



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 191**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 15/09</b> (2006.01)	<b>C12N 15/17</b> (2006.01)
<b>C12N 15/63</b> (2006.01)	<b>C07H 21/04</b> (2006.01)
<b>C07K 1/14</b> (2006.01)	<b>C07K 14/52</b> (2006.01)
<b>C07K 16/24</b> (2006.01)	<b>C12P 21/08</b> (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05077545 .1**

96 Fecha de presentación : **25.06.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **1666591**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **Citoquina que induce apoptosis.**

30 Prioridad: **29.06.1995 US 496632**  
**01.11.1995 US 548368**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.06.2011**

73 Titular/es: **Immunex Corporation**  
**One Amgen Center Drive**  
**Thousand Oaks, California 91320-1799, US**

72 Inventor/es: **Wiley, Steven R. y**  
**Goodwin, Raymond G.**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 362 191 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

Citoquina que induce apoptosis

Antecedentes de la invención

5 La muerte celular programada conocida como apoptosis es distinta de la muerte celular debida a necrosis. La apoptosis se produce en embriogénesis, metamorfosis, atrofia de tejido con dependencia endocrina, recambio normal de tejido, y muerte de timocitos inmunológicos (inducida a través de su complejo antígeno-receptor o por medio de glucocorticoides) (Itoh et al., Cell 66: 233, 1991). Durante la maduración de células T en el timo, se destruyen las células T que reconocen autoantígenos a través del proceso apoptótico, mientras que otros son seleccionados positivamente. Se ha sugerido la posibilidad de que algunas células T que reconocen ciertos autoepítomos (por ejemplo, ineficientemente procesados y que presentan determinantes antigénicos de una autoproteína dada) evadan este proceso de eliminación y posteriormente jueguen un papel en enfermedades autoinmunes (Gammon et al., Immunology Today 12: 193, 1991).

15 Se ha reportado que un antígeno de la superficie de la célula conocido como Fas media la apoptosis y se cree que juega un papel en la supresión clonal de células T autorreactivas (Itoh et al., Cell 66: 233, 1991; Watanabe-Fukunage et al., Nature 356: 314, 1992). Se ha reportado que el entrelazamiento de un anticuerpo monoclonal específico con Fas induce que diferentes líneas de células experimenten apoptosis (Yonehara et al., J. Exp. Med., 169: 1747, 1989; Trauth et al., Science, 245: 301, 1989). Sin embargo, bajo ciertas condiciones, el enlazamiento de un anticuerpo monoclonal específico con Fas puede tener un efecto coestimulador sobre células T recientemente aisladas (Alderson et al., J. Exp. Med. 178:2231, 1993).

20 Los ADN que codifican un ligando de Fas de rata (Suda et al., Cell, 75: 1169, 1993) y un ligando de Fas humana (Takahashi et al., International Immunology 6: 1567, 1994) han sido aislados. El enlazamiento del ligando de Fas con células que expresan al antígeno de Fas se ha demostrado que induce apoptosis (Suda et al., ver más arriba, y Takahashi et al., ver más arriba).

25 Es deseable la investigación relacionada con la existencia e identidad de otra(s) molécula(s) que juega(n) un papel en la apoptosis. La identificación de tales moléculas proporcionaría un medio adicional de regulación de la apoptosis, así como proporcionar una mayor comprensión en el desarrollo de autotolerancia por parte del sistema inmunológico y la etiología de enfermedades autoinmunes.

Resumen de la invención

30 La presente invención proporciona una nueva proteína citoquina, así como ADN aislado que codifica la citoquina y vectores de expresión que contienen al ADN aislado. Las propiedades de la nueva citoquina, que es un miembro de la familia de ligandos del factor de necrosis tumoral (TNF), incluyen la habilidad para inducir apoptosis de ciertos tipos de células objetivo. Esta proteína es denominada por lo tanto Ligando que Induce Apoptosis Relacionada con TNF (TRAIL). Entre los tipos de células que mueren por el contacto con TRAIL están células cancerosas tales como células de leucemia, linfoma, y melanoma, y células infectadas con un virus.

35 Un método para producir polipéptidos TRAIL que involucra el cultivo de células huésped transformadas con un vector de expresión recombinante que contiene ADN que codifica TRAIL bajo condiciones apropiadas para expresión de TRAIL, recuperando luego el polipéptido TRAIL expresado a partir del cultivo. También se proporcionan anticuerpos dirigidos contra polipéptidos TRAIL.

Breve descripción de los dibujos

40 La Figura 1 presenta los resultados de un ensayo descrito en el ejemplo 8. El ensayo demostró que un polipéptido TRAIL humano soluble indujo la muerte de células Jurkat, que son una línea e células de leucemia.

La Figura 2 presenta los resultados de un ensayo descrito en el ejemplo 11. El contacto con un polipéptido TRAIL humano soluble indujo la muerte de fibroblastos humanos infectados con citomegalovirus, mientras que los fibroblastos infectados en forma no viral no murieron.

45 Descripción detallada de la invención

Se proporciona aquí una nueva proteína denominada TRAIL, junto con el ADN que codifica TRAIL y vectores de expresión recombinante que contienen el ADN para TRAIL, como se define en las reivindicaciones. Un método para producir polipéptidos TRAIL recombinantes involucra el cultivo de células huésped transformadas con los vectores

de expresión recombinante bajo condiciones apropiadas para la expresión de TRAIL, y la recuperación de la TRAIL expresada, como se define en las reivindicaciones.

La presente invención también proporciona anticuerpos que enlazan específicamente proteínas TRAIL. En una modalidad, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales.

- 5 La proteína TRAIL induce apoptosis de ciertos tipos de células objetivo, tal como las células transformadas que incluyen pero no se limitan a células cancerosas y a células infectadas por virus. Como se demuestra en los ejemplos 5, 8, 9, y 10 más adelante, la apoptosis inducida por TRAIL de líneas de células humanas de leucemia, linfoma, y melanoma. Entre los usos de TRAIL se utiliza en la muerte de células cancerosas. TRAIL encuentra un uso adicional en el tratamiento de infecciones virales. La infección con citomegalovirus (CMV) volvió a los  
10 fibroblastos humanos susceptibles a la apoptosis cuando se los puso en contacto con TRAIL, mientras que los fibroblastos no infectados no murieron a través del contacto con TRAIL (ver el ejemplo 11).

- Más adelante, en el ejemplo 1 se describe el aislamiento de un ADN que codifica TRAIL humano. La secuencia de nucleótidos del ADN humano para TRAIL aislados en el ejemplo 1 se presenta en la SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos codificada de tal modo se presenta en la SEQ ID NO: 2. Esta proteína humana TRAIL contiene un dominio citoplasmático en el terminal N (aminoácidos 1 - 18), una región transmembrana (aminoácidos 19 - 38), y un dominio extracelular (aminoácidos 39 - 281). El dominio extracelular contiene una región de enlazamiento del receptor.  
15

- Las células de la cepa DH10B de E. coli transformadas con un vector recombinante que contiene este ADN humano para TRAIL fueron depositadas con la American Type Culture Collection el 14 de junio de 1995, y se les asignó el número de acceso no. 69849. El depósito se hizo bajo los términos del Tratado de Budapest. El vector recombinante en la cepa depositada es el vector de expresión pDC409 (descrito en el ejemplo 5). Se digirió el vector con Sall y NotI, y se ligó el ADN humano para TRAIL que incluye la región completa de codificación mostrada en la SEQ ID NO: 1 dentro del vector.  
20

- Se aisló el ADN que codifica una segunda proteína TRAIL humana como se describe en el ejemplo 2. La secuencia de nucleótidos de este ADN es presentado en la SEQ ID NO: 3, y la secuencia de aminoácidos codificada de tal modo es presentada en la SEQ ID NO: 4. La proteína codificada contiene un dominio citoplasmático en el terminal N (aminoácidos 1 - 18), una región transmembrana (aminoácidos 19 - 38), y un dominio extracelular (aminoácidos 39 - 101).  
25

- El ADN de la SEQ ID NO: 3 carece de una porción del ADN de la SEQ ID NO: 1, y es por lo tanto denominado el clon de la variante de supresión de TRAIL humana (huTRAILdv). Los nucleótidos 18 a 358 de la SEQ ID NO: 1 son idénticos a los nucleótidos 8 a 348 del ADN de huTRAILdv de la SEQ ID NO: 3. Los nucleótidos 359 a 506 de la SEQ ID NO: 1 faltan en el ADN clonado de la SEQ ID NO: 3. La supresión provoca un desplazamiento en el marco de lectura, que resulta en un codón de detención en el marco después el aminoácido 101 de la SEQ ID NO: 4. El ADN de la SEQ ID NO: 3 codifica por lo tanto una proteína truncada. Los aminoácidos 1 a 90 de la SEQ ID NO: 2 son idénticos a los aminoácidos 1 a 90 de la SEQ ID NO: 4. Sin embargo, debido a la supresión, la porción del terminal C de la proteína huTRAILdv (aminoácidos 91 a 101 de la SEQ ID NO: 4) se diferencia de los residuos en las posiciones correspondientes en la SEQ ID NO: 2. En contraste con la proteína huTRAIL de longitud completa, la proteína huTRAILdv truncada no exhibe la habilidad para inducir apoptosis de las células de leucemia de la célula T de la línea de células Jurkat.  
30  
35

- El ADN que codifica una proteína TRAIL de ratón también ha sido aislado, como se describe en el ejemplo 3. La secuencia de nucleótidos de este ADN es presentada en la SEQ ID NO: 5 y la secuencia de aminoácidos codificada de tal modo está presentada en la SEQ ID NO: 6. La proteína codificada contiene un dominio citoplasmático en el terminal N (aminoácidos 1 - 17), una región transmembrana (aminoácidos 18-38), y un dominio extracelular (aminoácidos 39 - 291). Esta TRAIL de ratón es 64% idéntica a la TRAIL humana de la SEQ ID NO: 2 a nivel de aminoácidos. La región de codificación de la secuencia de nucleótidos para la TRAIL de ratón es 75% idéntica a la región de codificación de la secuencia de nucleótidos humana de la SEQ ID NO: 1.  
40  
45

- Una modalidad de la presente invención está dirigida a proteína TRAIL humana caracterizada por la secuencia de aminoácidos del terminal N MetAlaMetMetGluValGlnGly GlyProSerLeuGlyGlnThr (aminoácidos 1 - 15 de las SEQ ID NOS: 2 y 4). También se proveen aquí las proteínas TRAIL de ratón caracterizadas por la secuencia de aminoácidos del terminal N MetProSerSerGlyAla LeuLysAspLeu-SerPheSerGlnHis (aminoácidos 1 - 15 de la SEQ ID NO: 6).  
50

- La TRAIL de la presente invención es distinta de la proteína conocida como ligando Fas (Suda et al., Cell, 75: 1169, 1993; Takahashi et al., International Immunology 6: 1567, 1994). El ligando Fas induce apoptosis de ciertos tipos de células, a través del receptor conocido como Fas. Como se demuestra en el ejemplo 5, la apoptosis inducida por TRAIL de células objetivo no es medida a través de Fas. La secuencia de aminoácidos de TRAIL humana de la SEQ ID NO: 2 es aproximadamente 20% idéntica a la secuencia de aminoácidos del ligando Fas humano que es  
55

presentada en Takahashi et al., ver más arriba. El dominio extracelular de TRAIL humana es aproximadamente 28,4% idéntica al dominio extracelular del ligando Fas humano.

Las secuencias de aminoácidos divulgadas aquí revelan que TRAIL es un miembro de la familia TNF de ligandos (Smith et al. Cell, 73: 1349, 1993; Suda et al., Cell, 75: 1169, 1993; Smith et al., Cell, 76: 959, 1994). Los porcentajes de identidad entre la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de TRAIL humana y la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de otras proteínas de esta familia son los siguientes: 28,4% con el ligando Fas, 22,4% con linfotóxina  $\beta$ , 22,9% con TNF- $\alpha$ , 23,1 % con TNF- $\beta$ , 22,1 % con el ligando CD30, y 23,4% con el ligando CD40.

TRAIL fue analizada por su habilidad para enlazar receptores de la familia TNF-R de receptores. El análisis del enlazamiento fue llevado a cabo utilizando el procedimiento de autorradiografía de diapositivas de Gearing et al. (EMBO J. 8: 3667, 1989). El análisis no reveló enlazamiento detectable de TRAIL humana con CD30, CD40, 4-1BB, OX40, TNF-R (forma p80), CD27, o LT $\beta$ R humano (también conocida como TNFR-RP). Los resultados en el ejemplo 5 indican que TRAIL humana no enlaza Fas humana.

Los polipéptidos TRAIL de la presente invención incluyen polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren de, pero son altamente homólogas a, aquellas presentadas en la SEQ ID NO: 2. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, homólogos derivados de otras especies de mamíferos, variantes (tanto variantes de ocurrencia natural como aquellas generadas por medio de tecnología de ADN recombinante), y fragmentos de TRAIL, que retienen una actividad biológica deseada. Tales polipéptidos exhiben una actividad biológica de las proteínas TRAIL de la SEQ ID NO: 2, y preferiblemente contienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica (más preferiblemente al menos 90% idéntica) a la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO: 2. Estas modalidades de la presente invención son descritas más detalladamente más adelante.

Las secuencias conservadas localizadas en la porción del terminal C de las proteínas en la familia TNF son identificadas en Smith et al. (Cell, 73: 1349, 1993, ver página 1353 y la Figura 6); Suda et al. (Cell, 75: 1169, 1993, ver la figura 7); Smith et al. (Cell, 76: 959, 1994, ver la figura 3); y Goodwin et al. (Eur. J. Immunol., 23: 2631, 1993, ver la figura 7 y las páginas 2638 - 39), incorporados aquí como referencia. Entre los aminoácidos en la proteína TRAIL humana que se conservan (en al menos la mayoría de los miembros de la familia TNF) están aquellos en las posiciones 124 - 125 (AH), 136 (L), 154 (W), 169 (L), 174 (L), 180 (G), 182 (Y), 187 (Q), 190 (F), 193 (Q), y 275 - 276 (FG) de la SEQ ID NO: 2. Otra característica estructural de TRAIL es una región espaciadora entre el terminal C de la región transmembrana y la porción del dominio extracelular que se cree que es la más importante para actividad biológica. Esta región espaciadora, localizada en el terminal N del dominio extracelular, consiste de los aminoácidos 39 a 94 de la SEQ ID NO: 2. Espaciadores análogos se encuentran en otros miembros de la familia, por ejemplo, el ligando CD40. Los aminoácidos 138 a 153 corresponden a un bucle entre las láminas  $\beta$  de la proteína TRAIL humana plegada (en tres dimensiones).

Se proporcionan aquí proteínas TRAIL enlazadas a la membrana (que contienen un dominio citoplasmático, una región transmembrana, y un dominio extracelular) así como fragmentos de TRAIL que retienen una propiedad biológica deseada de la proteína TRAIL de longitud completa. En una modalidad, los fragmentos de TRAIL son polipéptidos TRAIL solubles que contienen todo o parte del dominio extracelular, pero que carecen de la región transmembrana que causaría la retención del polipéptido sobre una membrana celular. Las proteínas TRAIL solubles son puede ser secretadas a partir de las células en las cuales se expresan. Convenientemente, se fusiona un péptido señal heterólogo al terminal N de tal manera que la TRAIL soluble sea secretada por expresión.

La TRAIL soluble puede ser identificada (y se distingue de sus contrapartes no solubles enlazadas a la membrana) por medio de la separación de células intactas que expresan la proteína deseada a partir del medio de cultivo, por ejemplo, por centrifugación, y analizando el medio (sobrenadante) por la presencia de la proteína deseada. La presencia de TRAIL en el medio indica que la proteína fue secretada a partir de las células y por lo tanto es una forma soluble de la proteína TRAIL. Las formas solubles de ocurrencia natural de TRAIL son abarcadas por la presente invención.

El uso de formas solubles de TRAIL es conveniente para ciertas aplicaciones. La purificación de las proteínas a partir de células huésped recombinantes se facilita, ya que las proteínas solubles son secretadas de las células. Además, las proteínas solubles son generalmente más adecuadas para administración intravenosa.

Los ejemplos de polipéptidos TRAIL solubles son aquellos que contienen el dominio extracelular completo (por ejemplo, aminoácidos 39 a 281 de la SEQ ID NO: 2). También se proporcionan los fragmentos del dominio extracelular que retienen una actividad biológica. Tales fragmentos incluyen convenientemente regiones de TRAIL que se conservan en las proteínas de la familia TNF de ligandos, como se describe más arriba.

Ejemplos adicionales de polipéptidos TRAIL solubles son aquellos que carecen no solamente del dominio citoplasmático y de la región transmembrana, sino también de toda o parte de la región espaciadora anteriormente

descrita. Los polipéptidos TRAIL humanos soluble incluyen por lo tanto, pero no se limitan a, polipéptidos que contienen los aminoácidos x a 281, en donde x representa cualquiera de los aminoácidos en las posiciones 39 a 95 de la SEQ ID NO: 2. En la modalidad en la cual el residuo 95 es el aminoácido del terminal N, se ha suprimido toda la región espaciadora.

- 5 Los fragmentos de TRAIL, que incluyen polipéptidos solubles, pueden ser preparados por medio de cualquier cantidad de técnicas convencionales. Una secuencia de ADN que codifica un fragmento deseado de TRAIL puede ser subclonado en un vector de expresión para la producción del fragmento de TRAIL. La secuencia de ADN que codifica TRAIL se fusiona convenientemente a una secuencia que codifica un péptido líder o señal adecuado. El fragmento deseado de ADN que codifica TRAIL puede ser sintetizado químicamente utilizando técnicas conocidas.
- 10 También pueden producirse fragmentos de ADN por medio de digestión con endonucleasa de restricción de una secuencia clonada de ADN de longitud completa, y aislada por electroforesis sobre geles de agarosa. Si es necesario, se pueden ligar oligonucleótidos que reconstruyen el terminal 5' ó 3' hasta un punto deseado a un fragmento de ADN generado por digestión con una enzima de restricción. Tales oligonucleótidos pueden contener adicionalmente un sitio de escisión de una endonucleasa de restricción secuencia arriba de la secuencia de codificación deseada, y posicionar un codón de inicio (ATG) en el terminal N de la secuencia de codificación.
- 15

- El procedimiento bien conocido de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también puede ser empleado para aislar y amplificar una secuencia de ADN que codifica un fragmento deseado de proteína. Los oligonucleótidos que definen los terminales deseados del fragmento de ADN se emplean como iniciadores 5' y 3'. Los oligonucleótidos pueden contener adicionalmente sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción, para facilitar la inserción del fragmento amplificado de ADN en un vector de expresión. Las técnicas de PCR están descritas en Saiki et al., Science 239: 487 (1988); Recombinant DNA Methodology, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), páginas 189 - 196; y PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., eds., Academic Press, Inc. (1990).
- 20

- Como lo comprenderá un experto en la materia, la región transmembrana de cada proteína TRAIL discutida anteriormente se identifica de acuerdo con criterios convencionales para identificar ese tipo de dominio hidrófobo. Los límites exactos de una región transmembrana pueden variar ligeramente (más probablemente en no más de cinco aminoácidos sobre cada extremo) de aquellos presentados anteriormente. Los programas de computador útiles para la identificación de tales regiones hidrófobas en proteínas se encuentran disponibles.
- 25

- El ADN para TRAIL de la presente invención incluye ADNc, ADN químicamente sintetizado, ADN aislado por PCR, ADN genómico, y combinaciones de los mismos. El ADN genómico para TRAIL puede ser aislado por medio de hibridación al ADNc para TRAIL divulgado aquí utilizando técnicas estándar. El ARN transcrito a partir del ADN para TRAIL es también abarcado por la presente invención.
- 30

- Una búsqueda del banco de datos de NCBI identificó cinco etiquetas de secuencia expresadas (las EST) que tienen regiones de identidad con el ADN para TRAIL. Estas EST (números de acceso del NCBI T90422, T82085, T10524, R31020, y Z36726) son todos fragmentos de ADNc humano. Los registros del NCBI no divulgan ninguno de los polipéptidos codificados por las EST, y no indican cuál puede ser el marco de lectura, si lo hay. Sin embargo, incluso si el conocimiento del marco de lectura revelado aquí por medio de la divulgación de regiones de codificación completas de TRAIL es utilizado para expresar las EST, ninguno de los polipéptidos codificados tendría la propiedad de inducir apoptosis de los polipéptidos TRAIL actualmente reivindicados. En otras palabras, si cada una de las cinco EST fueran insertadas en los vectores de expresión secuencia abajo de un codón iniciador de metionina, en el marco de lectura elucidado aquí, ninguno de los polipéptidos expresados resultantes contendría una porción suficiente del dominio extracelular de TRAIL para inducir apoptosis de las células Jurkat.
- 35
- 40

- Ciertas modalidades de la presente invención proporcionan ADN aislado que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de los nucleótidos 88 a 933 de la SEQ ID NO: 1 (región de codificación de TRAIL humana); nucleótidos 202 a 933 de la SEQ ID NO: 1 (que codifica al dominio extracelular de TRAIL humana); nucleótidos 47 a 922 de la SEQ ID NO:5 (región de codificación de TRAIL de ratón); y los nucleótidos 261 a 922 de la SEQ ID NO: 5 (que codifica al dominio extracelular de TRAIL de ratón). También se proporcionan los ADN que codifican fragmentos biológicamente activos de las proteínas de las SEQ ID NOS: 2 y 6. Otras modalidades incluyen secuencias que contienen los nucleótidos 370 a 930 de la SEQ ID NO: 1, que codifican al polipéptido TRAIL soluble humano particular, descrito en el ejemplo 7.
- 45
- 50

- Debido a la degeneración del código genético, dos secuencias de ADN pueden diferir, sin embargo codifican la misma secuencia de aminoácidos. La presente invención provee por lo tanto secuencias aisladas de ADN que codifican TRAIL biológicamente activa, seleccionadas del ADN que contiene la región de codificación de un ADNc nativo para TRAIL humana o de murino, o fragmentos del mismo, y ADN que se degenera como resultado del código genético para la secuencia nativa de ADN para TRAIL.
- 55

También se proporcionan en este documento polipéptidos TRAIL purificados, tanto recombinantes como no recombinantes. Las variantes y derivados de proteínas TRAIL nativas que retienen una actividad biológica deseada están también dentro del alcance de la presente invención. En una modalidad, la actividad biológica de una variante de TRAIL es esencialmente equivalente a la actividad biológica de una proteína TRAIL nativa. Una actividad biológica deseada de TRAIL es la habilidad para inducir la muerte de células Jurkat. Los procedimientos del ensayo para detectar apoptosis de células objetivo son conocidos. El escalamiento del ADN está entre las características de la muerte celular a través de la apoptosis, y está reconocido como uno de los fenómenos observables que distinguen la muerte celular apoptótica de la muerte celular necrótica. Los ejemplos de técnicas de ensayo adecuadas para detectar muerte o apoptosis de células objetivo incluyen aquellas descritas en los ejemplos 5 y 8 a 11. Otra propiedad de TRAIL es la habilidad para enlazarse con células Jurkat.

