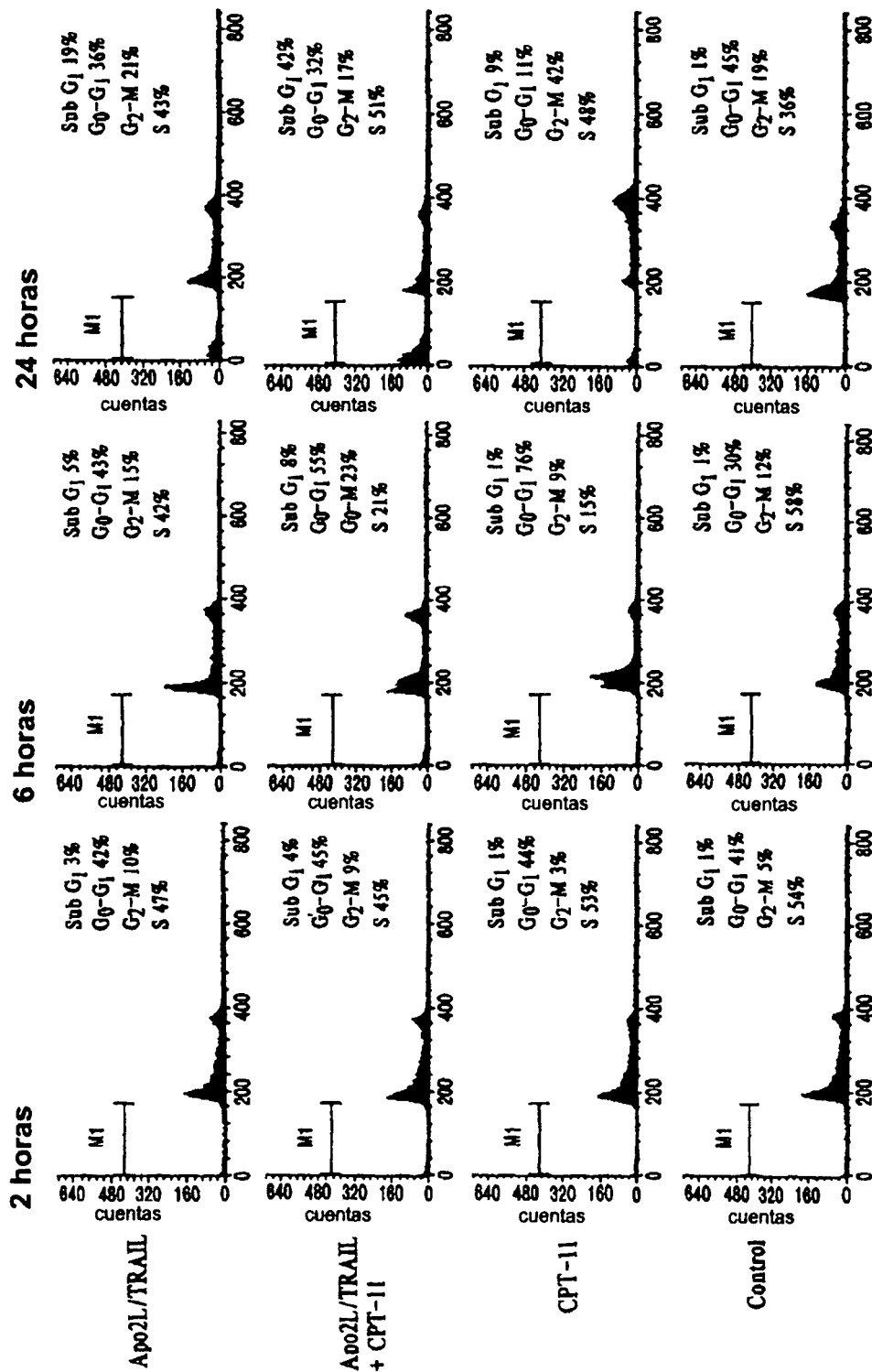
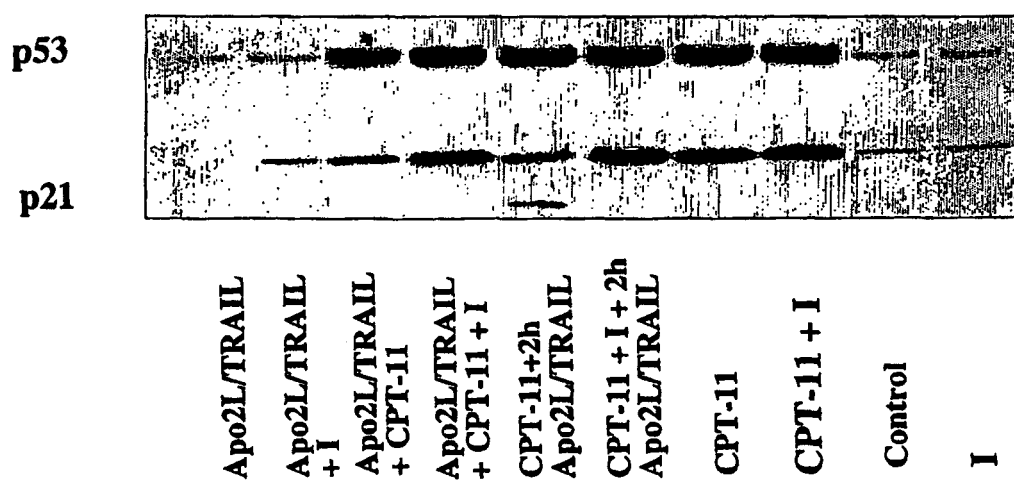


