



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 182**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99903166 .9**

96 Fecha de presentación : **15.01.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1045906**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.10.2000**

54 Título: **Ligando Apo-2.**

30 Prioridad: **15.01.1998 US 7886**
15.04.1998 US 60533

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

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

72 Inventor/es: **Ashkenazi, Avi, J.;**
Kelley, Robert, F.;
O'Connel, Mark, T.;
Pitti, Robert, M. y
Schwall, Ralph, H.

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 316 182 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

Ligando Apo-2.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere de manera general a la identificación, aislamiento y producción recombinante de una nueva citoquina, denominada en la presente invención “ligando Apo-2”, y a procedimientos de utilización de dichas composiciones.

10 **Antecedentes de la invención**

El control del número de células en mamíferos se cree que está determinado, en parte, por un equilibrio entre proliferación y muerte celulares. Una forma de muerte celular, en ocasiones denominada muerte celular necrótica, se caracteriza típicamente como una forma patológica de muerte celular que resulta en cierto nivel de traumatismo o daño celular. Por el contrario, existe otra forma de muerte celular, “fisiológica”, que habitualmente se produce de una manera ordenada o controlada. Esta forma ordenada o controlada de muerte celular con frecuencia se denomina “apóptosis” [ver, por ejemplo, Barr *et al.*, *Bio/Technology* 12:487-493, 1994]. La muerte celular apoptótica se produce naturalmente en muchos procesos fisiológicos, incluyendo el desarrollo embrionario y la selección clonal en el sistema inmunológico [Itoh *et al.*, *Cell* 66:233-243, 1991]. Sin embargo, se han asociado los niveles reducidos de muerte celular apoptótica a una diversidad de condiciones patológicas, incluyendo cáncer, lupus e infección por virus herpes [Thompson, *Science* 267:1456-1462, 1995].

La muerte celular apoptótica típicamente se ve acompañada por uno o más cambios morfológicos y bioquímicos característicos en las células, tales como la condensación del citoplasma, la pérdida de microvilli de la membrana plasmática, la segmentación del núcleo, la degradación del ADN cromosómico o la pérdida de función mitocondrial. Se cree que una diversidad de señales extrínsecas e intrínsecas desencadenan o inducen dichos cambios celulares morfológicos y bioquímicos [Raff, *Nature* 356:397-400, 1992; Steller, *Science* 267:1445-1449, 1995; Sachs *et al.*, *Blood* 82:15, 1993]. Por ejemplo, pueden ser desencadenados por estímulos hormonales, tales como hormonas glucocorticoides para los timocitos inmaduros, así como la retirada de determinados factores de crecimiento [Watanabe-Fukunaga *et al.*, *Nature* 356:314-317, 1992]. Además, algunos oncogenes identificados, tales como *myc*, *rel* y E1A, y supresores tumorales, tales como p53, se ha informado que presentan un papel en la inducción de la apoptosis. De manera similar, determinados fármacos quimioterapéuticos y algunas formas de radiación se ha observado que presentan actividad inductora de apoptosis [Thompson, *supra*].

Se han identificado numerosas moléculas, tales como el factor α de necrosis tumoral (“TNF- α ”), el factor β de necrosis tumoral (“TNF- β ” o “linfotóxina”), ligando CD30, ligando CD27, ligando CD40, ligando OX-40, ligando 4-1 BB y ligando Apo-1 (también denominado ligando Fas o ligando CD95), como miembros de la familia de citoquinas del factor de necrosis tumoral (“TNF”) [ver, por ejemplo, Gruss y Dower, *Blood* 85:3378-3404, 1995]. De entre dichas moléculas, TNF- α , TNF- β , ligando CD30, ligando 4-1BB y ligando Apo-1 se ha informado que están implicados en la muerte celular apoptótica. Tanto TNF- α como TNF- β se ha informado que 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]. Zheng *et al.* han informado de que TNF- α se encuentra implicado en la apoptosis post-estimuladora de las células T CD8-positivas [Zheng *et al.*, *Nature* 377:348-35, 1995]. Otros investigadores han informado que el ligando CD30 podría estar implicado en la deleción de células T autorreactivas en el timo [Amakawa *et al.*, *Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Programmed Cell Death*, resumen n° 10, 1995].

Las mutaciones en los genes de receptor o ligando Fas/Apo-1 de ratón (denominados *lpr* y *gld*, respectivamente) se han asociado a algunos trastornos autoinmunológicos, indicando que el ligando Apo-1 podría desempeñar un papel en la regulación de la deleción clonal de los linfocitos autorreactivos en la periferia [Krammeret *et al.*, *Curr. Op. Immunol.* 6:279-28, 1994; Nagata *et al.*, *Science* 267:1449-1456, 1995]. También se ha informado de que el ligando Apo-1 induce la apoptosis post-estimuladora en linfocitos T CD4-positivos y en linfocitos B y que podría estar implicado en la eliminación de los linfocitos activados cuando su función ya no resulte necesaria [Krammer *et al.*, *supra*; Nagata *et al.*, *supra*]. Los anticuerpos monoclonales de ratón agonistas que se unen específicamente al receptor Apo-1 se ha informado de que muestran actividad citocida que es comparable o similar a la de TNF- α [Yonehara *et al.*, *J. Exp. Med.* 169:1747-1756, 1989].

La inducción de diversas respuestas celulares mediadas por dichas citoquinas de la familia TNF se cree que resulta iniciada por su unión a receptores celulares específicos. Se han identificado y caracterizado dos receptores TNF diferentes, de aproximadamente 55 kDa (TNF-R1) y 75 kDa (TNF-R2) [Hohman *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264:14927-14934, 1989; Brockhaus *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:3127-3131, 1990; patente EP n° 417.563, publicada el 20 de marzo de 1991] y ADNc humano y de ratón correspondientes a ambos tipos de receptor [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].

Itoh *et al.* dan a conocer que el receptor Apo-1 puede señalizar una muerte celular apoptótica similar a la señalizada por TNF-R1 de 55 kDa [Itoh *et al.*, *supra*]. También se ha informado de que la expresión del antígeno Apo-1 se encuentra regulado negativamente junto con el antígeno de TNF-R1 al tratar las células con TNF- α o con anticuerpo

monoclonal de ratón anti-Apo-1 [Krammer *et al.*, *supra*; Nagata *et al.*, *supra*]. Por consiguiente, algunos investigadores han planteado la hipótesis de que las líneas que coexpresan los receptores Apo-1 y TNF-R1 podrían mediar en la eliminación celular a través de rutas de señalización comunes [*Id.*].

5 Los ligandos de la familia de TNF identificados hasta el momento, con la excepción de la linfotóxina- α , son proteínas transmembranales de tipo II, el extremo C-terminal de las cuales es extracelular. En contraste, los receptores en la familia de receptores TNF (TNFR) identificados hasta el momento son proteínas transmembranales de tipo I. Sin embargo, tanto en la familia de ligandos como de receptores de TNF, la homología identificada entre los miembros de la familia se ha encontrado principalmente en el dominio extracelular ("ECD"). Algunas de las citoquinas de la familia de
10 TNF, incluyendo TNF- α , el ligando de Apo-1 y el ligando de CD40, se cortan proteolíticamente en la superficie celular; la proteína resultante en cada caso típicamente forma una molécula homotrimérica que funciona como citoquina soluble. Las proteínas de la familia de los receptores TNF habitualmente también se cortan proteolíticamente para liberar ECDs de receptores solubles que pueden funcionar como inhibidores de citoquinas afines. Para una revisión de la familia TNF de citoquinas y los receptores de las mismas, ver Gruss y Dower, *supra*.

15

Descripción resumida de la invención

Los solicitantes han identificado clones de ADNc que codifican una nueva citoquina, denominada "ligando Apo-2". En la actualidad se cree que el ligando Apo-2 es un miembro de la familia de citoquinas TNF; el ligando Apo-2
20 está relacionado en secuencia de aminoácidos con algunas proteínas conocidas de tipo TNF, incluyendo el ligando de Apo-1. Sin embargo, los solicitantes han descubierto que el ligando Apo-2 no resulta apreciablemente inhibido por los receptores solubles de Apo-1 o de TNF, tales como los receptores de Fas/Apo-1, TNF-R1 o TNF-R2.

En la presente invención se describe el ligando Apo-2 aislado. Éste incluye ligando Apo-2 aislado que incluye una
25 secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 114 a 281 de la figura 1A, el ligando Apo-2 que incluye una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 91 a 281 de la figura 1A, el ligando Apo-2 que incluye una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 41 a 281 o 15 a 281 de la figura 1A, y el ligando Apo-2 que incluye una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 1 a 281 de la figura 1A (SEC ID n° 1).

30 El ligando Apo-2 aislado de la invención son variantes por sustitución de las secuencias anteriormente indicadas según las reivindicaciones. En particular, en una realización, se proporcionan variantes por sustitución del liando de Apo-2 que comprenden los aminoácidos 91 a 281 de la figura 1A en las que por lo menos uno de los aminoácidos en las posiciones 203, 218 ó 269 se sustituyen por un residuo alanina. En particular, dichas variantes por sustitución se identifican como "D203A", "D218A" y "D269A". Esta nomenclatura se utiliza para identificar los polipéptidos
35 ligando Apo-2 que comprenden, por ejemplo, los aminoácidos 91 a 281 de la figura 1A, en la que los residuos de ácido aspártico en las posiciones 203, 218 y/o 269 (utilizando la numeración mostrada en la figura 1A) se sustituyen por residuos de alanina. Opcionalmente, las variantes por sustitución pueden incluir una o más de dichas sustituciones.

40 En otra realización, la invención proporciona moléculas quiméricas que comprenden ligando Apo-2 fusionado con otro polipéptido heterólogo. Un ejemplo de dicha molécula quimérica comprende el ligando Apo-2 fusionado con una secuencia de polipéptido etiqueta.

En otra realización, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada codificante de ligando Apo-2. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico es ARN o ADN que codifica un ligando Apo-2 o es complementaria a una secuencia de ácido nucleico codificante de dicho ligando Apo-2, y permanece establemente unida al mismo bajo condiciones por lo menos moderadamente astringentes. En una realización, la secuencia parental de ácido nucleico de
45 ligando Apo-2 se selecciona de entre:

50 (a) la región codificante de la secuencia de ácido nucleico de la figura 1A que codifica la proteína de longitud completa entre el residuo 1 y el residuo 281 (es decir, los nucleótidos 91 a 933), ambos inclusive, o los nucleótidos 211 a 933 que codifican la proteína extracelular de residuos 41 a 281, ambos inclusive, o los nucleótidos 364 a 933 que codifican la proteína extracelular de residuos 92 a 281, ambos inclusive, o los nucleótidos 430 a 933 que codifican la proteína extracelular de residuos 114 a 281, ambos inclusive, de la secuencia de ácido nucleico mostrada en la figura 1A (SEC ID n° 2), o

55

(b) una secuencia correspondiente a la secuencia de (a) dentro del alcance de la degeneración del código genético.

60 En una realización adicional, la invención proporciona un vector replicable que comprende la molécula de ácido nucleico codificante del ligando Apo-2 operablemente ligado a secuencias de control reconocidas por una célula huésped transfecteda o transformada con el vector. Asimismo, se proporciona una célula huésped que comprende el vector o la molécula de ácido nucleico. También se proporciona un procedimiento para producir ligando Apo-2 que comprende cultivar una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico y recuperar la proteína a partir del cultivo de la célula huésped.

65

En otra realización, la invención proporciona una composición que comprende ligando Apo-2 y un portador. La composición puede ser una composición farmacéutica útil para inducir o estimular la apoptosis.

En otra realización, la invención proporciona células, la utilización del ligando Apo-2 reivindicado para la preparación de un medicamento para la inducción de apoptosis en células de cáncer de mamífero. La variante por sustitución del ligando Apo-2 también puede administrarse en el mamífero conjuntamente con una o más otras terapias, tales como la quimioterapia, la terapia de radiación u otros agentes capaces de ejercer actividad antitumoral.

5

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc del ligando Apo-2 humano y la secuencia de aminoácidos derivada el mismo.

10

La figura 1B muestra una alineación de la región C-terminal del ligando humano de Apo-2 con la región correspondiente de miembros conocidos de la familia de citoquinas TNF humanas: 4-1BBL, OX40L, CD27L, CD30L, TNF- α , LT- β , LT- α , CD40L y Apo-L.

15

Las figuras 1C-1E muestran (C) la topología celular del ligando Apo-2 etiquetado con epítipo *myc* recombinante de longitud completa C-terminal, expresado en células 293 humanas, según se determina mediante análisis FACS utilizando anticuerpo anti-epítipo *myc*; (D) el tamaño y estructura de subunidades de Apo-2 soluble etiquetado con epítipo His10 recombinante expresado en células de insecto infectadas por baculovirus recombinante y purificados mediante cromatografía de afinidad de Ni²⁺-quelato, según se determina con (carriles 2, 3) o sin (carril 1) entrecruzamiento químico seguido de SDS-PAGE y tinción de plata; (E) el tamaño y estructura de subunidades del ligando Apo-2 soluble etiquetado con epítipo gD recombinante expresado en células 293 humanas marcadas metabólicamente, según se determina mediante inmunoprecipitación con anticuerpo anti-epítipo gD, seguido de SDS-PAGE y autorradiografía.

20

25

Las figuras 2A-2E muestran la inducción de apoptosis en líneas celulares de linfocitos B y T por parte del ligando Apo-2. Las células apoptóticas se identificaron a partir de cambios morfológicos característicos (A); mediante tinción de fluorescencia positiva con yoduro de propidio (PI) y anexina V conjugada con FITC, mediante citometría de flujo (B-D), y mediante análisis de la fragmento del ADN internucleosómico (E).

30

Las figuras 3A-3C muestran el curso temporal y la dependencia de dosis de la apoptosis inducida por el ligando Apo-2 y la falta de inhibición de la apoptosis inducida por ligando Apo-2 por parte de las proteínas de fusión de receptor soluble-IgG basada en el receptor Fas/Apo-1, el receptor TNF-R1 o el receptor TNF-R2.

35

La figura 4 muestra la expresión del ARNm del ligando Apo-2 en tejidos fetales humanos y en tejidos adultos humanos, según medición mediante análisis de transferencia northern.

40

La figura 5 muestra el efecto *in vivo* del ligando Apo-2, administrado mediante inyección intratumoral, solo o en combinación con doxorubicina, sobre el peso de tumores de tipo carcinoma mamario MDA231 humano cultivado en ratones desnudos.

45

La figura 6 muestra el efecto *in vivo* del ligando Apo-2, administrado mediante inyección intratumoral, solo o en combinación con 5-FU, sobre el peso de tumores de tipo carcinoma de colon HCT 116 humano cultivados en ratones desnudos.

50

La figura 7 muestra el efecto *in vivo* del ligando Apo-2, administrado mediante inyección intraperitoneal, solo o en combinación con 5-FU, sobre el tamaño de tumores de tipo carcinoma de colon HCT116 humano cultivados en ratones desnudos.

55

La figura 8 muestra el efecto *in vivo* del ligando Apo-2, administrado mediante inyección intraperitoneal, solo o en combinación con 5-FU, sobre el peso de tumores de tipo carcinoma de colon HCT116 humano cultivados en ratones desnudos.

La figura 9 es un gráfico de columnas que ilustra que CrmA, aunque no FADD negativo dominante, bloquea la apoptosis inducida por el ligando Apo-2 en células HeLa-S3.

60

La figura 10 muestra el análisis FACS de la apoptosis inducida por el ligando Apo-2 y el efecto de cuatro anticuerpos anti-ligando Apo-2: 1D1, 2G6, 2E11 y 5C2 (células 9D apoptóticas detectadas utilizando anexina V conjugada con FITC -línea en negrita; células vivas no teñidas- línea delgada).

65

La figura 11 es un gráfico de columnas que ilustra la especificidad de antígeno de los anticuerpos monoclonales 1D1, 2G6, 2E11 y 5C2.

La figura 12 muestra un gráfico de columnas que ilustra los resultados de un ensayo de mapeo de epítopos de los anticuerpos monoclonales 1D1, 2G6, 2E11 y 5C2.

La figura 13 es un gráfico de columnas que ilustra los resultados de un ensayo que somete a ensayo la capacidad del anticuerpo monoclonal 1D1 de unirse a varios péptidos sintéticos diferentes que consisten de regiones específicas de aminoácidos del ligando Apo-2.

ES 2 316 182 T3

Las figuras 14A-14D muestran células HeLa cultivadas tratadas con sobrenadante de cultivo de células CHO que contienen ligando Apo-2 expresado (dilución 1:10, 1:20, 1:40) o medio no condicionado; la figura 14E es un gráfico de columnas que ilustra el número de células apoptóticas en cada campo.

5 La figura 15 muestra el cambio en porcentaje (%) de volumen tumoral del carcinoma de colon HCT116 en ratones desnudos en los que se ha administrado, mediante una minibomba osmótica, polipéptido ligando Apo-2 que se expresó en *E. coli* (tal como se describe en el Ejemplo 16).

10 La figura 16 muestra un mapa de restricción del plásmido pAPOK5.

La figura 17 ilustra la capacidad de las variantes por sustitución del ligando Apo-2 D218A, D269A y V207A de inducir la muerte celular apoptótica en un bioensayo en comparación con el ligando Apo-2 que consiste los aminoácidos 91 a 281 de la figura 1A (“Apo2L.2”).

15 La figura 18 ilustra la capacidad de la variante por sustitución del ligando Apo-2 denominada D203A de inducir la muerte celular apoptótica en un bioensayo en comparación con el ligando Apo-2 que consiste de los aminoácidos 91 a 281 de la figura 1A (“Apo2L.2”).

20 La figura 19 es una tabla que muestra las constantes de disociación (K_D) de las variantes por sustitución del ligando Apo-2 denominadas D203A, D218A y D269A en comparación con el ligando Apo-2 que consiste de los aminoácidos 91 a 281 de la figura 1A (“Apo2L.2”) según se determina mediante análisis cinético de unión utilizando BIAcore (Pharmacia).

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

25 I. Definiciones

Las expresiones “ligando Apo-2” y “Apo-2L” se utilizan intercambiamente para referirse a una secuencia de polipéptido que incluye los residuos aminoácidos 114 a 281, ambos inclusive, los residuos 92 a 281, ambos inclusive, los residuos 91 a 281, ambos inclusive, los residuos 41 a 281, ambos inclusive, los residuos 15 a 281, ambos inclusive, o los residuos 1 a 281, ambos inclusive, de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 1A, así como las variantes por delección, por inserción o por sustitución de las secuencias anteriormente indicadas. En una realización, la secuencia del polipéptido presenta por lo menos los residuos 114 a 281 de la figura 1A. Opcionalmente, la secuencia del polipéptido presenta por lo menos los residuos 92 a 281 o los residuos 91 a 281 de la figura 1A. En otra realización preferente, las variantes son biológicamente activas y presentan una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos aproximadamente 80%, más preferentemente una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 90%, y todavía más preferentemente, una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 95%, con cualquiera de las secuencias anteriormente indicadas. La definición comprende variantes por sustitución del ligando Apo-2 que comprende los aminoácidos 91 a 281 de la figura 1A en la que por lo menos uno de los aminoácidos en las posiciones 203, 218 ó 269 se sustituye por un residuo de alanina. La definición también comprende un ligando Apo-2 de secuencia nativa aislado de un fuente de ligando Apo-2, tal como de los tipos de tejido humano indicados en la presente invención (ver el Ejemplo 8) o de otra fuente, o preparado mediante procedimientos de recombinación o de síntesis. La presente definición del ligando Apo-2 excluye las secuencias de EST conocidas, tales como las secuencias de GenBank HHEA47M, T90422, R31020, H43566, H44565, H44565, H54628, H44772, H54629, T82085 y T10524.

45 La expresión “etiquetado con epítipo” cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un polipéptido químico que comprende ligando Apo-2, o una parte del mismo, fusionado con un “polipéptido etiqueta”. El polipéptido etiqueta presenta suficientes residuos para proporcionar un epítipo contra el que puede prepararse un anticuerpo, aunque suficientemente corto para que no interfiera con la actividad del ligando Apo-2. El polipéptido de etiqueta preferentemente también es único, de manera que el anticuerpo no reacciona cruzadamente en grado sustancial con otros epítipos. Los polipéptidos etiqueta adecuados generalmente presentan por lo menos seis residuos aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y aproximadamente 50 residuos aminoácidos (preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 residuos).

55 El término “aislado” cuando se utiliza para describir las diversas proteínas dadas a conocer en la presente invención, se refiere a una proteína que ha sido identificada y separada y/o recuperada de un componente del ambiente natural de la misma. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que típicamente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos de la proteína, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En las realizaciones preferentes, la proteína se purifica (1) en un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de taza giratoria, o (2) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie, o preferentemente tinción de plata. Entre las proteínas aisladas se incluyen proteínas *in situ* dentro de células recombinantes, debido a que por lo menos un componente del ambiente natural del ligando Apo-2 no se encontrará presente. Habitualmente, sin embargo, la proteína aislada se prepara mediante por lo menos una etapa de purificación.

65 Una molécula de ácido nucleico de ligando Apo-2 “aislada” es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que habitualmente se encuentra asociada en la fuente natural del ácido nucleico del ligando Apo-2. Una molécula de ácido nucleico del ligando Apo-

2 aislado es otra que la forma o contexto en la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico del ligando Apo-2 se distinguen de la molécula de ácido nucleico del ligando Apo-2 tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico de ligando Apo-2 aislado incluye moléculas de ácido nucleico de ligando Apo-2 contenidas en células que habitualmente expresan ligando Apo-2 en las que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se encuentra en una localización cromosómica diferente de aquélla en las células naturales.

La expresión “porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias 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 la secuencia del ligando Apo-2 tras alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y no considerando ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Los valores de % de identidad pueden generarse con WU-BLAST2 que pueden obtenerse a partir de Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology* 266:460-480, 1996; <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>. WU-BLAST2 utiliza varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se fija en los valores por defecto. Los parámetros ajustables pueden fijarse en los valores siguientes: overlap scan=1, overlap fraction=0.125, word threshold (T)=11. De manera similar, el “porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácidos nucleicos” con respecto a la secuencia de nucleótidos de los polipéptidos ligando Apo-2 se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en la secuencia codificante del ligando Apo-2. Los valores de identidad pueden generarse con el módulo BLASTN de WU-BLAST-2 fijado en los parámetros por defecto, fijando los parámetros overlap scan y overlap fraction en 1 y 0,125, respectivamente.

La expresión “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operablemente ligada en un organismo huésped particular. Entre las secuencias de control que resultan adecuadas para los procariontes, por ejemplo, se incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión ribosómica. Es conocido que las células eucarióticas utilizan promotores, señales de poliadenilación e intensificadores.

Un ácido nucleico se encuentra “operablemente ligado” cuando se encuentra situado en una relación funciona con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o un líder secretorio se encuentra operablemente ligado a ADN para un polipéptido si se expresa en forma de una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión ribosómica se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante si se sitúa de manera que facilite la traducción. Generalmente, la expresión “operablemente ligado” se refiere a que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretorio, son contiguas y se encuentran en la misma fase de lectura. Sin embargo, no resulta necesario que los intensificadores sean contiguos. La unión se consigue mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se utilizan oligonucleótidos adaptadores o *linkers* sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y específicamente cubre anticuerpos monoclonales anti-ligando Apo-2 individuales (incluyendo anticuerpos agonistas y antagonistas) y composiciones de anticuerpo anti-ligando Apo-2 con especificidad poliepitópica.

La expresión “anticuerpo monoclonal” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que puedan encontrarse presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones convencionales de anticuerpo (policlonal) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen anticuerpos híbridos y recombinantes producidos mediante el procesamiento de un dominio variable (incluyendo hipervariable) de un anticuerpo anti-ligando Apo-2 con un dominio constante (por ejemplo anticuerpos “humanizados”) o una cadena ligera con una cadena pesada, o una cadena de una especie con una cadena de otra especie, o fusiones con proteínas heterólogas, con independencia de la especie de origen o la denominación de clase o subclase de inmunoglobulina, así como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo Fab, F(ab')₂ y Fv), con la condición de que muestren la actividad deseada (ver, por ejemplo, la patente US nº 4.816.567 y Mage *et al.* en *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 79 a 97 (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987).

De esta manera, el modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo, indicando que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que deben utilizarse de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, *Nature* 256:495, 1975, o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante tal como se describe en la patente US nº 4.816.567. Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse a partir de bibliotecas fágicas generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554, 1990, por ejemplo.

Las formas “humanizadas” de los anticuerpos no humanos (por ejemplo “murinos” son inmunoglobulinas quí-
méricas específicas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab’, F(ab’)₂ u
otras subsecuencias de unión de antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmu-
noglobulina no humana. Mayoritariamente los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo
receptor) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen
por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón rata o conejo, que presen-
ten la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de Fv
de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Además, el anticuerpo
humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la secuencias de CDR
o de marco importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar y optimizar adicionalmente el comportamiento
del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y
típicamente dos, dominios variables, en los que la totalidad, o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR corres-
ponden a aquéllas de una inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones FR
son aquéllas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado ópticamente tam-
bién comprende por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una
inmunoglobulina humana. La expresión “biológicamente activo” para los fines de la presente invención se refiere a:
(a) presentar la capacidad de inducir o de estimular la apoptosis en por lo menos un tipo de célula de mamífero *in vivo* o *ex vivo*; (b) presentar la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo, es decir es inmunogénico, o (c)
conservar la actividad de un polipéptido Apo-2L nativo o natural.

Los términos “apoptosis” o “actividad apoptótica” se utilizan en un sentido amplio y se refieren a la forma ordenada
o controlada de muerte celular en mamíferos que típicamente se ve acompañada por uno o más cambios celulares
característicos, incluyendo la condensación del citoplasma, la pérdida de los microvilli 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, por ejemplo, mediante ensayos de viabilidad celular, análisis FACS o electroforesis de
ADN.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracte-
riza típicamente por el crecimiento celular no reglado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, aunque sin limitarse
a ellos, el carcinoma, el linfoma, la leucemia, el blastoma y el sarcoma. Entre los ejemplos más particulares de dichos
cánceres se incluyen el carcinoma de células escamosas, el cáncer pulmonar de células pequeñas, el cáncer pulmonar
de células no pequeñas, el cáncer gastrointestinal, el cáncer renal, el cáncer ovárico, el cáncer hepático, el cáncer co-
lorrectal, el cáncer endometrial, el cáncer renal, el cáncer de próstata, el cáncer del tiroides, el neuroblastoma, el cáncer
pancreático, el glioblastoma multiforme, el cáncer cervical, el cáncer de estómago, el cáncer de vejiga, el hepatoma,
el cáncer de mama, el carcinoma de colon y el cáncer de cabeza y cuello. En una realización, el cáncer incluye el
linfoma folicular, el carcinoma con mutaciones de p53 o el cáncer hormono-dependiente, tal como el cáncer de mama,
el cáncer de próstata o el cáncer de ovario.

Los términos “tratar”, “tratamiento” y “terapia” tal como se utilizan en la presente invención se refieren a la terapia
curativa, a la terapia profiláctica y a la terapia preventiva.

El término “mamífero” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a cualquier mamífero clasificado como
mamífero, incluyendo el ser humano, vacas, caballos, perros y gatos. En una realización preferente de la invención, el
mamífero es un ser humano.

II. Composiciones y procedimientos de la invención

La presente invención proporciona una nueva citoquina relacionada con la familia de ligandos TNF, la citoquina
identificada en la presente invención como “ligando Apo-2”. La secuencia madura de aminoácidos predicha del ligando
Apo-2 humano contiene 281 aminoácidos y presenta un peso molecular calculado de aproximadamente 32,5 kDa y un
punto isoelectrónico de aproximadamente 7,63. No existe ninguna secuencia de señal aparente en el extremo N-terminal,
aunque el análisis de hidropatía indica la presencia de una región hidrofóbica entre los residuos 15 y 40. La ausencia de
una secuencia de señal y la presencia de una región hidrofóbica interna sugiere que el ligando Apo-2 es una proteína
transmembranal de tipo II. Un sitio de glucosilación N-ligado potencial se encuentra localizado en el residuo 109
en la región extracelular putativa. La región citoplasmática putativa comprende los residuos aminoácidos 1 a 14, la
región transmembranal comprende los residuos aminoácidos 15 a 40 y la región extracelular comprende los residuos
aminoácidos 41 a 281, mostrados en la figura 1A. Los polipéptidos solubles ligandos de Apo-2 de dominio extracelular
se encuentran comprendidos dentro del alcance de la invención e incluyen, aunque sin limitación, polipéptidos ligandos
de Apo-2 que comprenden los residuos aminoácidos 114 a 281, 92 a 281 ó 91 a 281 de la región extracelular, mostrados
en la figura 1A.

La presente invención también proporciona variantes por sustitución de Apo-2L. Tal como se describe en la presen-
te invención, las técnicas de escaneo de alaninas se utilizaron para identificar varias moléculas variantes de sustitución
que presentan actividad biológica. Unas variantes por sustitución particulares del ligando Apo-2 comprenden los ami-
noácidos 91 a 281 de la figura 1A en la que por lo menos uno de los aminoácidos en las posiciones 203, 218 ó 269
se ha sustituido por un residuo de alanina. Estas variantes por sustitución se identifican como “D203A”, “D218A”
y “D269A”. Esta nomenclatura se utiliza para identificar los polipéptidos ligandos de Apo-2 que comprenden, por

ejemplo, los aminoácidos 91 a 281 de la figura 1A, en la que los residuos de ácido aspártico en las posiciones 203, 218 y/o 269 (utilizando la numeración mostrada en la figura 1A) se han sustituido por residuos de alanina. Opcionalmente, las variantes por sustitución pueden incluir una o más de dichas tres sustituciones de sitio diferente.

5 A. Preparación de ligando Apo-2

La descripción posterior se refiere principalmente a la producción de ligando Apo-2 mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene el ácido nucleico del ligando Apo-2 y a la recuperación del polipéptido a partir del cultivo celular. Evidentemente se contempla que procedimientos alternativos, que son bien conocidos de la técnica, puedan utilizarse para preparar el ligando Apo-2.

1. Aislamiento de ADN codificante de ligando Apo-2

El ADN codificante del ligando Apo-2 puede obtenerse a partir de cualquier biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree posee el ARNm del ligando Apo-2 y que lo expresa a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN de ligando Apo-2 humano puede obtenerse convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejidos humanos, tales como la biblioteca de bacteriófagos de ADNc placentario humano descrita en el Ejemplo 1. El gen codificante del ligando Apo-2 también puede obtenerse a partir de una biblioteca genómica o mediante la síntesis de oligonucleótidos.

Las bibliotecas pueden cribarse con sondas (tales como anticuerpos del ligando Apo-2 u oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20 a 80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. Los ejemplos de sondas oligonucleótidas se proporcionan en el Ejemplo 1. El cribado de la biblioteca de ADNc o genómica con la sonda seleccionada puede llevarse a cabo utilizando procedimientos estándares, tales como los descritos en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen codificante del ligando Apo-2 es la utilización de metodología de PCR [Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Un procedimiento preferente de cribado utiliza secuencias oligonucleótidas seleccionadas para cribar bibliotecas de ADNc de diversos tejidos humanos. El Ejemplo 1 posteriormente describe técnicas para cribar una biblioteca de ADNc con dos sondas oligonucleótidas diferentes. Las secuencias oligonucleótidas seleccionadas como sondas deberían ser de suficiente longitud y suficientemente no ambiguas para minimizar los falsos positivos. El oligonucleótido preferentemente se marca de manera que pueda detectarse tras la hibridación con ADN en la biblioteca que se criba. Los procedimientos de marcaje son bien conocidos de la técnica, e incluyen la utilización de marcajes radioactivos, tales como ATP marcado con ³²P, la biotilación o el marcaje enzimático.

Puede obtenerse ácido nucleico que presenta la totalidad de la secuencia codificante de proteína mediante el cribado de bibliotecas de ADNc o genómicas seleccionadas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida que se da a conocer en la presente invención y, en caso necesario, utilizando procedimientos convencionales de extensión de cebador tal como describen Sambrook *et al.*, *supra*, para detectar precursores y procesar intermediarios de ARNm que pueden no haberse transcrito inversamente en ADNc.