Se pueden obtener variantes de TRAIL por medio de mutaciones de secuencias nativas de nucleótidos para TRAIL, por ejemplo. Una variante de TRAIL, como la mencionada aquí, es un polipéptido sustancialmente homólogo a una TRAIL nativa, pero que tiene una secuencia de aminoácidos diferente de aquella de TRAIL nativa debido a una o a una pluralidad de supresiones, inserciones o sustituciones. Las secuencias de ADN que codifican TRAIL de la presente invención abarcan secuencias que incluyen una o más adiciones, supresiones, o sustituciones de nucleótidos cuando se comparan con una secuencia nativa de ADN para TRAIL, pero que codifican una proteína TRAIL que es esencialmente biológicamente equivalente a una proteína nativa TRAIL.

La variante de aminoácidos o la secuencia de ADN es al menos preferiblemente 80% idéntica a una secuencia nativa de TRAIL, más preferiblemente al menos 90% idéntica. Se puede determinar el grado de homología (porcentaje de identidad) entre una secuencia mutante y una nativa, por ejemplo, comparando las dos secuencias utilizando programas de computador comúnmente empleados para este propósito. Un programa adecuado es el programa de computador GAP, versión 6.0, descrito por Devereux et al. (Nucl. Acids Res. 12: 387, 1984) y disponible en el University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). El programa GAP utiliza el método de alineación de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 443, 1970), revisado por Smith y Waterman (Adv. Appl. Math 2: 482, 1981). En resumen, el programa GAP define la identidad como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos) que son idénticos, dividido por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros preferidos predeterminados para el programa GAP incluyen: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para falta de identidad) para nucleótidos, y la matriz de comparación ponderada de Gribskov y Burgess, Nucl. Acids Res. 14: 6745, 1986, como la descrita por Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, páginas 353 - 358, 1979; (2) una penalización de 3.0 para cada hueco y una penalización adicional de 0.10 para cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalización por huecos en el extremo.

Las alteraciones de la secuencia nativa de aminoácidos pueden ser logradas por medio de cualquier cantidad de técnicas conocidas. Se pueden introducir mutaciones en loci particulares por medio de la síntesis de oligonucleótidos que contienen una secuencia mutante, flanqueadas por sitios de restricción que permiten la ligación a fragmentos de la secuencia nativa. Después de la ligación, la secuencia reconstruida resultante codifica un análogo que tiene la inserción, sustitución o supresión deseada de aminoácidos.

Alternativamente, los procedimientos de mutagénesis específica para el sitio dirigida a nucleótidos pueden ser empleados para proporcionar un gen alterado que tiene codones particulares alterados de acuerdo con la sustitución, supresión, o inserción requerida. Las técnicas para elaborar tales alteraciones incluyen a aquellas divulgadas por Walder et al. (Gene 42: 133, 1986); Bauer et al. (Gene 37: 73, 1985); Craik (BioTechniques, January 1985, 12 - 19); Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981); y las Patentes Estadounidenses Nos. 4.518.584 y 4.737.462, que se incorporan aquí como referencia.

Las variantes pueden incluir secuencias sustituidas en forma conservadora, lo cual significa que uno o más residuos aminoácidos de un polipéptido nativo TRAIL son reemplazados por residuos diferentes, pero que el polipéptido TRAIL sustituido en forma conservadora retiene una actividad biológica deseada que es esencialmente equivalente a aquella de un polipéptido TRAIL nativo. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen sustituciones de aminoácidos que no alteran la estructura secundaria y/o terciaria de TRAIL. Otros ejemplos involucran la sustitución de aminoácidos por fuera del dominio de enlazamiento del receptor, cuando la actividad biológica deseada es la habilidad para enlazarse con un receptor sobre células objetivo e induce apoptosis de las células objetivo. Un aminoácido dado puede ser reemplazado por un residuo que tiene características fisicoquímicas similares, por ejemplo, sustituyendo un residuo alifático por otro (tal como Ile, Val, Leu, o Ala por algún otro), o sustitución de un residuo polar por otro (tal como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn). Otras de tales sustituciones conservadoras, por ejemplo, sustituciones de regiones enteras que tienen características similares de hidrofobicidad, son bien conocidas. Los polipéptidos TRAIL que contienen sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden ser analizados en uno de los ensayos descritos aquí para confirmar que se retiene una actividad biológica deseada de una TRAIL nativa. Las secuencias de ADN que codifican polipéptidos TRAIL tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos están abarcadas por la presente invención.

Los aminoácidos conservados localizados en la porción del terminal C de proteínas en la familia TNF, y que se cree que son importantes para la actividad biológica, han sido identificados. Estas secuencias conservadas son discutidas en Smith et al. (Cell, 73: 1349, 1993, ver la página 1353 y la Figura 6); Suda et al. (Cell, 75: 1169, 1993, ver la figura 7); Smith et al. (Cell, 76: 959, 1994, ver la figura 3); y Goodwin et al. (Eur. J. Immunol., 23: 2631, 1993, ver la figura 7 y las páginas 2638 - 39). Convenientemente, los aminoácidos conservados no se alteran cuando se generan secuencias sustituidas en forma conservada. Si se alteran, los aminoácidos encontrados en posiciones equivalentes en otros miembros de la familia TNF son sustituidos.

TRAIL también puede ser modificada para crear derivados de TRAIL por medio de la formación covalente o conjugados de agregación con otras estructuras químicas funcionales, tales como grupos glicosilo, lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares. Los derivados covalentes de TRAIL pueden ser preparados por medio del enlazamiento de las estructuras químicas funcionales con grupos funcionales sobre cadenas laterales de aminoácidos de TRAIL o en el terminal N o en el terminal C de un polipéptido TRAIL o el dominio extracelular del mismo. Otros derivados de TRAIL dentro del alcance de esta invención incluyen conjugados covalentes o de agregación de TRAIL o sus fragmentos con otras proteínas o polipéptidos, tal como por medio de síntesis en un cultivo recombinante como fusiones en el terminal N o en el terminal C. Por ejemplo, el conjugado puede incluir una secuencia del polipéptido señal o líder (por ejemplo el factor  $\alpha$  líder de *Saccharomyces*) en el terminal N de un polipéptido TRAIL. El péptido señal o líder dirige en forma co-traducida o post-traducida la transferencia del conjugado desde su sitio de síntesis hasta un sitio dentro o fuera de la membrana celular o de la pared celular.

Las fusiones del polipéptido TRAIL pueden incluir péptidos añadidos para facilitar la purificación e identificación de TRAIL. Tales péptidos incluyen, por ejemplo, poli-His o los péptidos antigénicos de identificación descritos en la Patente Estadounidense No. 5.011.912 y en Hopp et al., Bio/Technology 6:1204, 1988. Uno de tales péptidos es el péptido FLAG®, Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 7), que es altamente antigénico y proporciona un epítipo enlazado reversiblemente por un anticuerpo monoclonal específico, permitiendo así un análisis rápido y purificación fácil de la proteína recombinante expresada. Esta secuencia es también escindida en forma específica por enteroquinasa mucosa bovina en el residuo inmediatamente después del emparejamiento de Asp-Lys. Las proteínas de fusión cubiertas con este péptido pueden ser resistentes también a degradación intracelular en *E. coli*.

Un hibridoma de múrido denominado 4E11 produce un anticuerpo monoclonal que enlaza al péptido DYKDDDDK (SEQ ID NO: 7) en presencia de ciertos cationes metálicos divalentes (como se describe en la Patente Estadounidense No. 5.011.912), y ha sido depositado con el número de acceso de la American Type Culture Collection bajo el no. HB 9259. Los sistemas de expresión útiles para producir proteínas recombinantes fusionadas al péptido FLAG®, así como anticuerpos monoclonales que enlazan al péptido y son útiles en la purificación de las proteínas recombinantes, se encuentran disponibles con Eastman Kodak Company, Scientific Imaging Systems, New Haven, Connecticut.

La presente invención incluye además polipéptidos TRAIL con o sin glicosilación asociada de patrón nativo. TRAIL expresada en sistemas de expresión de mamífero o de levadura puede ser similar o significativamente diferente de un polipéptido TRAIL nativo en peso molecular y patrón de glicosilación, dependiendo de la escogencia del sistema de expresión. La expresión de polipéptidos TRAIL en sistemas de expresión bacteriana, tales como *E. coli*, proporcionan moléculas no glicosiladas.

Los sitios de glicosilación en el dominio extracelular de TRAIL pueden ser modificados para precluir la glicosilación mientras se permite la expresión de un análogo de carbohidrato reducido homogéneo utilizando sistemas de expresión de levadura o de mamífero. Los sitios de glicosilación de N en polipéptidos eucariotas se caracterizan por un triplete aminoácido Asn-X-Y, en donde X es cualquier aminoácido excepto Pro y Y es Ser o Thr. Las modificaciones apropiadas a la secuencia de nucleótidos que codifica este triplete resultarán en sustituciones, adiciones o supresiones que impiden la adhesión de residuos de carbohidratos en la cadena lateral de Asn. Los procedimientos conocidos para inactivar sitios de glicosilación de N en proteínas incluyen aquellos descritos en la Patente Estadounidense No. 5.071.972 y EP 276.846. Un sitio potencial de glicosilación de N se encuentra en las posiciones 109 - 111 en la proteína humana de la SEQ ID NO: 2 y en las posiciones 52 - 54 en la proteína de múrido de la SEQ ID NO: 6.

En otro ejemplo, se pueden alterar secuencias que codifican residuos de Cys que no son esenciales para actividad biológica para provocar que los residuos de Cys que son suprimidos o reemplazados con otros aminoácidos, impidan la formación de puentes disulfuro intramoleculares incorrectos por renaturalización. Otras variantes se preparan por modificación de residuos de aminoácidos dibásicos adyacentes para mejorar la expresión en sistemas de levadura en los cuales está presente la actividad de la proteasa KEX2. EP 212.914 divulga el uso de mutagénesis dirigida al sitio para inactivar los sitios de procesamiento de la proteasa KEX2 en una proteína. Los sitios de procesamiento de la proteasa KEX2 se inactivación por supresión, adición o sustitución de residuos para alterar los pares Arg-Arg, Arg-Lys, y Lys-Arg para eliminar la ocurrencia de estos residuos básicos adyacentes. Los emparejamientos Lys-Lys son considerablemente menos susceptibles a escisión de KEX2, y la conversión de Arg-

Lys o Lys-Arg a Lys-Lys representa una aproximación conservadora y preferida para inactivar los sitios de KEX2. Los sitios potenciales de procesamiento de la proteasa KEX2 se encuentran en las posiciones 89 - 90 y 149 - 150 en la proteína de la SEQ ID NO: 2, y en las posiciones 85 - 86, 135 - 136, y 162 - 163 en la proteína de la SEQ ID NO: 6.

- 5 Las variantes de TRAIL de origen natural están también abarcadas por la presente invención. Los ejemplos de tales variantes son proteínas que resultan de eventos alternativos de empalme de ARNm (ya que TRAIL es codificada por un gen de múltiples exones) o de escisión proteolítica de la proteína TRAIL, en donde se retiene una actividad biológica deseada. El empalme alternativo de ARNm puede producir una proteína TRAIL truncada pero biológicamente activa, tal como una forma soluble de origen natural de la proteína, por ejemplo. Las variaciones atribuibles a proteólisis incluyen, por ejemplo, diferencias en los terminales N o C por expresión en diferentes tipos de células huésped, debido a remoción proteolítica de uno o más aminoácidos terminales de la proteína TRAIL. Además, la escisión proteolítica puede liberar una forma soluble de TRAIL de una forma enlazada a la membrana de la proteína. Variantes alélicas también son abarcadas por la presente invención.

#### Oligómeros

- 15 La presente invención abarca polipéptidos TRAIL en la forma de oligómeros, tales como dímeros, trímeros, u oligómeros superiores. Se pueden formar oligómeros por medio de enlaces disulfuro entre residuos de cisteína sobre diferentes polipéptidos TRAIL, o por medio de interacciones no covalentes entre cadenas de polipéptido TRAIL, por ejemplo. En otras modalidades, los oligómeros incluyen de dos a cuatro polipéptidos TRAIL unidos a través de interacciones covalentes o no covalentes entre estructuras funcionales peptídicas fusionadas a los polipéptidos TRAIL. Tales péptidos pueden ser enlazadores peptídicos (espaciadores), o péptidos que tienen la propiedad de promover la oligomerización. Los cierres de leucina y ciertos polipéptidos derivados de anticuerpos están entre los péptidos que pueden promover oligomerización de polipéptidos TRAIL unidos a los mismos, como se describe más detalladamente más adelante. Los polipéptidos TRAIL son preferiblemente solubles.

- 25 La preparación de proteínas de fusión que comprenden polipéptidos heterólogos fusionados a diferentes porciones de polipéptidos derivados de anticuerpos (incluido el dominio Fc) ha sido descrita, por ejemplo, por Ashkenazi et al. (PNAS USA 88: 10535, 1991); Bym et al. (Nature 344:667, 1990); y Hollenbaugh y Aruffo ("Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en Current Protocols in Immunology, Suplemento 4, páginas 10.19.1 - 10.19.11, 1992), incorporados aquí como referencia. En una modalidad de la invención, se crea un dímero TRAIL por medio de la fusión de TRAIL con una región Fc de polipéptido derivada de un anticuerpo. El término "polipéptido Fc" incluye las formas nativa y muteína, así como Fc polipéptidos truncados que contienen la región de bisagra que promueve la dimerización. El polipéptido Fc preferiblemente se fusiona a una TRAIL soluble (por ejemplo, que contiene únicamente el dominio extracelular).

- 35 Se inserta una fusión génica que codifica la proteína de fusión TRAIL/Fc en un vector de expresión apropiado. Se permite que las proteínas de fusión TRAIL/Fc se ensamblen al igual que moléculas de anticuerpo, después de lo cual se forman enlaces disulfuro intercatenarios entre los polipéptidos Fc, produciendo TRAIL divalente. En otras modalidades, TRAIL puede ser sustituida por la porción variable de un anticuerpo pesado o una cadena liviana. Si se elaboran proteínas de fusión tanto con cadenas pesadas como livianas de un anticuerpo, es posible formar un oligómero TRAIL con hasta cuatro regiones extracelulares de TRAIL.

- 40 Un polipéptido Fc adecuado es el polipéptido de la región Fc nativa derivado de una IgG1 humana, que es descrito en la solicitud PCT WO 93/10151, incorporada aquí como referencia. Otro polipéptido Fc útil es la muteína Fc descrita en la Patente Estadounidense No. 5.457.035. La secuencia de aminoácidos de la muteína es idéntica a aquella de la secuencia Fc nativa presentada en WO 93/10151, excepto porque el aminoácido 19 ha sido cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 ha sido cambiado de Leu a Glu, y el aminoácido 22 ha sido cambiado de Gly a Ala. Esta muteína Fc exhibe afinidad reducida por receptores de inmunoglobulina.

- 45 Alternativamente, TRAIL oligomérico puede incluir dos o más polipéptidos TRAIL solubles unidos a través de enlazadores de péptidos. Los ejemplos incluyen a aquellos enlazadores de péptidos descritos en La Patente Estadounidense No. 5.073.627 (incorporada aquí como referencia). Las proteínas de fusión que comprenden múltiples polipéptidos TRAIL separados por enlazadores de péptidos pueden ser producidas utilizando tecnología convencional de ADN recombinante.

- 50 Otro método para preparar polipéptidos TRAIL oligoméricos involucra el uso de un cierre de leucina. Los dominios del cierre de leucina son péptidos que promueven oligomerización de las proteínas en las cuales ellos se encuentran. Los cierres de leucina fueron identificados originalmente en diferentes proteínas de enlazamiento de ADN (Landschulz et al., Science 240: 1759, 1988), y desde entonces han sido encontrados en una variedad de proteínas diferentes. Entre los cierre de leucina conocidos están los péptidos de origen natural y derivados de los mismos que dimerizan o trimerizan. Los ejemplos de dominios de cierre de leucina adecuados para la producción de proteínas TRAIL oligoméricas solubles son aquellos descritos en la solicitud PCT WO 94/10308, incorporada aquí

como referencia. Las proteínas de fusión recombinante que contienen un polipéptido TRAIL soluble fusionado a un péptido que dimeriza o trimeriza en solución se expresan en células huésped adecuadas, y se recupera la TRAIL oligomérica soluble resultante a partir del sobrenadante del cultivo.

5 Se cree que ciertos miembros de la familia TNF de proteínas existen en forma trimérica (Beutler y Huffer, Science 264: 667, 1994; Banner et al., Cell 73: 431, 1993). Por lo tanto, TRAIL trimérica puede ofrecer la ventaja de una actividad biológica mejorada. Las estructuras funcionales de cierre de leucina preferidas son aquellas que preferencialmente forman trímeros. Un ejemplo es un cierre de leucina derivado de proteína D tensoactiva del pulmón (SPD), como se describe en Hoppe et al. (FEBS Letters 344: 191, 1994) y en la solicitud de Patente Estadounidense serial no. 08/446,922, incorporada aquí como referencia. Otros péptidos derivados de proteínas triméricas de origen natural pueden ser empleados en la preparación de TRAIL trimérica.

10 Como se describe en el ejemplo 7, un polipéptido TRAIL-Flag® expresado en células CV-1/EBNA formó espontáneamente oligómeros que se cree que son una mezcla de dímeros y de trímeros. El efecto citotóxico de esta Flag®-TRAIL soluble en el ensayo del ejemplo 8 se mejoró por medio de la inclusión de un anticuerpo anti-Flag®, posiblemente debido al entrelazamiento facilitado por el anticuerpo de complejos TRAIL/receptor. En una modalidad de a invención, se mejora la actividad biológica de TRAIL por medio del empleo de TRAIL junto con un anticuerpo capaz del entrelazamiento de TRAIL. Las células que van a ser eliminadas pueden ser puestas en contacto tanto con un polipéptido TRAIL soluble como con un anticuerpo.