FIG. 11

FIG. 12



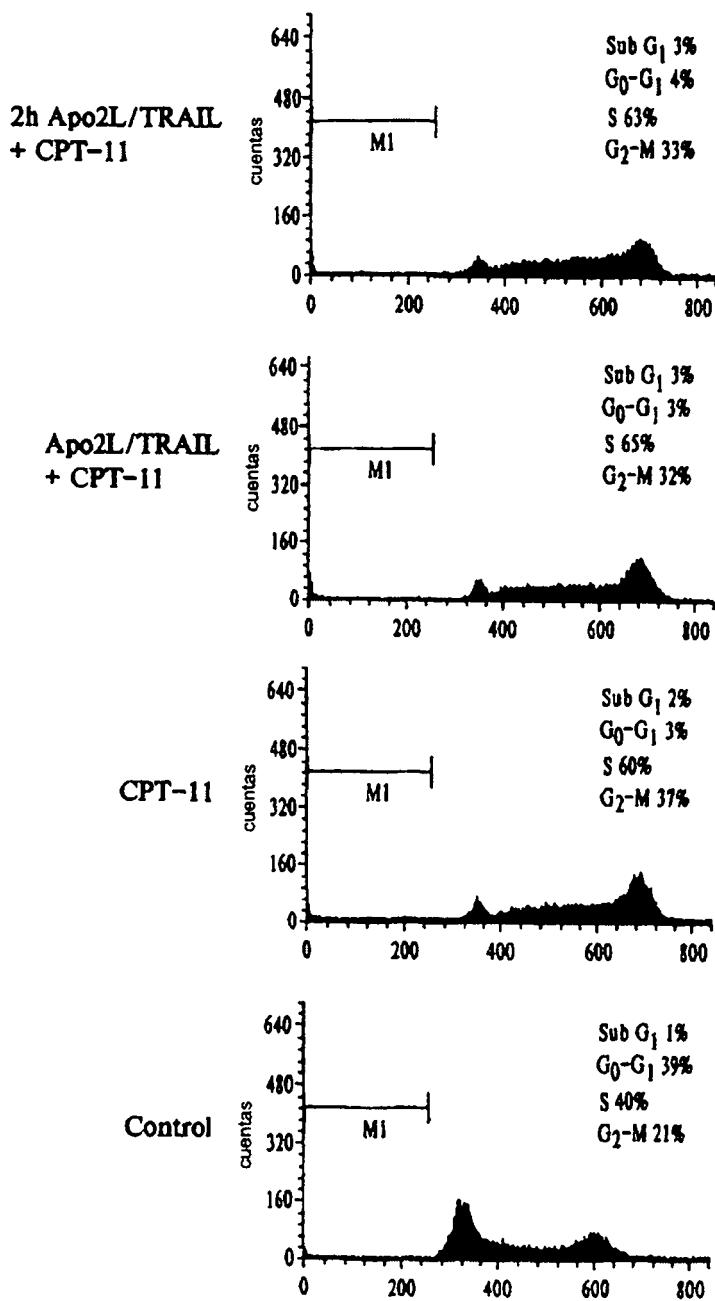


FIG. 13

FIG. 14A