Las variantes de secuencia de aminoácidos del ligando Apo-2 pueden prepararse mediante la introducción de cambios apropiados de nucleótidos en el ADN del ligando Apo-2, o mediante la síntesis del polipéptido ligando Apo-2 deseado. Dichas variantes representan inserciones, sustituciones y/o deleciones de residuos en el interior, en un extremo o en ambos extremos de la región intracelular, de la región transmembranal o de la región extracelular, o de la secuencia de aminoácidos mostrada para el ligando Apo-2 de longitud completa en la figura 1A. Puede prepararse cualquier combinación de inserción, sustitución y/o deleción para llegar al constructo final, con la condición de que el constructo final posea, por ejemplo, la actividad apoptótica deseada tal como se define en la presente invención. En una realización preferente, las variantes presentan una identidad e secuencia de aminoácidos de por lo menos aproximadamente 80%, más preferentemente una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 90% y todavía más preferentemente una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 95% con las secuencias identificadas en la presente invención para las regiones intracelular, transmembranal o extracelular del ligando Apo-2 o la secuencia de longitud completa del ligando Apo-2. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos post-traduccionales del ligando Apo-2, tales como el cambio del número o la posición de los sitios de glucosilación o la alteración de las características de anclaje a membrana.

Las variaciones en la secuencia del ligando Apo-2 tales como las descritas anteriormente pueden realizarse utilizando cualquiera de las técnicas y guías para las mutaciones conservativas y no conservativas proporcionadas en la patente US nº 5.364.934. Entre éstas se incluyen la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (sitio-dirigida), el escaneo de alaninas y la mutagénesis por PCR.

El análisis de escaneo de aminoácidos puede utilizarse para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de escaneo preferentes son aminoácidos neutros relativamente pequeños. Entre dichos aminoácidos se incluyen la alanina, la glicina, la serina y la cisteína. La alanina es típicamente un aminoácido de escaneo preferente de entre dicho grupo debido a que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham *et al.*, Science

244:101, 1989]. La alanina también es típicamente preferente debido a que es el aminoácido más común. Además, frecuentemente se encuentra en posiciones tanto enterradas como expuestas [Creighton, *The Proteins*, W.H. Freeman & Co., NY); Chothia, *J. Mol. Biol.* 50:1, 1976].

5 Las variaciones en la secuencia del ligando Apo-2 también comprendidas dentro del alcance de la invención se refieren a derivados aminoterminal o a formas modificadas. Entre dichas secuencias de ligando Apo-2 se incluyen cualquiera de los polipéptidos ligados de Apo-2 indicados en la presente invención que presentan una metionina o una metionina modificada (tal como formil-metionina u otras especies de metionina bloqueadas) en el extremo N-terminal de la secuencia del polipéptido.

10

2. Inserción del ácido nucleico en un vector replicable

15 El ácido nucleico (por ejemplo ADNc o ADN genómico) codificante de un ligando Apo-2 nativo o variante puede insertarse en un vector replicable para la clonación adicional (amplificación del ADN) o para la expresión. Diversos vectores se encuentran disponibles públicamente. Los componentes de vector generalmente incluyen, aunque sin limitarse a ellos, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento intensificador, un promotor y una secuencia de terminación de transcripción, cada uno de los cuales se describe posteriormente.

20 (i) Componente secuencia de señal

El ligando Apo-2 puede producirse por recombinación no sólo directamente, sino también en forma de un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia de señal u otro polipéptido que presente un sitio de corte específico en el extremo N-terminal de la proteína madura o polipéptido. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN del ligando Apo-2 que se ha insertado en el vector. La secuencia de señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que es reconocida y procesada (es decir, cortada por una peptidasa de señal) por la célula huésped. La secuencia de señal puede ser una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo de entre el grupo de la fosfatasa alcalina, la penicilinasasa, el lpp o los líderes de enterotoxina II termoestables. Para la secreción en levaduras la secuencia de señal puede ser, por ejemplo, el líder de invertasa de levadura, el líder de factor alfa (incluyendo los líderes de factor α de *Saccharomyces* y de *Kluyveromyces*, descrito éste último en la patente US n° 5.010.182) o el líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans* (patente EP n° 362.179, publicada el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en la patente WO n° 90/13646, publicada el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de las células de mamífero la presecuencia del ligando Apo-2 nativo que normalmente dirige la inserción del ligando Apo-2 en la membrana celular de las células humanas *in vivo* es satisfactoria, aunque pueden utilizarse otras secuencias de señal de mamífero para dirigir la secreción de la proteína, tal como secuencias de señal de polipéptidos secretados de la misma especie o de una especie relacionada, así como líderes secretorios víricos, por ejemplo la señal de glucoproteína D de herpes simplex.

40 El ADN para dicha región precursora preferentemente se liga en el mismo marco de lectura del ADN codificante del ligando Apo-2.

(ii) Componente origen de replicación

45 Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Generalmente, en los vectores de clonación esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas para una diversidad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación procedente del plásmido pBR322 resulta adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2μ resulta adecuado para levaduras, y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) resultan útiles para clonar vectores en células de mamífero. Generalmente el componente origen de replicación no resulta necesario para los vectores de expresión de mamífero (típicamente resulta posible utilizar el origen de SV40 debido a que contiene el promotor temprano).

55 La mayoría de los vectores de expresión son vectores "lanzadera", es decir, son capaces de replicación en por lo menos una clase de organismo, pero pueden transfectarse en otro organismo para la expresión. Por ejemplo, un vector se clona en *E. coli* y después el mismo vector se transfecta en células de levadura o de mamífero para la expresión aunque no es capaz de replicarse independientemente del cromosoma de la célula huésped.

60 El ADN también puede amplificarse mediante inserción en el genoma huésped. Esto se consigue fácilmente utilizando especies de *Bacillus* como huéspedes, por ejemplo mediante inclusión en el vector de una secuencia de ADN que es complementaria a una secuencia que se encuentra en el ADN genómico de *Bacillus*. La transfección de *Bacillus* con este vector resulta en la recombinación homóloga con el genoma y en la inserción del ADN del ligando Apo-2. Sin embargo, la recuperación del ADN genómico codificante del ligando Apo-2 es más compleja que la de un vector exógenamente replicado debido a que resulta necesaria la digestión con enzima de restricción para extraer el ADN del ligando Apo-2.

65

(iii) *Componente gen de selección*

Los vectores de expresión y de clonación típicamente contienen un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o el crecimiento de las células huésped transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Las células huésped no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que: (a) proporcionan resistencia a antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos, por ejemplo el gen codificante de la D-alanina racemasa para los Bacilli.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que resultan transformadas con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que proporciona resistencia a fármacos y de esta manera sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante utilizan los fármacos neomicina [Southern *et al.*, *J. Molec. Appl. Genet.* 1:327, 1982], ácido micofenólico [Mulligan *et al.*, *Science* 209:1422, 1980] o higromicina [Sugden *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5:410-413, 1985]. Los tres ejemplos proporcionados anteriormente utilizan genes bacterianos bajo control eucariótico para proporcionar resistencia frente al fármaco apropiado: G418 o neomicina (geneticina), xgpt (ácido micofenólico) o higromicina, respectivamente.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para las células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células componentes para incorporar el ácido nucleico del ligando Apo-2, tal como DHFR o timidina quinasa. Las células de mamífero transformantes se sitúan bajo una presión selectiva que sólo los transformantes se encuentran específicamente adaptados para sobrevivir en virtud de que han incorporado el marcador. Se impone presión selectiva mediante el cultivo de los transformantes bajo condiciones en las que la concentración del agente de selección en el medio se modifica sucesivamente, conduciendo de esta manera a la amplificación de tanto el gen de selección como el ADN que codifica el ligando Apo-2. La amplificación es el procedimiento por el que los genes en mayor demanda para la producción de una proteína crítica para el crecimiento se reiteran en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Se sintetizan cantidades incrementadas de ligando Apo-2 a partir del ADN amplificado. Entre otros ejemplos de genes amplificables se incluyen metalotioneína I y II, adenosina deaminasa y ornitina descarboxilasa.

Las células transformadas con 1 gen de selección DHFR pueden identificarse en primer lugar mediante el cultivo de la totalidad de los transformantes en un medio de cultivo que contenga metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiado en el caso de que se utilice DHFR de tipo salvaje es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada tal como describen Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216, 1980. A continuación, las células transformadas se exponen a niveles incrementados de metotrexato. Esto conduce a la síntesis de múltiples copias del gen DHFR y, concomitantemente, a múltiples copias de otro ADN que comprende los vectores de expresión, tal como DN codificante del ligando Apo-2. Esta técnica de amplificación puede utilizarse con cualquier huésped de otra manera adecuado, por ejemplo ATCC n° CCL61 CHO-K1, no obstante la presencia de DHFR endógeno si, por ejemplo, utiliza un gen DHFR mutante que sea altamente resistente a Mtx (patente EP n° 117.060).

Alternativamente, las células huésped (particularmente los huéspedes de tipo salvaje que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN codificante del ligando Apo-2, proteína DHFR de tipo salvaje y otro marcador seleccionable, tal como aminoglucósido-3'-fosfotransferasa (APH), pueden seleccionarse mediante crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglucósido, por ejemplo canamicina, neomicina o G418 (ver la patente US n° 4.965.199).

Un gen de selección adecuado para la utilización en levaduras es el gen *trp1* presentes en el plásmido de levadura YRp7 [Stinchcomb *et al.*, *Nature* 282:39, 1979; Kingsman *et al.*, *Gene* 7:141, 1979; Tschemper *et al.*, *Gene* 10:157, 1980]. El gen *trp1* proporciona un marcador seleccionable para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo ATCC n° 44076 o PEP4-1 [Jones, *Genetics* 85:23-33, 1977]. La presencia de la lesión en *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona entonces un ambiente efectivo para detectar la transformación mediante el crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC n° 20.622 o n° 38.626) se complementan con plásmidos conocidos que portan el gen *Leu2*.

Además, los vectores derivados del plásmido circular pKD1 de 1,6 μ m pueden utilizarse para la transformación de levaduras *Kluyveromyces* [Bianchi *et al.*, *Curr. Genet.* 12:185, 1987]. Más recientemente, se ha informado de un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina bovina recombinante para *K. lactis* [Van den Berg, *Bio/Technology* 8:135, 1990]. También se ha dado a conocer vectores de expresión multicopia estables para la secreción de albúmina sérica recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces* [Fleer *et al.*, *Bio/Technology* 9:968-975, 1991].

(iv) *Componente promotor*

Los vectores de expresión y de clonación habitualmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y se encuentra operablemente ligado a la secuencia de ácido nucleico del ligando Apo-2. Los promotores son secuencias no traducidas situadas cadena arriba (5') del codón de inicio de un gen estructural (generalmente a

menos de aproximadamente 100 a 1.000 pb) que controlan la transcripción y la traducción de una secuencia de ácido nucleico particular, tal como la secuencia de ácido nucleico del ligando Apo-2, al que se encuentran operablemente ligados. Dichos promotores típicamente se clasifican en dos grupos: inducibles y constitutivos. Los promotores inducibles son promotores que inician niveles incrementados de transcripción a partir del ADN bajo su control en respuesta a alguna modificación en las condiciones de cultivo, por ejemplo la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura. En la actualidad son bien conocidos un gran número de promotores reconocidos por una diversidad de potenciales células huésped. Estos promotores se ligan operablemente a ADN codificante del ligando Apo-2 mediante la eliminación del promotor del ADN fuente mediante la digestión con enzimas de restricción y la inserción de la secuencia aislada de promotor en el vector. Tanto la secuencia de promotor del ligando Apo-2 nativo y muchos promotores heterólogos pueden utilizarse para dirigir la amplificación y/o la expresión del ADN del ligando Apo-2.

Los promotores adecuados para la utilización con huéspedes procarióticos incluyen los sistemas de promotor β -lactamasa y lactosa [Chang *et al.*, Nature 275:615, 1997; Goeddel *et al.*, Nature 281:544, 1979], fosfatasa alcalina, un sistema de promotor triptófano (trp) [Goeddel, Nucleic Acids Res. 8:4057, 1980; patente EP n° 36.776] y promotores híbridos, tales como promotor tac [deBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25, 1983]. Sin embargo, resultan adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Las secuencias de nucleótidos de los mismos han sido publicadas, permitiendo de esta manera que un experto en la materia las ligue operablemente a ADN codificante del ligando Apo-2 [Siebenlist *et al.*, Cell 20:269, 1980] utilizando linkers o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido. Los promotores para la utilización en sistemas bacterianos también contienen una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) operablemente ligada al ADN codificante del ligando Apo-2.

Son conocidas secuencias de promotor para eucariotas. Prácticamente la totalidad de los genes eucarióticos presentan una región rica en AT situada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia que se encuentra 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de transcripción de muchos genes es una región CXCAAT en la que X puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucarióticos se encuentra una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli-A en el extremo 3' de la secuencia codificante. La totalidad de dichas secuencias se insertan convenientemente en los vectores de expresión eucarióticos.

Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para la utilización con huéspedes levadura se incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem. 255:2073, 1980] u otras enzimas glucolíticas [Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg. 7:149, 1968; Holland, Biochemistry 17:4900, 1978], tal como la enolasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la hexoquinasa, la piruvato descarboxilasa, la fosfofructoquinasa, la glucosa-6-fosfato isomerasa, la 3-fosfoglicerato mutasa, la piruvato quinasa, la triosafosfato isomerasa, la fosfoglucoisomerasa y la glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que presentan la ventaja adicional de que la transcripción está controlada por las condiciones de cultivo, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, el isocitocromo C, la fosfatasa ácida, los enzimas degradativos asociados al metabolismo del nitrógeno, la metalotioneína, la glíderaldehído-3-fosfato deshidrogenasa y los enzimas responsables de la utilización de la maltosa y de la galactosa. Los vectores y promotores adecuados para la utilización en la expresión en levaduras se describen adicionalmente en la patente EP n° 73.657. Los intensificadores de levadura también se utilizan ventajosamente con los promotores de levadura.

La transcripción de ligando Apo-2 a partir de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de genomas de virus, tales como el virus del polioma, el virus de la viruela aviar (patente UK n° 2.211.504, publicada el 5 de julio de 19), el adenovirus (tal como el adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviar, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y más preferentemente el virus 40 del simio (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo el promotor actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, y del promotor normalmente asociado con la secuencia del ligando Apo-2, con la condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de la célula huésped.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente en forma de un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico de SV40 [Fiers *et al.*, Nature 273:113, 1978; Mulligan y Berg, Science 209:1422-1427, 1980; Pavlakiset *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:7398-7402, 1981]. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente en forma de un fragmento de restricción HindII [Greenaway *et al.*, Gene 18:355-360, 1982]. Un sistema para expresar ADN en huéspedes mamíferos utilizando el virus del papiloma bovino como vector se da a conocer en la patente US n° 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente US n° 4.601.978 [ver también Gray *et al.*, Nature 295:503-508, 1982, sobre la expresión de ADNc codificante de interferón inmunológico en células de mono; Reyes *et al.*, Nature 297:598-601, 1982, sobre la expresión de ADNc de β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simplex; Canaani y Bergi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5166-5170, 1982, sobre la expresión del gen del interferón β 1 humano en células de ratón y de conejo en cultivo; y Gorman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777-6781, 1982, sobre la expresión de secuencias CAT bacterianas en células renales de mono CV-1, fibroblastos de embrión de polo, células de ovario de hámster chino, células HeLa y células NIH-3T3 de ratón utilizando la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor].

ES 2 316 182 T3

(v) *Componente elemento intensificador*

La transcripción de un ADN codificante del ligando Apo-2 por eucariotas superiores puede incrementarse mediante la inserción de una secuencia intensificadora en el vector. Los intensificadores son elementos de ADN que actúan en cis, habitualmente de entre aproximadamente 10 y 300 pb, que actúan sobre un promotor incrementando su transcripción. Los intensificadores son relativamente independientes de la orientación y la posición, observándose en orientación 5' [Laimins *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:993, 1981] y 3' [Lusky *et al.*, Mol. Cell Biol. 3:1108, 1983] respecto a la unidad de transcripción, dentro de un intrón [Banerji *et al.*, Cell 33:729, 1983], así como dentro de la secuencia codificante misma [Osborne *et al.*, Mol. Cell Bio. 4:1293, 1984]. En la actualidad se conocen muchas secuencias intensificadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Sin embargo, típicamente se utiliza un intensificador de un virus de célula eucariótica. Entre los ejemplos se incluyen el intensificador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100 a 270), el intensificador de promotor temprano de citomegalovirus, el intensificador del poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y los intensificadores de adenovirus (ver también Yaniv, Nature 297:17-18, 1982) sobre elementos intensificadores para la activación de promotores eucarióticos. El intensificador puede introducirse en el vector en una posición 5' ó 3' respecto a la secuencia codificante del ligando Apo-2, aunque preferentemente se localiza en un sitio 5' respecto al promotor.

(vi) *Componente terminador de transcripción*

Los vectores de expresión utilizados en las células huésped eucarióticas (levaduras, hongos, células de insecto, vegetales, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contienen secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias se encuentran comúnmente disponibles de las regiones 5', y ocasionalmente 3', no traducidas de ADNs o ADNcs eucarióticos o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcrito como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm codificante del ligando Apo-2.

(vii) *Construcción y análisis de vectores*

La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes anteriormente indicados utiliza técnicas de ligación estándares. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se corta, se adaptan y se religan en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos.

Para el análisis de confirmación de las secuencias correctas en los plásmidos construidos, las mezclas de ligación pueden utilizarse para transformar la cepa 294 de *E. coli* K12 (ATCC nº 31.446) y los transformantes con éxito seleccionados para la resistencia a ampicilina o a tetraciclina, en su caso. Se preparan plásmidos a partir de los transformantes, se analizan mediante digestión con endonucleasa de restricción y/o se secuencian mediante el procedimiento de Messing *et al.*, Nucleic Acids Res. 9:309, 1981, o mediante el procedimiento de Maxam *et al.*, Methods in Enzymology 65:499, 1980.

(viii) *Vectores de expresión transitoria*

Pueden utilizarse vectores de expresión que permiten la expresión transitoria en las células de mamífero de ADN codificante de ligando Apo-2. En general, la expresión transitoria implica la utilización de un vector de expresión que es capaz de replicarse eficientemente en una célula huésped, de manera que la célula huésped acumula muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetiza niveles elevados de un polipéptido deseado codificado por el vector de expresión [Sambrook *et al.*, *supra*]. Los sistemas de expresión transitoria, que comprenden un vector de expresión adecuado y una célula huésped, permiten la identificación positiva conveniente de los polipéptidos codificados por los ADNs clonados, así como el cribado rápido de dichos polipéptidos para las propiedades biológicas o fisiológicas deseadas. De esta manera, los sistemas de expresión transitoria resultan particularmente útiles en la invención con fines de identificación de análogos y variantes del ligando Apo-2 que son ligando Apo-2 biológicamente activo.

(ix) *Vectores células de vertebrado ejemplares adecuados*

Otros procedimientos, vectores y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis de ligando Apo-2 en cultivo celular de vertebrado recombinante se describen en Gething *et al.*, Nature 293:620-625, 1981; Mantei *et al.*, Nature 281:40-46, 1979; patente EP nº 117.060 y patente EP nº 117.058. Un plásmido particularmente útil para la expresión en cultivo celular de mamífero del ligando Apo-2 es pRK5 [patente EP nº 307.247, también descrito en el Ejemplo 1] o pSV16B [patente WO nº 91/08291, publicada el 13 de junio de 1991].

3. Selección y transformación de células huésped

Las células huésped adecuadas para la clonación o la expresión del ADN en los vectores de la presente invención son las células procarióticas, de levadura o de eucariota superior indicadas anteriormente. Entre las procariotas adecuadas para este fin se incluyen, aunque sin limitación, eubacterias, tales como los organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo enterobacteriáceas, 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 *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo *B. licheniformis* 41P, dado a conocer en la patente DD n° 266.710, publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Preferentemente, la célula huésped debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas.

Además de las procariotas, los microbios eucarióticos tales como los hongos filamentosos o las levaduras, resultan huéspedes de clonación o de expresión adecuados para los vectores codificantes del ligando Apo-2. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de panadería, es el microorganismo huésped eucariótico inferior más comúnmente utilizado. Sin embargo, se encuentran comúnmente disponibles y resultan útiles en la presente invención varios otros géneros, especies y cepas.

Las células huésped adecuadas para la expresión de ligando Apo-2 glucosilado se derivan a partir de organismos multicelulares. Dichas células huésped son capaces de actividades complejas de procesamiento y glucosilación. En principio, cualquier cultivo de células eucarióticas superiores es trabajable, sea de cultivo de vertebrado o de invertebrado. Entre los ejemplos de células de invertebrado se incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovíricas y células huésped de insecto permisivas correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori* [ver, por ejemplo, Luckow *et al.*, Bio/Technology 6:47-55, 1988; Miller *et al.*, en: Genetic Engineering, Setlow *et al.*, editores, vol. 8 (Plenum Publishing, 1986), páginas 277 a 279, y Maeda *et al.*, Nature 315:592-594, 1985]. Se encuentran públicamente disponibles una diversidad de cepas víricas, por ejemplo la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus pueden utilizarse como el virus según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9"), descrito en el Ejemplo 2.

Pueden utilizarse como huéspedes cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco. Típicamente las células vegetales se transfectan mediante incubación con determinadas cepas de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, que ha sido previamente manipulado para que contenga ADN codificante del ligando Apo-2. Durante la incubación del cultivo de células vegetales con *A. tumefaciens*, el ADN codificante del ligando Apo-2 se transfiere a la célula vegetal huésped, de manera que se transfecta y expresará, bajo las condiciones apropiadas, el ADN codificante del ligando Apo-2. Además, las secuencias reguladoras y de señal compatibles con las células vegetales se encuentran disponibles, tal como el promotor de la nopalina sintasa y las secuencias de señal de poliadenilación [Depickeret *et al.*, J. Mol. Appl. Gen. 1:561, 1982]. Además, los segmentos de ADN aislados de la región del ADN-T del gen 780 son capaces de activar o de incrementar los niveles de transcripción de los genes expresables en plantas en tejido vegetal que contiene ADN recombinante [patente EP n° 321.196, publicada el 21 de junio de 1989].

La propagación de las células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejidos) también es bien conocida de la técnica [ver, por ejemplo, Tissue Culture, Academic Press, Kruse y Patterson, editores, 1973]. Son ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7, ATCC n° CRL 1651), línea de riñón embrionario humano (células 293 ó 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36:59, 1977), células de riñón de hámster neonato (BHK, ATCC n° CCL 10), células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216, 1980), células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251, 1980), células de riñón de mono (CV 1, ATCC n° CCL 70), células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC n° CRL-1587), células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC n° CCL 2), células de riñón canino (MDCK, ATCC n° CCL 34), células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC n° CRL 1442), células pulmonares humanas (W138, ATCC n° CCL75), células hepáticas humanas (HepG2, HB 8065), tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC n° CCL51), células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68, 1982), células MRC 5 y células FS4.

Las células huésped se transfectan y preferentemente se transforman con los vectores de expresión o de clonación anteriormente indicados, para la producción de ligando Apo-2 y se cultivan en medio nutritivo convencional modificado según resulte apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes codificantes de las secuencias deseadas.

La transfección se refiere a la incorporación de un vector de expresión por una célula huésped, se expresen o no realmente alguna secuencia codificante. Son conocidos del experto ordinario en la materia numerosos procedimientos de transfección, por ejemplo CaPO_4 y la electroporación. La transfección con éxito se reconoce generalmente cuando se produce alguna indicación del funcionamiento de dicho vector dentro de la célula huésped.

La transformación se refiere a introducir ADN en un organismo, de manera que el ADN es replicable, en forma de un elemento extracromosómico o como integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándares apropiadas para dichas células. El tratamiento de calcio utilizando cloruro de calcio, tal como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, o la electroporación, se utiliza generalmente

para procariotas u otras células que contienen barreras de pared celular sustanciales. La infección por *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de determinadas células vegetales, tal como describen Shaw *et al.*, Gene 23:315, 1983, y la patente WO n° 89/05859, publicada el 29 de junio de 1989. Además, las plantas pueden transfectarse utilizando el tratamiento de ultrasonidos, tal como se describe en la patente WO n° 91/00358, publicada el 10 de enero de 1991.

Para las células de mamífero sin dichas paredes celulares, resulta preferente el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, Virology 52:456-457, 1978. Se han descrito aspectos generales de las transformaciones de sistemas de células huésped de mamífero en la patente US n° 4.399.216. Las transformaciones en levaduras típicamente se llevan a cabo según el procedimiento de Van Solingen *et al.*, J. Bact. 130:946, 1977, y Hsiao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76:3829, 1979. Sin embargo, también pueden utilizarse otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como la microinyección nuclear, la electroporación, la fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policones, por ejemplo polibreno, poliornitina. Para diversas técnicas de transformación de células de mamífero, ver Keown *et al.*, Methods in Enzymology 185:527-537, 1990, y Mansour *et al.*, Nature 336:348-352, 1988.

4. Cultivo de las células huésped

Las células procarióticas utilizadas para producir ligando Apo-2 pueden cultivarse en medio adecuado tal como se describe de manera general en Sambrook *et al.*, *supra*.

Las células huésped de mamífero utilizadas para producir ligando Apo-2 pueden cultivarse en una diversidad de medios. Entre los ejemplos de medios disponibles comercialmente se incluyen F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ("MEM", Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ("DMEM", Sigma). Cualquiera de dichos medios puede suplementarse según resulte necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tal como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GentamycinTM), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente energética equivalente. También pueden incluirse cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas que resultarán conocidas para el experto en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son aquéllas utilizadas anteriormente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y resultarán evidentes para el experto ordinario en la materia.

En general, pueden encontrarse los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos de células de mamífero en Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, editor (IRL Press, 1991).

Las células huésped a las que se hace referencia en la presente exposición comprenden células en cultivo, así como células que se encuentran dentro de un animal huésped.

5. Detección de la amplificación/expresión génica

La amplificación y/o expresión génicas pueden medirse en una muestra directamente, por ejemplo mediante transferencia southern-northern convencional para cuantificar la transcripción del ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205, 1980], transferencia por puntos (análisis del ADN) o hibridación *in situ*, utilizando una sonda apropiadamente marcada, basada en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Pueden utilizarse diversos marcajes, más comúnmente isótopos radioactivos, y particularmente ³²P. Sin embargo, también pueden utilizarse otras técnicas, tales como la utilización de nucleótidos modificados con biotina para la introducción en un polinucleótido. En este caso la biotina sirve como el sitio para la unión a avidina o a antibióticos, que pueden marcarse con una amplia diversidad de marcajes, tales como radionucleótidos, compuestos fluorescentes o enzimas. Alternativamente, pueden utilizarse anticuerpos que puedan reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez pueden marcarse y el ensayo llevarse a cabo donde el dúplex se encuentra unido a una superficie, de manera que tras la formación de dúplex sobre la superficie, pueda detectarse la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

Alternativamente, la expresión génica puede medirse mediante procedimientos inmunológicos, tales como la tinción inmunohistoquímica de células o de secciones de tejido y el ensayo de cultivo celular o de líquidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Con las técnicas de tinción inmunohistoquímica, se prepara una muestra celular, típicamente mediante deshidratación y fijación, seguido de reacción con anticuerpos marcados específicos para el producto génico acoplado, en el que los marcajes habitualmente son detectables visualmente, tal como marcajes enzimáticos, marcajes fluorescentes, marcajes luminiscentes y similares.

Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de líquidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido ligando Apo-2 nativo o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente invención o contra una secuencia exógena fusionada con ADN del ligando Apo-2 y codificante de un epítopo de anticuerpo específico

ES 2 316 182 T3

6. Purificación de polipéptido ligando Apo-2

El ligando Apo-2 preferentemente se recupera del medio de cultivo en forma de polipéptido secretado, aunque también puede recuperarse de lisados de las células huésped cuando se produce directamente sin una señal secretoria. Si el ligando Apo-2 se encuentra unido a membrana, puede liberarse de la membrana utilizando una solución detergente adecuada (por ejemplo Triton X-100) o puede liberarse su región extracelular mediante corte enzimático.

Al producir el ligando Apo-2 en una célula recombinante que no sea de origen humano, el ligando Apo-2 se encuentra libre de proteínas o de polipéptidos de origen humano. Sin embargo, habitualmente resulta necesario purificar el ligando Apo-2 de proteínas o polipéptidos celulares recombinantes para obtener preparaciones que sean sustancialmente homogéneas respecto al ligando Apo-2. Como primera etapa, el medio de cultivo o lisado puede centrifugarse para eliminar los residuos celulares particulados. Después, el ligando Apo-2 se purifica de proteínas y polipéptidos solubles contaminantes, siendo los procedimientos siguientes ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase reversa; cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75, y columnas de proteína A-seferosa para eliminar contaminantes, tales como IgG.

En una realización preferente, el ligando Apo-2 puede aislarse mediante cromatografía de afinidad, tal como se describe en el Ejemplo 3.

Las variantes del ligando Apo-2 en las que los residuos han sido delecionados, insertados o sustituidos se recuperan de la misma manera que el ligando Apo-2 nativo, teniendo en cuenta cualquier cambio sustancial de las propiedades ocasionado por la variación. Por ejemplo, la preparación de una fusión de ligando Apo-2 con otra proteína o polipéptido, por ejemplo un antígeno bacteriano o vírico, facilita la purificación; puede utilizarse una columna de inmunoafinidad que contenga anticuerpo contra el antígeno para adsorber el polipéptido de fusión. En una realización preferente, se fusiona una secuencia extracelular del ligando Apo-2 con un péptido His₁₀ y se purifica mediante cromatografía de afinidad de Ni²⁺-quelato.

Un inhibidor de proteasa, tal como el fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) también puede resultar útil para inhibir la degradación proteolítica durante la purificación, y pueden incluirse antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes adventicios. Un experto en la materia apreciará que los procedimientos de purificación adecuados para el ligando Apo-2 nativo pueden requerir modificaciones para ajustarse a cambios en el carácter del ligando Apo-2 o las variantes del mismo tras la expresión en cultivo celular recombinante.

7. Modificaciones covalentes de polipéptidos ligados de Apo-2

Las modificaciones covalentes del ligando Apo-2 se encuentran comprendidas dentro del alcance de la presente invención. Tanto el ligando Apo-2 nativo como las variantes de secuencia de aminoácidos del ligando Apo-2 pueden modificarse covalentemente. Un tipo de modificación covalente del ligando Apo-2 se introduce en la molécula mediante la reacción de los residuos aminoácidos diana del ligando Apo-2 con un agente derivatizante que sea capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los residuos N-terminales o C-terminales del ligando Apo-2.

La derivatización con agentes bifuncionales resulta útil para entrecruzar el ligando Apo-2 con una matriz de soporte o superficie insoluble en agua para la utilización en el procedimiento para purificar los anticuerpos anti-ligando Apo-2 y viceversa. Entre los agentes entrecruzantes utilizados comúnmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo disuccinimidilésteres, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato) y maleimidias bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes derivatizantes, tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato rinden intermediarios fotoactivables que son capaces de formar enlaces cruzados en presencia de luz. Alternativamente, para la inmovilización de proteínas se utilizan matrices reactivas insolubles en agua, tales como carbohidratos activados por bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos indicados en las patentes US n° 3.969.287, n° 3.691.016, n° 4.195.128, n° 4.247.642, n° 4.229.537 y n° 4.330.440.

Entre otras modificaciones se incluyen la desamidación de residuos glutaminilo y asparaginilo en los residuos glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente; la hidroxilación de la prolina y la lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de los residuos serilo o treonilo, la metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79 a 86, 1983], la acetilación de la amina N-terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal. Las formas modificadas de los residuos se encuentran comprendidas dentro del alcance de la presente invención.

Otro tipo de modificación covalente del polipéptido ligando Apo-2 incluido dentro del alcance de la presente invención comprende alterar el patrón de glucosilación nativo del polipéptido. La expresión "alterar el patrón de glucosilación nativo" pretende, para los fines de la presente invención, referirse a la deleción de uno o más grupos carbohidrato presentes en el ligando Apo-2 nativo y/o la adición de uno o más sitios de glucosilación que no se encuentran presentes en el ligando Apo-2 nativo.