15 Como ejemplo, se ponen en contacto células cancerosas o infectadas con virus con un anticuerpo anti-Flag® y un polipéptido Flag®-TRAIL soluble. Preferiblemente, se emplea un fragmento de anticuerpo que carece de la región Fc. Las formas bivalentes del anticuerpo pueden enlazar a las estructuras funcionales Flag® de dos polipéptidos TRAIL-Flag® que se encuentran en dímeros o trímeros separados. Se puede mezclar o incubar el anticuerpo con un polipéptido TRAIL-Flag® antes de la administración *in vivo*.

#### Sistemas de expresión

25 La presente invención proporciona vectores de expresión recombinante para expresión de TRAIL, y células huésped transformadas con los vectores de expresión. Cualquier sistema adecuado de expresión puede ser empleado. Los vectores incluyen un ADN que codifica un polipéptido TRAIL, operativamente enlazado a secuencias adecuadas de nucleótidos reguladoras transcripcionales o de traducción, tales como aquellas derivadas de un gen de mamífero, microbiano, viral, o de insecto. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores transcripcionales, operadores, o reforzadores, un sitio de enlazamiento ribosomal de ARNm, y secuencias apropiadas que controlan el inicio y la terminación de la transcripción y de la traducción. Las secuencias de nucleótidos están operativamente enlazadas cuando la secuencia reguladora se relaciona funcionalmente con la secuencia de ADN para TRAIL. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos promotora está operativamente enlazada a una secuencia de ADN de TRAIL si la secuencia de nucleótidos promotora controla la transcripción de la secuencia de ADN para TRAIL. Un origen de replicación que confiere la habilidad para replicaren las células huésped deseadas, y un gen de selección por medio del cual se identifican transformantes, son incorporados generalmente en el vector de expresión.

35 Además, se puede incorporar una secuencia que codifica un péptido señal apropiado en vectores de expresión. Se puede fusionar una secuencia de ADN para un péptido señal (líder secretor) en el marco con la secuencia de TRAIL de tal manera que TRAIL sea traducida inicialmente como una proteína de fusión que incluye al péptido señal. Un péptido señal que es funcional en las células huésped deseadas promueve la secreción extracelular del polipéptido TRAIL. El péptido señal se escinde del polipéptido TRAIL polipéptido por secreción de TRAIL de la célula.

40 Las células huésped adecuadas para expresión de polipéptidos TRAIL incluyen células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Los vectores de clonación y expresión apropiados para uso con huéspedes celulares bacterianos, de hongos, levadura, y de mamífero están descritos, por ejemplo, en Pouwels et al. Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, (1985). También se podrían emplear sistemas de traducción libres de células para producir polipéptidos TRAIL utilizando los ARN derivados de las construcciones de ADN divulgadas aquí.

45 Las procariotas incluyen organismos gram positivos o gram negativos, por ejemplo, *E. coli* o Bacilos. Las células huésped procariotas adecuadas para transformación incluyen, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y diferentes otras especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*. En una célula huésped procariota, tal como *E. coli*, un polipéptido TRAIL puede incluir un residuo de metionina en el terminal N para facilitar la expresión del polipéptido recombinante en la célula huésped procariota. La Met del terminal N puede ser escindida del polipéptido TRAIL recombinante expresado.

55 Los vectores de expresión para uso en células huésped procariotas generalmente contienen uno o más genes marcadores seleccionable fenotípicos. Un gen marcador seleccionable fenotípico es, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a los antibióticos o que suministra un requerimiento autotrófico.

Ejemplos de vectores de expresión útiles para células huésped procariotas incluyen aquellas derivadas de plásmidos derivados de plásmidos comercialmente disponibles tales como el vector de clonación pBR322 (ATCC 37017). pBR322 contiene genes para resistencia a la ampicilina y a la tetraciclina y por lo tanto proveen un medio sencillo para identificar células transformadas. Un promotor apropiado y una secuencia de ADN para TRAIL se insertan en el vector pBR322. Otros vectores comercialmente disponibles incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, EUA).

Las secuencias promotoras comúnmente utilizadas para vectores de expresión de células huésped procariotas recombinantes incluyen  $\beta$ -lactamasa (penicilinas), al sistema promotor de lactosa (Chang et al., Nature 275: 615, 1978; y Goeddel et al., Nature 281: 544, 1979), al sistema promotor de triptófano (trp) (Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8:4057, 1980; y EP-A-36776) y al promotor tac (Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 412, 1982). Un sistema de expresión de célula huésped procariota particularmente útil emplea un promotor P<sub>L</sub> de fago  $\lambda$  y una secuencia represora termolábil cl857ts. Los vectores plásmidos disponibles a partir de la American Type Culture Collection que incorporan derivados del promotor P<sub>L</sub> de  $\lambda$  incluyen al plásmido pHUB2 (residente en la cepa JMB9 de *E. coli*, ATCC 37092) y pPLc28 (residente en RR1 de *E. coli*, ATCC 53082).

TRAIL alternativamente puede ser expresada en células huésped de levadura, preferiblemente del género *Saccharomyces* (por ejemplo, *S. cerevisiae*). Otros géneros de levadura, tales como *Pichia* o *Kluyveromyces*, también pueden ser empleados. Los vectores de levadura a menudo contendrán un origen de secuencia de replicación de un plásmido de levadura  $\mu$ , una secuencia de replicación autónoma (ARS), una región promotora, secuencias para poliadenilación, secuencias para terminación de la transcripción, y un gen marcador seleccionable. Las secuencias promotoras adecuadas para vectores de levadura incluyen, entre otros, promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255: 2073, 1980) u otras enzimas glicolíticas (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7: 149, 1968; y Holland et al., Biochem. 17: 4900, 1978), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfo-glucosa isomerasa, y glucoquinasa. Otros vectores adecuados y promotores para uso en expresión de levadura son descritos adicionalmente en Hitzeman, EPA-73.657. Otra alternativa es el promotor ADH2 reprimible por glucosa descrito por Russell et al. (J. Biol. Chem. 258: 2674, 1982) y Beier et al. (Nature 300: 724, 1982). Los vectores lanzadera replicables tanto en levadura como en *E. coli* pueden ser construidos por medio de la inserción de secuencias de ADN de pBR322 para selección y replicación en *E. coli* (gen Amp<sup>r</sup> y origen de replicación) en los vectores de descritos anteriormente.

La secuencia líder del factor  $\alpha$  de levadura puede ser empleada para dirigir la secreción del polipéptido TRAIL. La secuencia líder del factor  $\alpha$  está a menudo insertada entre la secuencia promotora y la secuencia del gen estructural. Ver, por ejemplo, Kurjan et al., Cell 30: 933, 1982 y Bitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5330, 1984. Otras secuencias líder adecuadas para facilitar la secreción de polipéptidos recombinantes de huéspedes de levadura son conocidas por aquellos capacitados en el arte. Una secuencia líder puede ser modificada cerca de su extremo 3' para contener uno o más sitios de restricción. Esto facilitará la fusión de la secuencia líder al gen estructural.

Los protocolos de transformación de levadura son conocidos por aquellos capacitados en el arte. Uno de tales protocolos está descrito por Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929, 1978. El protocolo de Hinnen et al. selecciona los transformantes de Trp<sup>+</sup> en un medio selectivo, en donde el medio selectivo consiste de base nitrogenada de levadura al 0,67%, casaminoácidos al 0,5%, glucosa al 2%, 10  $\mu$ g/ml de adenina y 20  $\mu$ g/ml de uracilo.

Las células huésped de levadura transformadas por vectores que contienen una secuencia promotora ADH2 pueden ser cultivadas para inducir expresión en un medio "rico". Un ejemplo de un medio rico es uno que consiste de extracto de levadura al 1%, peptona al 2%, y glucosa al 1% suplementado con 80  $\mu$ g/ml de adenina y 80  $\mu$ g/ml de uracilo. La desrepresión del promotor ADH2 ocurre cuando se agota la glucosa del medio.

Los sistemas de cultivo de células huésped de insecto o de mamífero podrían ser empleados también para expresar polipéptidos TRAIL recombinantes. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos son revisados por Luckow y Summers, Bio/Technology 6: 47 (1988). Las líneas de células establecidas de origen mamífero también pueden ser empleadas. Los ejemplos de líneas adecuadas de células huésped de mamífero incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., Cell 23: 175, 1981), células L, células C 127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, y líneas de células BHK (ATCC CRL 10), y la línea de células CVI/EBNA derivada de la línea de células de riñón de mono verde africano CVI (ATCC CCL 70) como lo describen McMahan et al. (EMBO J. 10: 2821, 1991).

Las secuencias de control transcripcional y de traducción para vectores de expresión de células huésped de mamífero pueden ser extirpadas de genomas virales. Las secuencias promotoras comúnmente utilizadas y las secuencias reforzadoras se derivan del Poliomasvirus, Adenovirus 2, Virus Simio 40 (SV40), y citomegalovirus

- humano. Las secuencias de ADN derivadas del genoma viral SV40, por ejemplo, de origen SV40, promotor temprano y tardío, reforzador, empalme, y sitios de poliadenilación pueden ser utilizados para proporcionar otros elementos genéticos para expresión de una secuencia génica estructural en una célula huésped de mamífero. Los promotores virales temprano y tardío son particularmente útiles debido a que ambos son fácilmente obtenidos a partir de un genoma viral como un fragmento que puede contener también un origen viral de replicación (Fiers et al., Nature 273: 113, 1978). Se pueden utilizar también fragmentos más grandes o más pequeños de SV40, con tal de que esté incluida la secuencia de aproximadamente 250 pb que se extiende desde el sitio *Hind* III hacia el sitio *Bgl* I localizado en el origen viral de SV40 del sitio de replicación.
- Los vectores de expresión para uso en células huésped de mamífero pueden ser construidos como lo divulgan Okayama y Berg (Mol. Cell. Biol. 3: 280, 1983), por ejemplo. Un sistema útil para expresión estable de alto nivel de los ADNs de mamífero en células epiteliales mamarias de murino C127 puede ser construido sustancialmente como lo describen Cosman et al. (Mol. Immunol. 23: 935, 1986). Un vector de alta expresión, PMLSV N1/N4, descrito por Cosman et al., Nature 312: 768, 1984 ha sido depositado como ATCC 39890. Vectores adicionales de expresión de mamífero son descritos en EP-A-0367566, y en WO 91/18982. Como alternativa, se puede derivar el vector de un retrovirus. Sistemas adecuados adicionales de expresión están descritos en los ejemplos más adelante.
- Un sistema de expresión preferido emplea células de ovario de hámster chino (CHO) y un vector de expresión denominado PG5.7. Este vector de expresión está descrito en la solicitud estadounidense de patente con serial no. 08/586.509, presentada el 11 de enero de 1996, que se incorpora aquí como referencia. Los componentes de PG5.7 incluyen un fragmento de ADN genómico de células CHO, seguidos por un promotor derivado de CMV, que es seguido por una secuencia que codifica un líder tripartita de adenovirus, que a su vez es seguido por una secuencia que codifica dihidrofolato reductasa (DHFR). Estos componentes fueron insertados en un vector plásmido pGEM 1 (Promega, Madison, WI). ADN que codifica un polipéptido TRAIL (o proteína de fusión que contiene TRAIL) puede ser insertado entre las secuencias que codifican al líder tripartita y DHFR. Se puede añadir metotrexato al medio de cultivo para incrementar los niveles de expresión, como se reconoce en el campo.
- El fragmento de ADN genómico de células CHO en el vector PG5.7 mejora la expresión de TRAIL. Un lisado de fago que contiene un fragmento de ADN genómico aislado de células CHO fue depositado con la American Type Culture Collection el 4 de enero de 1996, y se le asignó el número de acceso ATCC 97411. El vector PG5.7 contiene los nucleótidos 8671 a 14507 del inserto de ADN genómico de CHO en el depósito de la cepa ATCC 97411.
- Para expresión de TRAIL, se pueden añadir una proteína tipo II que carece de una secuencia de señal nativa, una secuencia de señal heteróloga o funcional líder en células huésped de mamífero. Los ejemplos incluyen la secuencia señal para interleuquina-7 (IL-7) descrita en la Patente Estadounidense No. 4.965.195, la secuencia señal para el receptor interleuquina-2 descrito en Cosman et al., Nature 312: 768 (1984); el péptido señal del receptor de interleuquina-4 descrito en EP 367,566; el péptido señal del receptor de interleuquina-1 tipo I descrito en la Patente Estadounidense No. 4.968.607; y el péptido señal del receptor de interleuquina-1 tipo II descrito en EP 460.846.
- Un sistema de expresión preferido emplea una secuencia líder derivada de citomegalovirus (CMV). El ejemplo 7 ilustra el uso de uno de tales líderes. En el ejemplo 7, se transformaron las células huésped de mamífero con un vector de expresión que codifica al péptido Met Ala Arg Arg Leu Trp Ile Leu Ser Leu Leu Ala Val Thr Leu Thr Val Ala Leu Ala Ala Pro Ser Gln Lys Ser Lys Arg Arg Thr Ser Ser (SEQ ID NO: 9) fusionado al terminal N de un octapéptido denominado FLAG® (SEQ ID NO: 7, descrita más arriba), que a su vez está fusionado al terminal N de un polipéptido TRAIL soluble. Los residuos 1 a 29 de la SEQ ID NO: 9 constituyen una secuencia líder derivada de CMV, mientras que los residuos 30 a 32 son codificados por oligonucleótidos empleados en la construcción del vector de expresión descrito en el ejemplo 7. En una modalidad, el ADN que codifica un péptido poli-His (por ejemplo, un péptido que contiene seis residuos de histidina) está posicionado entre las secuencias que codifican al líder del CMV y al péptido FLAG®.
- Los sistemas de expresión que emplean tales péptidos líder derivados de CMV son útiles para expresión de proteínas que no sean TRAIL. Los vectores de expresión que comprenden una secuencia de ADN que codifica los aminoácidos 1 a 29 de la SEQ ID NO: 9 son suministrados aquí. En otra modalidad, el vector incluye una secuencia que codifica los aminoácidos 1 a 28 de la SEQ ID NO: 9. El ADN que codifica una proteína heteróloga deseada está posicionado secuencia abajo de, y en el mismo marco de lectura del ADN que codifica al líder. Residuos adicionales (por ejemplo, aquellos codificados por enlazadores o iniciadores) pueden ser codificados por ADN posicionado entre las secuencias que codifican al líder y la proteína heteróloga deseada, como se ilustra por medio del vector descrito en el ejemplo 7. Como se comprenderá en el campo pertinente, los vectores de expresión incluyen promotores y cualquier otra de las secuencias reguladoras deseadas, operativamente enlazadas a las secuencias que codifican a la proteína líder y a la heteróloga.
- El péptido líder presentado en la SEQ ID NO: 9 puede ser escindido después del residuo de arginina en la posición 29 para producir la forma secretada madura de una proteína fusionada al mismo. Alternativamente o adicionalmente, la escisión puede presentarse entre los aminoácidos 20 y 21, o entre los aminoácidos 28 y 29, de la SEQ ID NO: 9.

- El experto en la material se dará cuenta que la(s) posición(es) en la(s) cual(es) el péptido señal es escindido puede variar de acuerdo con factores tales como el tipo de células huésped empleadas, si TRAIL humana o de murino es expresada por el vector, y similares. Los análisis por medio de un programa de computador revelan que el sitio primario de escisión puede estar entre los residuos 20 y 21 de la SEQ ID NO: 9. Se predice que la escisión entre los
- 5 residuos 22 y 23, y entre los residuos 27 y 28, es posible también. Para ilustración, la expresión y secreción de un polipéptido TRAIL soluble de murino resultó en la escisión de un péptido señal derivado de CMV en múltiples posiciones. Las tres especies más prominentes de proteína secretada (en orden decreciente) resultaron de la escisión entre los aminoácidos 20 y 21 de la SEQ ID NO: 9, de la escisión entre los aminoácidos 22 y 23, y de la escisión entre los aminoácidos 27 y 28.
- 10 Un método para producir una proteína recombinante heteróloga involucra el cultivo de células huésped de mamífero transformadas con ese vector de expresión bajo condiciones que promueven la expresión y al secreción de la proteína heteróloga, y la recuperación de la proteína del medio de cultivo. Los sistemas de expresión que emplean líderes de CMV pueden ser utilizados para producir cualquier proteína deseada, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, factores estimuladores de colonias, interferones, interleuquinas, otras citoquinas, y receptores de citoquina.
- 15 Proteína TRAIL purificada
- La presente invención provee proteínas TRAIL purificadas, que pueden ser producidas por sistemas de expresión recombinante como se describió anteriormente o purificadas a partir de células de origen natural. El grado deseado de pureza puede depender del uso pretendido para la proteína. Un grado de pureza relativamente alto es deseable cuando la proteína va a ser administrada *in vivo*, por ejemplo. Convenientemente, se purifican los polipéptidos TRAIL
- 20 de tal manera que no son detectables bandas de proteína correspondientes a otras proteínas por electroforesis en ge de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Una persona capacitada en el campo pertinente se dará cuenta que se pueden detectar múltiples bandas correspondientes a proteína TRAIL por medio de SDS-PAGE, debido a glicosilación diferencial, a variaciones en el proceso post-traduccional, y similares, como se discutió anteriormente. Una preparación de proteína TRAIL se considera que está purificada siempre y cuando no se visualicen bandas correspondientes a diferentes (no TRAIL) proteínas. TRAIL se purifica más preferiblemente hasta homogeneidad sustancial, como se indica por medio de una sola banda de proteína después del análisis por SDS-PAGE. La banda de proteína puede ser visualizada por medio de coloración de plata, coloración azul de Coomassie, o (si la proteína está marcada en forma radioactiva) por autorradiografía.
- 25 Un proceso para la proteína TRAIL comprende el cultivo de una célula huésped transformada con un vector de expresión que contiene una secuencia de ADN que codifica TRAIL bajo condiciones tales que se exprese TRAIL. La proteína TRAIL es luego recuperada del cultivo (a partir del medio de cultivo o extractos celulares). Como reconocerá una persona experta en la materia, los procedimientos para purificación de TRAIL recombinante variarán de acuerdo con factores tales como el tipo de células huésped empleadas y de si se secreta o no TRAIL dentro del medio de cultivo.
- 30 Por ejemplo, cuando se emplean los sistemas de expresión que secretan la proteína recombinante, se puede concentrar primero el medio de cultivo utilizando un filtro de concentración de proteína comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, se puede aplicar el concentrado a una matriz de purificación tal como un medio de filtración por gel. Alternativamente, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo (DEAE). Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empelados en purificación de proteína. Alternativamente, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diferentes matrices insolubles que contienen grupos sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren los grupos sulfopropilo. Finalmente, se pueden emplear una o más etapas de cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC) que emplean medio hidrófobo para RP-HPLC,
- 40 (por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo u otros grupos alifáticos) para purificar adicionalmente TRAIL. Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diferentes combinaciones, pueden ser empleadas para suministrar una proteína TRAIL purificada.
- La proteína recombinante producida en cultivos bacterianos puede ser aislada por ruptura inicial de las células huésped, centrifugación, extracción a partir de precipitados celulares si existe un polipéptido insoluble, o a partir del fluido sobrenadante si existe un polipéptido soluble, seguido por una o más etapas de concentración, precipitación por saturación salina, intercambio iónico, purificación por afinidad o etapas de cromatografía de exclusión por tamaño. Finalmente, se puede emplear RP-HPLC para las etapas finales de purificación. Se pueden romper las células microbianas por medio de cualquier método conveniente, incluida ciclización por congelación -
- 50 descongelación, sonicación, rotura mecánica, o uso de agentes de lisado celular.
- 55 Las células huésped transformadas de levadura se emplean preferiblemente para expresar TRAIL como un polipéptido secretado. Esto simplifica la purificación. El polipéptido recombinante secretado a partir de la fermentación de células huésped de levadura puede ser purificado por métodos análogos a aquellos divulgados por

Urdal et al. (J. Chromatog. 296: 171, 1984). Urdal et al. describen dos etapas secuenciales de HPLC en fase reversa para la purificación de IL-2 humana recombinante sobre una columna de HPLC preparativa.