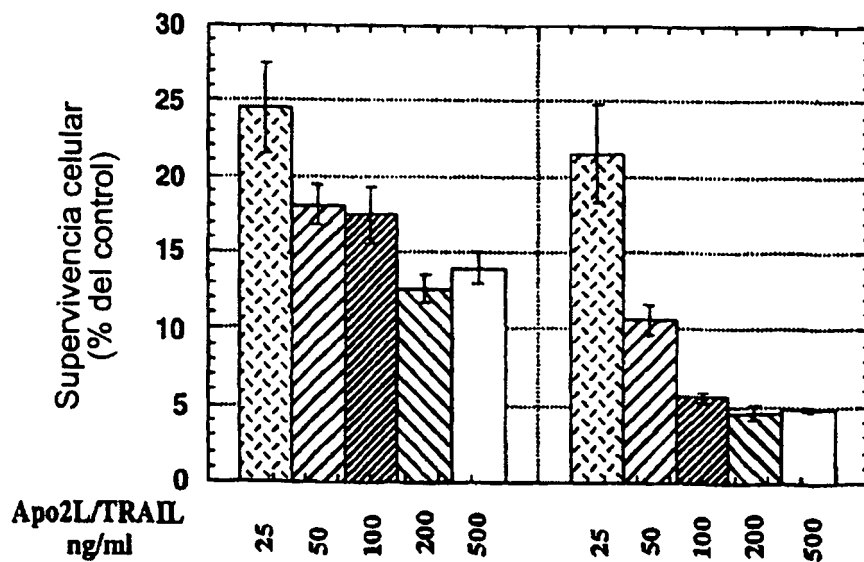
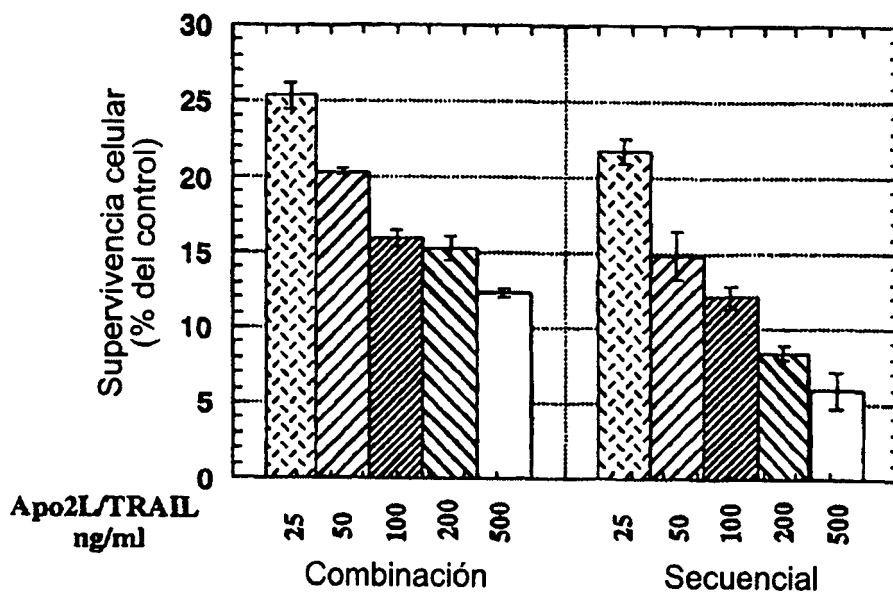