La glucosilación de los polipéptidos típicamente está N-ligada u O-ligada. La glucosilación N-ligada se refiere a la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo asparagina. Las secuencias tripeptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto la prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. De esta manera, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación O-ligada se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxilamino, más comúnmente serina o treonina, aunque también puede utilizarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al polipéptido ligando Apo-2 puede conseguirse mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos e manera que contenga una o más de las secuencias tripeptido anteriormente indicadas (para sitios de glucosilación N-ligada). La alteración también puede realizarse mediante la adición o la sustitución de uno o más residuos serina o treonina en la secuencia del ligando Apo-2 nativo (para los sitios de glucosilación N-ligada). La secuencia de aminoácidos del ligando Apo-2 opcionalmente puede alterarse mediante cambios a nivel del ADN, particularmente mediante la mutación del ADN codificante del polipéptido ligando Apo-2 en bases preseleccionadas, de manera que se genere codones que se traduzcan en los aminoácidos deseados. La mutación o mutaciones del ADN pueden realizarse utilizando procedimientos indicados anteriormente y en la patente US n° 5.364.934, *supra*.

Otro medio para incrementar el número de grupos carbohidrato en el polipéptido ligando Apo-2 es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar o azúcares pueden unirse a: (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres, tales como aquellos de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres, tales como aquellos de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos, tales como aquellos de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos procedimientos se describen en la patente WO n° 87/05330, publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., páginas 259 a 306, 1981.

La eliminación de grupos carbohidrato presentes en el polipéptido ligando Apo-2 puede conseguirse químicamente o enzimáticamente. Por ejemplo, la desglucosilación química que expone el polipéptido al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o un compuesto equivalente puede resultar en la expulsión de la mayoría o de la totalidad de los azúcares, excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando el polipéptido intacto. La desglucosilación química se describe en Hakimuddin *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 259:52, 1987, y por Edge *et al.*, Anal. Biochem. 118:131, 1981. El corte enzimático de los grupos carbohidrato en los polipéptidos puede conseguirse mediante la utilización de una diversidad de endoglucosidasas y exoglucosidasas, tal como describen Thotakura *et al.*, Meth. Enzymol. 138:350, 1987.

La glucosilación en los potenciales sitios de glucosilación puede impedirse mediante la utilización del compuesto tunicamicina, tal como describen Duskin *et al.*, J. Biol. Chem. 257:3105, 1982. La tunicamicina bloquea la formación de los enlaces proteína-N-glucósido.

Otro tipo de modificación covalente del ligando Apo-2 comprende la unión del polipéptido ligando Apo-2 a uno de entre una diversidad de polímeros proteicos, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera indicada, por ejemplo, en las patentes US n° 4.640.835, n° 4.496.689, n° 4.301.144, n° 4.670.417, n° 4.791.192 o n° 4.179.337.

8. Ligando Apo-2 etiquetado con epítipo

La presente invención también proporciona polipéptidos quiméricos que comprenden ligando Apo-2 fusionado con otro polipéptido heterólogo. En una realización, el polipéptido quimérico comprende la fusión del ligando de Apo-2 con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. La etiqueta epítipo generalmente se sitúa en el extremo aminoterminal o carboxilo-terminal del ligando Apo-2. La presencia de dichas formas etiquetadas con epítipo del ligando Apo-2 pueden detectarse utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la provisión de la etiqueta epítipo permite que el ligando Apo-2 se purifique con facilidad mediante purificación de afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la etiqueta epítipo.

Son bien conocidos de la técnica diversos polipéptidos etiqueta y sus anticuerpos respectivos. Entre los ejemplos se incluyen el polipéptido etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 [Field *et al.*, Mol. Cell. Biol. 8:2159-2165, 1988]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos del mismo 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 [Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology 5:3610-3616, 1985]; y la etiqueta glucoproteína D (gD) del virus del herpes simplex y su anticuerpo [Paborsky *et al.*, Protein Engineering 3(6):547-553, 1990]. Entre otros polipéptidos etiqueta se incluyen el péptido Flag [Hopp *et al.*, BioTechnology 6:1204-1210, 1988]; el péptido epítipo KT3 [Martin *et al.*, Science 255:192-194, 1992]; un péptido epítipo α -tubulina [Skinneret *et al.*, J. Biol. Chem. 266:15163-15166, 1991]; y la etiqueta péptido de la proteína del gen 10 de T7 [Lutz-Freyermuthet *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6393-6397, 1990]. Tras la selección del polipéptido etiqueta, puede generarse un anticuerpo del mismo utilizando las técnicas dadas a conocer en la presente invención.

Generalmente, el ligando Apo-2 etiquetado con epítipo puede construirse y producirse de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente para el ligando Apo-2 nativo y variante. Las fusiones de ligando Apo-2-polipéptido etiqueta preferentemente se construyen mediante la fusión de la secuencia de ADNc codificante de la parte de ligando Apo-2 en el mismo marco de lectura de la secuencia de ADN del polipéptido etiqueta y mediante la expresión del constructo de fusión de ADN resultante en células huésped apropiadas. Habitualmente, al preparar las quimeras de ligando Apo-2-polipéptido etiqueta de la presente invención, el ácido nucleico codificante del ligando Apo-2 se fusiona en su extremo 3' del ácido nucleico codificante del extremo N-terminal del polipéptido etiqueta, sin embargo las fusiones 5' también resultan posibles. Se describen ejemplos de ligando Apo-2 etiquetado con epítipo en más detalle en el Ejemplo 2, posteriormente.

El ligando Apo-2 etiquetado con epítipo puede purificarse mediante cromatografía de afinidad utilizando el anticuerpo anti-etiqueta. La matriz a la que se une el anticuerpo de afinidad puede incluir, por ejemplo, agarosa, vidrio de poro controlado o poli(estireno-divinil)benceno). El ligando Apo-2 etiquetado con epítipo seguidamente puede eluirse de la columna de afinidad utilizando técnicas conocidas de la técnica.

B. Usos terapéuticos del ligando Apo-2

El ligando Apo-2, tal como se da a conocer en la presente especificación, puede utilizarse terapéuticamente. Por ejemplo, el ligando Apo-2 puede utilizarse para inducir la apoptosis en las células de cáncer de mamífero. Generalmente, los procedimientos para inducir la apoptosis en las células de cáncer de mamífero comprenden exponer las células a una cantidad eficaz de ligando Apo-2. Esto puede conseguirse *in vivo* o *ex vivo* de acuerdo, por ejemplo, con los procedimientos descritos posteriormente y en los Ejemplos. Se contempla que los procedimientos para inducir la apoptosis puedan utilizarse en terapias para condiciones patológicas particulares que se caracterizan por niveles reducidos de apoptosis. Entre los ejemplos de dichas condiciones patológicas se incluyen trastornos autoinmunitarios como el lupus y la nefritis glomerular mediada inmunológicamente, y el cáncer. La aplicación terapéutica del ligando Apo-2 para el tratamiento del cáncer se describe en detalle posteriormente.

En los procedimientos para tratar el cáncer, el ligando Apo-2 se administra en un mamífero que se ha diagnosticado que presenta cáncer. Evidentemente se contempla que el ligando Apo-2 pueda utilizarse en combinación con todavía otras composiciones y técnicas terapéuticas, incluyendo otros agentes inductores de apoptosis, quimioterapia, terapia de radiación y cirugía.

El ligando Apo-2 preferentemente se administra en el mamífero en un portador. Los portadores adecuados y sus formulaciones se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, 1980, Mack Publishing Co., editado por Oslo *et al.* Típicamente se utiliza una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para que la formulación sea isotónica. Entre los ejemplos de portador farmacéuticamente aceptable se incluyen solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución preferentemente se encuentra comprendido entre aproximadamente 5 y aproximadamente 8, y más preferentemente entre aproximadamente 7,4 y aproximadamente 7,8. Resultará evidente para los expertos en la materia que determinados portadores pueden resultar más preferentes dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y de la concentración de ligando Apo-2 que se administra.

El ligando Apo-2 puede administrarse en el mamífero mediante inyección (por ejemplo intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular) o mediante otros procedimientos, tales como la infusión que garantizan su administración en el flujo sanguíneo de una forma eficaz (ver, por ejemplo, la figura 15). También se encuentra contemplado que el ligando Apo-2 pueda administrarse mediante terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

Las dosis y programas eficaces para administrar el ligando Apo-2 pueden determinarse empíricamente y la realización de dichas determinaciones se encuentra comprendida dentro de los conocimientos de la técnica. En la actualidad se cree que una dosis o cantidad eficaz de ligando Apo-2 utilizado solo puede encontrarse comprendida entre aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal o más al día. El escalado interespecífico de dosis puede llevarse a cabo de una manera conocida de la técnica, por ejemplo tal como dan a conocer Mordenti *et al.*, Pharmaceut. Res. 8:1351, 1991. Los expertos en la materia entenderán que la dosis de ligando Apo-2 que debe administrarse variará dependiendo, por ejemplo, del mamífero que recibirá el ligando Apo-2, de la vía de administración y de otros fármacos o terapias administradas en el mamífero.

La otra u otras terapias administradas en el mamífero pueden incluir, aunque sin limitarse a ellas, quimioterapia y/o radioterapia, inmunoadyuvantes, citoquinas y terapias basadas en anticuerpos. Entre los ejemplos se incluyen interleuquinas (por ejemplo IL-1, IL-2, IL-3, IL-6), factor inhibidor de la leucemia, interferones, TGF-beta eritropoyetina, trombopoyetina, anticuerpo anti-VEGF y anticuerpo HER-2. También pueden utilizarse otros agentes que es conocido que inducen la apoptosis en células de mamífero, y entre estos agentes se incluyen TNF- α , TNF- β (linfotóxina- α), ligando CD30, ligando 4-1BB y ligando Apo-1.

Entre las quimioterapias contempladas por la invención se incluyen sustancias químicas o fármacos conocidos de la técnica y que se encuentran comercialmente disponibles, tales como doxorubicina, 5-fluorouracilo ("5-FU"), etopósido, camptotecina, leucovorina, citosina arabinósido ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citoxina, taxol, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina y carboplatino. Los programas de preparación y de dosificación para

dicha quimioterapia pueden utilizarse siguiendo las instrucciones del fabricante o según determine empíricamente el experto en la materia. Los programas de preparación y de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en: *Chemotherapy*, Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1992.

5 La quimioterapia preferentemente se administra en un portador farmacéuticamente aceptable, tal como los indicados anteriormente para el ligando Apo-2. La vía de administración de la quimioterapia puede ser la misma que la utilizada para el ligando Apo-2 o puede administrarse en el mamífero por una vía diferente. Las vías de administración de quimioterapia en combinación con ligando Apo-2 se describen en más detalle en los Ejemplos 9 a 12, posteriormente.

10 La terapia de radiación puede administrarse en el mamífero siguiendo los protocolos comúnmente utilizados en la técnica y que son conocidos para el experto en la materia. Entre dichas terapias se incluyen la radiación de cesio, iridio, yodo o cobalto. La terapia de radiación puede ser irradiación de cuerpo completo o puede dirigirse localmente a un sitio o tejido específico dentro o sobre el cuerpo. Típicamente la terapia de radiación se administra en pulsos a lo largo de un periodo de tiempo de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2 semanas. Sin embargo, la terapia de radiación puede administrarse a lo largo de periodos de tiempo más prolongados. Opcionalmente la terapia de radiación puede administrarse en forma de dosis única o en forma de múltiples dosis secuenciales.

15 El ligando Apo-2 y una o más otras terapias pueden administrarse en el mamífero simultáneamente o secuencialmente. Tras la administración del ligando Apo-2 y una o más otras terapias en el mamífero, puede realizarse el seguimiento del cáncer y condición fisiológica del mamífero de diversas maneras bien conocidas para el experto en la materia. Por ejemplo, puede observarse la masa tumoral físicamente, mediante biopsia o mediante técnicas de formación de imágenes de rayos X.

20 Se encuentra contemplado que pueda utilizarse el ligando Apo-2 para tratar células de cáncer *ex vivo*. Este tratamiento *ex vivo* puede resultar útil en el trasplante de médula ósea y particularmente el trasplante de médula ósea autóloga. Por ejemplo, el tratamiento de las células o tejido o tejidos que contienen células de cáncer seguidamente se tratan con ligando Apo-2 y opcionalmente con una o más otras terapias, tales como las indicadas anteriormente, puede utilizarse para inducir la apoptosis y reducir sustancialmente el número de células de cáncer antes del trasplante en un mamífero receptor.

25 Las células o tejido o tejidos que contienen células de cáncer en primer lugar se obtienen a partir de un animal donante. Las células o tejido o tejidos pueden obtenerse quirúrgicamente y preferentemente se obtienen asépticamente. En el procedimiento de tratamiento de la médula ósea para el trasplante, la médula ósea se obtiene del mamífero mediante aspiración con aguja. Las células o tejido o tejidos que contienen células de cáncer seguidamente se tratan con ligando Apo-2 y opcionalmente con una o más otras terapias, tales como las indicadas anteriormente. La médula ósea preferentemente se fracciona para obtener una fracción de células mononucleares (por ejemplo mediante centrifugación en un gradiente de Ficoll-hypaque) previamente al tratamiento con ligando Apo-2.

30 Las células o tejido o tejidos tratados seguidamente pueden infundirse o trasplantarse en un mamífero receptor. El mamífero receptor puede ser el mismo individuo donante o puede ser otro individuo mamífero heterólogo. Para un trasplante de médula ósea autóloga, el mamífero se trata previamente al trasplante con una dosis eficaz de radiación o de quimioterapia, como es conocido de la técnica y se describe, por ejemplo, en: *Autologous Bone Marrow Transplantation: Proceedings of the Third International Symposium*, Dicke *et al.*, editores, University of Texas, M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute, 1987.

C. Usos no terapéuticos del ligando Apo-2

35 El ligando Apo-2 de la invención también presenta utilidad en aplicaciones no terapéuticas. Las secuencias de ácidos nucleicos codificantes del ligando Apo-2 pueden utilizarse como herramienta diagnóstica para el tipado específico de tejido. Por ejemplo, procedimientos tales como la hibridación *in situ*, la transferencia northern y southern y el análisis de PCR pueden utilizarse para determinar si el ADN y/o el ARN codificante del ligando Apo-2 se encuentran presentes en el tipo o tipos celulares que se están evaluando. El ácido nucleico del ligando Apo-2 también puede resultar útil para la preparación del polipéptido Apo-2 mediante las técnicas recombinantes descritas en la presente invención.

40 El ligando Apo-2 aislado puede utilizarse en ensayos diagnósticos cuantitativos como control frente al que pueden prepararse muestras que contienen cantidades desconocidas de ligando Apo-2. Las preparaciones de ligando Apo-2 también resultan útiles para generar anticuerpos, como estándares en ensayos para el ligando Apo-2 (por ejemplo mediante marcaje del ligando Apo-2 para la utilización como estándar en un radioinmunoensayo, ensayo de radioreceptor o inunoensayo ligado a enzima), en técnicas de purificación por afinidad, por ejemplo en la identificación o en el aislamiento de un receptor que se une al ligando Apo-2, y en ensayos de unión de receptor de tipo competitivo al marcarse con, por ejemplo, radioyodo, enzimas o fluoróforos.

45 Los ácidos nucleicos que codifican el ligando Apo-2 también pueden resultar útiles para generar animales transgénicos o animales "knock out" que, a su vez, resultan útiles en el desarrollo y cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo un ratón o una rata) es un animal que presenta células que contienen un transgén, el cual se introdujo en el genoma de una célula a partir de la que se desarrolla un animal transgénico. En

una realización, puede utilizarse ADNc codificante del ligando Apo-2 o una secuencia apropiada del mismo, para clonar ADN genómico codificante del ligando Apo-2 de acuerdo con técnicas establecidas, y utilizarse las secuencias genómicas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan ADN codificante del ligando Apo-2. Los procedimientos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, se han convertido en convencionales de la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes US n° 4.736.866 y n° 4.870.009. Típicamente se focaliza la incorporación del transgén del ligando Apo-2 en células particulares con intensificadores específicos de tejido. Los animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén codificante del ligando Apo-2 introducido en la línea germinal del animal en un estadio embrionario pueden utilizarse para examinar el efecto de la expresión incrementada del ADN codificante del ligando Apo-2.

Alternativamente, pueden utilizarse homólogos no humanos del ligando Apo-2 para construir un animal “knock out” para el ligando Apo-2 que presenta un gen defectuoso o alterado codificante del ligando Apo-2 como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno codificante del ligando Apo-2 y ADN genómico alterado codificante del ligando Apo-2 introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, puede utilizarse ADNc codificante del ligando Apo-2 para clonar ADN genómico codificante del ligando Apo-2 de acuerdo con técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico del ligando Apo-2 puede delecionarse o sustituirse por otro gen, tal como un gen codificante de un marcador seleccionable que puede utilizarse para seguir la integración. Típicamente se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante no alterado (tanto en el extremo 5' como en el 3') [ver, por ejemplo, Thomas y Capechi, Cell 51:503, 1987, para una descripción de los vectores de recombinación homóloga]. El vector se introduce en una línea celular madre embrionaria (por ejemplo mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado homológicamente con el ADN endógeno [ver, por ejemplo, Li *et al.*, Cell 69:915, 1992]. A continuación, se inyectan las células seleccionadas en un blastocito de un animal (por ejemplo un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación [ver, por ejemplo, Bradley, en: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, editor (IRL, Oxford, 1987), páginas 113 a 152]. A continuación, puede implantarse un embrión quimérico en una hembra pseudoembarazada nodriza adecuada y llevarse el embrión a término para crear un animal “knock out”. La progenie que porta el ADN recombinado homológicamente en sus células germinales puede identificarse mediante técnicas estándares y utilizarse para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado homológicamente. Los animales knockout pueden caracterizarse, por ejemplo, por su capacidad de defenderse frente a determinadas condiciones patológicas y por el desarrollo en los mismos de condiciones patológicas debidas a la ausencia del polipéptido ligando Apo-2.

D. Preparación del anticuerpo anti-ligando Apo-2

Asimismo, la presente invención proporciona anticuerpos anti-Apo-2. Los anticuerpos contra el ligando Apo-2 pueden prepararse de la manera siguiente. Entre los anticuerpos ejemplares se incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos del ligando Apo-2 pueden comprender anticuerpos policlonales. Los procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos para el experto en la materia. Pueden cultivarse anticuerpos policlonales en un mamífero, por ejemplo mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Típicamente el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectan en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido ligando Apo-2 o una proteína de fusión del mismo. Puede resultar útil conjugar el agente inmunizante con una proteína que es conocido que es inmunogénica en el mamífero que se inmuniza. Entre los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas que pueden utilizarse se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, la hemocianina de lapa americana, la albúmina sérica, la tiroglobulina bovina y el inhibidor de tripsina de soja. También puede utilizarse un agente agregante, tal como alum, para potenciar la respuesta inmunológica del mamífero. Entre los ejemplos de adyuvantes que pueden utilizarse se incluyen adyuvante completo de Freund y 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 indebida. A continuación, puede sangrarse el mamífero y someterse a ensayo el suero para el título de anticuerpos. Si se desea, el mamífero puede recibir un refuerzo hasta que el título de anticuerpo se incrementa o alcance un nivel máximo.

2. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos del ligando Apo-2 pueden ser, alternativamente, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando procedimientos de hibridoma, tales como aquellos descritos por Köhler y Milstein, Nature 256:495, 1975. En un procedimiento de hibridoma, típicamente se inmuniza (tal como se ha descrito anteriormente) un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado con un agente inmunizante para inducir linfocitos que producen, o son capaces de producir, anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

El agente inmunizante típicamente incluye el polipéptido ligando Apo-2 o una proteína de fusión del mismo. También pueden utilizarse células que expresan ligando Apo-2 en la superficie de las mismas. Generalmente se utilizan

linfocitos sanguíneos periféricos (“PBLs”) si se desean células de origen humano, o se utilizan 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 utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986, páginas 59 a 103].
 5 Las líneas celulares inmortalizadas habitualmente son células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Habitualmente se utilizan líneas celulares de mieloma de rata o de ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen del enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de
 10 cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (“medio HAT”), sustancias que impiden el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

Las líneas celulares inmortalizadas preferentes son aquéllas que se fusionan eficientemente, soportan niveles de expresión elevados estables de anticuerpo por parte de las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y que son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferentes son las líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano también han sido descritos 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., New York, 1987, páginas 51 a 63].
 15
 20

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma seguidamente puede someterse a ensayo para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el ligando Apo-2. Preferentemente, 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), la separación celular activada por fluoresceína (FACS) o el ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA). Estas técnicas y ensayos son conocidos de la técnica y se describen adicionalmente en los Ejemplos, posteriormente. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson y Rodbard, *Anal. Biochem.* 107:220, 1980.
 25
 30

Tras identificarse las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante procedimientos estándares [Goding, *supra*]. Entre los medios de cultivo adecuados para este fin se incluyen, por ejemplo, el medio de Eagle modificado por Dulbecco y el medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* en forma de ascites en un mamífero.
 35

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo o líquido ascites mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.
 40

En una realización de la invención, entre los anticuerpos monoclonales se pueden incluir los anticuerpos 1D1, 2G6, 2E11 o 5C2, indicados en la presente invención y en los Ejemplos, posteriormente. Entre los anticuerpos monoclonales también se pueden incluir anticuerpos que presentan las mismas características biológicas que los anticuerpos monoclonales 1D1, 2G6, 2E11 o 5C2 secretados por las líneas celulares de hibridoma depositadas bajo los números de acceso de la American Type Culture Collection ATCC n° HB-12256, HTB-12257, HB-12258 o HB-12259, respectivamente. La expresión “características biológicas” se utiliza para referirse a las actividades *in vitro* y/o *in vivo* del anticuerpo monoclonal, por ejemplo la capacidad de reducir o inhibir sustancialmente la apoptosis inducida por el ligando Apo-2, o de reducir sustancialmente o bloquear la unión del ligando Apo-2 a su receptor. El anticuerpo preferentemente se une al mismo epítipo, o sustancialmente el mismo epítipo, que los anticuerpos 1D1, 2G6, 2E11 o 5C2 dados a conocer en la presente invención. Lo anterior puede determinarse mediante la ejecución de ensayos descritos en la presente invención y en los Ejemplos.
 45
 50

Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente US n° 4.816.567. El ADN codificante de los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo mediante la utilización de sondas oligonucleótidas que son capaces de unirse específicamente a genes codificantes de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención son una fuente preferente de dicho ADN. Tras su aislamiento, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transfectan en células huésped, tales como las células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra manera no producirían proteína inmunoglobulina, con el fin de obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo mediante la sustitución de la secuencia codificante de los dominios constante de cadena pesada y ligera humanas en sustitución de las secuencias murinas homólogas [patente US n° 4.816.567; Morrison *et al.*, *supra*] o mediante unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulina. Este polipéptido no inmunoglobulina puede sustituir los dominios constantes de un anticuerpo de la invención o puede sustituir los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención, creando un anticuerpo bivalente quimérico.
 55
 60
 65

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos de la técnica. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de cadena ligera de inmunoglobulina y cadena pesada modificada. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc de manera que se impide el entrecruzamiento de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos cisteína relevantes se sustituyen por otro residuo aminoácido o se delecionan, de manera que se impide el entrecruzamiento.

Los procedimientos *in vitro* también resultan adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de los anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente los fragmentos Fab, puede conseguirse utilizando técnicas rutinarias conocidas de la técnica. Por ejemplo, la digestión puede llevarse a cabo utilizando papaína. Se describen ejemplos de digestión con papaína en la patente WO n° 94/29348, publicada el 22/12/1994 y en la patente US n° 4.342.566. La digestión con papaína típicamente produce dos fragmentos ligantes de antígeno idénticos, denominados fragmentos Fab, cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que presenta dos sitios de unión a antígeno y que todavía es capaz de entrecruzarse con antígeno.

Los fragmentos Fab producidos en la digestión del anticuerpo también contienen los dominios constantes de la cadena ligera y del primer dominio constante (CH₁) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos cuantos residuos en el extremo carboxi-terminal del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente invención de Fab' en el que el residuo o residuos cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ originalmente se produjeron en forma de pares de fragmentos Fab' que presentaban cisteínas de bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo

3. Anticuerpos humanizados

Los anticuerpos de ligando Apo-2 de la invención también pueden comprender adicionalmente anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias ligantes de antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Entre los anticuerpos humanizados se incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como el ratón, la rata o el conejo, que presentan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos se sustituyen residuos del marco Fv de la inmunoglobulina humana por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni el anticuerpo receptor ni en las secuencias importadas de CDR o de marco. En general, el anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de por lo menos un dominio variable, y típicamente de dos, en el que la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR corresponden a aquéllas de una inmunoglobulina no humana, y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones FR son aquéllas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprende por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana [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].

Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos de la técnica. Generalmente, en un anticuerpo humanizado se han introducido uno o más residuos aminoácidos procedentes de una fuente no humana. Estos residuos aminoácidos no humanos con frecuencia se denominan residuos "importados", típicamente obtenidos de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente según el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, Nature 321:522-525, 1986; Reichmann *et al.*, Nature 332:323-327, 1988; Verhoeven *et al.*, Science 239:1534-1536, 1988], y el procedimiento de Queen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 86:10029-10033, 1989, utilizando modelado informático, mediante la sustitución de CDRs de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente US n° 4.816.567), en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR, y posiblemente algunos residuos de FR, se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que deben utilizarse para preparar los anticuerpos humanizados es importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el procedimiento de "ajuste óptimo", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana más similar a la del roedor se acepta como el marco humano (FR) para el anticuerpo humanizado [Sims *et al.*, J. Immunol. 151:2296, 1993; Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901, 1987]. Otro procedimiento utiliza un marco particular derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. Puede utilizarse el mismo marco para varios anticuerpos humanizados diferentes [Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285, 1992; Presta *et al.*, J. Immunol. 151:2623, 1993].

También es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de elevada afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este fin, según un procedimiento preferente, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y de diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas se encuentran disponibles comúnmente y resultarán familiares para el experto en la materia. Se encuentran disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias candidatas de inmunoglobulina seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite analizar el papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir el análisis de los residuos que influyen sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse de la secuencia de consenso y de la secuencia importada de manera que se consigue la característica deseada del anticuerpo, tal como afinidad incrementada para el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de CDR se encuentran directa y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión de antígeno [ver la patente WO n° 94/04679, publicada el 3 de marzo de 1994].

Pueden utilizarse animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulinas. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada (J_H) del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de la línea germinal resulta en la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la serie génica de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal resulta en la producción de anticuerpos humanos tras el reto con antígeno [ver, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555, 1993; Jakobovits *et al.*, Nature 362:255-258, 1993; Bruggemann *et al.*, Year in Immunol. 7:33, 1993]. También pueden producirse anticuerpos humanos en bibliotecas de expresión fágica [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol. 227:381, 1991; Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:58, 1991]. Las técnicas de Cole *et al.* y Boerne *et al.* también se encuentran disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies y Cancer Therapy, Alan R. Liss, página 77, 1985, y Boemer *et al.*, J. Immunol. 147(1):86-95, 1991).

4. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que presentan especificidades de unión para por lo menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para el ligando Apo-2, la otra es para cualquier otro antígeno, y preferentemente para una proteína o receptor o subunidad de receptor de superficie celular.

Los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos de la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de los anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas pesadas presentan diferentes especificidades [Milstein y Cuello, Nature 305:537-539, 1983]. Debido a la selección aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de entre los que únicamente uno presenta la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta habitualmente se consigue mediante etapas de cromatografía de afinidad. Se dan a conocer procedimientos similares en la patente WO n° 93/08829, publicada el 13 de mayo de 1993, y en Trauneker *et al.*, EMBO J. 10:3655-3659, 1991.

De acuerdo con un enfoque diferente y más preferente se fusionan dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferentemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones de bisagra CH2 y CH3. Resulta preferente que la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera se encuentre presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN codificantes de las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto permite mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan rendimientos óptimos. Sin embargo, resulta posible insertar las secuencias codificantes para dos o la totalidad de las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión en el caso de que la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales resulte en rendimientos elevados o en el caso de que las proporciones no resulten particularmente importantes. En una realización preferente de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha encontrado que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, debido a que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en únicamente una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera fácil de separación. Este enfoque se da a conocer en la patente WO n° 94/04690, publicada el 3 de marzo de 1994. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos ver, por ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology 121:210, 1986.

5. Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados también se encuentran comprendidos dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Se ha propuesto que dichos anticuerpos, por ejemplo, dirigen las células del sistema inmunológico a células no deseadas [patente US n° 4.676.980] y para el tratamiento de la infección por VIH [patente WO n° 91/00360; patente WO n° 92/200373, patente EP n° 03089]. Se encuentra contemplado que los anticuerpos puedan prepararse *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en química sintética de proteínas, incluyendo aquellos que implican agentes entrecruzantes. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuros o mediante la formación de un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este fin se incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y aquellos dados a conocer, por ejemplo, en la patente US n° 4.676.980.

E. Usos de los anticuerpos de ligando Apo-2

Pueden utilizarse los anticuerpos de ligando Apo-2 en ensayos diagnósticos para el ligando Apo-2, por ejemplo mediante la detección de su expresión en células específicas, tejidos o suero. Pueden utilizarse diversas técnicas de ensayo diagnóstico conocidas de la técnica, tales como los ensayos de unión competitiva, los ensayos de sándwich directo o indirecto y los ensayos de inmunoprecipitación llevados a cabo en fases heterogéneas u homogéneas [Zolla, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., 1987, páginas 147 a 158]. Los anticuerpos utilizados en los ensayos diagnósticos pueden marcarse con un grupo detectable. El grupo detectable debe ser capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el grupo detectable puede ser un isótopo radioactivo, tal como ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S o ¹²⁵I, un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina, o un enzima, tal como la fosfatasa alcalina, la beta-galactosidasa o la peroxidasa de rábano picante. Puede utilizarse cualquier procedimiento conocido de la técnica para conjugar el anticuerpo con el grupo detectable, incluyendo aquellos procedimientos descritos por Hunter *et al.*, Nature 144:945, 1962; David *et al.*, Biochemistry 13:1014, 1974; Pain *et al.*, J. Immunol. Meth. 40:219, 1981; y Nygren, J. Histochem. y Cytochem. 30:407, 1982.

Los anticuerpos de ligando Apo-2 también resultan útiles para la purificación por afinidad del ligando Apo-2 a partir de un cultivo celular recombinante o de fuentes naturales. En este procedimiento, los anticuerpos contra el ligando Apo-2 se inmovilizan sobre un soporte adecuado, tal como resina Sephadex o papel de filtro, utilizando procedimientos bien conocidos de la técnica. A continuación, el anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el ligando Apo-2 que debe purificarse, y después el soporte se lava con un solvente adecuado que eliminará sustancialmente la totalidad de la materia en la muestra excepto el ligando Apo-2, que se encuentra unido al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro solvente adecuado que liberará el ligando Apo-2 del anticuerpo. Los anticuerpos de ligando Apo-2 también resultan útiles para la purificación por afinidad de un receptor solubilizado de Apo-2 o para la clonación por expresión de un receptor de Apo-2.

Los anticuerpos dados a conocer en la presente invención también pueden utilizarse como terapéuticos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-ligando Apo-2 que bloquean la actividad de ligando Apo-2 (por ejemplo la apoptosis inducida por ligando Apo-2) para tratar las condiciones patológicas o enfermedades asociadas con la apoptosis incrementada [ver Thompson, *supra*].

F. Kits que contienen ligando Apo-2 o anticuerpos de ligando Apo-2

En una realización adicional de la invención, se proporcionan productos de fabricación y kits que contienen ligando Apo-2 o anticuerpos de ligando Apo-2 que pueden utilizarse, por ejemplo, para las aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas indicadas anteriormente. El producto de fabricación comprende un recipiente con un marcaje. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales y probetas. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que incluye un agente activo que resulta eficaz para aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas, tales como las indicadas anteriormente. El agente activo en la composición es ligando Apo-2 o un anticuerpo de ligando Apo-2. La etiqueta en el recipiente indica que la composición se utiliza para una terapia específica o aplicación no terapéutica, y también puede indicar instrucciones para la utilización *in vivo* o *in vitro*, tales como aquéllas indicadas anteriormente.

El kit de la invención típicamente comprende el recipiente indicado anteriormente y uno o más otros recipientes que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e impresos insertados en el paquete con instrucciones de utilización.