5 Alternativamente, se pueden purificar polipéptidos TRAIL por medio de cromatografía de inmunoafinidad. Se puede preparar una columna de afinidad que contiene un anticuerpo que enlaza TRAIL por medio de procedimientos convencionales y emplearla en la purificación de TRAIL. El ejemplo 4 describe un procedimiento para generar anticuerpos monoclonales dirigidos contra TRAIL.

#### Propiedades y usos de TRAIL

10 La muerte celular programada (apoptosis) se presenta durante la embriogénesis, metamorfosis, atrofia de tejido con dependencia endocrina, renovación normal del tejido, y muerte de timocitos inmunes. La regulación de la muerte celular programada es vital para el normal funcionamiento del sistema inmunológico. Para ilustración, se destruyen células T que reconocen autoantígenos a través de un proceso apoptótico durante la maduración de células T en el timo, mientras otras células T son seleccionadas positivamente. Se ha propuesto la posibilidad de que algunas células T que reconocen ciertos autoepítomos (por ejemplo, ineficientemente procesados y que presentaron determinantes antigénicos de una autoproteína dada) escapen de este proceso de eliminación y posteriormente jueguen un papel en enfermedades autoinmunes (Gammon et al., Immunology Today 12: 193, 1991).

15 Una apoptosis insuficiente ha sido implicada en ciertas condiciones, mientras que niveles elevados de muerte celular apoptótica han sido asociados con otras enfermedades. La conveniencia de identificar y utilizar agentes que regulen la apoptosis en el tratamiento de tales trastornos es reconocida (Kromer, Advances in Immunology, 58: 211, 1995; Groux et al., J. Exp. Med. 175: 331, 1992; Sachs and Lotem, Blood 82:15, 1993).

20 La resistencia anormal de las células T a sufrir apoptosis ha sido relacionada con linfocitosis, linfadenopatía, esplenomegalia, acumulación de células T autorreactivas, enfermedades autoinmunes, desarrollo de leucemia, y desarrollo de linfoma (Kromer, ver más arriba; ver especialmente las páginas 214 - 215). Contrariamente, se ha sugerido que una apoptosis excesiva de células T juega un papel en linfopenia, inmunodeficiencia sistémica, e inmunodeficiencia específica, con ejemplos específicos siendo los estados inmunodeficientes inducidos por virus asociados con mononucleosis infecciosa e infección por citomegalovirus, e inmunosupresión mediada por tumores (Kromer, ver más arriba; ver especialmente la página 214). El agotamiento de células T CD4<sup>+</sup> en individuos infectados con VIH puede ser atribuida a muerte celular inducida por activación inapropiada (AICD) por apoptosis (Groux et al., J. Exp. Med. 175: 331, 1992).

30 Como se demuestra en los ejemplos 5 y 8, TRAIL induce apoptosis de la línea de células de leucemia aguda de células T denominada clon Jurkat E6-1. TRAIL es por lo tanto un reactivo para investigación útil en estudios de apoptosis, incluida la regulación de la muerte celular programada. Ya que las células Jurkat son una línea de células de leucemia que surgen de células T, la TRAIL de la presente invención encuentra uso en estudios del papel que puede jugar TRAIL en la apoptosis de otras células T transformadas, tal como otros tipos de células malignas que surgen de células T.

35 TRAIL se une a las células Jurkat, al igual que induce apoptosis de las mismas. TRAIL no provocó la muerte de timocitos de múrido recientemente aislados, o de células T de sangre periférica (las PBT) recientemente extraídas de un donante humano sano. Una cantidad de usos surgen a partir de estas propiedades de TRAIL.

40 Los polipéptidos TRAIL pueden ser utilizados para purificar células de leucemia, o cualquier otro tipo de célula con la cual se une TRAIL. Las células de leucemia se pueden aislar a partir de la sangre de pacientes, por ejemplo. En una modalidad, se purifican las células por medio de cromatografía de afinidad, utilizando una matriz de cromatografía que tiene TRAIL enlazada a la misma. La TRAIL unida a la matriz de cromatografía puede ser una proteína de longitud completa, un fragmento de TRAIL que contiene al dominio extracelular, una proteína de fusión que contiene TRAIL, u otros polipéptidos TRAIL adecuados descritos aquí. En una modalidad, una proteína de fusión soluble TRAIL/Fc está enlazada a una columna de Proteína A o de Proteína G a través de la interacción de la estructura funcional Fc con la Proteína A o Proteína G. Alternativamente, TRAIL puede ser utilizada en el aislamiento de células de leucemia por medio de citometría de flujo.

45 Se espera que las células de leucemia así purificadas mueran después de enlazarse a TRAIL, pero las células muertas todavía tienen antígenos de superficie celular, y pueden ser empleadas como inmunógenos en la obtención de anticuerpos anti-leucemia. Las células de leucemia, o un antígeno deseado de la superficie de la célula aislado de la misma, encuentran uso adicional en el desarrollo de vacunas.

50 Ya que TRAIL enlaza y mata células de leucemia (la línea de células Jurkat), TRAIL también puede ser útil en el tratamiento de la leucemia. Un método terapéutico involucra el contacto de células de leucemia con una cantidad efectiva de TRAIL. En una modalidad, se pone en contacto la sangre de un paciente con leucemia *ex vivo* con un

polipéptido TRAIL. El TRAIL puede ser inmovilizado sobre una matriz adecuada. TRAIL se enlaza a las células de leucemia, removiéndolas así de la sangre del paciente antes de que la sangre retorne al paciente.

5 Alternativamente o adicionalmente, la médula ósea extraída de un paciente con leucemia puede ser puesta en contacto con una cantidad de TRAIL efectiva para inducir la muerte de células de leucemia en la médula ósea. La médula ósea puede ser aspirada del esternón o de las crestas ilíacas, por ejemplo, y puesta en contacto con TRAIL para purgar las células de leucemia. La médula así tratada es retornada al paciente.

10 TRAIL también se enlaza a, e induce apoptosis de, células de linfoma y de melanoma (ver los ejemplos 5, 9, y 10). De este modo, los usos de TRAIL que son análogos a aquellos descritos anteriormente para células de leucemia son aplicables a células de linfoma y de melanoma. Los polipéptidos TRAIL pueden ser empleados en el tratamiento del cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, leucemia, linfoma, y melanoma. En una modalidad, el linfoma es linfoma de Burkitt. La Tabla I en el ejemplo 9 muestra que TRAIL tuvo un efecto citotóxico sobre diferentes líneas de células de linfoma de Burkitt. El virus de Epstein-Barr es un agente etiológico del linfoma de Burkitt.

15 Los polipéptidos TRAIL también encuentran uso en el tratamiento de infecciones virales. El contacto con TRAIL provoca la muerte de células infectadas con citomegalovirus, pero no del mismo tipo de célula cuando no está infectada, como se describe en el ejemplo 11. La habilidad de TRAIL para matar células infectadas con otros virus puede ser confirmada utilizando el ensayo descrito en el ejemplo 11. Tales virus incluyen, pero no se limitan al virus de la encefalomiocarditis, al virus de la enfermedad de Newcastle, al virus de estomatitis vesicular, al virus del herpes simple, adenovirus-2, al virus de diarrea viral bovina, VIH, y al virus de Epstein-Barr.

20 Se administra una cantidad efectiva de TRAIL a un mamífero, incluido un humano, afligido con una infección viral. En una modalidad, se emplea TRAIL junto con interferón para tratar una infección viral. En el experimento descrito en el ejemplo 11, el pretratamiento de células infectadas con CMV con interferón reforzó el nivel de muerte de las células infectadas que era mediado por TRAIL. Se puede administrar TRAIL junto con otros agentes que ejercen un efecto citotóxico sobre las células cancerosas o sobre células infectadas con virus.

25 En otra modalidad, se utiliza TRAIL para matar células infectadas en forma viral en preparaciones celulares, tejidos, u órganos que van a ser trasplantados. Para ilustración, se puede poner en contacto médula ósea con TRAIL para matar células infectadas con virus que pueden estar presentes allí, antes que la médula ósea sea trasplantada al beneficiario.

30 El TRAIL de la presente invención puede ser utilizado en el desarrollo de tratamientos para cualquier trastorno mediado (directa o indirectamente) por cantidades defectuosas o insuficientes de TRAIL. Se administra una cantidad terapéuticamente efectiva de proteína TRAIL purificada a un paciente afligido con tal trastorno. Alternativamente, las secuencias de ADN para TRAIL se pueden emplear en el desarrollo de un enfoque de terapia génica para tratar tales trastornos. La divulgación aquí de secuencias nativas de nucleótidos para TRAIL permite la detección de genes defectuosos para TRAIL, y el reemplazo de los mismos genes que codifican TRAIL normal. Los genes defectuosos pueden ser detectados en ensayos de diagnóstico *in vitro*, y por comparación de la secuencia nativa de nucleótidos para TRAIL divulgada aquí con aquella de un gen para TRAIL derivado de una persona sospechosa de albergar un defecto en este gen.

40 La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen TRAIL purificado y un portador, diluyente o excipiente fisiológicamente aceptable. Los portadores, diluyentes y excipientes adecuados son no tóxicos con los beneficiarios en las dosis y concentraciones empleadas. Tales composiciones pueden contener amortiguadores, antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (aproximadamente menos de 10 residuos) polipéptidos, proteínas, aminoácidos, carbohidratos incluyendo glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes de quelación tales como EDTA, glutatona y otros estabilizantes y excipientes comúnmente empleados en composiciones farmacéuticas. Entre los diluyentes apropiados se encuentran solución salina amortiguada neutra o solución salina mezclada con albúmina de suero conespecífica. La composición puede ser formulada con liofilizado que utiliza soluciones excipientes apropiadas (por ejemplo sacarosa) tales como diluyentes.

50 Para uso terapéutico, se administran las proteínas purificadas de la presente invención a un paciente, preferiblemente un humano, para tratamiento en una forma apropiada con la indicación. Por lo tanto, por ejemplo, se pueden administrar localmente las composiciones farmacéuticas, por medio de una inyección intravenosa, infusión continua, liberación sostenida de implantes, u otra técnica adecuada. Las dosis apropiadas y la frecuencia de administración dependerán, desde luego, de factores tales como la naturaleza y severidad de la indicación que está siendo tratado, de la respuesta deseada, de la condición del paciente, etc.

La proteína TRAIL empleada en las composiciones farmacéuticas se purifica preferiblemente de tal manera que la proteína TRAIL esté sustancialmente libre de otras proteínas de origen natural o endógeno, que contenga deseablemente aproximadamente menos del 1% en masa de contaminantes de la proteína como residuos de los

procesos de producción. Tales composiciones, sin embargo, puede contener otras proteínas añadidas como estabilizadores, portadores, excipientes o co-terapéuticos.

Los ADN que codifican TRAIL divulgados aquí encuentran uso en la producción de polipéptidos TRAIL, como se discute más arriba. Los fragmentos de las secuencias de nucleótidos para TRAIL son también útiles. En una modalidad, tales fragmentos incluyen aproximadamente al menos 17 nucleótidos consecutivos, más preferiblemente al menos 30 nucleótidos consecutivos, del ADN para TRAIL humano o de murino divulgado aquí. Se suministran aquí complementos de ADN y ARN de dichos fragmentos, junto tanto con formas monocatenarias como bicatenarias del ADN para TRAIL de las SEQ ID NOS: 1, 3 y 5.

Entre los usos de tales fragmentos de ácido nucleico para TRAIL están el uso como una sonda o como iniciadores en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como ejemplo, se puede emplear una sonda correspondiente al dominio extracelular de TRAIL. Las sondas encuentran uso en detectar la presencia de ácidos nucleicos para TRAIL en ensayos *in vitro* y en procedimientos tales como transferencias tipo Northern y tipo Southern. Se pueden identificar también tipos de células que expresan TRAIL. Tales procedimientos son bien conocidos, y la persona experta puede escoger una sonda de longitud adecuada, dependiendo de la aplicación particular pretendida. Para PCR, se emplean los iniciadores 5' y 3' correspondientes a los terminales de una secuencia deseada de ADN para TRAIL para aislar y amplificar esa secuencia, utilizando técnicas convencionales.

Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos para TRAIL son oligonucleótidos sentido o antisentido que contienen una secuencia de ácido nucleico monocatenaria (ya sea ARN o ADN) capaz de enlazarse con secuencias objetivo de ARNm para TRAIL (sentido) o ADN para TRAIL (antisentido). Tal fragmento generalmente contiene aproximadamente al menos 14 nucleótidos, preferiblemente aproximadamente desde 14 hasta aproximadamente 30 nucleótidos. La habilidad para crear un oligonucleótido sentido o antisentido, con base en una secuencia de ADNc para una proteína dada es descrita, por ejemplo, en Stein y Cohen, *Cancer Res.* 48: 2659, 1988 y van der Krol et al., *BioTechniques* 6: 958, 1988.

El enlazamiento de oligonucleótidos sentido o antisentido con secuencias de ácido nucleico objetivo resulta en la formación de dúplex que bloquean la traducción (ARN) o la transcripción (ADN) por uno de diferentes medios, incluida la degradación mejorada de los dúplex, la terminación prematura de la transcripción o de la traducción, o por otros medios. Los oligonucleótidos antisentido pueden ser usados por lo tanto para bloquear la expresión de proteínas TRAIL.

Los oligonucleótidos sentido o antisentido incluyen además oligonucleótidos que tienen columnas vertebrales modificadas de azúcar - fosfodiéster (u otros enlaces de azúcar, tal como aquellos descritos en WO91/06629) y en donde tales enlaces de azúcar son resistentes a nucleasas endógenas. Tales oligonucleótidos con enlaces resistentes de azúcar son estables *in vivo* (es decir, capaces de resistir degradación enzimática) pero retienen la especificidad de la secuencia para ser capaces de enlazarse con secuencias de nucleótidos objetivo. Otros ejemplos de oligonucleótidos sentido o antisentido incluyen a aquellos oligonucleótidos que están emplazados en forma corriente con estructuras orgánicas funcionales, tal como aquellas descritas en WO 90/10448, y otras estructuras funcionales que incrementan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácido nucleico objetivo, tal como poli-(L-lisina). Más aún, se pueden unir agentes de intercalación, tales como elipticina, y agentes de alquilación o complejos metálicos a oligonucleótidos sentido o antisentido para modificar las especificidades de enlazamiento de los oligonucleótidos sentido o antisentido para la secuencia de nucleótidos objetivo.

Los oligonucleótidos sentido o antisentido pueden ser introducidos en una célula que contenga la secuencia de ácido nucleico objetivo por medio de cualquier método de transferencia de genes, incluyendo, por ejemplo, transfección de ADN mediada por CaPO<sub>4</sub>, electroporación, otros vectores de transferencia de genes tales como el virus de Epstein-Barr. Los oligonucleótidos sentido o antisentido se introducen preferiblemente en una célula que contenga la secuencia de ácido nucleico objetivo por medio de la inserción del oligonucleótido sentido o antisentido en un vector retroviral adecuado, luego poner en contacto la célula con el vector retroviral que contiene la secuencia deseada, ya sea *in vivo* o *ex vivo*. Los vectores retrovirales adecuados incluyen, pero no se limitan a, el retrovirus de murino M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV), o los vectores de doble copia denominados DCT5A, DCT5B y DCT5C (ver la Solicitud PCT WO 90/13641). Alternativamente, se pueden utilizar otras secuencias promotoras para expresar al oligonucleótido.

Los oligonucleótidos sentido o antisentido pueden ser introducidos en una célula que contenga la secuencia de nucleótidos objetivo por medio de la formación de un conjugado con una molécula para el enlazamiento del ligando, como se describe en WO 91/04753. Las moléculas adecuadas para enlazamiento del ligando incluyen, pero no se limitan a, receptores de la superficie de la célula, factores de crecimiento, otras citoquinas, u otros ligandos que se enlacen con receptores de la superficie de la célula. Preferiblemente, la conjugación de la molécula de enlazamiento del ligando no interfiere sustancialmente con la habilidad de la molécula para enlazamiento del ligando para enlazarse con su molécula correspondiente o receptor, o bloquea la entrada del oligonucleótido sentido o antisentido o su versión conjugada en la célula.

Alternativamente, un oligonucleótido sentido o antisentido puede ser introducido en una célula que contenga la secuencia de ácido nucleico objetivo por medio de la formación de un complejo oligonucleótido - lípido, como se describe en WO 90/10448. El complejo oligonucleótido sentido o antisentido - lípido es preferiblemente disociado dentro de la célula por medio de una lipasa endógena.

## 5 Anticuerpos inmunoreactivos con TRAIL

Las proteínas TRAIL de la presente invención, o fragmentos inmunogénicos de las mismas, pueden ser empleadas en la generación de anticuerpos. La presente invención provee así anticuerpos que específicamente enlazan TRAIL, es decir, los anticuerpos enlazan a TRAIL a través de los sitios de enlazamiento del antígeno del anticuerpo (en lugar de enlazamiento no específico).

10 Se pueden preparar anticuerpos policlonales y monoclonales por medio de técnicas convencionales. Ver, por ejemplo, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet et al. (eds.), Plenum Press, New York (1980); y *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988). La producción de anticuerpos monoclonales que son inmunoreactivos con TRAIL es ilustrada adicionalmente en el ejemplo 4 más adelante.

15 Los fragmentos para enlazamiento de antígenos de tales anticuerpos, que pueden ser producidos por medio de técnicas convencionales, también son abarcados por la presente invención. Los ejemplos de tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos Fab, F(ab'), y F(ab')<sub>2</sub>. También se proporcionan fragmentos de anticuerpo y derivados producidos por medio de técnicas de ingeniería genética.

20 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, por ejemplo, versiones humanizadas de anticuerpos monoclonales de murino. Tales anticuerpos humanizados pueden ser preparados por medio de técnicas conocidas, y ofrecen la ventaja de inmunogenicidad reducida cuando se administran los anticuerpos a humanos. En una modalidad, un anticuerpo monoclonal humanizado contiene la región variable de un anticuerpo de murino (o simplemente el sitio de enlazamiento del antígeno del mismo) y una región constante derivada de un anticuerpo humano. Alternativamente, un fragmento de anticuerpo humanizado puede incluir el sitio de enlazamiento del antígeno de un anticuerpo monoclonal de murino y un fragmento de región variable (que carece del sitio de enlazamiento del antígeno) derivado de un anticuerpo humano. Los procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales quiméricos y modificados adicionalmente por ingeniería genética incluyen a aquellos descritos en Riechmann et al. (*Nature* 332: 323, 1988), Liu et al. (*PNAS* 84: 3439, 1987), Larrick et al. (*Bio/Technology* 7: 934, 1989), y Winter y Harris (*TIPS* 14: 139, Mayo, 1993).

30 Entre los usos de los anticuerpos está el uso en ensayos para detectar la presencia de polipéptidos TRAIL, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos encuentran uso adicionalmente en la purificación de TRAIL por medio de cromatografía de afinidad.

35 Aquellos anticuerpos que adicionalmente pueden bloquear el enlazamiento de TRAIL a células objetivo pueden ser utilizados para inhibir una actividad biológica de TRAIL. Un método terapéutico involucra la administración *in vivo* de tal anticuerpo en una cantidad efectiva para inhibir una actividad biológica mediada por TRAIL. Los trastornos mediados o exacerbados por TRAIL, directa o indirectamente, son tratados de este modo. Se prefieren generalmente anticuerpos monoclonales para uso en tales métodos terapéuticos.

40 Los anticuerpos dirigidos contra TRAIL pueden ser útiles para el tratamiento de microangiopatías trombóticas. Uno de tales trastornos es la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) (Kwaan, H. C., *Semin. Hematol.*, 24: 71, 1987; Thompson et al., *Blood*, 80: 1890, 1992). Se ha reportado un incremento en las tasas de mortalidad asociadas con TTP por parte de los Centros Estadounidenses para el Control de Enfermedades (Torok et al., *Am. J. Hematol.* 50: 84, 1995).