FIG. 14B

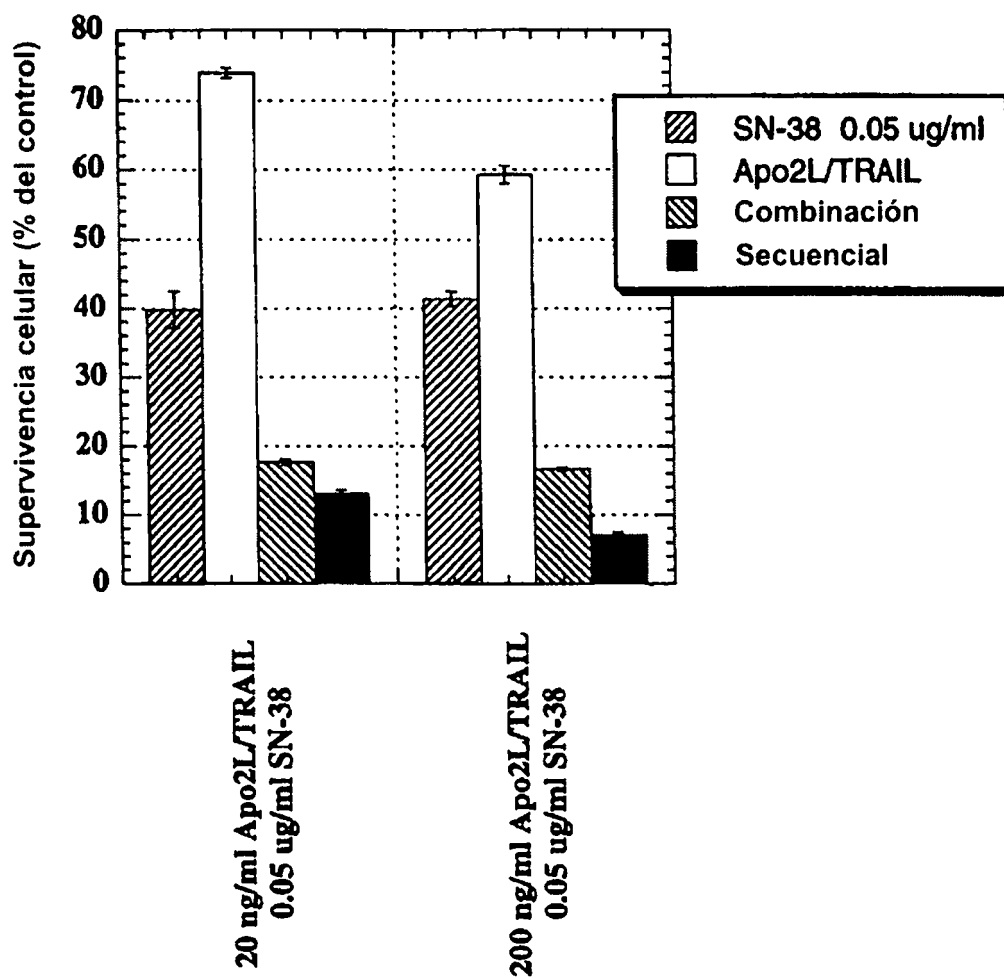


FIG. 15

# ES 2 317 924 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> GENENTECH, INC.  
 Escandon, Enrique  
 Fox, Judith A.  
 Kelley, Sean K.  
 Xiang, Hong
- 10 <120> SINERGIA DEL AGONISTA DEL RECEPTOR DEL APO-2L Y DEL CPT-11
- <130> P1838R1PCT
- 15 <140> PCT/US01/23691  
 <141> 2001-07-27
- <150> US 60/221,256  
 20 <151> 2000-07-27
- <160> 4
- 25 <210> 1  
 <211> 281  
 <212> PRT  
 <213> *Homo Sapiens*
- 30 <400> 1

35 Met Ala Met Met Glu Val Gln Gly Gly Pro Ser Leu Gly Gln Thr  
 1 5 10 15

Cys Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu Cys  
 20 25 30

40 Val Ala Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met  
 35 40 45

Gln Asp Lys Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu  
 50 55 60

45 Asp Asp Ser Tyr Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser  
 65 70 75

Pro Cys Trp Gln Val Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys  
 80 85 90