Los ejemplos siguientes se ofrecen con fines ilustrativos únicamente, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención en modo alguno.

ES 2 316 182 T3

Ejemplos

La totalidad de los enzimas de restricción a los que se hace referencia en los Ejemplos se adquirieron de New England Biolabs y se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. La totalidad de los demás reactivos disponibles comercialmente a los que se hace referencia en los ejemplos se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante a menos que se indique lo contrario. La fuente de aquellas células identificadas en los ejemplos siguientes, y en toda la especificación, con los números de acceso de la ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia.

Ejemplo 1

Aislamiento de clones de ADNc codificantes de ligando Apo-2 humano

Para aislar un ADNc de longitud completa del ligando Apo-2, se cribó una biblioteca de bacteriófago lambda gt1 de ADNc placentario humano (aproximadamente 1×10^6 clones) (HL10756 disponible comercialmente de Clontech) mediante hibridación con sondas oligonucleótidas sintéticas basadas en una secuencia EST (GenBank locus HHEA47M), que mostraba algún grado de homología con el ligando Fas/Apo-1 humano. La secuencia EST de HHEA7M es de 390 pb y al traducirse en su marco +3, muestra 16 identidades con una región de 34 aminoácidos del ligando Apo-1 humano. La secuencia de HHEA47M es la siguiente:

```
GGGACCCCAATGACGAAGAGAGTATGAAACAGCCCCTGCTGGCAAGTCAAGTGGCAACTCCGTC
AGCTCGTTAGAAAGATGATTTTGAGAACCTCTGAGGAAACCAATTCTACAGTTCAAGAAAAGCA
ACAAAATATTTCTCCCTAGTGAGAGAAAGAGGTCTCAGAGAGTACAGCTCACATAACTGG
GACCAGAGGAAGAAGCAACACATTGTCTTCTCCAACTCCAAGAATGAAAAGGCTCTGGGCCG
CAAAATAAACTCCTGGGAATCATCAAGGAGTGGGCATTTCCTGAGCAACTGCCTTGAGG
AATGGTGAAGTGGTCAATCCATGAAAAGGGTTTTACTACATCTATTCCCAAACATACTTTCGAT
TTCAGGAGG
SEQ ID NO:3
```

En el cribado se utilizó una sonda oligonucleótida de 60 pb con la secuencia siguiente:

```
TGACGAAGAGAGTATGAAACAGCCCCTGCTGGCAAGTCAAGTGGCAACTCCGTCAGCTCGT
SEQ ID NO:4
```

La hibridación se llevó a cabo durante la noche a temperatura ambiente en tampón que contenía formamida al 20%, 5x SSC, sulfato de dextrano al 10%, NaPiPO₄ al 0,1%, NaPO₄ 0,05 M, 0,05 mg de ADN de esperma de salmón y dodecilsulfato sódico al 0,1%, seguido de varios lavados a 42°C en 5x SSC, y después en 2x SSC. Se identificaron doce clones positivos en la biblioteca de ADNc y los clones positivos se cribaron nuevamente mediante hibridación con una segunda sonda oligonucleótida de 60 pb (no solapante con la primera sonda) que presentaba la secuencia siguiente:

```
GGTGAAGTGGTCAATCCATGAAAAGGGTTTTACTACATCTATTCCCAAACATACTTTCGA
SEQ ID NO:5
```

La hibridación se llevó a cabo tal como se ha descrito anteriormente.

Se identificaron cuatro clones positivos resultantes y se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un cebador basado en la secuencia de vector 5' flanqueante y añadiendo un sitio de restricción ClaI externo y un cebador basado en la secuencia de vector 3' flanqueante y añadiendo un sitio de restricción HindIII externo. Los productos de PCR se purificaron en gel y se subclonaron en pGEM-5 (disponible comercialmente de Promega) mediante ligación T-A. A continuación, se sometieron a secuenciación dideoxi de ADN tres clones independientes de PCRs diferentes. El análisis de secuencias de ADN de estos clones demostró que eran esencialmente idénticos, con alguna variación de longitud en sus regiones 5'.

La secuencia de nucleótidos de la región codificante del ligando Apo-2 se muestra en la figura 1A. La secuenciación de la región 3' terminal cadena abajo de uno de los clones reveló un sitio de poliadenilación característico (datos no mostrados). El ADNc contenía un marco de lectura abierta largo con un sitio de inicio asignado al codón ATG en las posiciones nucleótidas 91 a 93. La secuencia circundante en este sitio presenta un acuerdo razonable con la secuencia de consenso propuesta para los sitios de inicio [Kozak, J. Cell. Biol. 115:887-903, 1991]. El marco de lectura abierto acaba en el codón de terminación TAA en las posiciones nucleótidas 934 a 936.

ES 2 316 182 T3

La secuencia de aminoácidos madura predicha del ligando Apo-2 humano contiene 281 aminoácidos y presenta un peso molecular calculado de aproximadamente 32,5 kDa y un punto isoelectrico de aproximadamente 7,63. No existe ninguna secuencia de señal aparente en el extremo N-terminal, aunque el análisis de hidropatía (datos no mostrados) indicó la presencia de una región hidrofóbica entre los residuos 15 y 40. La ausencia de una secuencia de señal y la presencia de una región hidrofóbica interna sugiere que el ligando Apo-2 es una proteína transmembranal de tipo II. Las regiones citoplasmática, transmembranal y extracelular putativas presenta longitudes de 14, 26 y 241 aminoácidos, respectivamente. La región transmembranal putativa está subrayada en la figura 1f. Un sitio de glucosilación N-ligada potencial se encuentra situado en el residuo 109 en el dominio extracelular putativo.

Una alineación (utilizando el programa informático Align™) de la secuencia de aminoácidos de la región C-terminal del ligando Apo-2 con otros miembros conocidos de la familia de citoquinas TNF mostró que, dentro de la región C-terminal, el ligando Apo-2 mostraba una identidad de 23,2% con el ligando Apo-1 (figura 1B). El análisis de alineación mostró un grado menor de identidad con otros miembros de la familia TNF: CD40L (20,8%), LT- α (20,2%), LT- β (19,6%), TNF- α (19,0%), CD30L y CD27L (15,5%), OX-40L (14,3%) y 4-1BBL (13,7%). En la familia de citoquinas TNF, los residuos dentro de las regiones que se predice que formarán cadenas β , basándose en las estructuras cristalinas de TNF- α y LT- α [Eck *et al.*, J. Bio. Chem. 264:17595-17605, 1989; Eck *et al.*, J. Bio. Chem. 267:219-2122, 1992], tienden a encontrarse más altamente conservadas con otros miembros de la familia TNF que los residuos en los bucles de conexión predichos. Además, el bucle que conecta las cadenas β putativas, B y B', es marcadamente más largo en el ligando Apo-2.

Ejemplo 2

Expresión de ligando Apo-2 humano

A. Expresión de constructo de fusión de ADNc de longitud completa en células 293

Se constó un ADNc de longitud completa de ligando Apo-2 fusionado con una etiqueta epítipo myc de la manera siguiente. La inserción de ADNc de ligando Apo-2 se extrajo el plásmido pGEM-T parental de ligando Apo-2 (descrito en el Ejemplo 1) mediante digestión con ClaI e HindIII, y se insertó en un plásmido de expresión pRK5 de mamífero [Schall *et al.*, Cell 61:361-370, 1990; Suva *et al.*, Science 237:893-896, 1987] que se digirió con los mismos enzimas de restricción. A continuación, se insertó una secuencia codificante de una etiqueta epítipo myc de 13 aminoácidos Ser Met Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn SEC ID n° 6 [Evan *et al.*, Mol. Cell. Biol. 5:3610-3616, 1985] entre el codón 281 y el codón de parada (codón 282) en el extremo 3' de la secuencia codificante del ligando Apo-2 mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótido [Zoller *et al.*, Nucleic Acids Res. 10:6487-6496, 1982], proporcionando el plásmido pRK5 ligando Apo-2-myc.

El plásmido pRK5 ligando Apo-2-myc se cotransfectó en células 293 humanas (ATCC n° CRL 1573) con un plásmido pRK5 que portaba un gen de resistencia a la neomicina, mediante precipitación con fosfato de calcio. Se seleccionaron los clones estables que expresaban ligando Apo-2-myc por su capacidad de crecer en 50% medio F12 de Ham/50% DMEM (GIBCO) en presencia del antibiótico, G418 (0,5 mg/ml) (GIBCO).

Para investigar la topología del ligando Apo-2, se analizó un clon resistente a G418 mediante FACS tras tinción con el clon 9E10 de anticuerpo monoclonal anti-myc (mAb) [Evan *et al.*, *supra*; disponible comercialmente de Oncogene Science] y después con un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con ficoeritrina (PE) (disponible comercialmente de Jackson ImmunoResearch). El análisis FACS reveló un desplazamiento específico de tinción positiva en el clon transfectado con ligando Apo-2-myc, en comparación con las células falsamente transfectadas (fig. 1C), demostrando que el ligando Apo-2 se expresa en la superficie celular, con su extremo carboxi-terminal expuesto. Por consiguiente, se cree que el ligando Apo-2 es una proteína transmembranal de tipo II.

B. Expresión de constructos de fusión ECD en células 293 y en baculovirus

Se prepararon dos constructos de fusión solubles de dominio extracelular ("ECD") de ligando Apo-2, en los que otra secuencia se fusionó cadena arriba de la región C-terminal del ligando Apo-2.

En un constructo, 27 aminoácidos del péptido de señal glucoproteína D ("gD") del virus herpes [descrito en Lasky *et al.*, DNA 3:23-29, 1984; Pennica *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 92:1142-1146, 1995; Paborsky *et al.*, Protein Engineering 3:547-553, 1990] y la secuencia de etiqueta epítipo Lys Tyr AL Leu Ala Asp Ala Ser Leu Lys Met ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Ly Asp Leu Pro Val Leu Asp Gln SEC ID n° 7, se fusionaron cadena arriba de los codones 114 a 281 del ligando Apo-2 dentro de un plásmido de expresión de mamífero pRK5. Brevemente, se amplificó la secuencia de gD a partir de un plásmido parental, pCHAD (Genentech, preparado sustancialmente tal como se describe en Lasky *et al.*, Science 233:209-212, 1986) en una PCR en la que el cebador 3' era complementario a la región 3' de la secuencia de gD, así como a los codones 114 a 121 del ligando Apo-2. El producto se utilizó como cebador 5' junto con un cebador 3' complementario al extremo 3' de la región codificante del ligando Apo-2 en una PCR posterior en la que se utilizó el plásmido pRK5 del ligando Apo-2 como molde. El producto, codificante de la fusión de gD- ECD de ligando Apo-2, seguidamente se subclonó en un plásmido pRK5, proporcionando el plásmido pRK5 gD-ECD del ligando Apo-2.

ES 2 316 182 T3

Se transfectaron transitoriamente células 293 embrionarias de riñón humano (ATCC n° CRL 1573) con el plásmido pRK gD-ECD de ligando Apo-2 o con pRK5, mediante precipitación con fosfato de calcio. Se evaluó la expresión de la proteína soluble gD-ligando Apo-2 mediante marcaje metabólico de las células transfectadas con ³⁵S-Cys y ³⁵S-Met. Se recogieron los sobrenadantes celulares tras 24 horas y se clarificaron mediante centrifugación. Para la inmunoprecipitación, se incubaron 5 ml de sobrenadante con anticuerpo monoclonal 5B6 anti-gD (Genentech) a una concentración de 1 µg/ml durante la noche a 4°C. A continuación, se añadieron 25 µg de pansorbina (Sigma) durante una hora adicional a 4°C. Se centrifugaron los tubos y se lavaron los pellets en PBS y se hirvieron durante 5 minutos en tampón de muestras SDS. Las muestras hervidas se centrifugaron nuevamente y los sobrenadantes se sometieron a SDS-PAGE y autorradiografía.

La inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-gD reveló tres bandas predominantes de proteínas en los sobrenadantes de las células transfectadas con el plásmido gD-ligando Apo-2 (fig. 1E). Estas bandas migraron con masas moleculares relativas (*Mr*) de 23, 48 y 74 kDa. El peso molecular calculado del polipéptido gD-Apo-2 maduro es de aproximadamente 22,5 ka. Por lo tanto, las bandas observadas podrían representar formas monoméricas (23 kDa), diméricas (48 kDa) y triméricas (74 kDa) de la proteína de fusión, e indican que el ligando Apo-2 puede expresarse en células de mamífero en forma de una proteína de fusión de gD soluble secretada.

En un segundo constructo, una secuencia Met Gly His₁₀ (derivada del plásmido pET19B, Novagen), seguida de un sitio de corte de enterocinas de 12 aminoácidos: Met Gly His His His His His His His His Ser Ser Gly His Ile Asp Asp Asp Lys His Met SEC ID n° 8, se fusionó cadena arriba de los codones 114 a 281 del ligando Apo-2 dentro de un plásmido de expresión baculovirus (pVL1392, Pharmingen). Brevemente, la región de codones 114 a 281 del ligando Apo-2 se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pRK5 de ligando Apo-2 (descrito en el Ejemplo 1) con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3' que incorporan los sitios de restricción flanqueantes NdeI y BamHI, respectivamente. El producto se subclonó en GEM-T (Promega) mediante ligación T-A y se confirmó la secuencia del ADN. A continuación, se extrajo la inserción mediante digestión con NdeI y BamHI, y se subclonó en un vector de expresión baculovirus modificado pVL1392 (disponible comercialmente de Pharmingen) que contenía una etiqueta aminoterminal Met Gly His₁₀ y un sitio de corte de enterocinas.

Se generó un baculovirus recombinante mediante la cotransfección del plásmido His₁₀-ECD de Ap-2 y ADN vírico BaculoGold™ (Pharmingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") utilizando lipofectina (disponible comercialmente de GIBCO-BRL). Tras 4 a 5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se recolectaron y se utilizaron para amplificaciones posteriores. La infección vírica y la expresión de proteínas se llevó a cabo tal como describen O'Reilly *et al.*, Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press, 1994. Las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad de Ni²⁺-quelato, tal como se describe en el Ejemplo 3, a continuación.

Ejemplo 3

Purificación e ligando Apo-2 humano recombinante

Se prepararon extractos a partir de células Sf9 infectadas por virus recombinante y falsamente infectadas (ver el Ejemplo 2, sección B, anteriormente) tal como describen Rupert *et al.*, Nature 362:175-179, 1993. Brevemente, se lavaron células Sf9, se resuspendieron en tampón de sonicación (25 ml de Hepes, pH 7,9; MgCl₂ 12,5 mM; EDTA 0,1 mM; glicerol al 10%; NP-40 al 0,1%; KCl 0,4 M) y se sonicaron dos veces durante 20 segundos sobre hielo. Los sonicados se clarificaron mediante centrifugación y el sobrenadante se diluyó 50 veces en tampón de carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm. Se preparó una columna de Ni²⁺-NTA agarosa (disponible comercialmente de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lavó con 25 ml de agua y se equilibró con 25 ml de tampón de carga. El extracto celular filtrado se cargó en la columna a un caudal de 0,5 ml por minuto. La columna se lavó hasta la línea base de A₂₈₀ con tampón de carga, momento en el que se inició la recolección de fracciones. A continuación, la columna se lavó con un tampón de lavado secundario (fosfato 50 mM; NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluyó proteína unida no específicamente. Tras alcanzar nuevamente la línea base A₂₈₀, la columna se reveló con un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol en el tampón de lavado secundario. Se recogieron fracciones de un ml y se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción de plata o transferencia western con Ni²⁺-NTA conjugado con fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contenían la proteína eluída His₁₀-ligando Apo-2 se agruparon y se dializaron frente al tampón de carga.

Se repitió un procedimiento idéntico con células Sf9 falsamente transfectadas como material de partida, y se agruparon, dializaron y utilizaron las mismas fracciones como control para Apo-2 humano purificado.

El análisis SDS-PAGE de la proteína purificada reveló una banda predominante de *Mr* 24 kDa, correspondiente al peso molecular calculado de 22,4 kDa para el monómero His₁₀-ligando Apo-2 (fig. 1D, carril 3); el microanálisis de la secuencia proteica (datos no mostrados) confirmó que la banda de 24 kDa representa el polipéptido His₁₀-ligando Apo-2. También se observaron bandas menores n 48 kDa y 66 kDa, y probablemente representan homodímeros y homotrímeros solubles del ligando Apo-2. El entrecruzamiento químico de His₁₀-ligando Apo-2 purificado mediante incubación con sulfo-NHS (5 mM) (Pierce Chemical) y ECD (Pierce Chemical) a 25 mM y a 50 mM (fig. 1D, carriles 1 y 2, respectivamente) desplazó la proteína hacia la banda de 66 kDa principalmente. Estos resultados sugieren que la forma predominante del ligando Apo-2 en solución es homotrimérica y que estos trimeros se disocian en dímeros y monómeros en presencia de SDS.

Ejemplo 4

Actividad apoptótica del ligando Apo-2 sobre las líneas celulares linfoides humanas

5 Se examinó la actividad apoptótica del ligando Apo-2 soluble purificado (descrito en el Ejemplo 3) utilizando varias líneas celulares linfoides humanas. En un primer estudio, se examinó el efecto del ligando Apo-2 sobre las células 9D (Genentech, Inc.), derivado de células B de sangre periférica humanas transformadas con virus de Epstein-Barr (EBV). Las células 9D (5×10^4 células/pocillo en medio RPMI 1640 más suero de feto bovino al 10%) se incubaron durante 24 horas con un medio de control, ligando Apo-2 ($3 \mu\text{g/ml}$, preparado tal como se ha descrito en el

10 Ejemplo 3, anteriormente) o anticuerpo monoclonal anti-Apo-1, CH11 ($1 \mu\text{g/ml}$) [descrito por Yonehara *et al.*, J. Exp. Med. 169:1747-1756, 1989; disponible comercialmente de Medical and Biological Laboratories Co.]. El anticuerpo anti-Apo-1 CH11 es un anticuerpo agonista que imita la actividad de Fas/ligando Apo-1.

15 Tras la incubación, las células se recogieron sobre portaobjetos de vidrio Cytospin y se fotografiaron bajo un microscopio óptico invertido. Tanto el ligando Apo-2 como el anticuerpo monoclonal anti-Apo-1 indujeron un efecto apoptótico similar, caracterizado por la condensación citoplasmática y la reducción del número de células (ver la fig. 2A).

20 Los efectos del ligando Apo-2 sobre las células 9D, así como sobre las células Raji (línea celular de linfoma B de Burkitt, ATCC n° CCL 86) y células Jurkat (línea celular de leucemia humana de las células T, ATCC n° TIB 152) se analizaron adicionalmente mediante FACS. El análisis FACS se llevó a cabo utilizando criterios establecidos para la muerte celular apoptótica, es decir la relación entre la tinción fluorescente de las células con dos marcadores: (a) pigmento de yoduro de propidio ("PI"), que tiñe las células apoptóticas pero no las células vivas, y (b) un derivado fluorescente de la proteína, anexina V, que se une a la fosfatidilserina expuesta que se encuentra sobre la superficie de las células apoptóticas pero no sobre las células vivas [Darzynkiewicz *et al.*, Methods in Cell Biol. 41:15-38, 1994; Fadok *et al.*, J. Immunol. 148:2207-2214, 1992; Koopman *et al.*, Blood 84:1415-1420, 1994].

30 Se incubaron las células 9D (fig. 2B), las células Raji (fig. 2C) y las células Jurkat (fig. 2D) (1×10^6 células/pocillo) durante 24 horas con un medio de control (paneles izquierdos), con ligando Apo-2 ($3 \mu\text{g/ml}$, preparado tal como se ha descrito en el Ejemplo 3) (paneles centrales) o con anticuerpo anti-ligando Apo-2, CH11 ($1 \mu\text{g/ml}$) (paneles derechos). A continuación, las células se lavaron, se tiñeron con PI y con anexina V conjugada con tiocianato de fluoresceína (FITC) (adquirida de Brand Applications) y se analizaron mediante citometría de flujo. Las células negativas para tanto PI como anexina V (cuadrante 3) representan las células vivas; las células no teñidas con PI y teñidas con anexina V (cuadrante 4) representan las células apoptóticas tempranas; las células teñidas con PI y con anexina V (cuadrante 2) representan principalmente las células en etapas tardías de la apoptosis.

35 Las células 9D tratadas con ligando Apo-2 mostraron un nivel de unión incrementado de la anexina V extracelular, así como un marcado incremento de la incorporación de PI (fig. 2), indicando que el ligando Apo-2 inducía la apoptosis en las células. Se obtuvieron resultados comparables con el anticuerpo anti-Apo-1, CH11 (Fig. 2B). El ligando Apo-2 indujo una respuesta similar en las células Raji y Jurkat, al igual que el anticuerpo anti-Apo-1 (ver las figuras 2C y 2D). La inducción de la apoptosis (medida como % de células apoptóticas) en estas líneas celulares por el ligando Apo-2, en comparación con el control y con el anticuerpo anti-Apo-1, también se muestra en la Tabla 1, posteriormente.

40 También se analizó la activación de la fragmentación del ADN internucleosómico por el ligando Apo-2. Se incubaron células Jurkat (carriles izquierdo) y células 9D (carriles derechos) (2×10^6 células/pocillo) durante 6 horas con un medio de control o con ligando Apo-2 ($3 \mu\text{g/ml}$, preparado tal como se describe en el Ejemplo 3). A continuación, se extrajo el ADN de las células y se marcó con ^{32}P -ddATP utilizando transferasa terminal. Las muestras de ADN marcado se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% y después se analizaron mediante autorradiografía [Moore *et al.*, Cytotechnology 17:1-11, 1995]. El ligando Apo-2 indujo la fragmentación del ADN internucleosómico tanto en células Jurkat como en células 9D (fig. 2E). Dicha fragmentación del ADN es característica de la apoptosis [Cohen, Advances in Immunol. 50:55-85, 1991].

45 Para examinar el curso temporal de la actividad apoptótica del ligando Apo-2, se incubaron células 9D en placas de microtitulación (5×10^4 células/pocillo) con un medio de control o con ligando Apo-2 ($3 \mu\text{g/ml}$, preparado tal como se ha descrito en el Ejemplo 3) durante un periodo de tiempo comprendido entre 0 horas y 50 horas. Tras la incubación, se determinó el número de células muertas y el número de células vivas mediante examen microscópico utilizando un hemocitómetro.

50 Tal como se muestra en la fig. 3A, se indujeron niveles máximos de muerte celular en las células 9D dentro de las 24 horas.

60 Para determinar la dependencia de la dosis de la muerte celular inducida por el ligando Apo-2, se incubaron células 9D (5×10^4 células/pocillo) durante 24 horas con diluciones seriadas de un medio de control o con ligando Apo-2 (preparado tal como se ha descrito en el Ejemplo 3). Se determinó el número de células muertas y de células vivas tras la incubación tal como se ha descrito anteriormente. Los resultados se ilustran en la fig. 3B. Se determinó la apoptosis específica restando el % de apoptosis en el control del % de apoptosis en las células tratadas con ligando Apo-2. Se alcanzó la mitad de la activación máxima de apoptosis a una concentración de aproximadamente $0,1 \mu\text{g/ml}$ (aproximadamente 1 nM), y la inducción máxima se produjo a una concentración de entre aproximadamente 1 y aproximadamente $3 \mu\text{g/ml}$ (aproximadamente 10 a 30 nM).

ES 2 316 182 T3

Ejemplo 5

Actividad apoptótica del ligando Apo-2 sobre las líneas celulares de tumor no linfoide humano

5 Se examinó el efecto del ligando Apo-2 sobre líneas celulares de tumor no linfoide humano utilizando las líneas celulares siguientes:

10 HeLa (derivada del carcinoma cervical humano, ATCC n° CCL 22); ME-180 (derivada del carcinoma cervical humano, ATCC n° HTB 33); MCF7 (derivada del carcinoma mamario humano, ATCC n° HTB 22); U-937 (derivada del linfoma histiocítico humano, ATCC n° CRL 1593); A549 (derivada del carcinoma pulmonar humano, ATCC n° CCL 185) y 293 (derivada de una línea de células renales embrionarias humanas transformadas por adenovirus, ATCC n° CCL 1573).

15 En el ensayo, se incubaron 1×10^6 células de cada línea celular durante 24 horas con un medio de control, con ligando Apo-2 ($3 \mu\text{g/ml}$), preparado tal como se ha descrito en el Ejemplo 3), o con anticuerpo monoclonal anti-Apo-1, CH11 ($1 \mu\text{g/ml}$). Tras la incubación, se midió la apoptosis mediante análisis de FACS, tal como se ha descrito en el Ejemplo 4. Se muestran los resultados a continuación, en la Tabla 1.

20 TABLA 1

Línea celular	% de células apoptóticas		
	Control	Apo-2L	Ab anti-Apo-1
<u>Linfoide</u>			
9D	22,5	92,4	90,8
Raji	35,9	73,4	83,7
Jurkat	5,9	77,0	18,1
<u>No linfoide</u>			
HeLa	5,3	18,6	17,9
MCF7	39,9	47,3	44,0
U-937	3,6	62,3	16,6
A549	16,5	74,6	25,1
ME-180	8,6	80,7	9,9
293	12,3	12,2	16,7

45 Las células HeLa y MCF7 eran igualmente sensibles a la inducción de la apoptosis por el ligando Apo-2 en comparación con el anticuerpo anti-Apo-1 CH11. En contraste, las células U-937 y A549 eran marcadamente más sensibles a la inducción de la apoptosis por el ligando Apo-2. Las células ME-180 eran bastante sensibles al ligando Apo-2, aunque relativamente resistentes al anticuerpo anti-apo-1. Las células 293 eran resistentes al ligando Apo-2 y respondían débilmente al anticuerpo anti-Apo-1.

55 De esta manera, el ligando Apo-2 era capaz de inducir apoptosis en células de origen no linfoide, así como en células de origen linfoide (ver el Ejemplo 4). Además, aunque no se entiende por completo y sin respaldo teórico, los Solicitantes en la actualidad creen que el ligando Apo-2 actúa mediante un receptor que es diferente de Apo-1. Esta creencia se apoya en los datos de la presente invención que demuestran que las líneas celulares indicadas anteriormente muestran patrones diferenciales de sensibilidad al ligando Apo-2 y al anticuerpo anti-Apo-1 (ver también el Ejemplo 7, posteriormente).

60 Ejemplo 6

Efecto del ligando Apo-2 sobre monocitos de sangre periférica humana

65 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica ("PBMC") de sangre de donantes humanos mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll utilizando medio de separación de linfocitos (LSM[®], Organon Teknika). Se preparó una población aislada de células T a partir de las PBMC mediante eliminación de las células B mediante unión de las Ig superficiales a una columna anti-Ig y eliminación de los monocitos mediante unión del receptor Fc a

ES 2 316 182 T3

una columna de Ig (R & D Systems). Se preparó una población aislada de células B a partir de las PBMC mediante eliminación mediada por el complemento de las células T que se hicieron reaccionar con el anticuerpo anti-CD3 producido por el mieloma OKT3 (ATCC n° CRL 8001) y de monocitos que se habían hecho reaccionar con un anticuerpo específico de monocitos producido por el hibridoma 4F2C13 (ATCC n° HB 22). Se consiguió la eliminación adicional de los monocitos mediante la adherencia a plástico.

Las células sanguíneas periféricas B o T recién aisladas (1×10^6 células/pocillo) se cultivaron durante 3 días en presencia de un medio de control o de ligando Apo-2 ($3 \mu\text{g/ml}$, preparado tal como se describe en el Ejemplo 3). Para la activación, se trataron las células B simultáneamente con lipopolisacárido ("LPS", $1 \mu\text{g/ml}$) y las células T se trataron con acetato de miristato de forbol ("PMA", 10 ng/ml) más yonomicina ($1 \mu\text{g/ml}$) (Sigma). Para el pretratamiento de interleuquina 2 ("IL-2"), se cultivaron las células T durante 3 a 5 días en presencia de IL-2 (50 U/ml) (Genzyme) previamente a la exposición al ligando Apo-2. La apoptosis se determinó utilizando análisis de FACS, esencialmente tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 4. Sin embargo, las células B encontraron una ventana con los anticuerpos anti-CD19/CD20 (Jackson Immunoreserach) y las células T con los anticuerpos anti-CD4/CD8 (Jackson Immunoresearch). Los resultados se muestran en la Tabla 2, posteriormente, representando medias \pm SE de experimentos independientes [linfocitos B-9 experimentos; linfocitos T-8 experimentos; linfocitos T más IL-2-5 experimentos], en los que se analizaron 50.000 células por punto de datos. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la prueba t de Student. En la Tabla 2, $a=p<0,05$ y $b=p<0,02$ respecto al control respectivo.

TABLA 2

		% de células apoptóticas	
	Tratamiento	Control	Apo-2L
<u>Linfocitos B</u>	Ninguno	40,1 \pm 4,1	53,2 \pm 3,3 ^a
	LPS	44,8 \pm 2,8	55,9 \pm 3,2 ^a
<u>Linfocitos T</u>	Ninguno	6,3 \pm 0,6	8,2 \pm 0,8
	PMA/yonomicina	40,3 \pm 4,4	54,2 \pm 3,3 ^a
	pretratamiento de IL-2	13,7 \pm 1,2	34,5 \pm 4,8 ^b

El ligando Apo-2 indujo apoptosis significativa en células B no estimuladas, en células B activadas por LPS y en células T activadas con PMA y yonomicina. Previamente se ha informado de que las células T periféricas pueden predisponerse a la apoptosis mediante el cultivo de las células en presencia de IL-2 [Lenardo *et al.*, Nature 353:858-861, 1991]. El presente estudio ha demostrado que el pretratamiento de IL-2 sensibilizó a las células T periféricas frente a la muerte inducida por ligando Apo-2.

Ejemplo 7

Ensayo de inhibición utilizando receptores Fas/Apo-1 y TNF

Se llevó a cabo un ensayo para determinar si el receptor Fas/Apo-1, así como los receptores TNF de tipo 1 y de tipo 2 (TNF-R y TNF-R2) se encontraban implicados en la mediación de la actividad apoptótica del ligando Apo-2 mediante el ensayo de si las formas solubles de dichos receptores son capaces de inhibir la actividad apoptótica de ligando Apo-2 soluble purificado (descrito en el Ejemplo 3).

Se incubaron células 9D (5×10^4 células/pocillo) durante 24 horas con un medio de control o con ligando Apo-2 ($0,3 \mu\text{g/ml}$, preparado tal como se ha descrito en el Ejemplo 3) en presencia de tampón de control, control CD4-IgG ($25 \mu\text{g/ml}$), Apo-1-IgG soluble ($25 \mu\text{g/ml}$), TNFR1-IgG soluble ($25 \mu\text{g/ml}$) o proteína de fusión TNFR2-IgG ($25 \mu\text{g/ml}$). Se produjeron derivados solubles de los receptores Fas/Apo-1, TNF-R1 y TNF-R2 en forma de proteínas de fusión de IgG tal como se describe en Ashkenazi *et al.*, Methods 8:104-115, 1995. Se produjo CD4-IgG en forma de una proteína de fusión de IgG tal como se describe en Bym *et al.*, Nature 344:667-670, 1990, y se utilizó como control.

Tal como se muestra en la fig. 3C, ninguna de las moléculas de fusión de receptores inhibió la actividad apoptótica del ligando Apo-2 sobre las células 9D. Estos resultados indican que la actividad apoptótica del ligando Apo-2 es independiente de Fas/Apo-1 y de TNF-R1 y TNF-R2.

ES 2 316 182 T3

Ejemplo 8

Expresión de ARNm de ligando Apo-2 en tejidos de mamífero

5 Se examinó la expresión del ARNm del ligando Apo-2 en tejidos humanos mediante análisis de transferencia northern (fig. 4). Se hibridaron filtros de ARN con una sonda de ADN marcada con ³²P basada en el ADNc del ligando de Apo-2 de longitud completa, o a una sonda de ARN marcada con ³²P basada en la secuencia EST de GenBank, HHEA47M (ver el Ejemplo 1). Se incubaron el filtro MTN de ARN fetal humano (Clontech) y el filtro MTNII de ARN adulto humano (Clontech) con la sonda de ADN, mientras que el filtro MTN-I de ARN adulto humano (Clontech) se incubó con la sonda de ARN. Los filtros se incubaron con las sondas en tampón de hibridación (5 x SSPE; 2 x solución de Denhardt; 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón sonificado desnaturalizado; formamida al 50%; SDS al 2%) durante 16 horas a 42°C. Los filtros se lavaron varias veces en 1 X SSPE; SDS al 2% durante 1 hora a 65°C y formamida al 50% recién desionizada; 1 X SSPE; SDS al 0,2% durante 30 minutos a 65°C. Los filtros se revelaron tras la exposición durante la noche, utilizando un aparato Phosphorimager (Fuji).