45 El plasma de pacientes afligidos con TTP (incluidos los pacientes con VIH<sup>+</sup> y VIH<sup>-</sup>) inducen apoptosis de células endoteliales humanas de origen microvascular dérmico, pero no originadas en vasos grandes (Laurence et al., *Blood*, 87: 3245, Abril 15, 1996). Se piensa por lo tanto que en plasma de pacientes con TTP contiene uno o más factores que inducen directa o indirectamente apoptosis. En el ensayo de distrito en el ejemplo 13 más abajo, los anticuerpos policlonales surgidos contra TRAIL inhibieron la apoptosis inducida por plasma con TTP de células endoteliales microvasculares dérmicas. Los datos presentados en el ejemplo 13 sugieren que TRAIL está presente en el suero de pacientes con TTP, y pueden jugar un papel en la inducción de apoptosis de células endoteliales microvasculares. Otra microangiopatía trombótica es el síndrome hemolítico-urémico (HUS) (Moake, J. L., *Lancet*, 343: 393, 1994; Melnyk et al., (*Arch. Intern. Med.*, 155: 2077, 1995; Thompson et al., ver más arriba). Una modalidad de la invención está dirigida al uso de un anticuerpo anti-TRAIL para tratar la condición que a menudo es denominada como "HUS en adultos" (incluso aunque puede golpear a niños también). Un trastorno conocido como HUS asociado con la infancia/diarrea difiere en etiología del HUS de adultos.

Otras condiciones caracterizadas por la coagulación de vasos sanguíneos pequeños pueden ser tratadas utilizando anticuerpos anti-TRAIL. Tales condiciones incluyen pero no se limitan a las siguientes. Los problemas cardíacos observados en aproximadamente 5 - 10% de pacientes pediátricos con SIDA se cree que involucran coagulación de vasos sanguíneos pequeños. La ruptura de la microvasculatura en el corazón ha sido reportada en pacientes con esclerosis múltiple. Como ejemplo adicional, se contempla el tratamiento de lupus eritematoso sistémico (SLE).

En una modalidad, se pone en contacto sangre o plasma de un paciente con un anticuerpo anti-TRAIL *ex vivo*. El anticuerpo (preferiblemente un anticuerpo monoclonal) puede ser enlazado a una matriz cromatográfica adecuada por medio de procedimientos convencionales. La sangre o el plasma del paciente fluyen a través de una columna cromatográfica que contiene al anticuerpo enlazado a la matriz, antes de ser regresada al paciente. El anticuerpo inmovilizado enlaza TRAIL, removiendo por lo tanto la proteína TRAIL de la sangre del paciente.

En una modalidad alternativa, se administran los anticuerpos *in vivo*, en cuyo caso se emplean deseablemente anticuerpos de bloqueo. Tales anticuerpos pueden ser identificados utilizando cualquier procedimiento adecuado de ensayo, tal como por medio de anticuerpos de prueba por la habilidad para inhibir el enlazamiento de TRAIL a células objetivo. Alternativamente, se pueden identificar los anticuerpos de bloqueo en ensayos por la habilidad para inhibir un efecto biológico del enlazamiento de TRAIL con células objetivo. El ejemplo 12 ilustra un método adecuado para identificar anticuerpos de bloqueo, en donde se analizan los anticuerpos por la habilidad para inhibir la lisis mediada por TRAIL de células Jurkat.

La presente invención provee por lo tanto un método para tratar una microangiopatía trombótica, que involucran el uso de una cantidad efectiva de un anticuerpo dirigido contra TRAIL. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser empleados en procedimientos *in vivo* o *ex vivo*, para inhibir el daño mediado por TRAIL (por ejemplo, apoptosis de) a células endoteliales microvasculares.

Los anticuerpos anti-TRAIL pueden ser empleados junto con otros agentes útiles en el tratamiento de un trastorno particular. En un estudio *in vitro* reportado por Laurence et al. (Blood 87: 3245, 1996), se logró alguna reducción de la apoptosis mediada por plasma con TTP de células endoteliales microvasculares por medio del uso de un anticuerpo de bloqueo anti-Fas, ha sido aurintricarboxílico, o plasma normal sin crioprecipitado.

Por lo tanto, un paciente puede ser tratado con un agente que inhiba la apoptosis mediada por un ligando de Fas de células endoteliales, en combinación con un agente que inhiba la apoptosis mediada por TRAIL de células endoteliales. En una modalidad, se administran tanto un anticuerpo de bloqueo anti-TRAIL como un anticuerpo de bloqueo anti-FAS un paciente afligido con un trastorno caracterizado por microangiopatía trombótica, tal como TTP o HUS. Ejemplos de anticuerpos monoclonales de bloqueo dirigidos contra antígeno Fas (CD95) son descritos en la publicación de la solicitud PCT número WO 95/10540, que se incorporan aquí como referencia.

Se suministran aquí composiciones farmacéuticas que contiene un anticuerpo que es inmunorreactivo con TRAIL, y un diluyente, excipiente, o portador adecuado. Los componentes adecuados de tales composiciones son como se describió anteriormente para las composiciones que contienen proteínas TRAIL.

#### **EJEMPLO 1:** Aislamiento de un ADN para TRAIL humano

Se aisló el ADN que codifica una proteína TRAIL humana de la presente invención por medio del siguiente procedimiento. Se llevó a cabo una búsqueda por TBLASTN de la base de datos dbEST en el National Center for Biological Information (NCBI), utilizando la secuencia de consulta LVVXXXGLYYVYXQVXF (SEQ ID NO: 8). Esta secuencia está basada en la región más conservada de la familia del ligando TNF (Smith et al., Cell, 73: 1349, 1993). Se identificó un archivo de etiquetas de secuencia expresada (EST), número de acceso del GenBank Z36726, utilizando estos parámetros de búsqueda. El archivo del GenBank indicó que esta EST se obtuvo a partir de una biblioteca de ADNc de atrio de corazón humano.

Se sintetizaron dos oligonucleótidos de 30 pb con base en las secuencias de los extremos 3' y 5' de este archivo de EST. El oligonucleótido del extremo 3' tenía la secuencia TGAAATCGAAAGTATGTTTGGGAATAGATG (complemento de los nucleótidos 636 a 665 de la SEQ ID NO: 1) y el oligonucleótido del extremo 5' era TGACGAAGAGAGTATGAA CAGCCCCTGCTG (nucleótidos 291 a 320 de la SEQ ID NO: 1). Los oligonucleótidos fueron marcados en el extremo 5' con  $\gamma$ -ATP con <sup>32</sup>P y polinucleótido quinasa. Se seleccionaron dos bibliotecas de ADNc  $\lambda$ gt10 por medio de métodos convencionales con una mezcla equimolar de estos oligonucleótidos marcados como sonda. Una biblioteca era del ADNc del tramo 5' de corazón humano (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA). La otra era una biblioteca de linfocitos de sangre periférica (PBL) preparada de la siguiente manera: los PBL se obtuvieron de voluntarios humanos normales y tratados con 10 ng/ml de OKT3 (un anticuerpo anti-CD3) y 10 ng/ml de IL-2 humana durante seis días. Las células de PBL fueron lavadas y estimuladas con 500 ng/ml de ionomicina (Calbiochem) y 10 ng/ml de PMA durante 4 horas. Se aisló el ARN mensajero de las células estimuladas de PBL. Se recogió el ADNc sintetizado sobre el molde de ARNm en vectores fago  $\lambda$ gt1 0 (Gigapak®, Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA).

5 Se sembraron en placa los fagos recombinantes sobre una cepa C600-HFL de *E. coli* y se seleccionaron utilizando técnicas de hibridación estándar de plaquetas. Se recogieron filtros de nitrocelulosa de estas placas por duplicado, y se hibridaron con los oligonucleótidos marcados con <sup>32</sup>P durante la noche a 67°C en una solución de Tris 60 mM pH 8.0, EDTA 2 mM, Solución de Denhardt 5x, SSC 6x, 1 mg/ml de n-lauroil sarcosina, NP40 al 0,5%, y 4 µg/ml de ADN de esperma de salmón SS. Se lavaron luego los filtros en SSC 3x a 67°C durante treinta minutos.

10 A partir de la biblioteca de ADNc del tramo 5' de corazón, se obtuvo una placa positiva de aproximadamente un millón de plaquetas. Este clon no incluyó el extremo 3' del gen. Utilizando la biblioteca de PBL, se obtuvieron aproximadamente 50 plaquetas positivas de 500.000 plaquetas. Se recogieron quince de esta primera ronda de plaquetas, y se amplificaron los insertos de las reservas enriquecidas utilizando iniciadores oligonucleótidos diseñados para amplificar insertos de fago. Se resolvieron los productos resultantes por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, transferidos sobre nitrocelulosa, y analizados por medio de una técnica estándar de transferencia tipo Southern utilizando los oligonucleótidos de 30 mer marcados con <sup>32</sup>P como sondas. Se purificaron las dos selecciones de plaquetas que produjeron las bandas más grandes por medio de análisis Southern por selección secundaria, y se obtuvieron plaquetas aisladas de fagos utilizando los mismos procedimientos descritos anteriormente.

15 Se preparó el ADN de los fagos aislados por medio del método de lisis en placa, y se extrajeron los insertos de ADNc con EcoRI, se los purificó por medio de electroforesis utilizando agarosa al 1,5% en amortiguador de Tris-Borato-EDTA, y ligó dentro del plásmido pBluescript® SK(+). Se secuenciaron luego estos insertos por medio de métodos convencionales, y se alinearon las secuencias resultantes.

20 La secuencia de nucleótidos de un ADN para TRAIL humano es presentada en la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos codificada de tal modo es presentada en la SEQ ID NO: 2. Esta proteína TRAIL humana incluye un dominio citoplasmático del terminal N (aminoácidos 1 - 18), una región transmembrana (aminoácidos 19 - 38), y un dominio extracelular (aminoácidos 39 - 281). El peso molecular calculado de esta proteína es de 32.508 daltons.

25 Las células de la cepa DH10B de *E. coli* transformadas con un vector recombinante que contiene este ADN para TRAIL fueron depositadas en la American Type Culture Collection el 14 de junio de 1995, y se les asignó el número de acceso 69849. El depósito fue hecho bajo los términos del Tratado de Budapest. El vector recombinante en la cepa depositada es el vector de expresión pDC409 (descrito en el ejemplo 5). Se digirió el vector con Sall y NotI, y se ligó el ADN para TRAIL humano que incluye la región entera de codificación mostrada en la SEQ ID NO: 1 dentro del vector digerido.

30 **EJEMPLO 2:** Aislamiento del ADN que codifica un TRAIL truncado

El ADN que codifica una segunda proteína TRAIL humana fue aislado de la siguiente manera. Esta TRAIL truncada no exhibe la habilidad para inducir apoptosis de células Jurkat.

35 El análisis por PCR, utilizando los 30 mers descritos en el ejemplo 1 como los iniciadores 5' y 3', indicó que 3 de los 14 de la primera ronda recogida de plaquetas en el ejemplo 1 contenía formas más cortas del ADN para TRAIL. Se aisló una de las formas abreviadas del gen, ligada dentro del vector de clonación pBluescript® SK(+) (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) y se la secuenció.

40 La secuencia de nucleótidos de este ADN es presentada en la i SEQ ID NO: 3. La secuencia de aminoácidos codificada de tal modo es presentada en la SEQ ID NO: 4. La proteína codificada incluye un dominio citoplasmático en el terminal N (aminoácidos 1 - 18), una región transmembrana (aminoácidos 19 - 38), y un dominio extracelular (aminoácidos 39 - 101).

45 El ADN de la SEQ ID NO: 3 carece de los nucleótidos 359 a 506 del ADN de la SEQ ID NO: 1, y es denominado por lo tanto como el clon de la variante de supresión de TRAIL humano (huTRAILdv). La supresión provoca un cambio en el marco de lectura, que resulta en un codón de detención en el marco después del aminoácido 101 de la SEQ ID NO: 4. El ADN de la SEQ ID NO: 3 codifica por lo tanto una proteína truncada. Los aminoácidos 1 a 90 de la SEQ ID NO: 2 son idénticos a los aminoácidos 1 a 90 de la SEQ ID NO: 4. Sin embargo, debido a la supresión, la porción del terminal C de la proteína huTRAILdv (aminoácidos 91 a 101 de la SEQ ID NO: 4) es diferente de los residuos en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2.

50 La proteína huTRAILdv carece de las regiones conservadas anteriormente descritas encontradas en el terminal C de los miembros de la familia TNF de proteínas. La inhabilidad de esta proteína huTRAILdv para provocar muerte apoptótica de células Jurkat confirma además la importancia de estas regiones conservadas por la actividad biológica.

**EJEMPLO 3:** ADN que codifica un TRAIL de murido

El ADN que codifica un TRAIL de murino fue aislado por medio del siguiente procedimiento. Se preparó una biblioteca de ADNc que contiene el ADNc derivado de la línea de células T de ratón 7B9 en el vector λZAP como se describe en Mosley et al. (Cell 59: 335, 1989). Se transfirió el ADN de la biblioteca sobre filtros de nitrocelulosa por medio de técnicas convencionales.

- 5 Se utilizaron sondas de ADN para TRAIL humano para identificar la hibridación de los ADNc de ratón sobre los filtros. Se utilizaron dos sondas separadas, en dos rondas de selección. Se emplearon los productos de la reacción PCR de aproximadamente 400 pb de longitud, aislados y amplificados utilizando el ADN para TRAIL humano como molde, como la sonda es la primera ronda de selección. Estos productos PCR consistían de un fragmento de la región de codificación de TRAIL humano. La sonda utilizada en la segunda ronda de selección consistía de la región completa de codificación del ADN para TRAIL humano de la SEQ ID NO: 1. Se utilizó un kit de marcación de ADN cebado en forma aleatoria (Stratagene, La Jolla, CA) para marcar en forma radioactiva las sondas.

Se llevó a cabo la hibridación a 37°C en formamida al 50%, seguido por un lavado con SSC 1x, SDS al 0,1% a 50°C. Se aisló un ADNc de ratón que era positivo en ambas rondas de selección.

- 15 La secuencia de nucleótidos de este ADN es presentada en la SEQ ID NO: 5 y la secuencia de aminoácidos codificada de tal modo es presentada en la SEQ ID NO: 6. La proteína codificada incluye un dominio citoplasmático en el terminal N (aminoácidos 1 - 17), una región transmembrana (aminoácidos 18 - 38), y un dominio extracelular (aminoácidos 39 - 291). Este TRAIL de ratón es 64% idéntica al TRAIL humano de la SEQ ID NO: 2, a nivel de los aminoácidos. La región de codificación de la secuencia de nucleótidos para TRAIL de ratón es 75% idéntica a la región de codificación de la secuencia de nucleótidos humana de la SEQ ID NO: 1.

#### 20 **EJEMPLO 4:** Anticuerpos que enlazan TRAIL

- Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que enlazan específicamente TRAIL. Los inmunógenos adecuados que pueden ser empleados en la generación de tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, proteína TRAIL purificada o un fragmento inmunogénico de la misma (por ejemplo, el dominio extracelular), proteínas de fusión que contienen polipéptidos TRAIL (por ejemplo, proteínas de fusión TRAIL/Fc solubles), y células que expresan TRAIL recombinante sobre la superficie de la célula.

- 30 Las técnicas conocidas para producir anticuerpos monoclonales incluyen aquellas descritas en la Patente Estadounidense No. 4.411.993. En resumen, se inmunizan los ratones con TRAIL como un inmunógeno emulsionado en adyuvante completo de Freund, y se inyectan cantidades en el rango de 10 - 100 µg en forma subcutánea o intraperitoneal. Diez a doce días después, se les aplica un refuerzo a los animales inmunizados con TRAIL adicional emulsionado en adyuvante incompleto de Freund. Se refuerzan periódicamente los ratones después de eso con un cronograma de inmunización entre semanal y bisemanal. Se toman periódicamente muestras de suero por medio de un sangrado retro-orbital o por un corte en la punta de la cola para análisis de transferencia en mancha o ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) para anticuerpos TRAIL.

- 35 Después de la detección de un título apropiado de anticuerpo, se les suministra a los animales positivos una última inyección intravenosa de TRAIL en solución salina. Tres a cuatro días después, se sacrifican los animales, se recolectan células del bazo, y se fusionan con una línea de células de mieloma de murino tal como NS 1 o, preferiblemente, P3x63Ag 8.653 (ATCC CRL 1580). Las fusiones generan células de hibridoma, que se siembran en placa en placas de microtitulación múltiple en un medio selectivo HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma, e híbridos de células de bazo.

- 40 Se seleccionan las células de hibridoma por medio de ELISA por reactividad contra TRAIL publicado por medio de adaptaciones de las técnicas divulgadas en Engvall et al. (Immunochem. 8: 871, 1971) y en la Patente Estadounidense No. 4.703.004. Se puede inyectar las células de hibridoma positivas en forma intraperitoneal en ratones BALB/c singénicos para producir ascitis que contienen altas concentraciones de anticuerpos monoclonales anti-TRAIL. Alternativamente, las células de hibridoma pueden ser cultivadas *in vitro* en frascos o en botellas para rodillo por medio de técnicas diferentes. Los anticuerpos monoclonales producidos en ascitis de ratón pueden ser purificados por precipitación en sulfato de amonio, seguido por cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, se puede utilizar cromatografía de afinidad con base en el enlazamiento del anticuerpo a proteína A o proteína G, al igual que cromatografía de afinidad con base en el enlazamiento con TRAIL.

#### **EJEMPLO 5:** Ensayo de apoptosis por escalamiento de ADN

- 50 Se expresó TRAIL humano y se lo analizó por la habilidad para inducir apoptosis. Se sintetizaron los oligonucleótidos que corresponden a los extremos 3' y 5' de la región de codificación del gen para TRAIL humano, con los sitios de restricción Sall y NotI incorporados en los extremos de los oligonucleótidos. Se amplificó la región de codificación del gen para TRAIL humano por medio de técnicas estándar por PCR, utilizando estos oligonucleótidos como iniciadores. Se digirieron los productos de reacción PCR con las endonucleasas de restricción Sall y NotI,

luego se los inserta en el vector digerido por Sall/NotI pDC409. pDC409 es un vector de expresión para uso en células de mamífero, pero también es replicable en células de *E. coli*.

5 pDC409 se deriva de un vector de expresión denominado pDC406 (descrito en McMahan et al., EMBO J. 10: 2821, 1991, y en la solicitud PCT WO 91/18982, incorporados aquí como referencia). pDC406 contiene orígenes de replicación derivados de SV40, el virus de Epstein-Barr y de pBR322 y es un derivado de HAV-EO descrito por Dower et al., J. Immunol. 142: 4314 (1989). pDC406 difiere de HAV-EO por la supresión de un intrón presente en la secuencia líder tripartita del adenovirus 2 en HAV-EO. El ADN insertado en un sitio de clonación múltiple (que contiene una cantidad de sitios de escisión de la endonucleasa de restricción) es transcrito y traducido utilizando elementos reguladores derivados del VIH y del adenovirus. El vector también contiene un gen que confiere resistencia a la ampicilina.

pDC409 difiere de pDC406 en que un sitio Bgl II fuera de mcs ha sido suprimido de manera que el sitio Bgl II de mcs es único. Se han añadido dos sitios Pme I y un sitio Srf I al mcs, y se han posicionado tres codones de detención (TAG) secuencia abajo del mcs para funcionar en los tres marcos de lectura. Se ha añadido un iniciador/promotor T7 para ayudar en el proceso de secuenciación del ADN.

15 Se deriva la línea de células de riñón de mono CV-1/EBNA-1 (ATCC CRL 10478) por transfección de la línea de células CV-1 (ATCC CCL 70) con un gen que codifica al antígeno-1 del virus de Epstein-Barr (EBNA-1) que expresa constitutivamente EBNA-1 dirigido desde el reforzador/promotor temprano intermedio del CMV humano, como lo describen McMahan et al., ver más arriba. El gen EBNA-1 permite la replicación episomal de vectores de expresión, tales como pDC409, que contienen el origen de replicación del EBV.

20 Se transfectaron las células d CV1/EBNA cultivadas en frascos Falcon T175 con 15 µg ya sea de pDC409 "vacío" o de pDC409 que contiene la región de codificación de TRAIL humano. Se cultivaron las células transformadas durante tres días a 37°C y 10% de CO<sub>2</sub>. Se lavaron luego las células con PBS, se incubó durante 20 minutos a 37°C en EDTA 50 mM, raspadas del frasco con un raspador de células, y se las lavó una vez en PBS. A continuación, se fijaron las células en paraformaldehído al 1% PBS durante 10 minutos a 4°C, y se las lavó 3x en PBS.