50 Met Ile Leu Arg Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu  
 95 100 105

Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln  
 110 115 120

55 Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr  
 125 130 135

Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys  
 140 145 150

Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser  
 155 160 165

60 Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly  
 170 175 180

Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu  
 185 190 195

65

# ES 2 317 924 T3

Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile  
 200 205 210  
 5 Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser  
 215 220 225  
 Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr  
 230 235 240  
 10 Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg  
 245 250 255  
 Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His  
 260 265 270  
 15 Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly  
 275 280

<210> 2  
 <211> 468  
 <212> PRT  
 <213> *Homo Sapiens*  
 25 <400> 2

Met Ala Pro Pro Pro Ala Arg Val His Leu Gly Ala Phe Leu Ala  
 1 5 10 15  
 30 Val Thr Pro Asn Pro Gly Ser Ala Ala Ser Gly Thr Glu Ala Ala  
 20 25 30  
 Ala Ala Thr Pro Ser Lys Val Trp Gly Ser Ser Ala Gly Arg Ile  
 35 35 40 45  
 35 Glu Pro Arg Gly Gly Gly Arg Gly Ala Leu Pro Thr Ser Met Gly  
 50 55 60  
 Gln His Gly Pro Ser Ala Arg Ala Arg Ala Gly Arg Ala Pro Gly  
 40 65 70 75  
 Pro Arg Pro Ala Arg Glu Ala Ser Pro Arg Leu Arg Val His Lys  
 80 85 90  
 Thr Phe Lys Phe Val Val Val Gly Val Leu Leu Gln Val Val Pro  
 95 100 105  
 45 Ser Ser Ala Ala Thr Ile Lys Leu His Asp Gln Ser Ile Gly Thr  
 110 115 120  
 Gln Gln Trp Glu His Ser Pro Leu Gly Glu Leu Cys Pro Pro Gly  
 125 130 135  
 50 Ser His Arg Ser Glu Arg Pro Gly Ala Cys Asn Arg Cys Thr Glu  
 140 145 150  
 Gly Val Gly Tyr Thr Asn Ala Ser Asn Asn Leu Phe Ala Cys Leu  
 155 160 165  
 55 Pro Cys Thr Ala Cys Lys Ser Asp Glu Glu Glu Arg Ser Pro Cys  
 170 175 180  
 Thr Thr Thr Arg Asn Thr Ala Cys Gln Cys Lys Pro Gly Thr Phe  
 185 190 195  
 60 Arg Asn Asp Asn Ser Ala Glu Met Cys Arg Lys Cys Ser Thr Gly

65

# ES 2 317 924 T3

	200		205		210
	Cys Pro Arg Gly Met Val Lys Val Lys Asp Cys Thr Pro Trp Ser				
	215		220		225
5	Asp Ile Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Asn Gly His Asn Ile				
	230		235		240
	Trp Val Ile Leu Val Val Thr Leu Val Val Pro Leu Leu Leu Val				
	245		250		255
10	Ala Val Leu Ile Val Cys Cys Cys Ile Gly Ser Gly Cys Gly Gly				
	260		265		270
	Asp Pro Lys Cys Met Asp Arg Val Cys Phe Trp Arg Leu Gly Leu				
	275		280		285
15	Leu Arg Gly Pro Gly Ala Glu Asp Asn Ala His Asn Glu Ile Leu				
	290		295		300
	Ser Asn Ala Asp Ser Leu Ser Thr Phe Val Ser Glu Gln Gln Met				
	305		310		315
20	Glu Ser Gln Glu Pro Ala Asp Leu Thr Gly Val Thr Val Gln Ser				
	320		325		330
	Pro Gly Glu Ala Gln Cys Leu Leu Gly Pro Ala Glu Ala Glu Gly				
	335		340		345
25	Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn Gly Ala Asp Pro				
	350		355		360
	Thr Glu Thr Leu Met Leu Phe Phe Asp Lys Phe Ala Asn Ile Val				
	365		370		375
30	Pro Phe Asp Ser Trp Asp Gln Leu Met Arg Gln Leu Asp Leu Thr				
	380		385		390
	Lys Asn Glu Ile Asp Val Val Arg Ala Gly Thr Ala Gly Pro Gly				
	395		400		405
35	Asp Ala Leu Tyr Ala Met Leu Met Lys Trp Val Asn Lys Thr Gly				
	410		415		420
	Arg Asn Ala Ser Ile His Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Arg Met				
	425		430		435
40	Glu Glu Arg His Ala Lys Glu Lys Ile Gln Asp Leu Leu Val Asp				
	440		445		450
	Ser Gly Lys Phe Ile Tyr Leu Glu Asp Gly Thr Gly Ser Ala Val				
	455		460		465
45	Ser Leu Glu				