15 Se muestran los resultados en la figura 4. En los tejidos humanos fetales, se detectó la expresión de ARNm de ligando Apo-2 en pulmón, hígado y riñón, pero no en el tejido cerebral. En los tejidos humanos adultos, se detectó la expresión de ARNm de ligando Apo-2 en bazo, timo, próstata, ovario, intestino delgado, linfocitos de sangre periférica, corazón, placenta, pulmón y riñón. Se detectó poca o ninguna expresión en testículo, cerebro, músculo esquelético y páncreas. El perfil de expresión observado para el ligando Apo-2, tal como se ha descrito anteriormente, no es idéntico al del ligando Apo-2, que se expresa principalmente en células T y en el testículo [Nagata *et al.*, *supra*].

Ejemplo 9

Actividad apoptótica del ligando Apo-2 en líneas celulares tumorales humanas

25 Se examinó adicionalmente la actividad apoptótica del ligando Apo-2 (descrito en el Ejemplo 3) sobre líneas celulares tumorales humanas en presencia o en ausencia de uno de entre varios agentes quimioterapéuticos.

30 Se sometieron a ensayo las líneas celulares tumorales humanas siguientes: A549 (carcinoma pulmonar; ATCC n° CCL 185); HCT116 (carcinoma de colon, ATCC n° CCL 247); SW480 (adenocarcinoma de colon, ATCC n° CCL 228; MDA231 (carcinoma, ATCC n° HTB 33); T24 (carcinoma de vejiga, ATCC n° HTB 4); SK-N-AS (neuroblastoma, White *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 92:5520-5524, 1995). Varias de estas líneas celulares expresan p53 de tipo salvaje, mientras que otras no lo expresan debido a mutaciones, tal como se muestra en la Tabla 3, posteriormente. Las células se sembraron en placa a una concentración de 2,5 x 10⁶ células/ml en placas de 96 pocillos y se incubaron durante la noche. Las células se cultivaron en presencia de diluciones de 2 veces de ligando Apo-2 (comprendidas entre 100 ng/ml y 0,01 ng/ml). En algunos de estos cultivos, también se añadió un agente quimioterapéutico durante 24 horas: ciclohexamida ("CHX") (50 µg/ml; Sigma Chemicals), doxorubicina (10 a 100 µg/ml; Pharmacia) o 5-FU (6 mg/ml; Roche).

40 Tras 24 horas de incubación, las células se tiñeron con cristal violeta al 0,5% en metanol al 20%. Se determinó la viabilidad celular mediante la elución del pigmento de las células teñidas con citrato sódico 0,1 M (ácido cítrico 0,1 M en metanol al 50%) y midiendo la absorbancia a 540 nm.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 316 182 T3

Se muestran los resultados en la Tabla a continuación:

TABLA 3

	LÍNEA CELULAR	TIPO TUMORAL	STATUS DE p53	SENSIBILIDAD A Apo-2L	INTENSIFICADA POR		
					CHX	Dox	5-FU
5							
10	A549	carcinoma pulmonar	WT	++	sí	sí	sí
15	HCT116	carcinoma de colon	mut.	++	sí	sí	sí
20	SW480	carcinoma de colon	mut.	++	sí	sí	sí
25	MDA231	carcinoma de mama	mut.	++	sí	sí	sí
30	HeLa	carcinoma cervical	mut.	+	sí	ND	ND
35	ME180	carcinoma cervical	WT	++	sí	sí	ND
	T24	carcinoma de vejiga	mut.	+++	sí	sí	ND
	SK-N-AS	neuroblastoma	?	+	ND	ND	ND
	+:>35% mortalidad tras 24 horas con 100 ng/ml de Apo-2L						
	++:>70% mortalidad tras 24 horas con 100 ng/ml de Apo-2L						
	+++:>70% mortalidad tras 24 horas con 10 ng/ml de Apo-2L						

Estos resultados demuestran que el ligando Apo-2 indujo la muerte celular en líneas celulares tumorales derivadas de diversos tipos tumorales y que Apo-2L indujo la muerte celular independientemente del status de p53 de las células tumorales. Estos resultados también demuestran que la muerte celular inducida por el ligando Apo-2 resulta incrementada por varios fármacos quimioterapéuticos diferentes.

Ejemplo 10

Actividad apoptótica del ligando Apo-2 in vivo

Se examinaron los efectos del ligando Apo-2 en ratones desnudos que portaban un tumor. En ratones desnudos (5 a 10 ratones por grupo) (adquiridos de Harlan Sprague Dawley) se inyectaron (día 0) subcutáneamente células de carcinoma mamario humano MDA2231 (ATCC n° HTB 26) (2×10^6 células/ratón). A continuación, se dejó que crecieran los tumores durante 14 días. Los días 14 y 15, se inyectaron $2 \mu\text{g}/0,05 \text{ ml/ratón}$ de ligando Apo-2 (Ejemplo 3) y/o $10 \mu\text{g}/0,05 \text{ ml/ratón}$ de doxorubicina (Pharmacia) en el sitio tumoral. Los animales de control recibieron de manera similar inyecciones de 0,05 ml de PBS. El día 21, se sacrificaron los animales y se extirparon los tumores y se pesaron (gramos):

Se muestran los resultados en la figura 5. Los datos demuestran que el tratamiento de ligando Apo-2 inhibió el crecimiento tumoral por sí mismo y que el ligando Apo-2 incrementó los efectos inhibitorios de la doxorubicina sobre el crecimiento tumoral.

Ejemplo 11

Actividad apoptótica del ligando Apo-2 in vivo

También se examinaron los efectos antitumorales del ligando Apo-2 en ratones desnudos que portaban un tumor, tal como se ha descrito en el Ejemplo 10, excepto en que el día 0 los ratones recibieron una inyección subcutánea de células de carcinoma de colon humano HCT116 (ATCC n° CCL 247) (2×10^6 células/ratón). Después, los ratones se

ES 2 316 182 T3

dejaron crecer durante 14 días. Los días 14 y 15, se inyectaron 2 $\mu\text{g}/0,05$ ml/ratón de ligando Apo-2 y/o 10 $\mu\text{g}/0,05$ ml/ratón de 5-FU (Roche) en el sitio tumoral. Los animales de control de manera similar recibieron una inyección de 0,05 ml de PBS. El día 21 se sacrificaron los animales y se extirparon los tumores y se pesaron (gramos).

5 Se muestran los resultados en la figura 6. Estos resultados demuestran que el tratamiento de ligando Apo-2 inhibió el crecimiento tumoral por sí mismo y que el ligando Apo-2 incrementó los efectos inhibitorios de 5-FU sobre el crecimiento tumoral.

Ejemplo 12

10

Actividad antiapoptótica del ligando Apo-2 in vivo

15 Se examinaron los efectos antitumorales del ligando Apo-2 en ratones desnudos que portaba un tumor, tal como se describe en el Ejemplo 11, excepto en que los días 1 y 2, se inyectaron intraperitonealmente 10 $\mu\text{g}/0,05$ ml/ratón de ligando Apo-2 y/o 100 $\mu\text{g}/0,05$ ml/ratón de 5-FU. Los animales de control de manera similar recibieron una inyección de PBS. Después, se midió el tamaño tumoral (mm^2) los días 5, 9 y 15. El día 15 se sacrificaron los animales y se extirparon los tumores y se pesaron (gramos).

20 Se muestran los resultados en las figuras 7 y 8. Estos resultados demuestran que el ligando Apo-2 es capaz de alcanzar el sitio tumoral subcutáneo y de ejercer un efecto antitumoral cuando se administra mediante una inyección intraperitoneal. Además, estos resultados confirman la capacidad del tratamiento de ligando Apo-2 de inhibir el crecimiento tumoral por sí mismo y de incrementar los efectos inhibidores de 5-FU sobre el crecimiento tumoral.

Ejemplo 13

25

Ensayo de inhibición utilizando CrmA

30 Con el fin de investigar si proteasas tales como ICE y CPP32/Yama desempeñan un papel en la inducción de la apoptosis por el ligando Apo-2, se llevó a cabo un ensayo para determinar si CrmA bloquea la apoptosis inducida por el ligando Apo-2 [Marsters *et al.*, Current Biology 6:750-752, 1996]. CrmA es un inhibidor derivado de poxvirus de las proteasas letales ICE y CPP32/Yama, y bloquea la señalización de muerte celular por TNFR1 y Fas/Apo-1. Además, con el fin de investigar si la proteína adaptadora que contiene el "dominio letal", FADD, que media en la inducción de la apoptosis por el ligando Apo-1 y por TNF (Chinnaiyan *et al.*, Cell 81:505-512, 1995; Hsu *et al.*, Cell 84:299-308, 1996), se encontraba implicada en la apoptosis inducida por ligando Apo-2, se llevó a cabo un ensayo para determinar si una forma mutante negativa dominante de FACC, (FADD-DN) [Hsu *et al.*, *supra*], inhibe la función del ligando Apo-2 [Marsters *et al.*, Current Biology 6:750-752, 1996]

40 Se transfectaron células HeLa-S3 (ATCC n° CCL22) con un plásmido de expresión pRKS-CrmA (la secuencia de CrmA se informa en Ray *et al.*, *supra*) o un plásmido de expresión pRK-5-FADD-DN (Hsu *et al.*, Cell 84:299-308, 1996). Se utilizó pRK5 como control. Las células se cotransfectaron con pRK5-CD4 (Smith *et al.*, Science 238:1704-1707, 1988) como marcador de la incorporación del plásmido de ADN. Las células transfectadas se identificaron mediante tinción con anticuerpo anti-CD4 conjugado con ficoeritrina (Jackson Immunoresearch) y se analizó la apoptosis mediante FACS esencialmente tal como se ha descrito en el Ejemplo 4, anteriormente.

45 Se muestran los resultados en la figura 9. CrmA bloqueó la apoptosis inducida por el ligando Apo-2, así como la apoptosis inducida por el anticuerpo anti-Apo-1. En contraste, FADD-DN presentó un efecto reducido sobre la apoptosis inducida por el ligando Apo-2, aunque bloqueó sustancialmente la inducción de apoptosis por el anticuerpo anti-Apo-1. Por consiguiente, los resultados del ensayo sugieren que el ligando Apo-2, TNFR1 y Fas/Apo-1 podrían inducir una ruta distal común de señalización, activando la muerte celular apoptótica. En particular, los resultados sugieren que proteasas tales como ICE y CPP32/Yama podrían resultar necesarias para la apoptosis inducida por el ligando Apo-2. En contraste, FADD resulta necesario para la inducción de la muerte celular por parte de TNFR1 y Fas/Apo-1, pero no por parte del ligando Apo-2.

Ejemplo 14

55

A. Preparación de anticuerpos anti-ligando Apo-2

60 Se inmunizaron ratones Balb/c (obtenidos de Charles River Laboratories) mediante la inyección de 1 μg de ligando Apo-2 (preparado tal como se ha descrito en el Ejemplo 3 y diluido en adyuvante MPL-TDM adquirido de Ribi Immunochemical Research Inc., Hamilton, MT) diez veces en cada almohadilla plantar trasera en intervalos de 1 semana. Tres días después de la inyección de refuerzo final, se extrajeron los nódulos linfáticos poplíteos de los ratones y se preparó una suspensión de células individuales en medio DMEM (obtenida de Biowhitakker Corp.) suplementado con 1% de penicilina-estreptomina. A continuación, se fusionaron las células de los nódulos linfáticos con células de mieloma murino P3X63AgU.1 (ATCC n° CRL 1597) utilizando polietilenglicol al 35% [Laskov *et al.*, Cell. Immunol. 55:251, 1980] 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, se cribaron los sobrenadantes de los cultivos de hibridoma en una ELISA [Kim *et al.*, J. Immunol. Meth. 156:9-17, 1992] para analizar la presencia de anticuerpos monoclonales ligantes de la proteína ligando Apo-2.

ES 2 316 182 T3

En la ELISA, se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) mediante la adición de 50 μ l de ligando Apo-2 0,5 μ g/ml (ver el Ejemplo 3) en PBS a cada pocillo e incubando a 4°C durante la noche. A continuación, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (PBS más Tween-20 al 0,05%). Seguidamente, los pocillos en las placas de microtitulación se bloquearon con 200 μ l de albúmina de suero bovino al 2% (BSA) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, las placas se lavaron nuevamente tres veces con tampón de lavado.

Tras la etapa de lavado, se añadieron 50 μ l de 2 μ g/ml de anticuerpos de ligando Apo-2 o 100 μ l del sobrenadante del cultivo de hibridoma a los pocillos asignados. Se añadieron 100 μ l de medio condicionado de células de mieloma P3X63AgU.1 a otros pocillos asignados como controles. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en un aparato agitador y después se lavaron tres veces con tampón de lavado.

A continuación, se añadieron 50 μ l de IgG de cabra antiratón conjugado con HRP (adquirido de Cappel Laboratories), diluido 1:1.000 en tampón de ensayo (albúmina de suero bovino al 0,5%, Tween-20 al 0,05%, Timersol al 0,01% en PBS) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un aparato agitador. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado, seguido de la adición de 50 μ l de sustrato (TMB, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina; obtenida de Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 μ l de solución de parada (Kirkegaard & Perry) a cada pocillo y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación automático.

Se sometieron a ensayo los sobrenadantes de hibridoma (99 seleccionados) para actividad de bloqueo de la eliminación de células 9D inducida por el ligando Apo-2. Se determinó inicialmente la actividad mediante el examen del % de viabilidad de las células 9D tratadas utilizando exclusión de pigmento azul tripán.

También se confirmó la actividad de bloqueo mediante análisis FACS. Se suspendieron las células 9D (5 x 10⁵ células/0,5 ml) en medio RPMI completo (RPMI más FCS al 10%, glutamina, aminoácidos no esencialmente, penicilina, estreptomycin, piruvato sódico) y se introdujeron en placas de microtitulación de 24 pocillos. Se suspendieron 0,5 ml de ligando Apo-2 (1 μ g/ml) (preparados tal como se ha descrito en el Ejemplo 3) en medio RPMI completo, se preincubaron con 10 μ g de anticuerpos monoclonales purificados o con 100 μ l de sobrenadante de cultivo, y después se añadieron a los 24 pocillos de microtitulación que contenían las células 9D. Las placas de microtitulación se incubaron durante la noche a 37°C y en presencia de 7% de CO₂. Después, las células incubadas se recolectaron y se lavaron una vez con PBS. Se determinó la viabilidad de las células mediante tinción de la unión de FITC-anexina V a fosfatidilserina siguiendo las recomendaciones del fabricante (Clontech). Las células se lavaron en PBS y se resuspendieron en 200 μ l de tampón de unión. Se añadieron 10 μ l de anexina V-FITC (1 μ g/ml) y 10 μ l de yoduro de propidio a las células. Tras incubar durante 15 minutos en la oscuridad, se analizaron las células 9D mediante FACS.

Se identificaron ocho hibridomas secretores de anticuerpos potencialmente bloqueadores y cuatro hibridomas secretores de anticuerpos no bloqueadores y se clonaron adicionalmente (dos veces) mediante técnicas de dilución limitante.

El análisis FACS de cuatro anticuerpos, denominados anticuerpos monoclonales 1D1, 2G6, 2E11 y 5C2 se ilustra en la figura 10 (tal como se indica posteriormente, los anticuerpos 1D1, 2G6, 2E11 y 5C2 son producidos por los hibridomas 1D1.12.4, 2G6.3.4, 2E11.5. y 5C2.4.9, respectivamente, la totalidad de los cuales han sido depositados en la ATCC). Las células 9D tratadas con el ligando Apo-2 (gráfico superior izquierda) mostraron 50% más células apoptóticas que las células no tratadas, de control (gráfico superior derecha). Las células 9D tratadas con ligando Apo-2 más los anticuerpos 2E11, 5C2, 2G6 o 1D1 mostraron 0%, 6%, 26% y 48% más células apoptóticas que el control no tratado, respectivamente. Estos resultados demuestran que los anticuerpos 5C2, 2E11 y 2G6 son anticuerpos bloqueadores, mientras que el anticuerpo 1D1 es un anticuerpo no bloqueador. La actividad bloqueadora más potente se observó con el anticuerpo 5C2.

También se sometieron a ensayo en una ELISA las especificidades de antígeno de los cuatro anticuerpos. Se recubrieron placas de microtitulación con 2 μ g/ml de linfotóxina (Genentech Inc., ver también la patente EP n° 164.965; Gray *et al.*, Nature 312:721-724, 1984), de TNF-alfa (Genentech, Inc., ver también Pennica *et al.*, Nature 312:724-729, 1984; Aggarwal *et al.*, J. Biol. Chem. 260:2345-2354, 1985) o de ligando Apo-2 (ver el Ejemplo 3). Los anticuerpos monoclonales 1D1, 2G6, 2E11 y 5C2 se sometieron a ensayo a una concentración de 10 μ g/ml.

Los resultados del ensayo se muestran en la figura 11. Los datos en la figura 11 muestran que los anticuerpos monoclonales 2G6, 2E11 y 5C2 no son específicos para el ligando Apo-2, mientras que el anticuerpo monoclonal 1D1 mostró una unión cruzada débil a la linfotóxina y a TNF-alfa.

B. Isotipado

Se determinaron los isotipos de los anticuerpos 1D1, 2G6, 2E11 y 5C2 (descritos en la Sección A, anteriormente) mediante recubrimiento de placas de microtitulación con Ig de cabra antiratón específico de isotipo (Fisher Biotech, Pittsburgh, PA) durante la noche a 4°C. A continuación, las placas se lavaron con tampón de lavado tal como se ha descrito anteriormente. Después, los pocillos en las placas de microtitulación se bloquearon con 200 μ l de albúmina de suero bovino al 2% y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron nuevamente tres veces con tampón de lavado.

ES 2 316 182 T3

A continuación, se añadieron 100 μ l de 5 μ g/ml de los anticuerpo de ligando Apo-2 purificados o 100 μ g del sobrenadante del cultivo de hibridoma a los pocillos asignados. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se añadieron a cada pocillo 50 μ l de IgG de cabra antiratón conjugada con HRP (tal como se ha descrito anteriormente). Las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se detectó el nivel de HRP unido a la placa utilizando sustrato de HRP tal como se ha descrito anteriormente.

El análisis de isotipado demostró que los anticuerpos 1D1 y 2G6 son anticuerpos IgG2b, y que los anticuerpos 2E11 y 5C2 son anticuerpos IgG2a.

C. Mapado de epítomos

Se llevó a cabo un mapado de epítomos utilizando una ELISA de unión competitiva tal como se describen Kim *et al.*, *supra*, utilizando anticuerpos monoclonales biotinilados. Los anticuerpos monoclonales seleccionados se biotinilaron utilizando N-hidroxilsuccinimida tal como se describe en: Antibodies, A Laboratory Manual, editores E. Harlow y D. Lane, página 342. Se recubrieron pocillos de una placa de microtitulación con 50 μ l de ligando Apo-2 (ver el Ejemplo 3, 0,1 μ g/ml) y se mantuvieron durante la noche a 4°C y después se bloquearon con BSA al 2% durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar los pocillos de microtitulación, se añadió en cada pocillo una mezcla de una concentración óptima predeterminada de anticuerpos biotinilados y un exceso de mil veces de anticuerpo no marcado. Tras una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron y se detectó la cantidad de anticuerpo biotinilado mediante la adición de HRP-estreptavidina. Tras lavar los pocillos de microtitulación, el enzima unido se detectó mediante la adición del sustrato (TMB) y las placas se leyeron a 490 nm con un lector de placas ELISA.

Se muestran los resultados en la figura 12. Los resultados demuestran que la unión de los anticuerpos conjugados con HRP fue eficazmente inhibida por la cantidad en exceso de su propio anticuerpo pero no por los otros anticuerpos sometidos a ensayo.

Las regiones del ligando Apo-2 reconocidas por los anticuerpos monoclonales se determinaron utilizando péptidos sintéticos [aminoácidos 128 a 143 (péptido "APO 14"); aminoácidos 144 a 159 (péptido "APO 15"); aminoácidos 192 a 204 (péptido "APO 17"); aminoácidos 230 a 238 (péptido "APO 18"); aminoácidos 261 a 272 (péptido "APO 19") de la secuencia del ligando Apo-2 tal como se muestra en la fig. 1A] en una ELISA tal como se describe en Chuntharapai *et al.*, J. Immunol. 152:1783-1789, 1994. Se muestran los resultados en la figura 13. Los anticuerpos 1D1 demostraron la unión al péptido APO 17 que comprendía los residuos aminoácidos 192 a 204 del ligando Apo-2.

Ejemplo 15

Expresión del ligando Apo-2 en células CHO

Se insertó en un plásmido pRK5 la inserción de ADNc de ligando Apo-2 de longitud completa del plásmido pGEM-T-ligando Apo-2 (descrito en los Ejemplos 1 y 2, anteriormente). Este plásmido seguidamente se cotransfectó en células CHO DP-12 utilizando el procedimiento de lipofectamina Plus (Gibco/BRL) junto con un plásmido pFD11 (promotor temprano de SV40) que portaba un gen de selección con DHFR. Se seleccionaron los clones estables que expresaban el ligando Apo-2 por su capacidad de crecer en medio de crecimiento selectivo PS21 (G1074)/280 empobrecido en GHT con FBS dializado al 2,5%.

Las células CHO seleccionadas que expresaban ligando Apo-2 se incubaron durante 2 a 4 días a 37°C. A continuación, se recolectó y se filtró el medio de cultivo celular. La presencia del ligando Apo-2 en el sobrenadante del cultivo celular se sometió a ensayo mediante análisis de transferencia western. Para preparar la proteína para el análisis de transferencia western, los sobrenadantes de cultivo se incubaron con el 5C2 anti-Apo-2L dado a conocer en la presente invención unido a perlas de vidrio de poro controlado. Tras la incubación, las perlas se lavaron y la proteína unida se eluyó con tampón de muestra SDS-PAGE que contenía DTT 25 mM. Seguidamente el eluido se corrió en un gel SDS de gradiente de 4% a 20% de poliacrilamida y se electrotransfirió sobre un filtro de nitrocelulosa. El filtro se incubó con un anticuerpo policlonal de conejo anti-ligando Apo-2 humano seguido de IgG anticonejo conjugada con peroxidasa de rábano picante, y se reveló mediante quimioluminiscencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante (NEB). La muestra de las células CHO que expresaban ligando Apo-2 dio lugar a una sola banda en el gel a 22.000 daltons (datos no mostrados).

Para determinar la secuencia del ligando Apo-2 expresado por las células CHO transfectadas, se purificaron 25 ml del sobrenadante de cultivo celular utilizando anticuerpo anti-Apo-2L (anticuerpo 5C2 dado a conocer en la presente invención). Para preparar la columna de purificación, se acoplaron 2,0 mg del anticuerpo 5C2 a 0,5 ml de perlas de vidrio de poro controlado (CPG, Inc., Fairfield, NJ) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras el acoplamiento, la resina se lavó con 15 ml de Tris 50 mM, pH 7,5, seguido de 15 ml de ácido acético 0,1 M/citrato sódico 0,15 M/NaCl 0,05 M.

Previamente a la carga, la columna de 0,5 ml se equilibró con 15 ml de Tris 50 mM, pH 7,5. Se cargaron aproximadamente 25 ml del medio de cultivo celular CHO recolectado, pH 7,2, conductividad de 10,2 mmho, sobre la columna de anticuerpos en un modo de carga de alimentación por gravedad. El efluente de la carga se recicló a través

ES 2 316 182 T3

de la columna de manera que el tiempo total de carga fuese una hora. Tras la carga, las proteínas no específicas se desprendieron por lavado con 2 ml de TMAC 0,5 M/NaCl 0,25 M. La columna se eluyó con 1,5 ml de ácido acético 0,1 M/NaCl 0,15 M, pH 3,0. El eluido de 1,5 ml se recogió en un tubo y se neutralizó inmediatamente hasta pH 7,0 con 50 μ l de Tris 3 M, pH 9,0.

5 Se analizó una alícuota del material analizado en un gel SDS, junto con un control purificado de polipéptido ligando Apo-2 consistente de los residuos aminoácidos 96 a 281 de la figura 1A que había sido previamente expresada en *E. coli* y purificada. El gel confirmó que el polipéptido ligando Apo-2 soluble expresado en células CHO había sido purificado en la columna de afinidad de anticuerpo 5C2. Se concentró otra alícuota del material eluido, se corrió en SDS-PAGE, se electrotransfirió sobre una membrana de PVDF y después se secuenció mediante degradación Edman. El análisis de la secuencia proteica reveló que las células CHO expresaban una forma soluble de ligando Apo-2 que presentaba un aminoácido N-terminal en la posición 92 en la secuencia de la figura 1A. De esta manera, el polipéptido ligando Apo-2 soluble incluía los aminoácidos 92 a 281 de la figura 1A. En la actualidad se cree que esta forma soluble de aminoácidos 92 a 281 del ligando Apo-2 comprende la forma naturalmente cortada del ligando Apo-2.

15 Se sometió a ensayo la actividad apoptótica del ligando Apo-2 expresado por las células CHO en células HeLa cultivadas (ATCC nº CCL 22). Las células HeLa se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos en medio F12 de Ham con FBS al 10% y se incubó durante la noche a 37°C. El medio se aspiró y se añadieron 2 ml del sobrenadante del cultivo celular CHO que contenía el ligando Apo-2 expresado (diluciones 1:10, 1:20, 1:40) a cada pocillo de muestra. 20 Las placas se incubaron durante la noche a 37°C. En paralelo bajo las mismas condiciones se corrió un pocillo de control que contenía 2 ml de medio no condicionado (sobrenadante de cultivo celular CHO no transfectado).

A continuación, las células HeLa tratadas se analizaron bajo un microscopio óptico para la morfología apoptótica (ver las figuras 14A a 14D). Se muestra en la figura 14E el número de células apoptóticas en cada campo. Las células HeLa tratadas con el sobrenadante de cultivo celular CHO que contenía el ligando Apo-2 expresado mostraron un incremento de dos o más veces en la morfología apoptótica en comparación con las células tratadas con medio no condicionado.

30 Ejemplo 16

Actividad apoptótica de ligando Apo-2 expresado en E. coli

Se examinaron los efectos antitumorales del ligando Apo-2 en ratones desnudos portadores de tumor. En contraste con los Ejemplos anteriores, el polipéptido ligando Apo-2 soluble se expresó en *E. coli* y después se infundió en los animales a través de un dispositivo minibomba implantado.

Se preparó el ligando Apo-2 mediante la inserción del ADNc codificante de los aminoácidos 91 a 281 (ver la fig. 1A) en un plásmido pS1346 [pS1346 comprende un plásmido hgh207-1 que presenta un terminador de transcripción insertado; ver DeBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 80:21-25, 1983; Scholtissek *et al.*, Nucl. Acids Research 15:3185, 1987]. Este plásmido seguidamente se transformó en la cepa *E. coli* 52A7. La cepa 52A7 es una cepa *E. coli* K12 W31 10 0 con el genotipo siguiente: fhuA (tonA) lon galE rpoHts (htpRts) clpP lacIq. Se cultivó un cultivo de 25 ml del *E. coli* en medio LB hasta una densidad óptica de aproximadamente 1,0 (DO550) y se recolectó mediante centrifugación (5.000 rpm durante 15 minutos). El pellet celular se lavó una vez en NaCl 0,15 M antes de resuspender en 2,5 ml de tampón (caldo B, pH 6,1 con HCl, que contenía 100 g/l de PEG 8000, MgSO₄ 10 mM, MgCl₂ 10 mM y DMSO al 5%). La suspensión celular se dejó sobre hielo durante 30 a 45 minutos, se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C. Esta suspensión celular sirvió como fuente de células competentes para el proceso de transformación. La transformación de las células competentes con el plásmido, y la preparación, selección y aislamiento de transformantes se llevó a cabo siguiendo los protocolos estándares descritos en Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, vol. 1:1.74-1.84.

Se preparó el inóculo de fermentador mediante la inoculación de 1 ml de los transformantes en 500 ml de medio LB que contenía 5 μ g/ml de tetraciclina. Este cultivo se incubó durante 10 horas en un matraz con deflectores de 2 litros a una temperatura de 30°C o 37°C. A continuación, el cultivo resultante se utilizó para inocular un fermentador de 10 litros que contenía 8 litros de medio (6,25 g/l de sulfato amónico, 7,5 g/l de fosfato potásico dibásico, 3,75 g/l de fosfato sódico monobásico dihidrato y 1,25 g/l de citrato sódico) con 25 g/l de NZ Amina AS, 6,25 g/l de extracto de levadura, 0,125 g/l de triptófano, 6,25 mg/l de tetraciclina, 0,94 g/l de glucosa, 0,625 g/l de L-isoleucina y 94 mg/l de antiespumante L-61.

60 La fermentación se llevó a cabo a 30°C con agitación vigorosa y aireación y con control de pH a 7,0 utilizando adiciones de NH₄OH. Tras agotarse la glucosa inicial, se alimentó una solución estéril de glucosa al 50% para mantener el cultivo. A aproximadamente 30 DO, la temperatura se modificó a 25°C para minimizar el espumado. Al alcanzar la DO del cultivo aproximadamente 50 (A550), se añadieron 25 ml de 1AA (ácido 3-beta-indol acrílico) a una concentración de 25 mg/ml para la inducción de la expresión de ligando Apo-2 regulada por el promotor trp. Las 65 células se recolectaron mediante centrifugación 6 a 10 horas después de la adición de IAA.

El polipéptido expresado se purificó de la manera siguiente. La pasta celular que contenía el ligando Apo- expresado de *E. coli* se extrajo con tampón Tris 0,1 M, NaCl 0,2 M, EDTA 50 mM, pH 8. A continuación, el extracto se

ES 2 316 182 T3

precipitó utilizando sulfato amónico al 40%. Todas las etapas de la cromatografía se llevaron a cabo a temperatura ambiente a menos que se indique lo contrario. El precipitado de sulfato amónico se disolvió en tampón HEPES 50 mM, Triton X-100 al 0,05%, pH 8 y después se aplicó en una columna de Macro-prep de hidroxipatito equilibrada en HEPES 50 mM, Triton X-100 al 0,05%, pH 8, a un caudal de 80 cm/hora. La columna se lavó con tampón de 5 equilibración hasta que la absorbancia A280 volvió a aproximadamente la línea base. El ligando Apo-2 se eluyó de la columna con 8 volúmenes de columna con un gradiente lineal de fosfato sódico de 0 a 0,2 M. Las fracciones que contenían el ligando Apo-2 se agruparon y el pH se ajustó a 6,5. El pool de pH ajustado se cargó en una columna Ni-NTA Superflow equilibrada en tampón NaCl 0,35 M/PBS, pH 6,5, a un caudal de 80 cm/hora. La columna se lavó con 10 tampón de equilibración hasta una absorbancia próxima a la línea base. El ligando Apo-2 se eluyó de la columna con 8 volúmenes de columna con un gradiente lineal de 0 a 50 mM de imidazol/tampón de equilibración. Las fracciones que contenían el ligando Apo-2 se agruparon y se concentraron utilizando membranas Biomax 8 del sistema Millipore Lab TFF. El pool concentrado se formuló con una columna G-25 en tampón Tris 20 mM, trehalosa al 8%, Tween-20 al 0,01%. El pool formulado de ligando Apo-2 seguidamente se filtró a través de un filtro de 0,22 micrómetros.

15 El análisis del material purificado reveló que contenía (en una proporción aproximada de 50:50) polipéptido ligando Apo-2 que presentaba los aminoácidos 91 a 281 (mostrado en la figura 1A) y polipéptido ligando Apo-2 que presentaba los aminoácidos 92 a 281 mostrado en la figura 1A) (esta proporción en la actualidad se cree que se debe al potencial procesamiento N-terminal; el residuo aminoácido 91 mostrado en la figura 1A es un residuo de metionina).