25 Se utilizaron células Jurkat como objetivo en este ensayo, para determinar si las células que expresan TRAIL podrían inducir apoptosis de las mismas. La línea de células Jurkat, el clon E6-1, es una línea de células de leucemia aguda de células T humanas disponible en la American Type Culture Collection bajo el número de acceso ATCC TIB 152, y descrita en Weiss et al. (J. Immunol. 133: 123 - 128, 1984). Se cultivaron las células Jurkat en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10% y 10 µg/ml de estreptomina y penicilina hasta una densidad de 200.000 a 500.000 células por ml. Se co-cultivaron cuatro millones de estas células por pozo en una placa de 6 pozos con 2,5 ml de medio con diferentes combinaciones de células fijadas, sobrenadantes de células transfectadas con ligando Fas, y diferentes anticuerpos, como se indica más adelante.

35 Después de cuatro horas se lavaron las células una vez en PBS y se precipitaron a 1200 RPM durante 5 minutos en una centrífuga de mesa. Se resuspendió el precipitado y se incubó durante diez minutos a 4°C en 500 µl de un amortiguador que consiste de Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, pH 7,5, y Triton X-100 al 0,2%, que lisa las células pero deja los núcleos intactos. Se centrifugó luego el lisado a 4°C durante diez minutos en una microcentrífuga a 14.000 RPM. Se removieron los sobrenadantes y se extrajo tres veces con 1 ml de fenolcloroformo-alcohol isoamílico en proporción 25:24:1, seguido por precipitación con NaOAc y etanol en presencia de 1 µg del portador glicógeno (Sigma).

40 Se resuspendió el precipitado resultante en Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, pH 7,5, y se incubó con 10 µg/ml de ARNasa A a 37°C durante 20 minutos. Se resolvieron luego las soluciones de ADN por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en amortiguador Tris-Borato-EDTA, coloreado con bromuro de etidio y fotografiado mientras es trans-iluminado con luz UV.

45 Los resultados fueron los siguientes. Las células CV1/EBNA fijadas y transfectadas ya sea con pDC409 o con pDC409-TRAIL no produjeron escalamiento detectable de ADN. Las células fijadas con cpDC409-TRAIL co-cultivadas con células Jurkat produjeron escalamiento de ADN, pero las células fijadas con pDC409 co-cultivadas con células Jurkat no lo hicieron.

50 El escalamiento de ADN fue observado también cuando células Jurkat fueron co-cultivadas con sobrenadantes concentrados de células COS transfectadas con ADN que codifica al ligando Fas humano en pDC409. Se cree que los sobrenadantes contienen ligando Fas soluble que es proteolíticamente liberado de la superficie de la célula. El escalamiento de ADN inducido por el ligando Fas podría ser bloqueado por medio de la adición de 10 µg/ml de un anticuerpo monoclonal soluble de bloqueo dirigido contra Fas. Este mismo anticuerpo podría no inhibir el escalamiento del AND de Jurkat por las células con pDC409-TRAIL, lo cual indica que TRAIL no induce apoptosis a través de Fas.

En el mismo procedimiento de ensayo, las células CV1/EBNA fijadas transfectadas con pDC409-TRAIL indujeron el escalamiento del ADN en células U937. U937 (ATCC CRL 1593) es una línea de células de linfoma histiocítico humano. La proporción del efector con respecto a las células objetivo fue de 1:4 (lo mismo que el ensayo sobre las células objetivo Jurkat).

- 5 La fragmentación del ADN celular en patrones conocidos como escalamiento del ADN es un sello de apoptosis. El ensayo anterior, TRAIL indujo apoptosis de una línea de células de leucemia y una línea de células de linfoma.

**EJEMPLO 6:** Análisis de transferencias tipo Northern

10 Se analizó la expresión de TRAIL en una cantidad de tipos de tejidos diferentes en un procedimiento convencional de transferencias tipo Northern. Se obtuvieron transferencias tipo Northern que contenían ARN poli A+ de una variedad de tejidos humanos adultos (transferencias I y II tipo Northern de múltiples tejidos) de Clontech (Palo Alto, CA). Se prepararon otras transferencias por resolución de muestras de ARN sobre un gerente de agarosa - formaldehído, transfiriendo sobre Hybond-N de acuerdo con la recomendación de fabricante (Amersham Corporation), y coloreando con azul de metileno hasta concentraciones de control de ARN. Se sondearon las transferencias con una ribosonda de ARN antisentido correspondiente a la región entera de codificación de TRAIL humano.

15 Se detectó el ARNm para TRAIL humano en linfocitos de sangre periférica, colon, intestino delgado, ovario, próstata, timo, bazo, placenta, pulmón, riñón, corazón, páncreas, y músculo esquelético. Se encontró que eran abundantes los transcritos de TRAIL en las células grandes de la línea de células de linfoma anaplásico Karpas 299 (Fischer et al., Blood, 72: 234, 1988) y en células T de las amígdalas. El mensaje de TRAIL estaba presente en menor grado en la línea de células de linfoma de Burkitt denominada Raji.

20 El ARNm para TRAIL no fue detectado en testículos, cerebro, o hígado, o en diferentes líneas de células T. se detectaron pocos o ningún transcrito de TRAIL en células T de sangre periférica recientemente aislada (PBT), ya sea estimuladas o no estimuladas con PMA y ionóforo de calcio durante 20 horas.

**EJEMPLO 7:** Producción de un polipéptido TRAIL soluble

25 Un polipéptido TRAIL soluble humano que contiene los aminoácidos 95 a 281 de la SEQ ID NO: 2 fue preparado de la siguiente forma. Este polipéptido es un fragmento del dominio extracelular, que carece de la región espaciadora discutida anteriormente.

30 Se construyó un vector de expresión que codifica TRAIL humano soluble por medio de la fusión en el marco de ADN que codifica las siguientes secuencias de aminoácidos (enlistadas a partir del terminal N hasta C): una secuencia líder derivada de citomegalovirus humano (CMV), un epítipo sintético denominado Flag®, y los aminoácidos 95 - 281 de TRAIL humano. El octapéptido Flag® (SEQ ID NO: 7) facilita la purificación de proteínas fusionadas al mismo, como se describió anteriormente y en Hopp et al. (Biotechnology 6: 1204 - 1210, 1988).

35 Se aisló el fragmento de ADN que codifica TRAIL y se lo amplificó por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando iniciadores de oligonucleótido que definían los terminales de un fragmento de ADN que codifica los aminoácidos 95 - 281 de la SEQ ID NO: 2. El iniciador 3' era un 31-mer que adicionalmente añadió un sitio NotI secuencia abajo de la secuencia que codifica TRAIL. El iniciador 5' añadió un sitio SpeI y un epítipo Flag® que codifica una secuencia, secuencia arriba de la secuencia que codifica TRAIL. Se llevó a cabo la PCR por medio de procedimientos convencionales, utilizando el ADNc para TRAIL humano descrito anteriormente como molde.

40 Se digirieron los productos de reacción con SpeI y NotI, y se los insertó en el vector de expresión pDC409 (descrito en el ejemplo 5), que había sido escindido con Sall y NotI. Los oligonucleótidos apareados que forman un fragmento Sall-SpeI que codifica un líder del marco de lectura abierto del CMV fueron también ligados dentro del vector. La secuencia de aminoácidos del líder derivado del CMV es presentada como la SEQ ID NO: 9. Los aminoácidos 1 a 29 de la SEQ ID NO: 9 son codificados por el ADN del CMV, mientras que los aminoácidos 30 a 32 son codificados por los oligonucleótidos empleados en la construcción del vector. Se transfectaron las células de *E. coli* con la mezcla de ligación, y se aisló el vector de expresión recombinante deseado a partir de allí.

45 Se transfectaron las células CV1-EBNA (ATCC CRL 10478; descritas en el ejemplo 5) con el vector recombinante, que es denominado pDC409-Flag-shTRAIL, y se las cultivó para permitir la expresión y secreción del polipéptido TRAIL- Flag® soluble. Se recogieron los sobrenadantes del cultivo 3 días después de la transfección y se los aplicó a una columna que contenían un anticuerpo anti-Flag® denominado M2 inmovilizado sobre un soporte sólido. Se lavó luego la columna con PBS. El anticuerpo monoclonal M2 está descrito en i Hopp et al., ver más arriba, y se lo puede obtener con Kodak Scientific Imaging Systems, New Haven, Connecticut. Se eluyeron 800 µl de fracciones a

partir de la columna con citrato 50 mM, y se las neutralizó inmediatamente en 0,45 ml de Tris 1 M (pH 8). Se ajustaron las fracciones con glicerol al 10% y se almacenaron a -20°C hasta requerirlas nuevamente.

5 Este TRAIL humano/Flag® recombinante soluble expresado en células CV1/EBNA tiene un peso molecular aparente de 28 kD cuando se lo analiza por medio de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). La estructura funcional de Flag® contribuye en un estimado de 880 daltons al peso molecular total. El análisis de filtración en gel de Flag®/TRAIL soluble purificado sugiere que la molécula es multimérica en solución con un tamaño de 80 kD. Aunque sin querer vincularse a una teoría, el análisis de la filtración por gel sugiere que el Flag®/TRAIL humano recombinante soluble formó naturalmente una combinación de dímeros y trímeros, con predominio de los trímeros.

10 Un vector de expresión denominado pDC409-Flag-smTRAIL, que codifica una proteína TRAIL soluble de múrido de Flag®-líder del CMV, fue construido por medio de procedimientos análogos. Se aisló y purificó un fragmento de ADN que codifica un polipéptido TRAIL soluble de múrido por medio de PCR. Se emplearon los oligonucleótidos que definían los terminales del ADN que codifica los aminoácidos 99 a 291 de la secuencia de TRAIL de múrido de la SEQ ID NO: 6 como los iniciadores 5' y 3' en la PCR.

#### **EJEMPLO 8:** Lisis de células de leucemia por medio de TRAIL soluble

15 En el ejemplo 5, las células que expresan TRAIL humano indujeron apoptosis de células Jurkat (una línea de células de leucemia). En el siguiente estudio, un polipéptido TRAIL humano soluble mató células Jurkat.

20 Se cultivaron células Jurkat hasta una densidad de 200.000 a 500.000 células por ml en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 µg/ml de estreptomycin, y 100 µg/ml de penicilina. Se incubaron las células (en placas de 96 pozos a razón de 50.000 células por pozo en un volumen de 100 µl) durante veinte horas con los reactivos indicados en la Figura 1. "Sobrenadante de TRAIL" se refiere al sobrenadante acondicionado (10 µl por pozo) de células CV1/EBNA transfectadas con pDC409-Flag-shTRAIL (ver el ejemplo 7). "Sobrenadante de control" se refiere al sobrenadante de células CV1/EBNA transfectadas con un vector vacío. En donde se indica, se añadió anticuerpo M2 anti-Flag® inmovilizado ("M2 inmovilizado") en una concentración de 10 µg/ml en un volumen de 100 µl por pozo y se permitió que se adhiriera ya sea durante la noche a 4°C o durante 2 horas a 37°C, desp ués de lo cual se aspiraron los pozos y se lavó dos veces con PBS para remover el anticuerpo no enlazado. Se incluyeron células Jurkat tratadas con ligando Fas o M3, un anticuerpo monoclonal de bloqueo dirigido contra Fas, (Alderson et al., J. Exp. Med. 181: 71, 1995; y la solicitud PCT WO 95/10540) en el ensayo como se indicó.

30 La actividad metabólica de las células tratadas así fue analizada por medio de la conversión metabólica del colorante Azul de alamar, en el siguiente procedimiento. Se midió la conversión del Azul de alamar por medio de la adición de 10 µl del colorante Azul de alamar (Biosource International, Camarillo, CA) por pozo, y restando la densidad óptica (OD) a 550 - 600 nm en el momento en que añadió el colorante del OD 550 - 600 nm después de cuatro horas. La no conversión del colorante se grafica como 0 por ciento de viabilidad, y el nivel de conversión de colorante en la ausencia de TRAIL se grafica como 100 por ciento de viabilidad. El porcentaje de viabilidad fue calculado multiplicando la proporción de coloración de cultivos experimentales versus de control por 100.

35 Los resultados se presentan en la Figura 1. Las barras de error representan la desviación estándar de mediciones de cuatro pozos independientes, y los valores son el promedio de estas mediciones.

40 El sobrenadante que contiene TRAIL provocó una reducción significativa en la viabilidad de células Jurkat. Una mayor reducción de la viabilidad celular resultó del contacto con una combinación del sobrenadante que contiene TRAIL y anticuerpo M2 anti-Flag® inmovilizado. Una posible explicación es que M2 facilita el entrelazamiento de los complejos del receptor de Flag®/TRAIL, incrementando por lo tanto la fuerza de la señalización.

El ligandos Fas demostró la habilidad para matar células Jurkat. El anticuerpo M3 anti-Fas inhibió la actividad del ligando Fas, pero no la actividad de TRAIL.

45 Con el propósito de confirmar que los cambios en la conversión del colorante en el ensayo de Azul de alamar fue debida a muerte celular, la disminución en la viabilidad celular inducido por TRAIL fue confirmada por medio de la coloración de las células con azul de tripano.

#### **EJEMPLO 9:** Lisis de células de leucemia y de linfoma

En los ejemplos 5 y 8, TRAIL indujo apoptosis de una línea de células de leucemia (Jurkat) y una línea de células de linfoma (U937). El siguiente estudio demuestra además la habilidad de TRAIL para matar células de leucemia y linfoma.

5 Las líneas de células humanas indicadas en la Tabla I fueron cultivadas hasta una densidad de 200.000 a 500.000 células por ml en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 µg/ml de estreptomicina, y 100 µg/ml de penicilina. Las células (en placas de 96 pozos a razón de 50.000 células por pozo en un volumen de 100 µl) fueron incubadas durante veinte horas con sobrenadantes acondicionados (10 µl por pozo) de células CV1/EBNA transfectadas con pDC409-Flag-shTRAIL.

Se analizó la actividad metabólica por medio de la conversión del colorante Azul de alamar, en el procedimiento del ensayo descrito en el ejemplo 8. Los resultados se presentan en la Tabla I.

10 Con el propósito de confirmar que los cambios en la conversión del colorante en el ensayo de Azul de alamar fueron debidos a muerte celular, se confirmó la disminución en la viabilidad celular inducida por TRAIL por medio de coloración de las células con azul de tripano. La coloración con cristal violeta, llevada a cabo como lo describieron Flick y Gifford (J. Immunol. Methods 68: 167 - 175, 1984), también confirmó los resultados observados en el ensayo con Azul de alamar. La naturaleza apoptótica de la muerte celular fue confirmada por medio de coloración con azul de tripano y visualización de la fragmentación apoptótica por microscopía.

15 Como se muestra en la Tabla I, muchas líneas de células cancerosas fueron sensibles a muerte mediada por TRAIL. La susceptibilidad de tipos adicionales de células a la apoptosis mediada por TRAIL puede ser determinada utilizando los procedimientos de ensayo descritos en esta sección de ejemplos.

20 TRAIL no exhibió un efecto citotóxico significativo sobre las líneas de células THP-1, K562, Karpas 299, y MP-1. K299, también conocida como Karpas 299, (DSM-ACC31) fue establecida a partir de sangre periférica de un macho diagnosticado con linfoma anaplástico de células grandes de alto grado (Fischer et al., Blood, 72: 234, 1988). MP-1 es una línea de células B transformadas con EBV derivadas espontáneamente (Goodwin et al., Cell 73: 447, 1993). Aunque sin querer vincularse a una teoría, es posible que estas cuatro líneas de células no expresen un receptor para TRAIL, o se caracterizan por reducción de la expresión de un gen que inhibe apoptosis.

Tabla 1. Efecto de TRAIL soluble sobre la viabilidad de la línea de células

Línea de células	Descripción	Porcentaje de Viabilidad <sup>a</sup>
Bjab	linfoma de Burkitt	0,5 ± 3,8
Ramos	linfoma de Burkitt	12,1 ± 2,1
U937	linfoma histiocítico	25,2 ± 8,2
HL60	leucemia promielocítica	59,5 ± 3,2
Raji	linfoma de Burkitt	64,9 ± 4,5
Daudi	linfoma de Burkitt	70,2 ± 4,2
THP-1	línea de células monocíticas	92,3 ± 6,8
K562	leucemia mielógena crónica	97,1 ± 4,8
K 299	linfoma anaplástico de células grandes	99,0 ± 4,3
MP-1	línea de células B espontáneas	104,9 ± 11,7

<sup>a</sup> Los resultados son los promedios ± los SEM de 4 pozos para cada punto de datos

#### EJEMPLO 10: Actividad de cruzamiento de especies de TRAIL

25

La reactividad cruzada entre especies de TRAIL humano y de murino fue analizada de la siguiente manera. Se incubaron TRAIL humana y de murino con la línea de células de melanoma humano A375 (ATCC CRL 1619). Ya que ésta es una línea de células adherente, se utilizó un ensayo con cristal violeta, en vez de Azul de alamar, para

determinar la viabilidad de las células. Se cultivaron células A375 en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 µg/ml de estreptomycin, y 100 µg/ml de penicilina. Se incubaron las células (en placas de 96 pozos a razón de 10.000 células por pozo en un volumen de 100 µl) durante 72 horas con el TRAIL soluble de múrido descrito en el ejemplo 7. Se llevó a cabo la coloración con cristal violeta como lo describen (Flick y Gifford (J. Immunol. Methods 68: 167 - 175, 1984). Los resultados demostraron que tanto TRAIL humano como de múrido son activos sobre estas células humanas, ya que TRAIL humano y de múrido mataron células A375.

Se analizó la habilidad de TRAIL humano para actuar sobre células de múrido, utilizando la línea de células inmortalizada de fibroblasto de múrido L929. La incubación de células L929 ya sea con TRAIL humano o de múrido resultó en una disminución en la coloración con cristal violeta, demostrando así que TRAIL humano y de múrido son activos sobre (indujeron apoptosis de) células de múrido. Además del cristal violeta, se confirmó la muerte de las células por medio de coloración con azul de tripano.

#### **EJEMPLO 11:** Lisis de células infectadas con CMV

El siguiente experimento demuestra que la proteína TRAIL humana - Flag® soluble preparada en el ejemplo 7 tiene un efecto citotóxico sobre células viralmente infectadas.

Se cultivaron fibroblastos gingivales humanos normales hasta confluencia sobre placas de 24 pozos en 10% de CO<sub>2</sub> y medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 µg/ml de estreptomycin, y 100 µg/ml de penicilina. Se trataron las muestras de los fibroblastos como se indica en la Figura 2. Las concentraciones de citoquinas fueron de 10 ng/ml para γ-interferón y 30 ng/ml de TRAIL humano - Flag® soluble. Todas las muestras que recibieron TRAIL también recibieron un exceso dos veces en peso de anticuerpo M2 anti-Flag® (descrito más arriba), que mejora la actividad de TRAIL (presumiblemente por entrelazamiento).

El tratamiento previo de las células con las citoquinas indicadas fue durante 20 horas. Para infectar las células con citomegalovirus (CMV), se aspiraron los medios de cultivo y se infectaron las células con CMV en DMEM con una MOI aproximada (multiplicidad de infección) de 5. Después de dos horas se reemplazó el medio que contenía el virus con DMEM y se añadieron citoquinas como se indicó. Después de 24 horas se colorearon las células con coloración cristal violeta como se describió (Flick y Gifford, 1984, ver más arriba). Se lavaron las células coloreadas dos veces con agua, se las rompió en 200 µl de desoxicolato de sodio al 2%, se diluyó 5 veces en agua, y se tomó la OD a 570 nm. Se calculó el porcentaje máximo de coloración por medio de la normalización de las OD para la muestra que mostró la mayor coloración. Se obtuvieron resultados similares a partir de diferentes experimentos independientes.

Los resultados presentados en la Figura 2 demostraron que TRAIL mató específicamente fibroblastos infectados con CMV. Se mejoró la mortalidad de las células por medio del tratamiento previo de las células con γ-interferón. No se presentó una mortalidad significativa de fibroblastos no infectados viralmente como resultado del contacto con TRAIL.

#### **EJEMPLO 12:** Ensayo para identificar anticuerpos de bloqueo

Los anticuerpos de bloqueo dirigidos contra TRAIL pueden ser identificados por medio del análisis de anticuerpos por su habilidad para inhibir una actividad biológica particular de TRAIL. En el siguiente ensayo, se analizó un anticuerpo monoclonal por su habilidad para inhibir apoptosis mediada por TRAIL de células Jurkat. La línea de células Jurkat está descrita en el ejemplo 5.