<210> 3

<211> 440

50 <212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

55

60

65

ES 2 317 924 T3

<400> 3

5 Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg  
 1 5 10 15  
 Lys Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro  
 20 25 30  
 10 Gly Pro Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val  
 35 40 45  
 Leu Leu Leu Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp  
 50 55 60  
 15 Leu Ala Pro Gln Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser  
 65 70 75  
 Pro Ser Glu Gly Leu Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp  
 80 85 90  
 20 Gly Arg Asp Cys Ile Ser Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr  
 95 100 105  
 His Trp Asn Asp Leu Leu Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp  
 110 115 120  
 25 Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr  
 125 130 135  
 Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro  
 140 145 150  
 30 Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met Val  
 155 160 165  
 Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile Glu Cys Val His  
 170 175 180  
 35 Lys Glu Ser Gly Thr Lys His Ser Gly Glu Ala Pro Ala Val Glu  
 185 190 195  
 Glu Thr Val Thr Ser Ser Pro Gly Thr Pro Ala Ser Pro Cys Ser  
 200 205 210  
 40 Leu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala Ala Val Val Leu  
 215 220 225  
 Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp Lys Lys Val  
 230 235 240  
 45 Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly Asp Pro  
 245 250 255  
 Glu Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp Asn  
 260 265 270  
 50 Val Leu Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val Pro  
 275 280 285  
 Glu Gln Glu Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val  
 290 295 300  
 55 Asn Met Leu Ser Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala  
 305 310 315  
 Glu Ala Glu Arg Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn  
 320 325 330  
 60 Glu Gly Asp Pro Thr Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe

65

# ES 2 317 924 T3

	335	340	345
	Ala Asp Leu Val Pro Phe Asp Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys		
	350	355	360
5	Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu Ile Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala		
	365	370	375
	Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Tyr Thr Met Leu Ile Lys Trp Val		
	380	385	390
10	Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala Ser Val His Thr Leu Leu Asp Ala		
	395	400	405
	Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu Ala Lys Gln Lys Ile Glu Asp		
	410	415	420
15	His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met Tyr Leu Glu Gly Asn Ala		
	425	430	435
	Asp Ser Ala Met Ser		
20	440		

<210> 4

<211> 411

25 <212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<220>

30 <221> no es eguro

<222> 410

<223> aminoácido desconocido

35 <400> 4

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

65

ES 2 317 924 T3

Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met Val  
 155 160 165  
 5 Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile Glu Cys Val His  
 170 175 180  
 Lys Glu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala Ala Val Val  
 185 190 195  
 10 Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp Lys Lys  
 200 205 210  
 Val Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly Asp  
 215 220 225  
 15 Pro Glu Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp  
 230 235 240  
 Asn Val Leu Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val  
 245 250 255  
 20 Pro Glu Gln Glu Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly  
 260 265 270  
 Val Asn Met Leu Ser Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro  
 275 280 285  
 25 Ala Glu Ala Glu Arg Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala  
 290 295 300  
 Asn Glu Gly Asp Pro Thr Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp  
 305 310 315  
 30 Phe Ala Asp Leu Val Pro Phe Asp Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg  
 320 325 330  
 35 Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu Ile Lys Val Ala Lys Ala Glu  
 335 340 345  
 Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Tyr Thr Met Leu Ile Lys Trp  
 350 355 360  
 40 Val Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala Ser Val His Thr Leu Leu Asp  
 365 370 375  
 Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu Ala Lys Gln Lys Ile Glu  
 380 385 390  
 45 Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met Tyr Leu Glu Gly Asn  
 395 400 405  
 50 Ala Asp Ser Ala Xaa Ser  
 410

55

60

65