20 En el experimento, los ratones desnudos recibieron una inyección subcutánea de células de carcinoma de colon humano HCT116 (ATCC n° CCL 247) (1×10^6 células) en cada flanco del animal. A continuación, los tumores se dejaron crecer hasta alcanzar un diámetro de aproximadamente 1 cm (aproximadamente 10 días). El día 0, se midió el volumen del tumor con un calibrador. El volumen se calculó como $\pi/6 \times ab^2$, donde a=longitud y b=anchura. Después, se implantaron intraperitonealmente en cada animal minibombas osmóticas (disponibles de Alza Corp., modelo 1003). 25 Las minibombas se cargaron con: (1) vehículo de control (Tris 20 mM, pH 7,5, trehalosa al 8%, Tween-20 al 0,01%), o (2) ligando Apo-2. Cinco animales en cada grupo recibieron el vehículo de control o el ligando Apo-2. Las minibombas se calibraron para administrar cada día 10 mg/kg de ligando Apo-2 (10 mg/ml \times 2 μ l/hora) o 2 μ l/hora de vehículo de control.

30 El día 3, se midió nuevamente el volumen tumoral y se sacrificaron los animales. El examen e los animales no reveló ninguna evidencia clara de toxicidad. En la figura 15, los resultados muestran el porcentaje de cambio del volumen tumoral. El volumen tumoral no cambió en el grupo de vehículo, pero se observó una marcada reducción del tamaño tumoral en ratones infundidos con el Apo-2L. El tratamiento con Apo-2L encogió los tumores en aproximadamente 50% a lo largo de 3 días.

35

Ejemplo 17

Preparación de variantes por sustitución de ligando Apo-2.

40

Se utilizó la mutagénesis por escaneo de alaninas para descubrir y describir el epítipo o epítipos importantes para la unión de receptores y la actividad de inducción de apoptosis. La mutagénesis por escaneo de alaninas puede utilizarse para identificar epítipos ligantes, tal como se describe en Kelley *et al.*, Biochemistry 34:10383-10392, 1995, y Cunningham y Wells, Science 244:1081-1085, 1989. En general, se introdujo una mutación codificante del aminoácido alanina en lugar de otros residuos mediante procedimientos descritos en la presente invención. La sustitución 45 seleccionada fue la alanina debido a que presenta una cadena lateral truncada (un grupo metilo). Además, la alanina se puede encontrar tanto sobre la superficie como enterrada en el interior de las proteínas y, por lo tanto, se cree que es menos probable que perturbe la integridad estructural de la proteína expresada.

50 Se construyeron plásmidos codificantes de las proteínas con sustituciones de alanina utilizando mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (Kunkel, T.A. *et al.*, Methods in Enzymology 154:367-382, 1987) en la forma monocatenaria del plásmido pAPOK5 (ver la figura 16). Este plásmido se diseñó para la expresión intracelular en *E. coli* de la forma 91-281 de Apo-2L controlada por el promotor triptófano (*trp*). pAPOK5 se construyó utilizando PCR para clonar el ADNc de Apo-2L (codificante de los residuos 91 a 281) en el plásmido pS1162 que porta el promotor *trp*. Todas 55 las sustituciones de Ala se confirmaron mediante secuenciación con dideoxinucleótidos (Sanger, F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 74:5463-5467, 1977).

Los plásmidos codificantes de las proteínas Apo-2L con sustitución de alaninas seguidamente se transformaron en *E. coli* cepa 294 para la expresión. Los cultivos se cultivaron durante la noche hasta la saturación a 37°C en caldo 60 Lura más carbenicilina a una concentración de 50 μ g/ml. Las células posteriormente se sembraron en medio filtrado a esterilidad que comprendía Na₂HPO₄ (6 g/l), KH₂PO₄ (3 g/l), NaCl (0,5 g/l), NH₄Cl (1 g/l), glucosa (4,9 g/l), casaminoácidos (4,9 g/l), MgSO₄ 27 mM, HCl de tiamina al 0,003% y c.s. de agua destilada más carbenicilina a una concentración de 50 μ g/ml a una dilución de 20 veces y se cultivaron durante 1 hora a 37°C.

65 A continuación se indujo la expresión con ácido 3- β -indolacrílico (IAA) (Sigma, St. Louis, MO.) a una concentración de 25 μ g/ml y las células se cultivaron durante la noche a 30°C con agitación. Las células se recolectaron mediante centrifugación y se almacenaron congeladas a -20°C para la recuperación posterior del Apo-2L, tal como se describe posteriormente.

ES 2 316 182 T3

Las proteínas Apo-2L se extrajeron de los pellets congelados células de *E. coli* mediante homogeneización en 10 volúmenes (p/v) de Tris 100 mM, pH 8,0/NaCl 200 mM/EDTA 5 mM/DTT 1 mM utilizando un microfluidificador modelo M110-F (Microfluidics Corporation, Newton, MA). Se añadió polietilenimina (PEI) hasta una concentración final de 0,5% (v/v) al homogenado, que después se centrifugó para eliminar los residuos celulares. Se añadió sulfato amónico sólido al sobrenadante de extracción hasta una concentración final de 45% de la saturación a temperatura ambiente bajo agitación, y el pellet se recuperó mediante centrifugación. El pellet de sulfato amónico se lavó con solución al 50% de sulfato amónico para eliminar el EDTA residual, después se resuspendió en 50 volúmenes (p/v) de EPPS 50 mM, pH 7,5/Triton X-100 al 0,1%. La solución resultante se clarificó mediante centrifugación y se purificó mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) utilizando una columna de sefarosa quelante HiTrap de 5 ml (Pharmacia, Piscataway, NJ). La columna se cargó con níquel en NiSO₄ 100 mM/Tris 300 mM, pH 7,5 se equilibró con NaCl 350 mM en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Tras la carga, la columna se lavó con NaCl 350 mM en PBS y se eluyó con imidazol 50 mM/NaCl 350 mM en PBS. El eluyente IMAC se dializó frente a Tris 20 mM, pH 7,5, se clarificó mediante centrifugación y se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio catiónico utilizando una columna de sefarosa HiTrap SP de 5 ml (Pharmacia) que se equilibró y se lavó con Tris 20 mM, pH 7,5. La columna HiTrap SP se eluyó con Tris 20 mM, pH 7,5/NaCl 0,5 M. El eluido de la columna SP se redujo con DTT 2 mM y posteriormente se precipitó mediante la adición de sulfato amónico sólido bajo agitación hasta una concentración final de 45% de la saturación a temperatura ambiente. El pellet del sulfato amónico se resuspendió en 3,5 ml de Tris 20 mM, pH 7,5/NaCl 100 mM y se intercambió en el tampón final de Tris 20 mM, pH 7,5/NaCl 100 mM mediante cromatografía de filtración en gel utilizando una columna PD10 (Pharmacia). Las proteínas Apo-2L purificadas con sustitución de alaninas se caracterizaron mediante SDS-PAGE teñida con Coomassie y secuenciación N-terminal y se almacenaron congeladas a -20°C.

Ejemplo 18

Ensayo de apoptosis utilizando variantes por sustitución de Apo-2L

Se llevó a cabo un ensayo *in vitro* para determinar la actividad apoptótica de algunas de las variantes por sustitución del ligando Apo-2 preparadas tal como se describe en el Ejemplo 17, anteriormente.

Se cultivaron células de carcinoma pulmonar humano SK-MES (ATCC n° HTB 58) en DMEM:medio F-12 de Ham (50:50) suplementado con 10% de FBS, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 microgramos de estreptomina. Se sembraron células SK-MES-1 en microplacas tratadas de cultivo de tejidos Falcon de 96 pocillos en un volumen de 0,1 ml a una densidad de $4,0 \times 10^4$ células/pocillo y se dejó que se uniesen durante la noche a 37°C. Se indujo la apoptosis mediante la adición de diversas variantes por sustitución de Apo-2L o de Apo-2L (consistente de los aminoácidos 91 a 281 de la figura 1A; denominada Apo2L.2) durante 24 horas. Tras el tratamiento con las proteínas de ensayo, se eliminó el medio y los pocillos se tiñeron durante 15 minutos con solución al 0,5% de cristal violeta en metanol. Se determinó el número celular mediante la medición de la densidad óptica de las placas secas a 540 nm utilizando un lector de placas SLT 340 ATC (Salzburg, Austria).

Los resultados se ilustran en las figuras 17 y 18. La figura 17 muestra datos de bioensayo de las variantes D218A, D269A y V207A en comparación con la molécula Apo2L.2 (V207A es una variante de sustitución identificada que comprende los aminoácidos 91 a 281 de la figura 1 en la que se ha sustituido por alanina la valina en la posición 207 en la secuencia de la figura 1A). Las variantes D218A y D269A mostraron una actividad incrementada de inducción de apoptosis de aproximadamente 3 veces y 7 veces, respectivamente, en comparación con Apo-2L.2. V207A era aproximadamente 9 veces menos activos que Apo-2L.2 en el bioensayo.

La figura 18 muestra los datos de bioensayo de D203A en comparación con Apo2L.2. La variante D203A mostró una actividad incrementada de inducción de apoptosis de aproximadamente 2 veces en comparación con Apo2L.2.

Ejemplo 19

Análisis de unión de las variantes por sustitución del ligando Apo-2

Las proteínas Apo-2L con sustitución de alaninas (D203A; D218A y D269A a las que se hace referencia en el Ejemplo 18, anteriormente) se analizaron para su unión a diversos receptores de Apo-2L descritos en la literatura: DR4 [Pan *et al.*, Science 276:111-113, 1997], DR5 [Sheridan *et al.*, Science 277:818-821, 1997], receptor señuelo, DcR2 [Marsters *et al.*, Current Biology 7:1003-1006, 1997] y OPG [Simonet *et al.*, Cell 89:309-319, 1997] utilizando el BIAcore (Pharmacia). A título de comparación, también se sometió a ensayo Apo-2L consistente de los aminoácidos 91 a 281 en el BIAcore para la unión a las moléculas de fusión de IgG-receptor. Se preparó cada una de las proteínas receptoras de Apo-2L como inmunoadhesinas esencialmente tal como describen Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 88:10535-10539, 1991. Las moléculas de fusión IgG-receptor se inmovilizaron en el chip CM5 BIAcore, de grado para uso en investigación (Pharmacia), utilizando química de acoplamiento de aminas de NHS-EDC. Las proteínas Apo-2L con sustitución de alaninas se diluyeron en serie 2 veces de 500 nM a 15,625 nM en el tampón de corrido del BIAcore, PBS/Tween-20 al 0,05% y se pasaron a través de la superficie del chip sensor con receptor inmovilizado. Se utilizaron parámetros cinéticos de unión específicos para determinar el valor KD utilizando el programa informático de evaluación del BIAcore (siguiendo las instrucciones del fabricante).

ES 2 316 182 T3

Se muestran los resultados en la figura 19. La tabla muestra las constantes de disociación (K_D) de las variantes D203A, D218A y D269A en comparación con la de Apo2L.2 según se determinó mediante análisis cinético de unión utilizando el BIAcore (Pharmacia). Los datos no demostraron ningún cambio significativo (>2 veces) en la unión de las variantes con sustitución de alaninas a las proteínas de fusión de IgG-receptor DR4, DR5 y DcR2 en comparación con Apo2L.2. En el caso de la unión a OPGF-IgG, las variantes D203A, D218A y D269A mostraron una unión más estrecha que Apo2L.2 ($2 < KD_{wt} < KD_{mut.} < 4$).

Depósito del material

Las líneas celulares siguientes han sido depositados en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA, USA (ATCC):

Línea celular	n° dep. ATCC	Fecha de depósito
2935-pRK5-hApo-2L-myc clon 2.1	CRL-12014	3 de enero de 1996
1D1.12.4	HB-12257	8 de enero de 1997
2G6.3.4	HB-12259	8 de enero de 1997
2E11.5.5	HB-12256	8 de enero de 1997
5C2.4.9	HB-12258	8 de enero de 1997

Este depósito se preparó bajo las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de procedimiento de patentes y normas del mismo (Tratado de Budapest). Esto garantiza el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años desde la fecha del depósito. La ATCC pondrá a disposición del público el depósito bajo los términos del Tratado de Budapest y sujeto a un acuerdo entre Genentech, Inc. y la ATCC, garantizando la disponibilidad permanente y no limitada de la progenie del cultivo del depósito para el público tras la publicación de la patente US pertinente o tras la apertura al público de cualquier solicitud de patente US o foránea, la que sea la primera, y garantiza la disponibilidad de la progenie para la persona que determine el comisario US de patentes y marcas que presenta el derecho para ello según la disposición 35 USC § 122 y las normas del comisario pertinentes (incluyendo la 37 CFR § 1.14, con referencia particular a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si el cultivo de la línea celular en depósito muriese, se perdiese o resultase destruida estando en cultivo bajo condiciones adecuadas, la línea celular será sustituida rápidamente tras la notificación con otro del mismo plásmido. La disponibilidad de la línea celular depositada no debe interpretarse como una licencia para la práctica de la invención en contravención de los derechos otorgados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con su legislación de patentes.

La especificación escrita anterior se considera suficiente para permitir que un experto en la materia ponga en práctica la invención. La presente invención no debe considerarse limitada en su alcance por el constructo depositado, debido a que la realización depositada se pretende como una única ilustración de determinados aspectos de la invención, y cualquier constructo que sea funcionalmente equivalente se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención. El depósito del material de la presente invención no constituye el reconocimiento de que la descripción escrita contenida en la presente memoria resulta inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni debe interpretarse como limitativa del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa la misma. En efecto, se pondrán de manifiesto para los expertos en la materia diversas modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas en la presente invención, a partir de la descripción anterior y se encuentran comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- EP 417563 A [0006]
- US 4816567 A [0027] [0028] [0132] [0132] [0137]
- US 5364934 A [0042] [0097]

ES 2 316 182 T3

- US 5010182 A [0046]
- WO 9013646 A [0046]
- 5 • US 4965199 A [0055]
- EP 73657 A [0062]
- US 4419446 A [0064]
- 10 • EP 117058 A [0070]
- WO 9108291 A [0070]
- 15 • EP 321196 A [0074]
- WO 9100358 A [0078]
- US 3969287 A [0093]
- 20 • US 4195128 A [0093]
- US 4229537 A [0093]
- 25 • WO 8705330 A [0098]
- US 4496689 A [0101]
- US 4670417 A [0101]
- 30 • US 4179337 A [0101]
- US 9901039 W [0103]
- 35 • US 4870009 A [0121]
- US 4342566 A [0134]
- WO 9308829 A [0142]
- 40 • US 4676980 A [0144] [0144]
- WO 9100360 A [0144]
- 45 • EP 03089 A [0144]
- US 09007886 B [0249]
- EP 362179 A [0046]
- EP 117060 A [0054] [0070]
- EP 36776 A [0059]
- GB 2211504 A [0063]
- US 4601978 A [0064]
- EP 307247 A [0070]
- DD 266710 [0071]
- WO 8905859 A [0078]
- US 4399216 A [0079]
- US 3691016 A [0093]
- US 4247642 A [0093]
- US 4330440 A [0093]
- US 4640835 A [0101]
- US 4301144 A [0101]
- US 4791192 A [0101]
- WO 9936535 A [0103]
- US 4736866 A [0121]
- WO 9429348 A [0134]
- WO 9404679 A [0139]
- WO 9404690 A [0143]
- WO 92200373 A [0144]
- EP 164965 A [0211]
- US 09060533 B [0249]

50 Documentos que no son patentes citados en la descripción

- **BARR** *et al.* *Bio/Technology*, 1994, vol. 12, 487-493 [0002]
- **ITOH** *et al.* *Cell*, vol. 66, 233-243 [0002]
- 55 • **THOMPSON**. *Science*, 1995, vol. 267, 1456-1462 [0002]
- **RAFF**. *Nature*, 1992, vol. 356, 397-400 [0003]
- 60 • **STELLER**. *Science*, 1995, vol. 267, 1445-1449 [0003]
- **SACHS** *et al.* *Blood*, 1993, vol. 82, 15 [0003]
- **WATANABE-FUKUNAGA** *et al.* *Nature*, 1992, vol. 356, 314-317 [0003]
- 65 • **GRUSS; DOWER**. *Blood*, 1995, vol. 85, 3378-3404 [0004]

ES 2 316 182 T3

- **SCHMID** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci*, 1986, vol. 83, 1881 [0004]
- **DEALTRY** *et al. Eur. J. Immunol.*, 1987, vol. 17, 689 [0004]
- 5 • **ZHENG** *et al. Nature*, 1995, vol. 377, 348-351 [0004]
- **AMAKAWA** *et al. Symposium on Programmed Cell Death. Cold Spring Harbor Laboratory*, 1995, vol. 10 [0004]
- 10 • **KRAMMERET**. *Curr. Op. Immunol.*, 1994, vol. 6, 279-289 [0005]
- **NAGATA** *et al. Science*, 1995, vol. 267, 1449-1456 [0005]
- **YONEHARA** *et al. J. Exp. Med*, 1989, vol. 169, 1747-1756 [0005]
- 15 • **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]
- 20 • **LOETSCHER** *et al. Cell*, 1990, vol. 61, 351 [0006]
- **SCHALL** *et al. Cell*, 1990, vol. 61, 361 [0006]
- **SMITH** *et al. Science*, 1990, vol. 248, 1019-1023 [0006]
- 25 • **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]
- 30 • **ALTSCHUL** *et al. Methods in Enzymology*, 1996, vol. 266, 460-480 [0022]
- **MAGE** *et al. Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. Marcel Dekker, Inc*, 1987, 79-97 [0027]
- 35 • **KOHLER; MILSTEIN**. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0028] [0125]
- **MCCAFFERTY** *et al. Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0028]
- **SAMBROOK** *et al. Molecular Cloning A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0038]
- 40 • **DIEFFENBACH** *et al. PCR Primer:A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1995 [0038]
- **CUNNINGHAM** *et al. Science*, 1989, vol. 244, 1081 [0043]
- 45 • **CREIGHTON**. *The Proteins. W.H. Freeman & Co*, [0043]
- **CHOTHIA**. *J. Mol. Biol.*, 1976, vol. 150, 1 [0043]
- 50 • **SOUTHERN** *et al. J. Molec. Appl. Genet.*, 1982, vol. 1, 327 [0052]
- **MULLIGAN** *et al. Science*, 1980, vol. 209, 1422 [0052]
- **SUGDEN** *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 410-413 [0052]
- 55 • **URLAUB** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0054]
- **STINCHCOMB** *et al. Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0056]
- 60 • **KINGSMAN** *et al. Gene*, 1979, vol. 7, 141 [0056]
- **TSCHEMPER** *et al. Gene*, 1980, vol. 10, 157 [0056]
- **JONES**. *Genetics*, 1977, vol. 85, 23-33 [0056]
- 65 • **BIANCHI** *et al. Curr. Genet.*, 1987, vol. 12, 185 [0057]
- **VAN DEN BERG**. *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 135 [0057]

ES 2 316 182 T3

- **FLEER** *et al. Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 968-975 [0057]
- **CHANG** *et al. Nature*, 1978, vol. 275, 615 [0059]
- 5 • **GOEDEL** *et al. Nature*, 1979, vol. 281, 544 [0059]
- **GOEDEL**. *Nucleic Acids Res.*, 1980, vol. 8, 4057 [0059]
- **DEBOER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 21-25 [0059]
- 10 • **SIEBENLIST** *et al. Cell*, 1980, vol. 20, 269 [0059]
- **HITZEMAN** *et al. J. Biol. Chem*, 1980, vol. 255, 2073 [0061]
- 15 • **HESS** *et al. J. Adv. Enzyme Reg*, 1968, vol. 7, 149 [0061]
- **HOLLAND**. *Biochemistry*, 1978, vol. 17, 4900 [0061]
- **FIERS** *et al. Nature*, 1978, vol. 273, 113 [0064]
- 20 • **MULLIGAN; BERG**. *Science*, 1980, vol. 209, 1422-1427 [0064]
- **PAVLAKISET**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, 7398-7402 [0064]
- 25 • **GREENAWAY** *et al. Gene*, 1982, vol. 18, 355-360 [0064]
- **GRAY** *et al. Nature*, 1982, vol. 295, 503-508 [0064]
- **REYES** *et al. Nature*, 1982, vol. 297, 598-601 [0064]
- 30 • **BERG**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, 5166-5170 [0064]
- **GORMAN** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, 6777-6781 [0064]
- 35 • **LAIMINS** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, 993 [0065]
- **LUSKY** *et al. Mol. Cell Bio.*, 1983, vol. 3, 1108 [0065]
- **BANERJI** *et al. Cell*, 1983, vol. 33, 729 [0065]
- 40 • **OSBORNE** *et al. Mol. Cell Bio.*, 1984, vol. 4, 1293 [0065]
- **YANIV**. *Nature*, 1982, vol. 297, 17-18 [0065]
- 45 • **MESSING** *et al. Nucleic Acids Res.*, 1981, vol. 9, 309 [0068]
- **MAXAM** *et al. Methods in Enzymology*, 1980, vol. 65, 499 [0068]
- **GETHING** *et al. Nature*, 1981, vol. 293, 620-625 [0070]
- 50 • **MANTEI** *et al. Nature*, 1979, vol. 281, 40-46 [0070]
- **LUCKOW** *et al. Bio/Technology*, 1988, vol. 6, 47-55 [0073]
- 55 • **MILLER** *et al. Genetic Engineering. Plenum Publishing*, 1986, vol. 8, 277-279 [0073]
- **MAEDA** *et al. Nature*, 1985, vol. 315, 592-594 [0073]
- **DEPICKERET**. *J. Mol. Appl. Gen.*, 1982, vol. 1, 561 [0074]
- 60 • Tissue Culture. *Academic Press*, 1973 [0075]
- **GRAHAM** *et al. J. Gen Virol.*, 1977, vol. 36, 59 [0075]
- 65 • **URLAUB; CHASIN**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0075]
- **MATHER**. *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, 243-251 [0075]

ES 2 316 182 T3

- **MATHER** *et al. Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1982, vol. 383, 44-68 [0075]
- **SHAW** *et al. Gene*, 1983, vol. 23, 315 [0078]
- 5 • **GRAHAM; VAN DER EB**. *Virology*, 1978, vol. 52, 456-457 [0079]
- **VAN SOLINGEN** *et al. J. Bact.*, 1977, vol. 130, 946 [0079]
- *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1979, vol. 76, 3829 [0079]
- 10 • **KEOWN** *et al. Methods in Enzymology*, 1990, vol. 185, 527-537 [0079]
- **MANSOUR** *et al. Nature*, 1988, vol. 336, 348-352 [0079]
- 15 • Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach. *IRL Press*, 1991 [0082]
- **THOMAS**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 5201-5205 [0084]
- T.E. **CREIGHTON**. Proteins: Structure and Molecular Properties. W.H. *Freeman & Co*, 1983, 79-86 [0094]
- 20 • **APLIN; WRISTON**. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 1981, 259-306 [0098]
- **HAKIMUDDIN** *et al. Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, vol. 259, 52 [0099]
- 25 • **EDGE** *et al. Anal. Biochem.*, 1981, vol. 118, 131 [0099]
- **THOTAKURA** *et al. Meth. Enzymol.*, 1987, vol. 138, 350 [0099]
- **DUSKIN** *et al. J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, 3105 [0100]
- 30 • **FIELD** *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 2159-2165
- **EVAN** *et al. Molecular and Cellular Biology*, 1985, vol. 5, 3610-3616 [0103]
- 35 • **PABORSKY** *et al. Protein Engineering*, 1990, vol. 3 (6), 547-553 [0103]
- **HOPP** *et al. BioTechnology*, 1988, vol. 6, 1204-1210 [0103]
- **MARTIN** *et al. Science*, 1992, vol. 255, 192-194 [0103]
- 40 • **SKINNERET**. *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 15163-15166 [0103]
- **LUTZ-FREYERMUTHET**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 6393-6397 [0103]
- 45 • *Remington's Pharmaceutical Sciences*. Mack Publishing Co, 1980 [0108]
- **MORDENTI** *et al. Pharmaceut. Res.*, 1991, vol. 8, 1351 [0110]
- Autologous Bone Marrow Transplantation: Proceedings of the Third International Symposium. 1987 [0118]
- 50 • **THOMAS; CAPECCHI**. *Cell*, 1987, vol. 51, 503 [0122]
- **LI** *et al. Cell*, 1992, vol. 69, 915 [0122]
- 55 • **BRADLEY**. Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. *IRL*, 1987, 113-152 [0122]
- **GODING**. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. *Academic Press*, 1986, 59-103 [0126]
- **KOZBOR**. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0127]
- 60 • **BRODEUR** *et al. Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*. Marcel Dekker, Inc, 1987, 51-
63 [0127]
- 65 • **MUNSON; RODBARD**. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0128]
- **JONES** *et al. Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0136] [0137]
- **REICHMANN** *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0136]

ES 2 316 182 T3

- **PRESTA.** *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0136]
- **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0137]
- 5 • **VERHOEYEN et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0137]
- **QUEEN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1989, vol. 86, 10029-10033 [0137]
- **SIMS et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2296 [0138]
- 10 • **CHOTHIA; LESK.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901 [0138]
- **CARTER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285 [0138]
- 15 • **PRESTA et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2623 [0138]
- **JAKOBOVITS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551-255 [0140]
- **JAKOBOVITS et al.** *Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0140]
- 20 • **BRUGGEMANN et al.** *Year in Immuno.*, 1993, vol. 7, 33 [0140]
- **HOOGENBOOM; WINTER.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0140]
- 25 • **MARKS et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 58 [0140]
- **COLE et al.** *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy.* Alan R. Liss, 1985, 77 [0140]
- **BOEMER et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0140]
- 30 • **MILSTEIN; CUELLO.** *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0142]
- **TRAUNECKER et al.** *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0142]
- 35 • **SURESH et al.** *Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0143]
- **ZOLA.** *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques.* CRC Press, Inc, 1987, 147-158 [0145]
- **HUNTER et al.** *Nature*, 1962, vol. 144, 945 [0145]
- 40 • **DAVID et al.** *Biochemistry*, 1974, vol. 13, 1014 [0145]
- **PAIN et al.** *J. Immunol. Meth.*, 1981, vol. 40, 219 [0145]
- 45 • **NYGREN.** *J. Histochem. and Cytochem.*, 1982, vol. 30, 407 [0145]
- **KOZAK.** *J. Cell. Biol.*, 1991, vol. 115, 887-903 [0154]
- **ECK et al.** *J. Bio. Chem.*, 1989, vol. 264, 17595-17605 [0156]
- 50 • **ECK et al.** *J. Bio. Chem.*, 1992, vol. 267, 219-2122
- **SCHALL et al.** *Cell*, 1990, vol. 61, 361-370 [0157]
- 55 • **SUVA et al.** *Science*, 1987, vol. 237, 893-896 [0157]
- **EVAN et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 3610-3616 [0157]
- **ZOLLER et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1982, vol. 10, 6487-6496 [0157]
- 60 • **LASKY et al.** *DNA*, 1984, vol. 3, 23-29 [0161]
- **PENNICA et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995, vol. 92, 1142-1146 [0161]
- 65 • **PABORSKY et al.** *Protein Engineering*, 1990, vol. 3, 547-553 [0161]
- **LASKY et al.** *Science*, 1986, vol. 233, 209-212 [0161]

ES 2 316 182 T3

- **O'REILLEY** *et al.* *Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual*. Oxford University Press, 1994 [0165]
- **RUPERT** *et al.* *Nature*, 1993, vol. 362, 175-179 [0166]
- 5 • **YONEHARA** *et al.* *J. Exp. Med.*, 1989, vol. 169, 1747-1756 [0169]
- **DARZYNKIEWICZ** *et al.* *Methods in Cell Biol.*, 1994, vol. 41, 15-38 [0171]
- **FADOK** *et al.* *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 2207-2214 [0171]
- 10 • **KOOPMAN** *et al.* *Blood*, 1994, vol. 84, 1415-1420 [0171]
- **MOORE** *et al.* *Cytotechnology*, 1995, vol. 17, 1-11 [0174]
- 15 • **COHEN**. *Advances in Immunol.*, 1991, vol. 50, 55-85 [0174]
- **LENARDO** *et al.* *Nature*, 1991, vol. 353, 858-861 [0184]
- **ASHKENAZI** *et al.* *Methods*, 1995, vol. 8, 104-115 [0186]
- 20 • **BYM** *et al.* *Nature*, 1990, vol. 344, 667-670 [0186]
- **WHITE** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995, vol. 92, 5520-5524 [0191]
- 25 • **MARSTERS** *et al.* *Current Biology*, 1996, vol. 6, 750-752 [0200] [0200]
- **CHINNAIYAN** *et al.* *Cell*, 1995, vol. 81, 505-512 [0200]
- **HSU** *et al.* *Cell*, 1996, vol. 84, 299-308 [0200] [0201]
- 30 • **SMITH** *et al.* *Science*, 1988, vol. 238, 1704-1707 [0201]
- **LASKOV** *et al.* *Cell. Immunol.*, 1980, vol. 55, 251 [0203]
- 35 • **KIM** *et al.* *J. Immunol. Meth.*, 1992, vol. 156, 9-17 [0203]
- **GRAY** *et al.* *Nature*, 1984, vol. 312, 721-724 [0211]
- **PENNICA** *et al.* *Nature*, 1984, vol. 312, 724-729 [0211]
- 40 • **AGGARWAL** *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, 2345-2354 [0211]
- **CHUNTHARAPAI** *et al.* *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 1783-1789 [0218]
- 45 • **DEBOER** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1983, vol. 80, 21-25 [0227]
- **SCHOLTISSEK** *et al.* *Nucl. Acids Research*, 1987, vol. 15, 3185 [0227]
- **MANIATIS** *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. vol. 1, 1.74-1.84 [0227]
- 50 • **KELLEY** *et al.* *Biochemistry*, 1995, vol. 34, 10383-10392 [0234]
- **CUNNINGHAM; WELLS**. *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0234]
- 55 • **KUNKEL, T.A.** *et al.* *Methods in Enzymology*, 1987, vol. 154, 367-382 [0235]
- **SANGER, F.** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1977, vol. 74, 5463-5467 [0235]
- **PAN** *et al.* *Science*, 1997, vol. 276, 111-113 [0243]
- 60 • **SHERIDAN** *et al.* *Science*, 1997, vol. 277, 818-821 [0243]
- **MARSTERS** *et al.* *Current Biology*, 1997, vol. 7, 1003-1006 [0243]
- 65 • **SIMONET** *et al.* *Cell*, 1997, vol. 89, 309-319 [0243]
- **ASHKENAZI** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1991, vol. 88, 10535-10539 [0243]

ES 2 316 182 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido ligando Apo-2 aislado que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80% con los aminoácidos 91 a 281 de la figura 1A (SEC ID nº 1), en el que el polipéptido comprende una sustitución por un residuo alanina del residuo ácido aspártico en una o más de las posiciones 203, 218 ó 269, lo que incrementa la actividad inductora de apoptosis del polipéptido ligando Apo-2 en comparación con el ligando Apo-2 consistente de los aminoácidos 91 a 281 de la SEC ID nº 1 en un ensayo *in vitro* utilizando células de carcinoma pulmonar humano SK MES-1 (ATCC nº HTB58).
- 10 2. Polipéptido ligando Apo-2 aislado según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido presenta un residuo alanina en sustitución de un residuo ácido aspártico en la posición 203.
- 15 3. Polipéptido ligando Apo-2 aislado según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido presenta un residuo alanina en sustitución del residuo ácido aspártico en la posición 218.
- 20 4. Polipéptido ligando Apo-2 aislado según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido presenta un residuo alanina en sustitución del residuo ácido aspártico en la posición 269.
- 25 5. Polipéptido ligando Apo-2 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho polipéptido variante comprende los residuos aminoácidos 92 a 281 de la figura 1A (SEC ID nº 1) con la sustitución por un residuo alanina de un residuo ácido aspártico en una o más de las posiciones 203, 218 ó 269.
- 30 6. Polipéptido ligando Apo-2 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho polipéptido variante comprende los residuos aminoácidos 91 a 281 de la figura 1A (SEC ID nº 1) con la sustitución por un residuo alanina de un residuo ácido aspártico en una o más de las posiciones 203, 218 ó 269.
- 35 7. Polipéptido ligando Apo-2 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho polipéptido variante comprende los residuos aminoácidos 114 a 281 de la figura 1A (SEC ID nº 1) con la sustitución por un residuo alanina de un residuo ácido aspártico en una o más de las posiciones 203, 218 ó 269.
- 40 8. Polipéptido ligando Apo-2 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho polipéptido se encuentra unido a un polímero no proteico.
- 45 9. Polipéptido ligando Apo-2 según la reivindicación 8, en el que dicho polímero no proteico es polietilenglicol.
- 50 10. Polipéptido quimérico que comprende el polipéptido ligando Apo-2 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 fusionado con una secuencia polipeptídica heteróloga.
- 55 11. Ácido nucleico aislado que comprende ADN codificante del polipéptido ligando Apo-2 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 60 12. Vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 11.
- 65 13. Célula huésped aislada que comprende el vector según la reivindicación 12.
14. Célula huésped según la reivindicación 13, en la que dicha célula huésped es una célula CHO.
15. Célula huésped según la reivindicación 13, en la que dicha célula huésped es una célula de levadura.
- 50 16. Célula huésped según la reivindicación 13, en la que dicha célula huésped es una célula de levadura
- 55 17. Procedimiento para producir polipéptido ligando Apo-2 que comprende cultivar la célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, y recuperar el polipéptido ligando Apo-2 a partir del cultivo de células huésped.
- 60 18. Composición que comprende el polipéptido ligando Apo-2 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un portador.
- 65 19. Composición según la reivindicación 18, en la que la composición resulta útil para estimular la apoptosis de las células de mamífero.
20. Utilización de un polipéptido ligando Apo-2 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la preparación de un medicamento para inducir la apoptosis en células de cáncer de mamífero.
- 65 21. Utilización según la reivindicación 20, en la que dicho medicamento se administra mediante infusión en un mamífero que se ha diagnosticado que presenta cáncer.