En este ensayo se empleó una línea de células de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal surgido contra una proteína de fusión TRAIL humana soluble/Flag®. Se incubaron los sobrenadantes de los cultivos de hibridoma con 20 ng/ml de TRAIL humano soluble Flag® entrelazado con 40 ng/ml de anticuerpo monoclonal M2 anti-Flag®, en medio completo de RPMI en una placa de microtitulación de 96 pozos. Se añadió una cantidad equivalente de medio de cultivo fresco de hibridoma a los cultivos de control. La proteína de fusión TRAIL humana soluble/Flag® y el anticuerpo monoclonal denominado M2 están descritos en el ejemplo 7.

Se empleó el sobrenadante de hibridoma en una dilución de 1:50 (v/v) (concentración de partida), y en diluciones seriales dos veces de la misma. Después de incubación a 37°C, 10% de CO<sub>2</sub>, durante 30 minutos, se añadieron 50.000 células Jurkat por pozo, y se continuó la incubación durante 20 horas.

Se evaluó luego la viabilidad de las células midiendo la conversión metabólica del colorante azul de alamar. Un procedimiento de ensayo de conversión con azul de alamar es descrito en el ejemplo 8. Se encontró que el anticuerpo monoclonal inhibe la apoptosis de células Jurkat inducidas por TRAIL humano soluble/Flag®.

#### **EJEMPLO 13:** Estudio de bloqueo de TRAIL

5 Se trataron células endoteliales microvasculares humanas de origen dérmico durante 16 - 18 horas con plasma de pacientes con púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) o con plasma de control, ya sea solas o en presencia de antisuero policlonal anti-TRAIL. Se empleó una dilución 1:2000 del antisuero. El plasma era de dos pacientes con TTP, denominados #1 y #2 más abajo. Las células empleadas en los ensayos eran MVEC-1 (HMVEC 2753, adquiridas de Clonetics, San Diego, CA) y MVEC-2 (DHMVEC 30282, adquiridas de Cell Systems, Kirkland, WA). Los cultivos de estas células pueden ser mantenidos como se describe en Laurence et al. (Blood, 87: 3245, 1996).

Los resultados fueron los siguientes. Los datos mostrados son de histogramas de ADN de células coloreadas con yoduro de propidio, y "pico A<sub>0</sub>" representa el pico apoptótico (ver Oyaizu et al., Blood, 82: 3392, 1993; Nicoletti et al., J. Immunol. Methods, 139: 271, 1991; y Laurence et al., Blood, 75: 696, 1990).

	EC Microvascular	Plasma (1%)	Anticuerpo	pico A <sub>0</sub> en %
Experimento 1				
	MVEC-1 Dérmico	control	-	0
	MVEC-1 Dérmico	TTP (#1)	-	19,5
	MVEC-1 Dérmico	TTP (#1)	+	0,3
Experimento 2				
	MVEC-2 Dérmico	control	-	0
	MVEC-2 Dérmico	TTP (#2)	-	20,0
	MVEC-2 Dérmico	TTP (#2)	Ab de control	13,1
	MVEC-2 Dérmico	TTP (#2)	+	0,2
Experimento 3				
	MVEC-1 Dérmico	TTP (#1)	-	50,1
	MVEC-1 Dérmico	TTP (#1)	+	10,6
Experimento 4				
	MVEC-2 Dérmico	control	-	0
	MVEC-2 Dérmico	TTP (#1)	-	13,9
	MVEC-2 Dérmico	TTP (#1)	Ab de control	14,1
	MVEC-2 Dérmico	TTP (#1)	+	0,6

10 Los datos revelan que el plasma derivado de pacientes con TTP induce apoptosis de células endoteliales microvasculares de origen dérmico. Esta apoptosis fue inhibida por anticuerpos policlonales dirigidos contra TRAIL.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

##### (1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: Immunex Corporation.

15 (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Citoquina que induce Apoptosis

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 9

(iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:

- (A) DESTINATARIO: Kathryn A. Anderson, Immunex Corporation
- (B) CALLE: 51 University Street
- (C) CIUDAD: Seattle
- (D) ESTADO: WA
- 5 (E) PAÍS: EUA
- (F) ZIP: 98101
- (v) FORMATO LEIBLE POR EL ORDENADOR:
  - (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
  - (B) ORDENADOR: Apple Macintosh
- 10 (C) SISTEMA OPERATIVO: Apple 7.5.2
- (D) SOFTWARE: Microsoft Word, Versión 6.0.1
- (vi) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD:
  - (A) NÚMERO DE LA SOLICITUD: --a ser asignada--
  - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 25-JUNIO-1996
- 15 (C) CLASIFICACIÓN:
  - (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:
    - (A) NÚMERO DE LA SOLICITUD: US 08/496.632
    - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 29-JUNIO-1995
  - (C) CLASIFICACIÓN:
- 20 (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:
  - (A) NÚMERO DE LA SOLICITUD: US 08/548.368
  - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 01-NOV-1995
  - (C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
  - 25 (A) NOMBRE: Anderson, Kathryn A.
  - (B) NÚMERO DE REGISTRO: 32.172
  - (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 2835-WO
- (ix) INFORMACIÓN PARA TELECOMUNICACIÓN:
  - (A) TELÉFONO: (206) 587-0430
  - 30 (B) TELEFAX: (206) 233-0644

(C) TÉLEX: 756822

(2) INFORMATION PARA LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1751 pares de bases

5 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc a ARNm

(iii) HIPOTÉTICA: NO

10 (iv) ANTISENTIDO: NO

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: huAIC

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

15 (B) UBICACIÓN: 88..933

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

CCTCACTGAC	TATAAAAGAA	TAGAGAAGGA	AGGGCTTCAG	TGACCGGCTG	CCTGGCTGAC	60
TTACAGCAGT	CAGACTCTGA	CAGGATC	ATG GCT ATG ATG GAG	GTC CAG GGG	111	
			Met Ala Met Met	Glu Val Gln Gly		
			1	5		
GGA CCC AGC CTG GGA CAG ACC TGC GTG CTG ATC GTG ATC TTC ACA GTG	159					
Gly Pro Ser Leu Gly Gln Thr Cys Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val						
10	15	20				
CTC CTG CAG TCT CTC TGT GTG GCT GTA ACT TAC GTG TAC TTT ACC AAC	207					
Leu Leu Gln Ser Leu Cys Val Ala Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn						
25	30	35	40			
GAG CTG AAG CAG ATG CAG GAC AAG TAC TCC AAA AGT GGC ATT GCT TGT	255					
Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp Lys Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys						
	45	50	55			
TTC TTA AAA GAA GAT GAC AGT TAT TGG GAC CCC AAT GAC GAA GAG AGT	303					
Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser Tyr Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser						
	60	65	70			
ATG AAC AGC CCC TGC TGG CAA GTC AAG TGG CAA CTC CGT CAG CTC GTT	351					
Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln Val Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val						
	75	80	85			
AGA AAG ATG ATT TTG AGA ACC TCT GAG GAA ACC ATT TCT ACA GTT CAA	399					
Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln						
	90	95	100			
GAA AAG CAA CAA AAT ATT TCT CCC CTA GTG AGA GAA AGA GGT CCT CAG	447					
Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln						
105	110	115	120			
AGA GTA GCA GCT CAC ATA ACT GGG ACC AGA GGA AGA AGC AAC ACA TTG	495					
Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu						
	125	130	135			
TCT TCT CCA AAC TCC AAG AAT GAA AAG GCT CTG GGC CGC AAA ATA AAC	543					
Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn						
	140	145	150			
TCC TGG GAA TCA TCA AGG AGT GGG CAT TCA TTC CTG AGC AAC TTG CAC	591					

Ser	Trp	Glu	Ser	Ser	Arg	Ser	Gly	His	Ser	Phe	Leu	Ser	Asn	Leu	His		
		155					160					165					
TTG	AGG	AAT	GGT	GAA	CTG	GTC	ATC	CAT	GAA	AAA	GGG	TTT	TAC	TAC	ATC	639	
Leu	Arg	Asn	Gly	Glu	Leu	Val	Ile	His	Glu	Lys	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Ile		
		170				175					180						
TAT	TCC	CAA	ACA	TAC	TTT	CGA	TTT	CAG	GAG	GAA	ATA	AAA	GAA	AAC	ACA	687	
Tyr	Ser	Gln	Thr	Tyr	Phe	Arg	Phe	Gln	Glu	Glu	Ile	Lys	Glu	Asn	Thr		
185					190				195					200			
AAG	AAC	GAC	AAA	CAA	ATG	GTC	CAA	TAT	ATT	TAC	AAA	TAC	ACA	AGT	TAT	735	
Lys	Asn	Asp	Lys	Gln	Met	Val	Gln	Tyr	Ile	Tyr	Lys	Tyr	Thr	Ser	Tyr		
				205				210						215			
CCT	GAC	CCT	ATA	TTG	TTG	ATG	AAA	AGT	GCT	AGA	AAT	AGT	TGT	TGG	TCT	783	
Pro	Asp	Pro	Ile	Leu	Leu	Met	Lys	Ser	Ala	Arg	Asn	Ser	Cys	Trp	Ser		
			220					225					230				
AAA	GAT	GCA	GAA	TAT	GGA	CTC	TAT	TCC	ATC	TAT	CAA	GGG	GGA	ATA	TTT	831	
Lys	Asp	Ala	Glu	Tyr	Gly	Leu	Tyr	Ser	Ile	Tyr	Gln	Gly	Gly	Ile	Phe		
		235				240						245					
GAG	CTT	AAG	GAA	AAT	GAC	AGA	ATT	TTT	GTT	TCT	GTA	ACA	AAT	GAG	CAC	879	
Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Asp	Arg	Ile	Phe	Val	Ser	Val	Thr	Asn	Glu	His		
		250				255					260						
TTG	ATA	GAC	ATG	GAC	CAT	GAA	GCC	AGT	TTT	TTC	GGG	GCC	TTT	TTA	GTT	927	
Leu	Ile	Asp	Met	Asp	His	Glu	Ala	Ser	Phe	Phe	Gly	Ala	Phe	Leu	Val		
265					270				275					280			
GGC	TAA	CTGACCTGGA	AAGAAAAAGC	AATAACCTCA	AAGTGACTAT	TCAGTTTTCA										983	
Gly	*																
GGATGATACA	CTATGAAGAT	GTTTCAAAAA	ATCTGACCAA	AACAAACAAA	CAGAAAACAG	1043											
AAAACAAAA	AACCTCTATG	CAATCTGAGT	AGAGCAGCCA	CAACCAAAAA	ATTCTACAAC	1103											
ACACACTGTT	CTGAAAGTGA	CTCACTTATC	CCAAGAAAAT	GAAATTGCTG	AAAGATCTTT	1163											
CAGGACTCTA	CCTCATATCA	GTTTGCTAGC	AGAAATCTAG	AAGACTGTCA	GCTTCCAAAC	1223											
ATTAATGCAA	TGGTTAACAT	CTTCTGTCTT	TATAATCTAC	TCCTTGTAAG	GACTGTAGAA	1283											
GAAAGCGCAA	CAATCCATCT	CTCAAGTAGT	GTATCACAGT	AGTAGCCTCC	AGGTTTCCTT	1343											
AAGGGACAAC	ATCCTTAAGT	CAAAGAGAG	AAGAGGCACC	ACTAAAAGAT	CGCAGTTTGC	1403											
CTGGTGCAGT	GGCTCACACC	TGTAATCCCA	ACATTTTGGG	AACCAAGGT	GGGTAGATCA	1463											
CGAGATCAAG	AGATCAAGAC	CATAGTGACC	AACATAGTGA	AACCCCATCT	CTACTGAAAG	1523											
TGCAAAAATT	AGCTGGGTGT	GTTGGCACAT	GCCTGTAGTC	CCAGCTACTT	GAGAGGCTGA	1583											
GGCAGGAGAA	TCGTTTGAAC	CCGGGAGGCA	GAGGTTGCAG	TGTGGTGAGA	TCATGCCACT	1643											
ACACTCCAGC	CTGGCGACAG	AGCGAGACTT	GGTTTCAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAACTT	1703											
CAGTAAGTAC	GTGTTATTTT	TTTCAATAAA	ATTCTATTAC	AGTATGTC		1751											

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 281 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

- 10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

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



AATTCGGAA TAGAGAAGGA AGGGCTTCAG TGACCGGCTG CCTGGCTGAC TTACAGCAGT	60
CAGACTCTGA CAGGATC ATG GCT ATG ATG GAG GTC CAG GGG GGA CCC AGC	110
Met Ala Met Met Glu Val Gln Gly Gly Pro Ser	
1 5 10	
CTG GGA CAG ACC TGC GTG CTG ATC GTG ATC TTC ACA GTG CTC CTG CAG	158
Leu Gly Gln Thr Cys Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val Leu Leu Gln	
15 20 25	
TCT CTC TGT GTG GCT GTA ACT TAC GTG TAC TTT ACC AAC GAG CTG AAG	206
Ser Leu Cys Val Ala Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn Glu Leu Lys	
30 35 40	
CAG ATG CAG GAC AAG TAC TCC AAA AGT GGC ATT GCT TGT TTC TTA AAA	254
Gln Met Gln Asp Lys Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys	
45 50 55	
GAA GAT GAC AGT TAT TGG GAC CCC AAT GAC GAA GAG AGT ATG AAC AGC	302
Glu Asp Asp Ser Tyr Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser	
60 65 70 75	
CCC TGC TGG CAA GTC AAG TGG CAA CTC CGT CAG CTC GTT AGA AAG ACT	350
Pro Cys Trp Gln Val Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys Thr	
80 85 90	
CCA AGA ATG AAA AGG CTC TGG GCC GCA AAA TAA ACTCCTGGGA ATCATCAAGG	403
Pro Arg Met Lys Arg Leu Trp Ala Ala Lys *	

AGTGGGCATT CATTCCCTGAG CAACTTGCAC TTGAGGAATG GTGAACTGGT CATCCATGAA 463  
 AAAGGGTTTT ACTACATCTA TTCCCAAACA TACTTTTCGAT TTCAGGAGGA AATAAAAGAA 523  
 AACACAAAGA ACGACAAACA AATGGTCCAA TATATTTACA AATACACAAG TTATCCTGAC 583  
 CCTATATTGT TGATGAAAAG TGCTAGAAAT AGTTGTTGGT CTAAAGATGC AGAATATGGA 643  
 CTCTATTCCA TCTATCAAGG GGAATATTT GAGCTTAAGG AAAATGACAG AATTTTTGTT 703  
 TCTGTAACAA ATGAGCACTT GATAGACATG GACCATGAAG CCAGTTTTTT CGGGGCCTTT 763  
 TTAGTTGGCT AACTGACCTG GAAAGAAAAA GCAATAACCT CAAAGTGA CTATTAGTTT 823  
 CAGGATGATA CACTATGAAG ATGTTTCAA AAATCTGACC AAAACAAACA AACAGAAAAC 883  
 AGAAAACAAA AAAACCTCTA TGCAATCTGA GTAGAGCAGC CACAACCAA AAATTCTACA 943  
 ACACACACTG TTCTGAAAGT GACTCACTTA TCCCAAGAGA ATGAAATTGC TGAAAGATCT 1003  
 TTCAGGACTC TACCTCATAT CAGTTTGCTA GCAGAAATCT AGAAGACTGT CAGCTTCCAA 1063  
 ACATTAATGC AGTGGTTAAC ATCTTCTGTC TTTATAATCT ACTCCTTGTA AAGACTGTAG 1123  
 AAGAAAGCGC AACAATCCAT CTCTCAAGTA GTGTATCACA GTAGTAGCCT CCAGGTTTCC 1183  
 TTAAGGGACA ACATCCTTAA GTCAAAAGAG AGAAGAGGCA CCACTAAAAG ATCGCAGTTT 1243  
 GCCTGGTGCA GTGGCTCACA CCTGTAATCC CAACATTTTG GGAACCCAAG GTGGGTAGAT 1303  
 CACGAGATCA AGAGATCAAG ACCATAGTGA CCAACATAGT GAAACCCCAT CTCTACTGAA 1363  
 AGTGCAAAAA TTAGCTGGGT GTGTTGGCAC ATGCCTGTAG TCCCAGCTAC TTGAGAGGCT 1423  
 GAGGCAGGAG AATCGTTTGA ACCCGGGAGG CAGAGGTTGC AGTGTGGTGA GATCATGCCA 1483  
 CTACACTCCA GCCTGGCGAC AGAGCGAGAC TTGGTTTC 1521