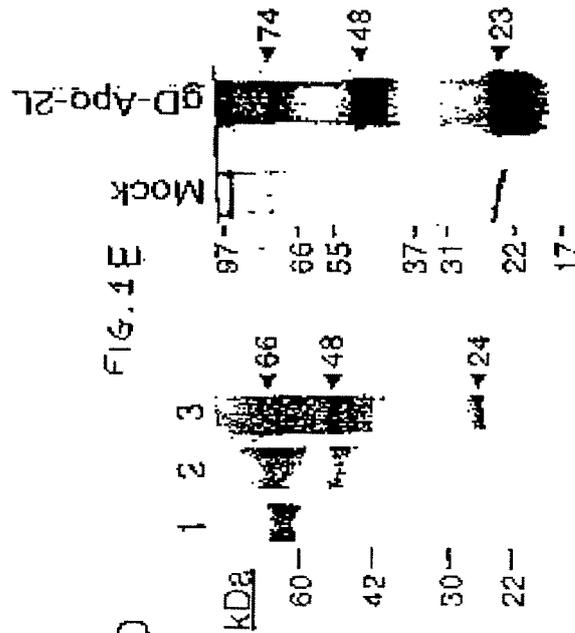


FIG. 1E

FIG. 1D

FIG. 1C

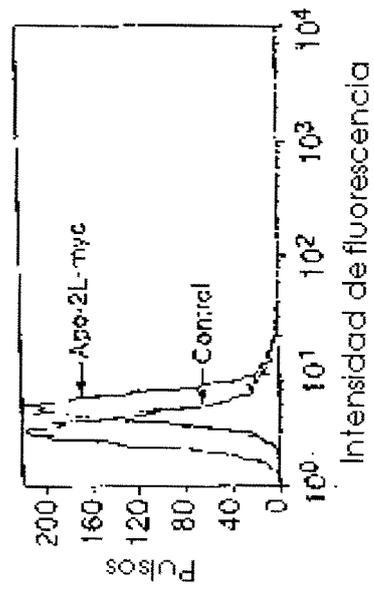


FIG. 2A células 9D

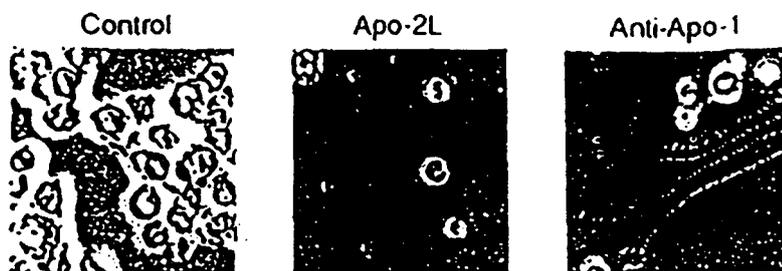


FIG. 2B células 9D

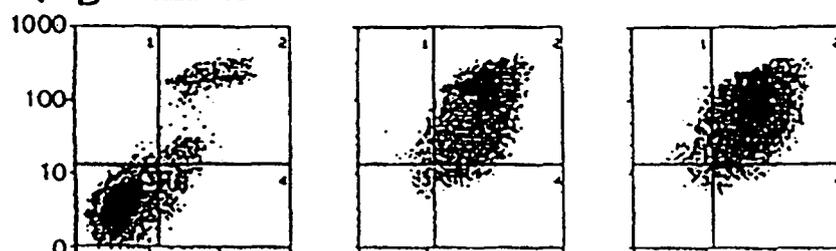


FIG. 2C células Raji



FIG. 2D células Jurkat

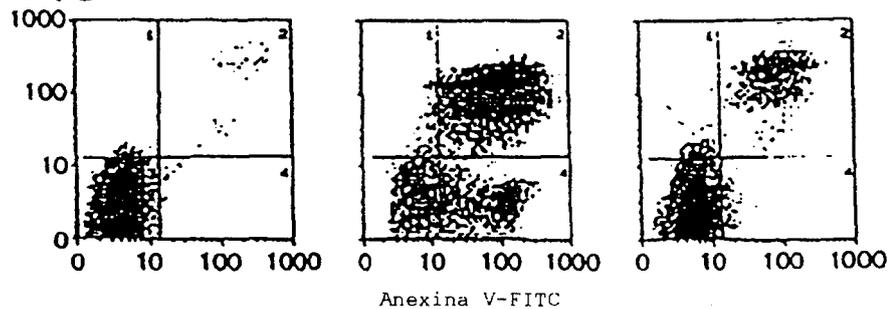


FIG. 2E



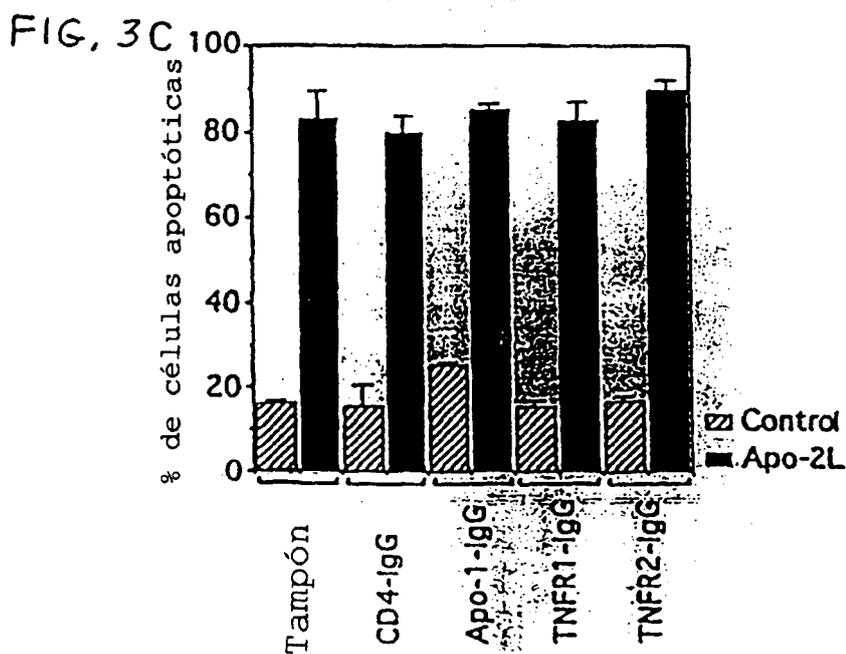
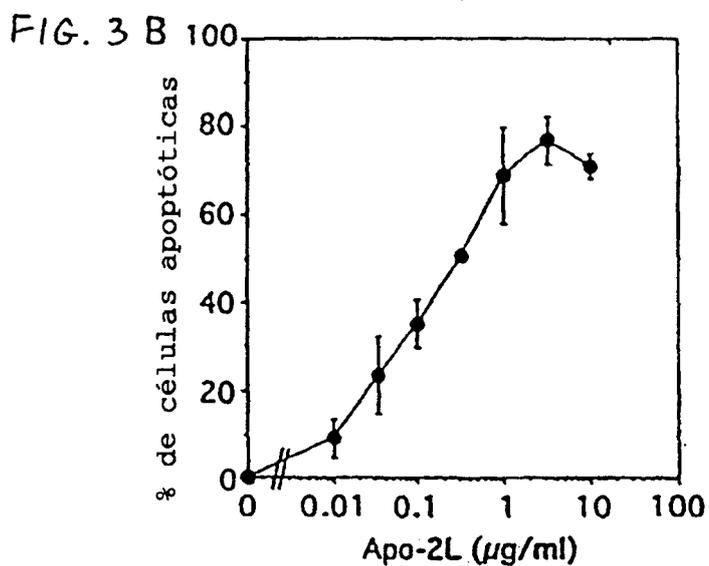
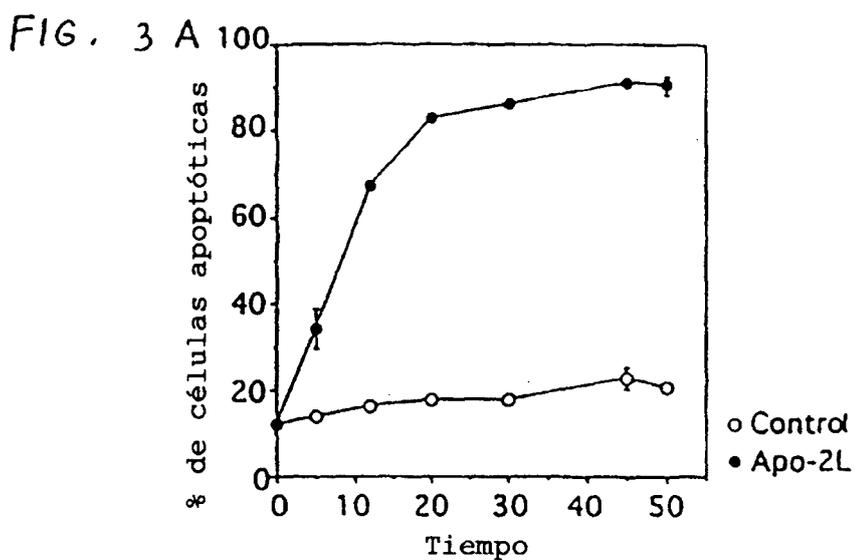


FIG. 4

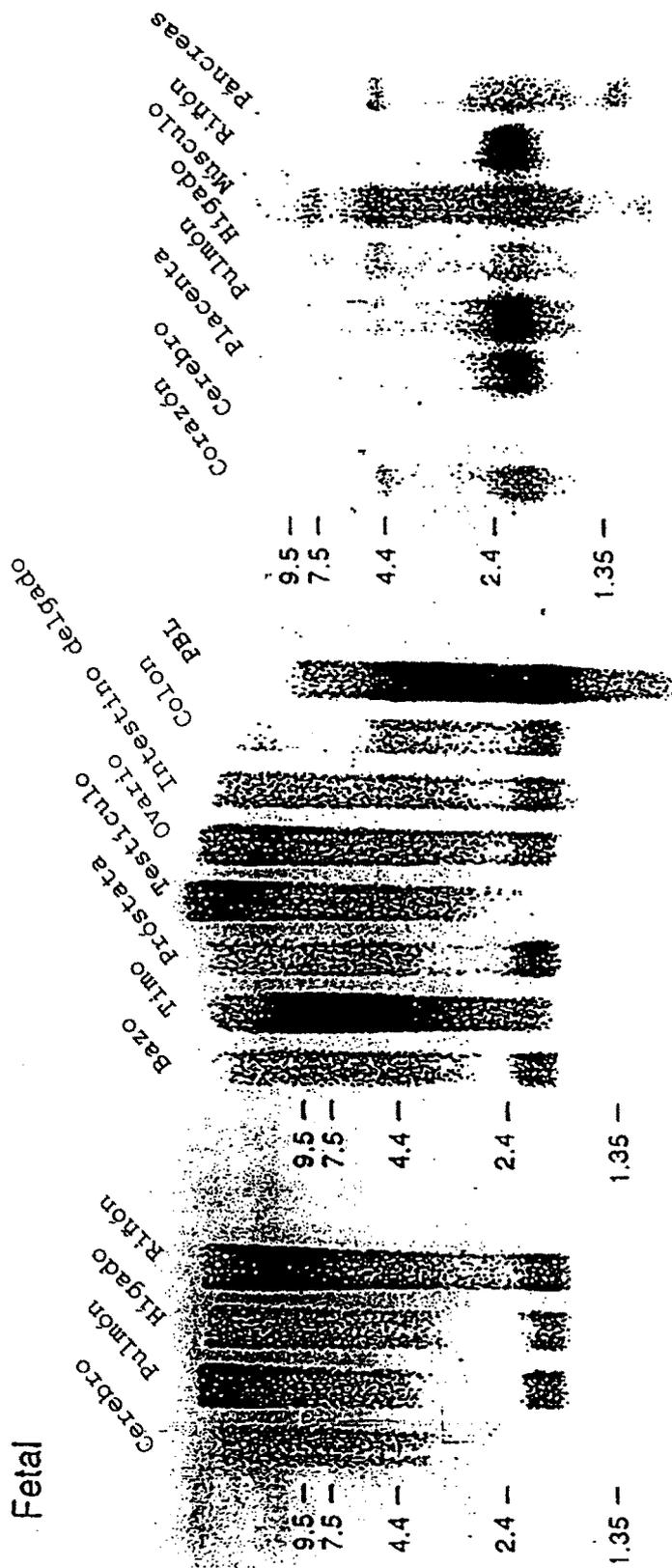


Fig. 5

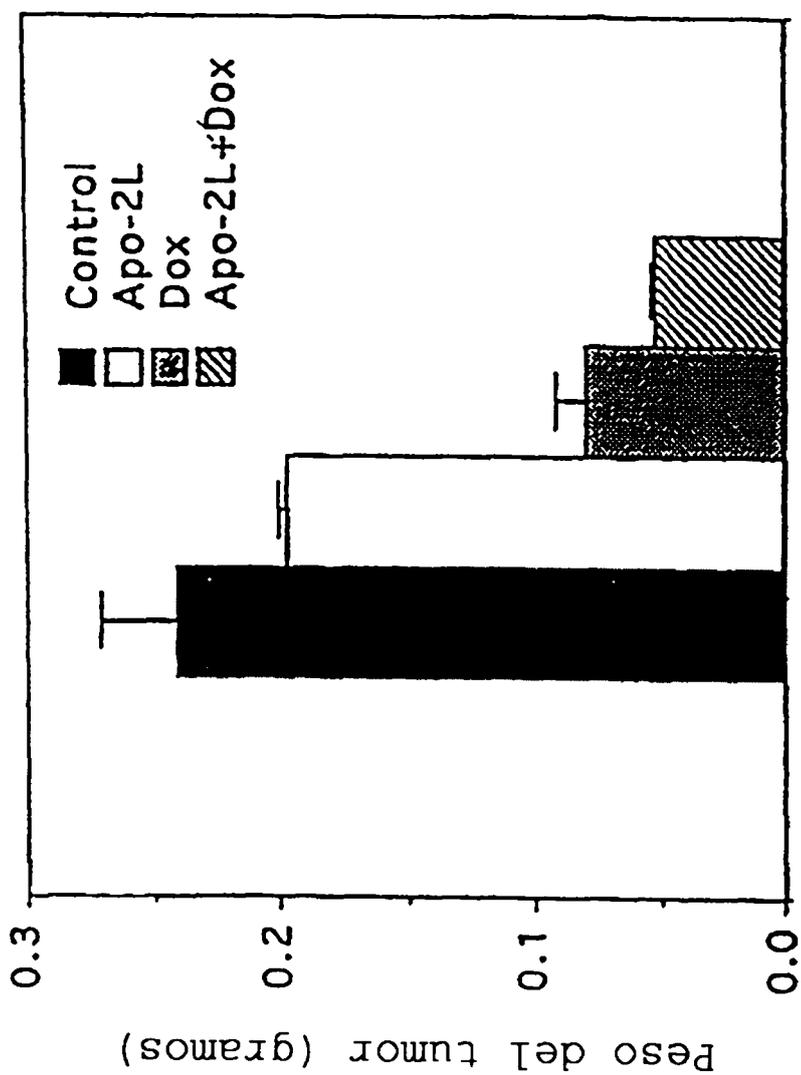


Fig. 6

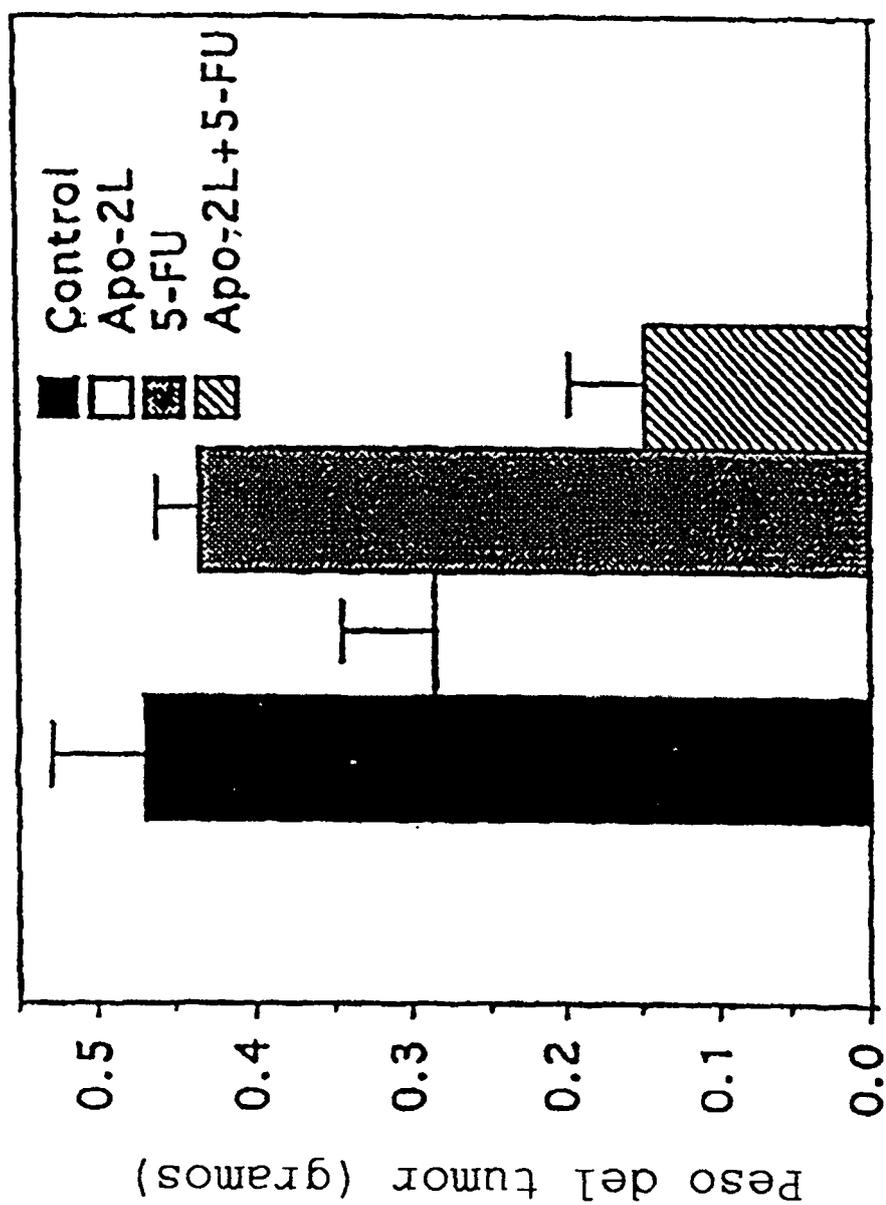


Fig. 7

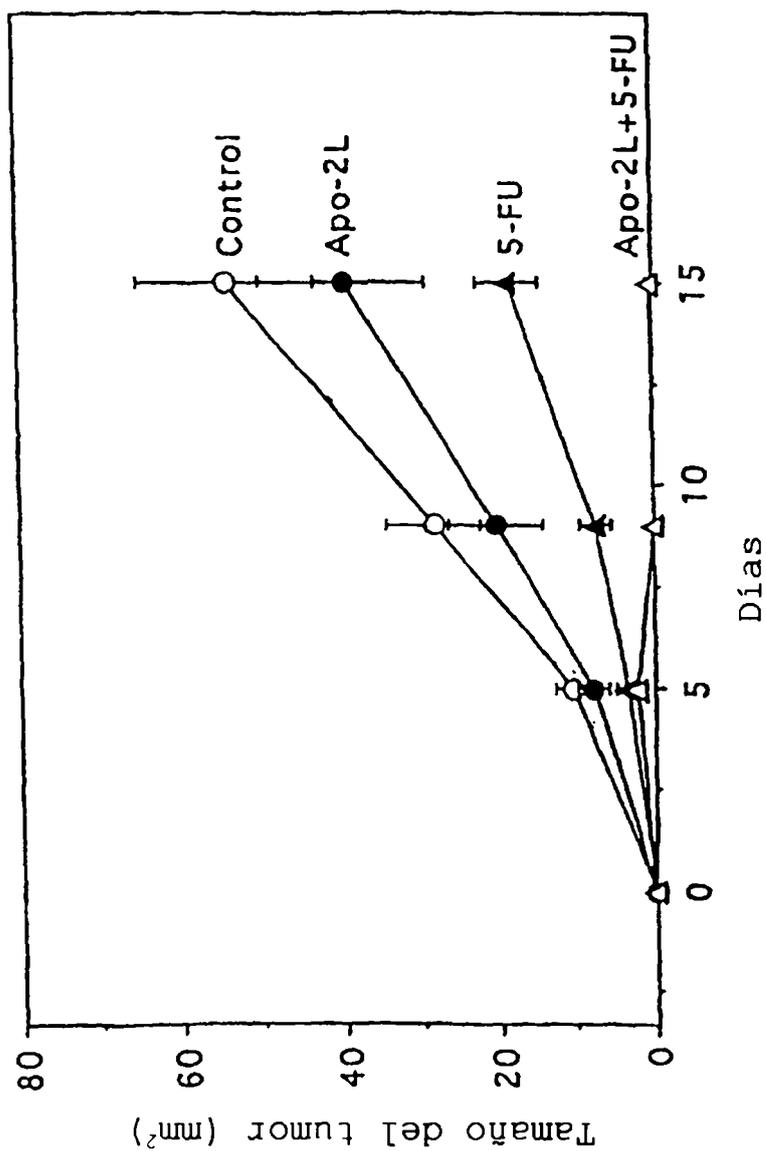


Fig. 8

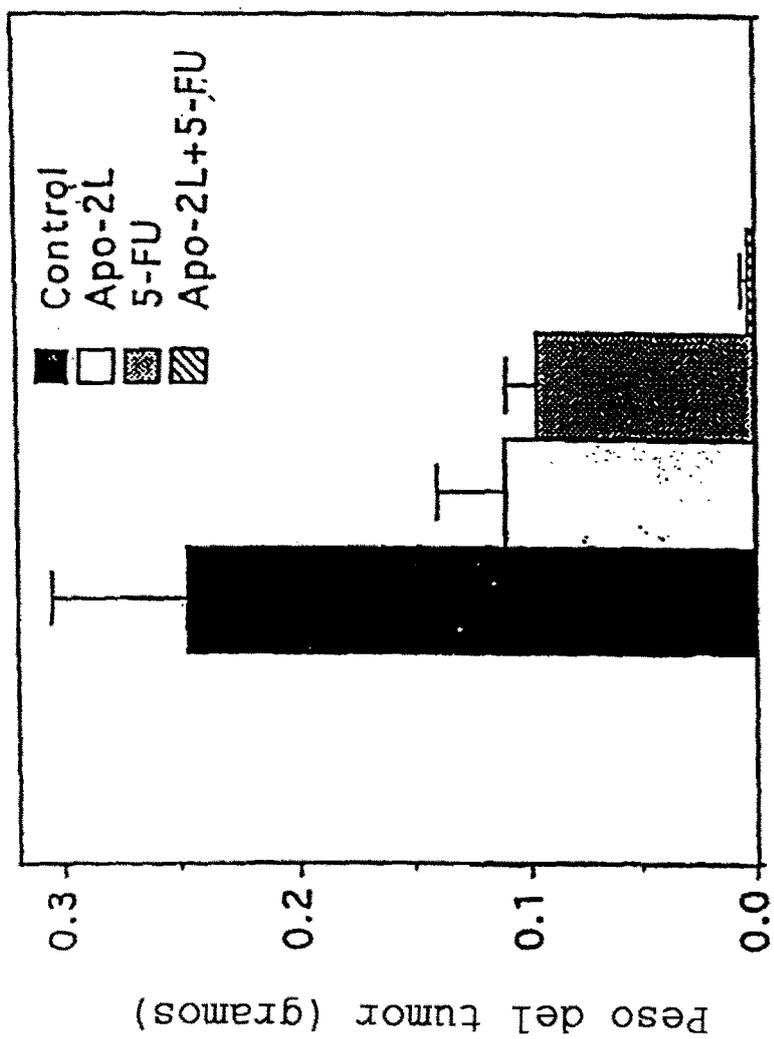


Fig. 9

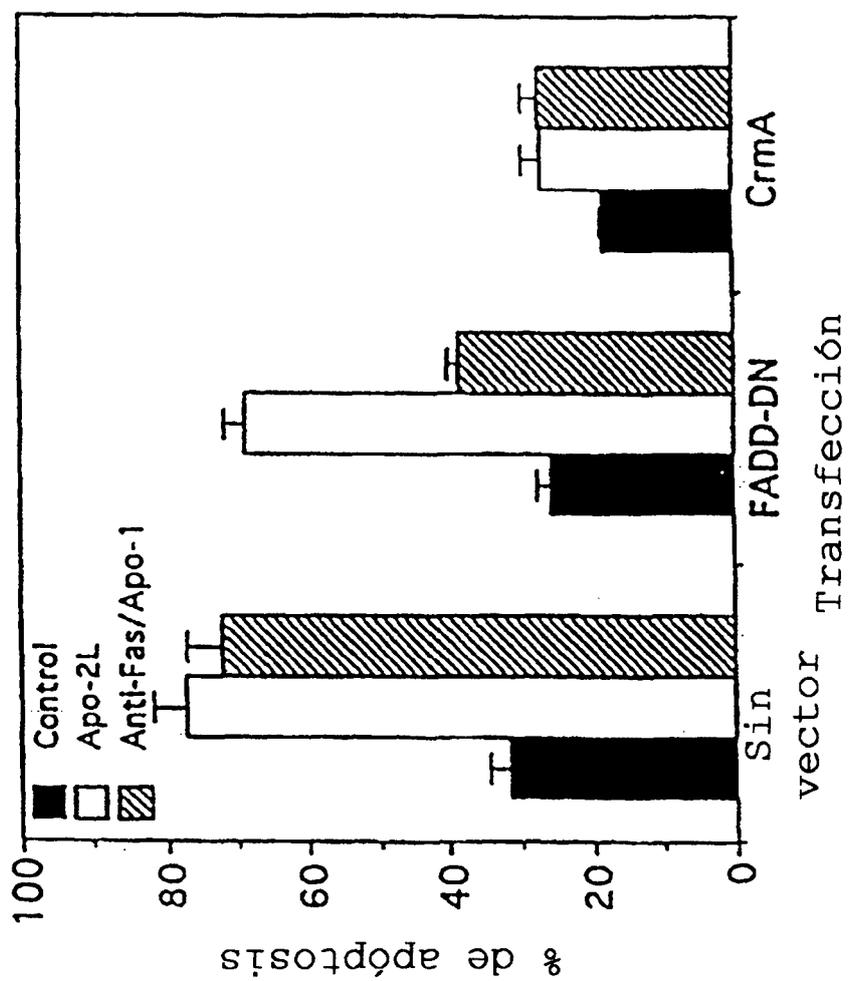


Fig. 10

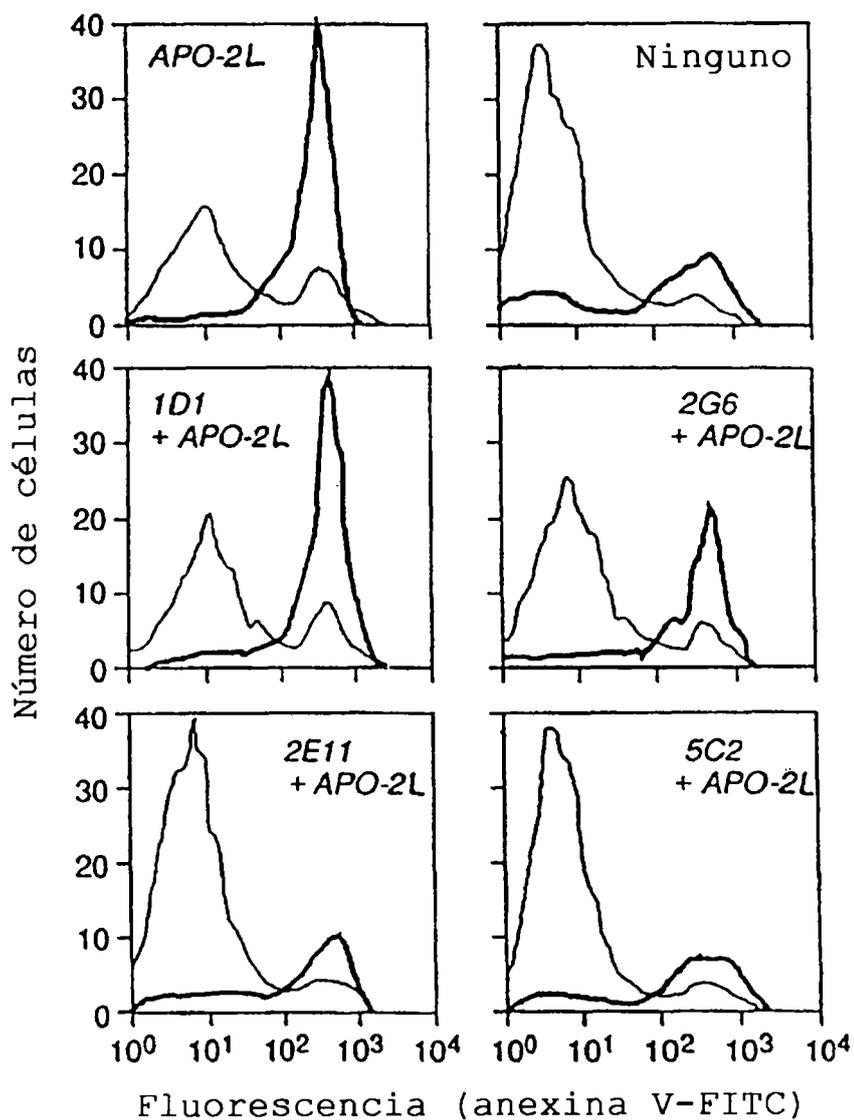


Fig. 11

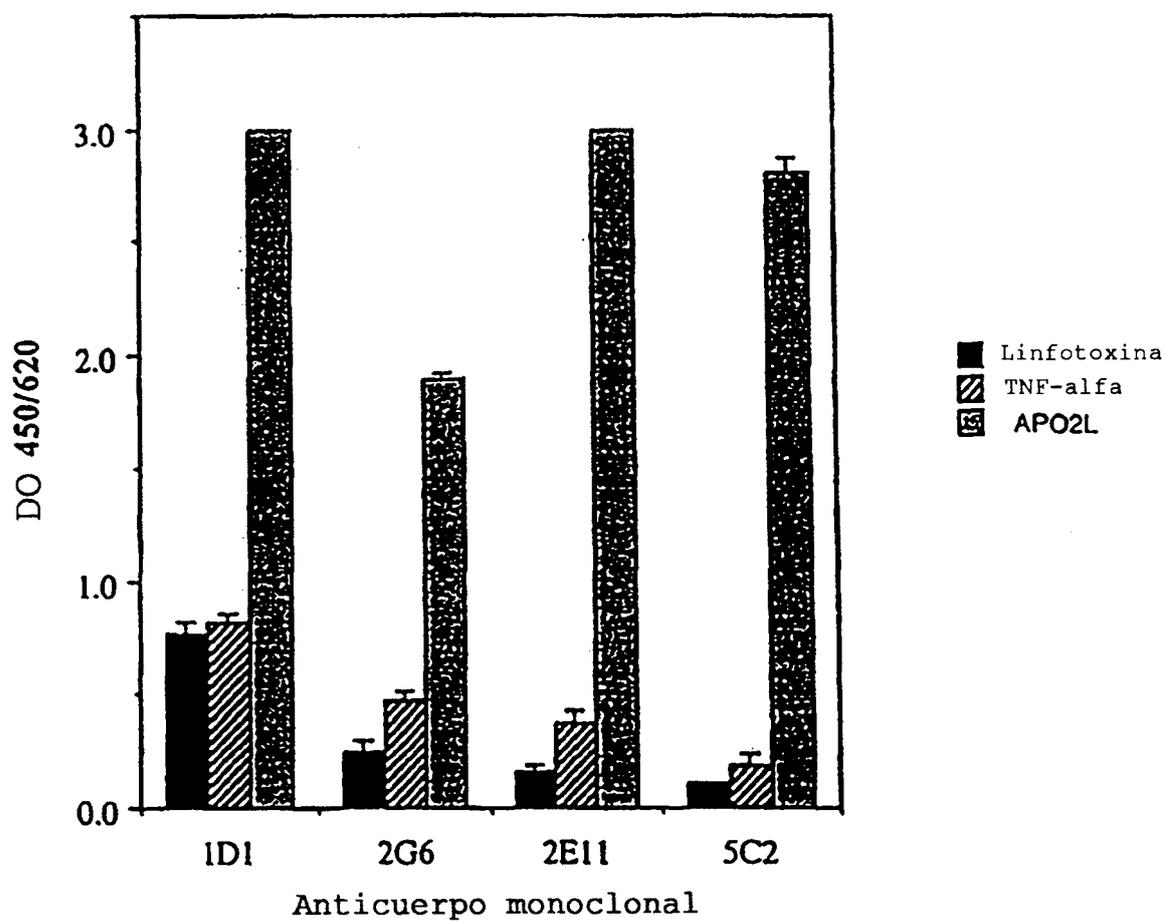


Fig. 12

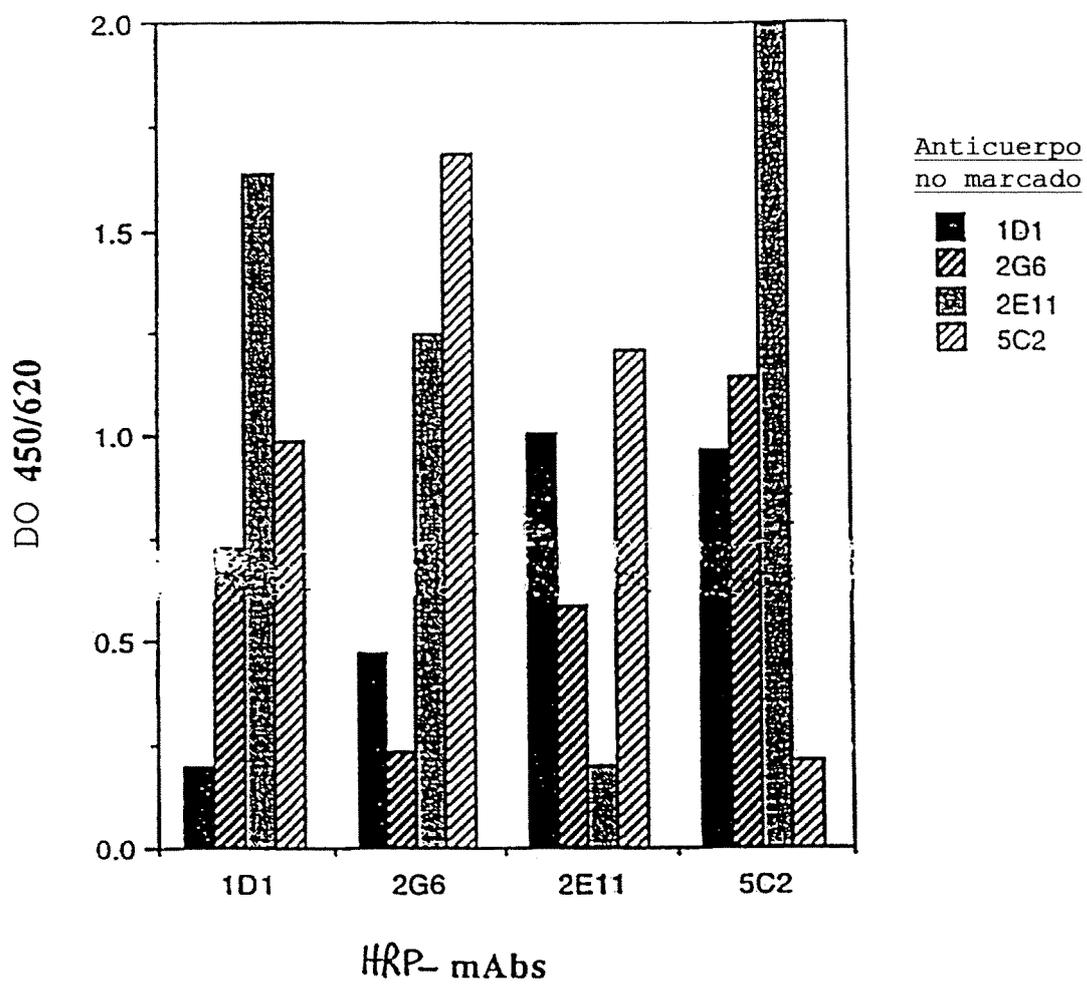


Fig. 13

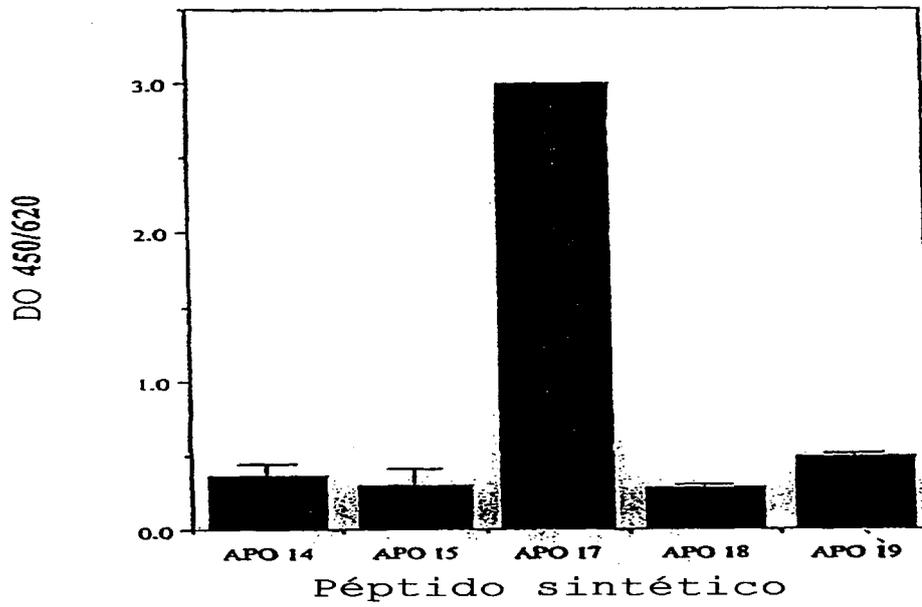
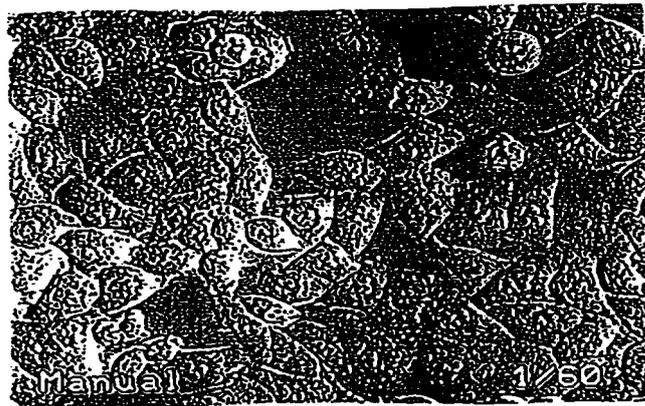
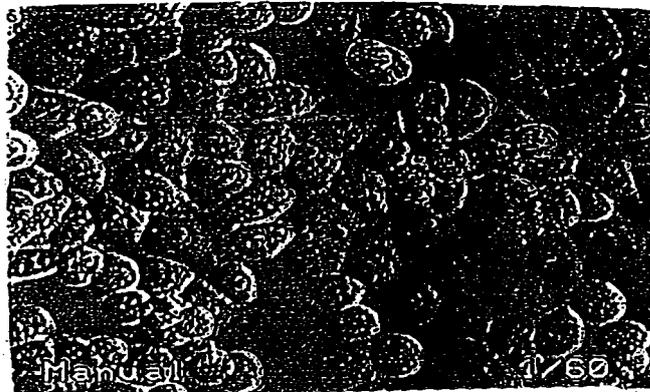


Fig. 14A



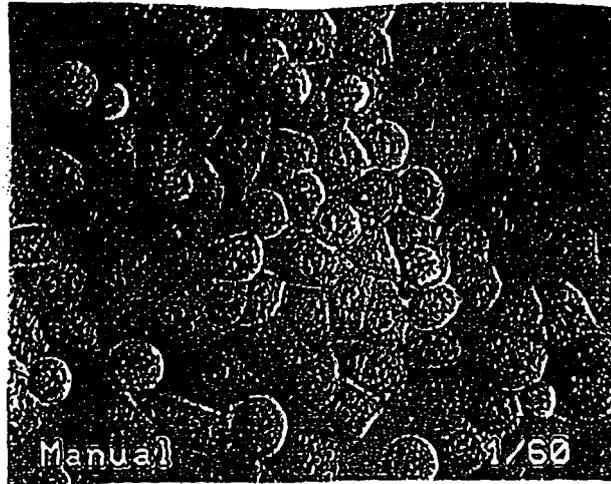
Medio
no
condicio-
nado

Fig. 14B



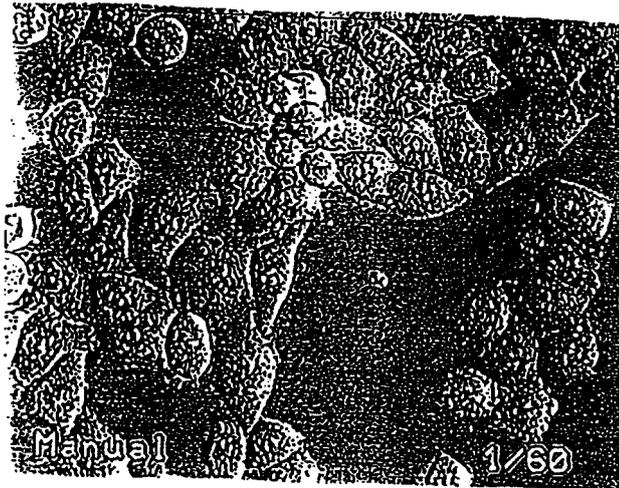
1/10

Fig. 14C



1:20

Fig. 14D



1:40

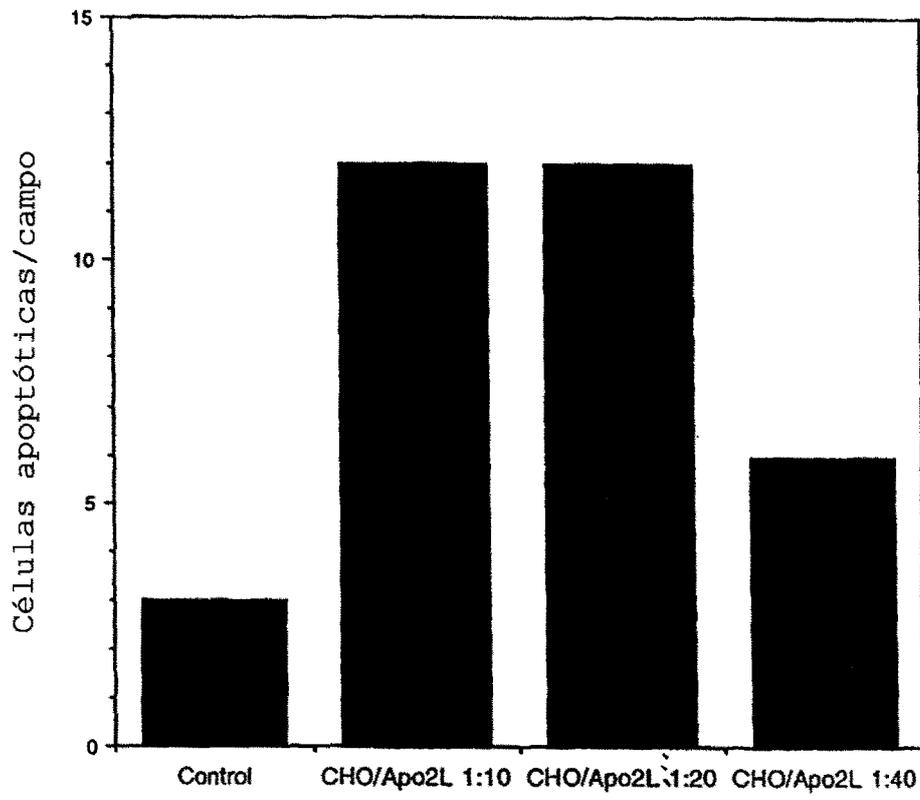


Fig. 14E

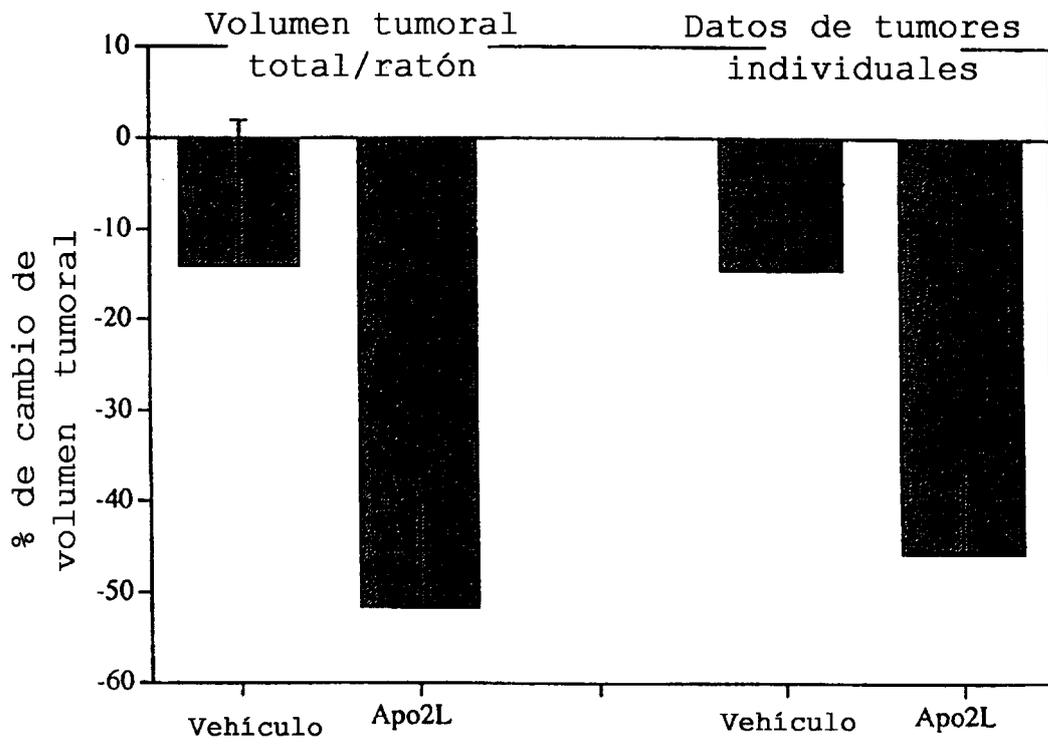


Fig. 15

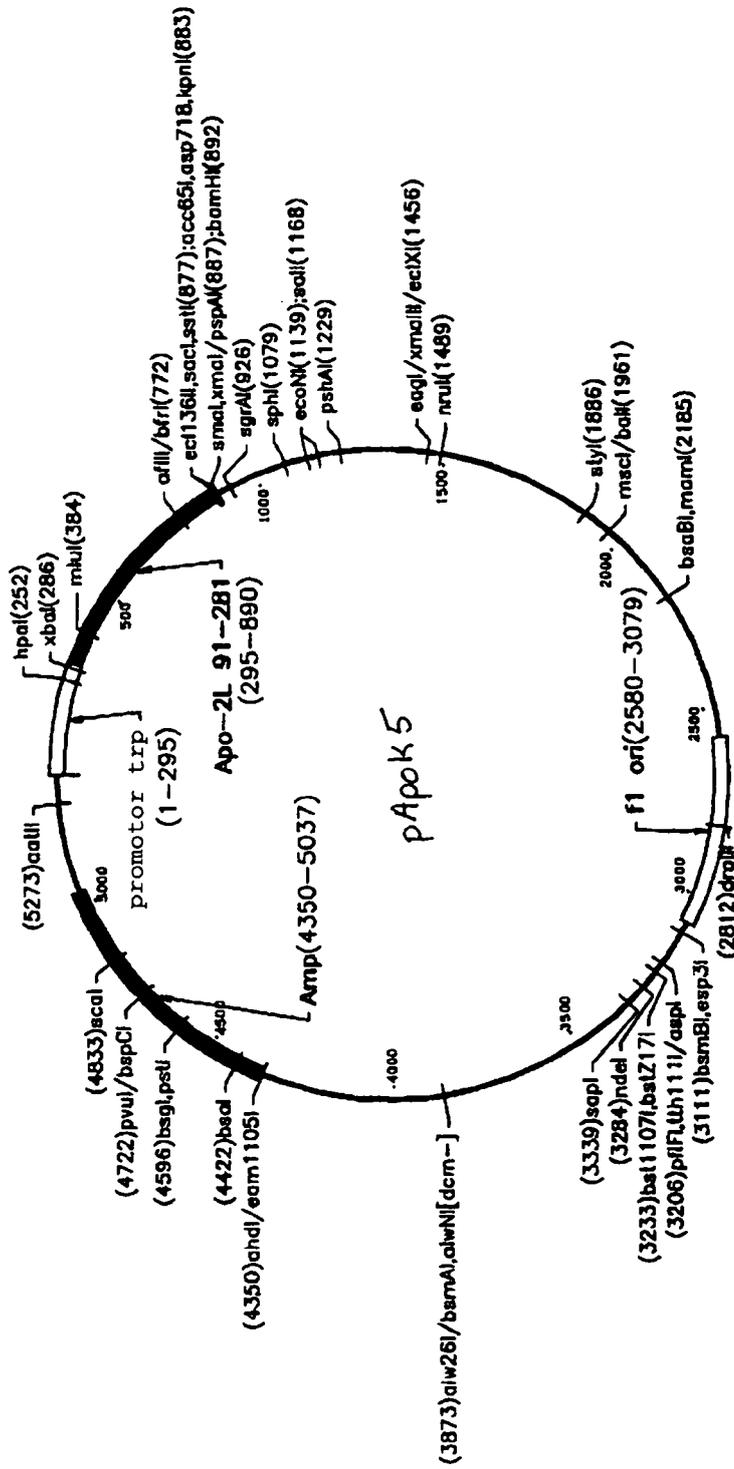
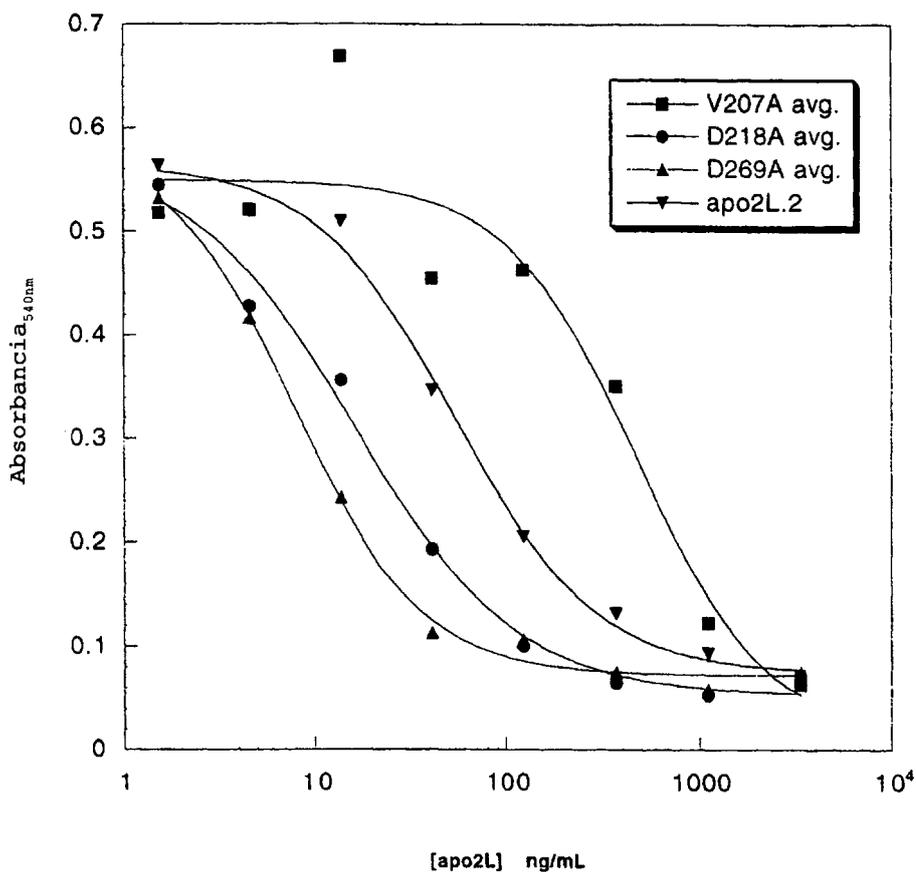


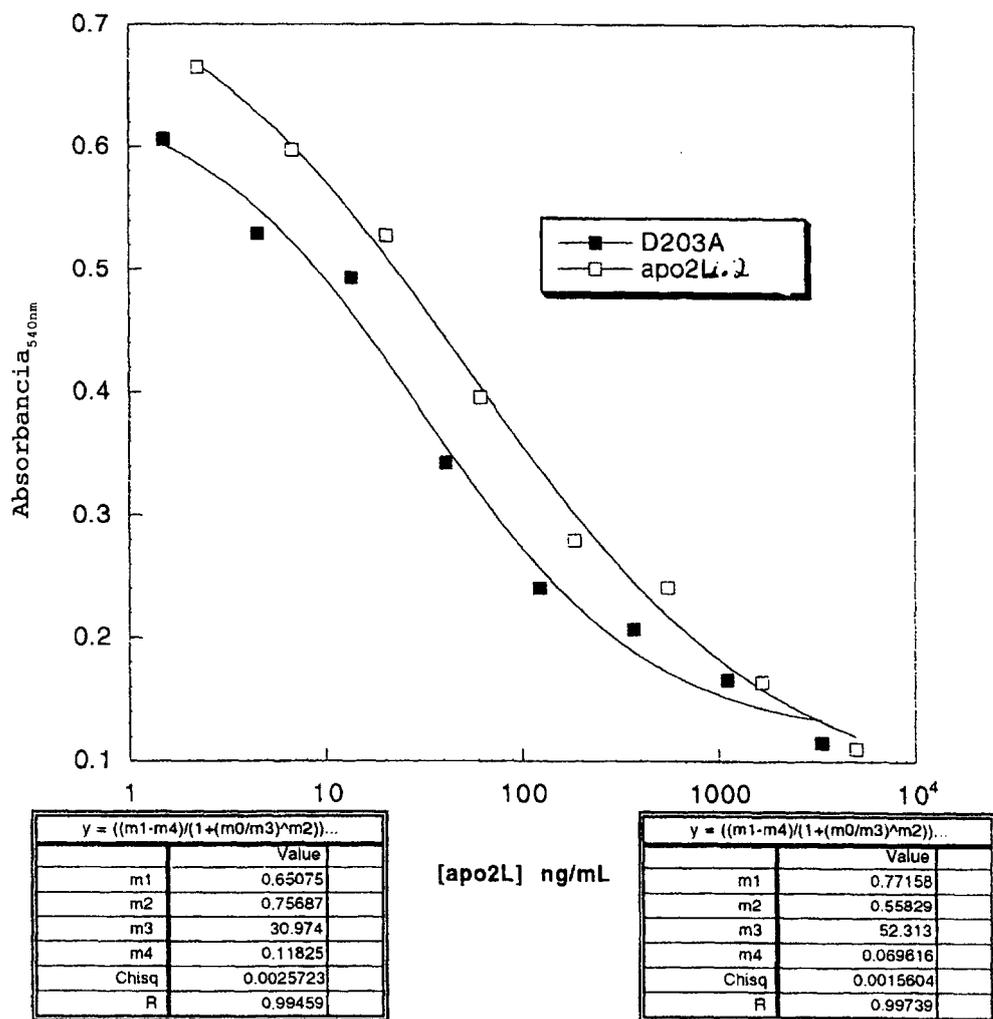
Fig. 16

Fig. 17



V207A		D218A		D269A		apo2L.2	
	Value		Value		Value		Value
m1	0.54934	m1	0.5728	m1	0.58458	m1	0.56479
m2	1.2961	m2	1.0255	m2	1.317	m2	1.1882
m3	476.73	m3	15.958	m3	7.9059	m3	54.188
m4	0.013109	m4	0.053001	m4	0.072343	m4	0.074132
Chisq	0.023848	Chisq	0.0022909	Chisq	0.00080486	Chisq	0.0016377
R	0.95939	R	0.99551	R	0.99822	R	0.99726

Fig. 18



Datos de K_D (nM) BIAcore				
	<i>DR4</i>	<i>DR5</i>	<i>dcR2</i>	<i>opgR</i>
D203A	4.4	3.4	1.2	2.5
D218A	3.7	6.2	2.5	2.1
D269A	4.9	1.7	2.0	3.8
apo2L.2	2.9	3.2	2.2	9.1

Fig. 19

ES 2 316 182 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Genentech, Inc.
 Ashkenazi, Avi J.
 Kelley, Robert F.
 O'Connell, Mark T.
 Pitti, Robert M.
 Schwall, Ralph H.

10 <120> Ligando Apo-2

<130> P0978P4PCT

15 <141> 1999-01-15

<150> US 09/060.533

20 <151> 1998-04-15

<160> 8

<210> 1

25 <211> 281

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 1

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

35 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

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

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

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

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

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

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

65 Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys

ES 2 316 182 T3

					140					145					150
5	Ile	Asn	Ser	Trp	Glu	Ser	Ser	Arg	Ser	Gly	His	Ser	Phe	Leu	Ser
					155					160					165
10	Asn	Leu	His	Leu	Arg	Asn	Gly	Glu	Leu	Val	Ile	His	Glu	Lys	Gly
					170					175					180
15	Phe	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Gln	Thr	Tyr	Phe	Arg	Phe	Gln	Glu	Glu
					185					190					195
20	Ile	Lys	Glu	Asn	Thr	Lys	Asn	Asp	Lys	Gln	Met	Val	Gln	Tyr	Ile
					200					205					210
25	Tyr	Lys	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	Pro	Ile	Leu	Leu	Met	Lys	Ser
					215					220					225
30	Ala	Arg	Asn	Ser	Cys	Trp	Ser	Lys	Asp	Ala	Glu	Tyr	Gly	Leu	Tyr
					230					235					240
35	Ser	Ile	Tyr	Gln	Gly	Gly	Ile	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Asp	Arg
					245					250					255
40	Ile	Phe	Val	Ser	Val	Thr	Asn	Glu	His	Leu	Ile	Asp	Met	Asp	His
					260					265					270
45	Glu	Ala	Ser	Phe	Phe	Gly	Ala	Phe	Leu	Val	Gly				
					275					280	281				

<210> 2

<211> 1042

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

45

50

55

60

65

ES 2 316 182 T3

<400> 2

5 tttcctcact gactataaaa gaatagagaa ggaagggctt cagtgaccgg 50
ctgcctggct gacttacagc agtcagactc tgacaggatc atggctatga 100
10 tggaggtcca ggggggacce agcctgggac agacctgctg gctgatcgtg 150
atcttcacag tgctcctgca gtctctctgt gtggctgtaa cttacgtgta 200
15 ctttaccaac gagctgaagc agatgcagga caagtactcc aaaagtggca 250
ttgcttgttt cttaaaagaa gatgacagtt attgggacce caatgacgaa 300
20 gagagtatga acagcccctg ctggcaagtc aagtggcaac tccgtcagct 350
cgttagaaag atgattttga gaacctctga ggaaaccatt tctacagttc 400
25 aagaaaagca acaaaatatt tctcccctag tgagagaaag aggtcctcag 450
agagtagcag ctcacataac tgggaccaga ggaagaagca acacattgtc 500
30 ttctccaaac tccaagaatg aaaaggctct gggccgcaaa ataaactcct 550
gggaatcadc aaggagtggg cattcattcc tgagcaactt gcacttgagg 600
35 aatggtgaac tggatcctca tgaaaaaggg ttttactaca tctattecca 650
40
aacatacttt cgatttcagg aggaataaaa agaaaacaca aagaacgaca 700
45 aacaaatggg ccaatatatt taaaaataca caagttatcc tgaccctata 750
ttgttgatga aaagtgctag aaatagttgt tggctctaaag atgcagaata 800
50 tggactctat tccatctatc aagggggaat atttgagctt aaggaaaatg 850
acagaatfff tgtttctgta acaaatgagc acttgataga catggaccat 900
55 gaagccagtt ttttcggggc ctttttagtt ggctaactga cctggaaaga 950
aaaagcaata acctcaaagt gactattcag ttttcaggat gatacactat 1000
60 gaagatgfff caaaaaatct gaccaaaca acaaacaga aa 1042

<210> 3

65 <211> 390

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 316 182 T3

<400> 3

5 gggaccccaa tgacgaagag agtatgaaca gcccctgctg gcaagtcaag 50
 tggcaactcc gtcagctcgt tagaaagatg attttgagaa cctctgagga 100
10 aaccatttct acagttcaag aaaagcaaca aaatatttct cccctagtga 150
 gagaaagagg tcctcagaga gtagcagctc acataactgg gaccagagga 200
15 agaagcaaca cattgtcttc tccaaactcc aagaatgaaa aggctctggg 250
 ccgcaaaata aactcctggg aatcatcaag gagtgggcat tcattcctga 300
20 gcaacttgca cttgaggaat ggtgaactgg tcatccatga aaaagggttt 350
 tactacatct attcccaaac atactttcga tttcaagagg 390

25 <210> 4

<211> 60

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> Secuencia artificial

35 <222> 1-60

<223> La secuencia es sintética

<400> 4

40 tgacgaagag agtatgaaca gcccctgctg gcaagtcaag tggcaactcc 50
 gtcagctcgt 60

<210> 5

<211> 60

50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <221> Secuencia artificial

<222> 1-60

<223> La secuencia es sintética

60 <400> 5

 ggtgaactgg tcatccatga aaaagggttt tactacatct attcccaaac 50
65 atactttcga 60

ES 2 316 182 T3

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> Secuencia artificial
10 <222> 1-13
<223>

15 <400> 6

Ser Met Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
1 5 10 13

20 <210> 7
<211> 27
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> Secuencia artificial
30 <222> 1-27
<223>

35 <400> 7

Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Ala Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn
1 5 10 15

40 **Arg Phe Arg Gly Lys Asp Leu Pro Val Leu Asp Gln**
20 25 27

45 <210> 8
<211> 24
<212> PRT
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> Secuencia artificial
55 <222> 124
<223>

60 <400> 8

Met Gly His Ser Ser Gly
1 5 10 15

65 **His Ile Asp Asp Asp Asp Lys His Met**
20 24