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 4:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 101 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

```

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

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

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

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

Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln Val
 65                               70                               75                               80

Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys Thr Pro Arg Met Lys Arg
                               85                               90                               95

Leu Trp Ala Ala Lys *
                               100
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 5:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1366 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

10 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc a ARNm

(iii) HIPOTÉTICA: NO

15 (iv) ANTISENTIDO: NO

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: MuAIC

20 (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) UBICACIÓN: 47..919

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:



GTT AAG AGG CAA CTG TAT CAG CTC ATT GAA GAG GTG ACT TTG AGA ACC 343  
 Val Lys Arg Gln Leu Tyr Gln Leu Ile Glu Glu Val Thr Leu Arg Thr  
 85 90 95

TTT CAG GAC ACC ATT TCT ACA GTT CCA GAA AAG CAG CTA AGT ACT CCT 391  
 Phe Gln Asp Thr Ile Ser Thr Val Pro Glu Lys Gln Leu Ser Thr Pro  
 100 105 110 115

CCC TTG CCC AGA GGT GGA AGA CCT CAG AAA GTG GCA GCT CAC ATT ACT 439  
 Pro Leu Pro Arg Gly Gly Arg Pro Gln Lys Val Ala Ala His Ile Thr  
 120 125 130

GGG ATC ACT CGG AGA AGC AAC TCA GCT TTA ATT CCA ATC TCC AAG GAT 487  
 Gly Ile Thr Arg Arg Ser Asn Ser Ala Leu Ile Pro Ile Ser Lys Asp  
 135 140 145

GGA AAG ACC TTA GGC CAG AAG ATT GAA TCC TGG GAG TCC TCT CGG AAA 535  
 Gly Lys Thr Leu Gly Gln Lys Ile Glu Ser Trp Glu Ser Ser Arg Lys  
 150 155 160 265

GGG CAT TCA TTT CTC AAC CAC GTG CTC TTT AGG AAT GGA GAG CTG GTC 583  
 Gly His Ser Phe Leu Asn His Val Leu Phe Arg Asn Gly Glu Leu Val  
 165 170 175

ATC GAG CAG GAG GGC CTG TAT TAC ATC TAT TCC CAA ACA TAC TTC CGA 631  
 Ile Glu Gln Glu Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg  
 180 185 190 195

TTT CAG GAA GCT GAA GAC GCT TCC AAG ATG GTC TCA AAG GAC AAG GTG 679  
 Phe Gln Glu Ala Glu Asp Ala Ser Lys Met Val Ser Lys Asp Lys Val  
 200 205 210

AGA ACC AAA CAG CTG GTG CAG TAC ATC TAC AAG TAC ACC AGC TAT CCG 727  
 Arg Thr Lys Gln Leu Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro  
 215 220 225

GAT CCC ATA GTG CTC ATG AAG AGC GCC AGA AAC AGC TGT TGG TCC AGA 775  
 Asp Pro Ile Val Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Arg  
 230 235 240

GAT GCC GAG TAC GGA CTG TAC TCC ATC TAT CAG GGA GGA TTG TTC GAG 823  
 Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Leu Phe Glu  
 245 250 255

CTA AAA AAA AAT GAC AGG ATT TTT GTT TCT GTG ACA AAT GAA CAT TTG 871  
 Leu Lys Lys Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu  
 260 265 270 275

ATG GAC CTG GAT CAA GAA GCC AGC TTC TTT GGA GCC TTT TTA ATT AAC 919  
 Met Asp Leu Asp Gln Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Ile Asn  
 280 285 290

TAAATGACCA GTAAAGATCA AACACAGCCC TAAAGTACCC AGTAATCTTC TAGGTTGAAG 979

GCATGCCTGG AAAGCGACTG AACTGGTTAG GATATGGCCT GGCTGTAGAA ACCTCAGGAC 1039

AGATGTGACA GAAAGGCAGC TGGAAGTCAG CAGCGACAGG CCAACAGTCC AGCCACAGAC 1099

**ACTTTCGGTG TTTCATCGAG AGACTTGCTT TCTTCCGCA AAATGAGATC ACTGTAGCCT 1159**  
**TTCAATGATC TACCTGGTAT CAGTTTGCAG AGATCTAGAA GACGTCCAGT TTCTAAATAT 1219**  
**TTATGCAACA ATTGACAATT TTCACCTTTG TTATCTGGTC CAGGGGTGTA AAGCCAAGTG 1279**  
**CTCACAAGCT GTGTGCAGAC CAGGATAGCT ATGAATGCAG GTCAGCATAA AAATCACAGA 1339**  
**ATATCTCACC TACTAAAAA AAAAAA 1366**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

(A) LONGITUD: 291 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

Met	Pro	Ser	Ser	Gly	Ala	Leu	Lys	Asp	Leu	Ser	Phe	Ser	Gln	His	Phe
1				5					10					15	
Arg	Met	Met	Val	Ile	Cys	Ile	Val	Leu	Leu	Gln	Val	Leu	Leu	Gln	Ala
			20					25					30		
Val	Ser	Val	Ala	Val	Thr	Tyr	Met	Tyr	Phe	Thr	Asn	Glu	Met	Lys	Gln
		35					40					45			
Leu	Gln	Asp	Asn	Tyr	Ser	Lys	Ile	Gly	Leu	Ala	Cys	Phe	Ser	Lys	Thr
	50					55					60				
Asp	Glu	Asp	Phe	Trp	Asp	Ser	Thr	Asp	Gly	Glu	Ile	Leu	Asn	Arg	Pro
65					70					75					80
Cys	Leu	Gln	Val	Lys	Arg	Gln	Leu	Tyr	Gln	Leu	Ile	Glu	Glu	Val	Thr
				85					90					95	
Leu	Arg	Thr	Phe	Gln	Asp	Thr	Ile	Ser	Thr	Val	Pro	Glu	Lys	Gln	Leu
			100						105					110	
Ser	Thr	Pro	Pro	Leu	Pro	Arg	Gly	Gly	Arg	Pro	Gln	Lys	Val	Ala	Ala
		115					120					125			
His	Ile	Thr	Gly	Ile	Thr	Arg	Arg	Ser	Asn	Ser	Ala	Leu	Ile	Pro	Ile
	130					135					140				
Ser	Lys	Asp	Gly	Lys	Thr	Leu	Gly	Gln	Lys	Ile	Glu	Ser	Trp	Glu	Ser
145					150					155					160
Ser	Arg	Lys	Gly	His	Ser	Phe	Leu	Asn	His	Val	Leu	Phe	Arg	Asn	Gly
				165					170					175	
Glu	Leu	Val	Ile	Glu	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Gln	Thr
			180					185						190	
Tyr	Phe	Arg	Phe	Gln	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ser	Lys	Met	Val	Ser	Lys
		195					200					205			

**Asp Lys Val Arg Thr Lys Gln Leu Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr**  
**210 215 220**  
**Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Val Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys**  
**225 230 235 240**  
**Trp Ser Arg Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly**  
**245 250 255**  
**Leu Phe Glu Leu Lys Lys Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn**  
**260 265 270**  
**Glu His Leu Met Asp Leu Asp Gln Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe**  
**275 280 285**  
**Leu Ile Asn**  
**290**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 7:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: no relevante

10 (D) TOPOLOGÍA: no relevante

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

15 (vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: péptido FLAG

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

20

**Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys**  
**1 5**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 8:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: no relevante

30 (D) TOPOLOGÍA: no relevante

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

35 (vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: péptido conservado

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

**Leu Val Val Xaa Xaa Xaa Gly Leu Tyr Tyr Val Tyr Xaa Gln Val Xaa**  
**1 5 10 15**

5 **Phe**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

- (A) LONGITUD: 32 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: no relevante
- (D) TOPOLOGÍA: no relevante

15

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (vii) FUENTE INMEDIATA:

20

(B) CLON: líder del CMV

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

**Met Ala Arg Arg Leu Trp Ile Leu Ser Leu Leu Ala Val Thr Leu Thr**  
**1 5 10 15**

**Val Ala Leu Ala Ala Pro Ser Gln Lys Ser Lys Arg Arg Thr Ser Ser**  
**20 25 30**

25

30

35

40

45

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido TRAIL soluble purificado que contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de:
- 5 a) un dominio extracelular de la TRAIL humana de la SEQ ID NO: 2; y
- b) un fragmento de dicho dominio extracelular de (a) en donde el fragmento es capaz de inducir apoptosis de células cancerosas sensibles a TRAIL,
- en donde dicho polipéptido TRAIL humano soluble es capaz de inducir apoptosis de células cancerosas sensibles a TRAIL.
- 10 2. Un polipéptido TRAIL de la reivindicación 1, que contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:
- a) el dominio extracelular de TRAIL humano (aminoácidos 39 a 281 de la SEQ ID NO: 2); y
- b) un fragmento de dicho dominio extracelular, en donde dicho fragmento es capaz de inducir apoptosis de células cancerosas sensibles a TRAIL.
- 15 3. Un polipéptido TRAIL de la reivindicación 2, que contiene la secuencia de aminoácidos x hasta 281 de la SEQ ID NO: 2, en donde x representa un entero de 39 a 95.
4. Un polipéptido TRAIL de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido TRAIL soluble contiene una sustitución(es) conservadora(s) en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:
- a) un dominio extracelular de TRAIL humana (aminoácidos 39 a 281 de la SEQ ID NO: 2); y
- 20 b) un fragmento de dicho dominio extracelular en donde el fragmento es capaz de inducir apoptosis de células cancerosas sensibles a TRAIL,
- en donde la TRAIL sustituida en forma conservadora es capaz de inducir apoptosis de células cancerosas sensibles a TRAIL.
- 25 5. Un oligómero que comprende de dos a tres polipéptidos TRAIL solubles de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Un trímero TRAIL que contiene tres polipéptidos TRAIL solubles de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
7. Un polipéptido TRAIL purificado, en donde dicho polipéptido TRAIL es un fragmento de la proteína TRAIL humana de la SEQ ID NO: 2, en donde dicho fragmento es capaz de inducir apoptosis de células cancerosas sensibles a TRAIL.
- 30 8. Una proteína de fusión que comprende un polipéptido TRAIL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, fusionada a un polipéptido heterólogo.
9. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho polipéptido heterólogo promueve oligomerización.
10. Un oligómero de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende tres polipéptidos TRAIL solubles.
- 35 11. Una composición que comprende un polipéptido TRAIL, oligómero, o proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y un portador, diluyente o excipiente fisiológicamente aceptable.
12. Una composición que comprende un oligómero de acuerdo con la reivindicación 10, y un portador, diluyente o excipiente fisiológicamente aceptable.
- 40 13. Un ADN aislado que codifica un polipéptido TRAIL, en donde dicho polipéptido TRAIL es un fragmento de la proteína TRAIL humana de la SEQ ID NO: 2, en donde dicho fragmento es capaz de inducir apoptosis de células cancerosas sensibles a TRAIL.

14. Un ADN aislado que codifica un polipéptido TRAIL soluble, en donde dicho polipéptido TRAIL soluble comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de:

a) el dominio extracelular de la proteína TRAIL humana de la SEQ NO:2; y

5 b) un fragmento de dicho dominio extracelular en donde el fragmento es capaz de inducir apoptosis de células cancerosas sensibles a TRAIL;

en donde dicho polipéptido TRAIL soluble es capaz de inducir apoptosis de células cancerosas sensibles a TRAIL.

15. Un ADN de la reivindicación 14, en donde dicho polipéptido TRAIL soluble comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:

10 a) el dominio extracelular de TRAIL humano (aminoácidos 39 a 281 de la SEQ ID NO: 2); y

b) un fragmento de dicho dominio extracelular, en donde dicho fragmento es capaz de inducir apoptosis de células cancerosas sensibles a TRAIL.

16. Un ADN de la reivindicación 15, en donde dicho polipéptido TRAIL soluble comprende la secuencia de aminoácidos x a 281 de la SEQ ID NO: 2, en donde x representa un entero de 39 a 95.

15 17. Un ADN de la reivindicación 14, en donde dicho polipéptido TRAIL soluble comprende una sustitución(es) conservadora(s) en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:

a) el dominio extracelular de TRAIL humano (aminoácidos 39 a 281 de la SEQ ID NO: 2); y

b) un fragmento de dicho dominio extracelular en donde el fragmento es capaz de inducir apoptosis de células cancerosas sensibles a TRAIL,

20 en donde el TRAIL sustituido en forma conservadora es capaz de inducir apoptosis de células cancerosas sensibles a TRAIL.

18. Un vector de expresión que comprende un ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17.

25 19. Un proceso para preparar un polipéptido TRAIL, que comprende el cultivo de una célula huésped transformada con un vector de acuerdo con la reivindicación 18 bajo condiciones que promueven la expresión de TRAIL, y la recuperación del polipéptido TRAIL.

20. Un polipéptido, oligómero o proteína de fusión TRAIL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso en medicina humana.

30

35

40

FIGURA 1

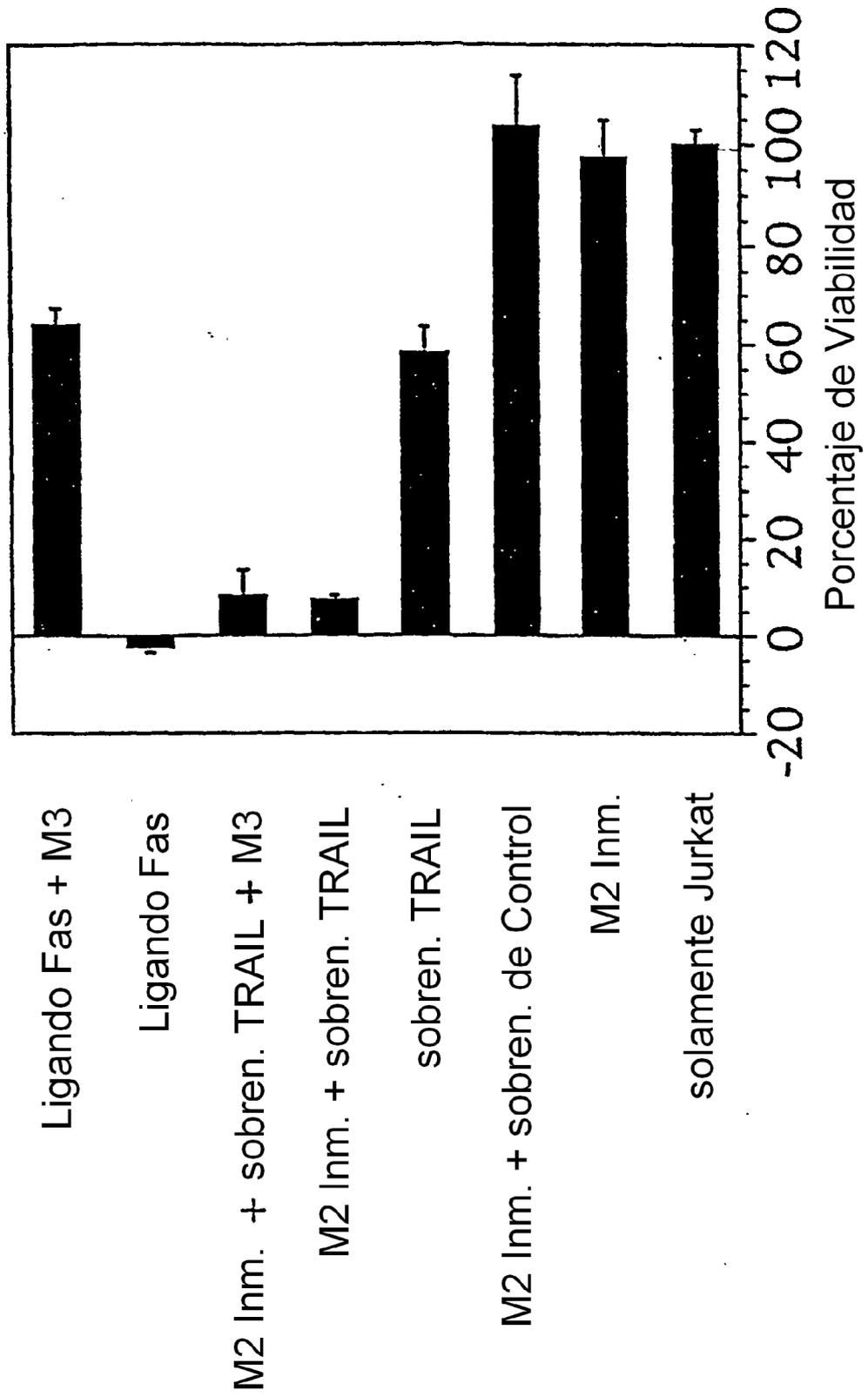
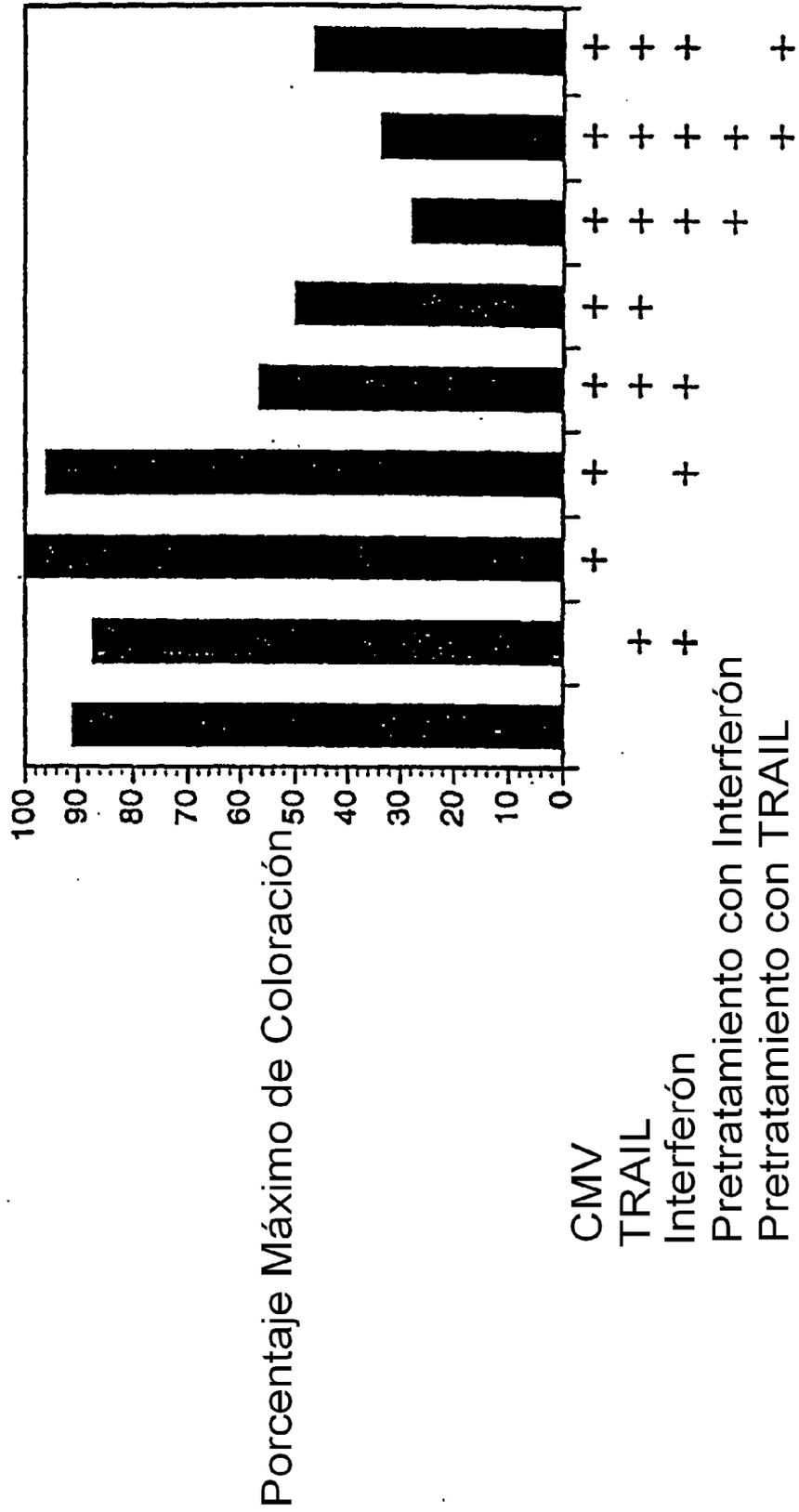


FIGURA 2



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

**Documentos de patente citados en la descripción**

- US 4518584 A [0038]
- US 4737462 A [0038]
- US 5011912 A [0042] [0043]
- US 5071972 A [0045]
- EP 276846 A [0045]
- EP 212914 A [0046]
- WO 9310151 A [0051]
- US 5457035 A [0051]
- US 5073627 A [0052]
- WO 9410308 A [0053]
- US 446922 A [0054]
- EP 36776 A [0062]
- EP 73657 A, Hitzeman [0063]
- EP 0367566 A [0069]
- WO 9118982 A [0069] [0146]
- US 58650996 A [0070]
- US 4965195 A [0072]
- EP 367566 A [0072]
- US 4968607 A [0072]
- EP 460846 A [0072]
- WO 9106629 A [0105]
- WO 9010448 A [0105] [0108]
- WO 9013641 A [0106]
- WO 9104753 A [0107]
- WO 9510540 A [0123] [0168]
- US 4411993 A [0142]
- US 4703004 A [0144]
- US 08496632 A [0193]
- US 08548368 B [0193]

**10 Literatura citada en la descripción que no es de patente:**

- Itoh et al. Cell, 1991, vol. 66, 233 [0001] [0002]
- Gammon et al. Immunology Today, 1991, vol. 12, 193 [0001] [0084]
- Watanabe-Fukunage et al. Nature, 1992, vol. 356, 314 [0002]
- 15 • Yonehara et al. J. Exp. Med., 1989, vol. 169, 1747 [0002]
- Trauth et al. Science, 1989, vol. 245, 301 [0002]
- Alderson et al. J. Exp. Med., 1993, vol. 178, 2231 [0002]
- Suda et al. Cell, 1993, vol. 75, 1169 [0003] [0017] [0018] [0021] [0040]
- Takahashi et al. International Immunology, 1994, vol. 6, 1567 [0003] [0017]
- 20 • Smith et al. Cell, 1993, vol. 73, 1349 [0018] [0021] [0125]
- Smith et al. Cell, 1994, vol. 76, 959 [0018] [0021] [0040]
- Gearing et al. EMBO J., 1989, vol. 8, 3667 [0019]
- Goodwin et al. Eur. J. Immunol., 1993, vol. 23, 2631 [0021]
- Saiki et al. Science. 1988, vol. 239, 487 [0028]
- 25 • Recombinant ADN Methodology. Academic Press, Inc, 1989, 189 - 196 [0028]
- PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc, 1990 [0028]
- Devereux et al. Nucl. Acids Res., 1984, vol. 12, 387 [0036]
- Needleman; Wunsch. J. Mol. Biol, 1970, vol. 48, 443 [0036]
- Smith; Waterman. Adv. Appl. Math, 1981, vol. 2, 482 [0036]
- 30 • Gribskov ; Burgess. Nucl. Acids Res., 1986, vol. 14, 6745 [0036]
- Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, 1979, 353 - 358 [0036]
- Walder et al. Gene, 1986, vol. 42, 133 [0038]
- Bauer et al. Gene, 1985, vol. 37, 73 [0038]
- Craik. BioTechniques, January 1985, 12 - 19 [0038]
- 35 • Smith et al. Genetic Engineering: Principles and Methods. Plenum Press, 1981 [0038]
- Smith et al. Cell, 1993, vol. 73 (1349), 1353 [0040]
- Goodwin et al. Eur. J. Immunol, 1993, vol. 23, 2631, 2638 - 39 [0040]
- Hopp et al. Bio/Technology, 1988, vol. 6, 1204 [0042]
- Ashkenazi et al. PNAS USA, 1991, vol. 88, 10535 [0049]

- **Bym et al.** Nature, 1990, vol. 344, 667 [0049]
- **Hollenbaugh ; Aruffo.** Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins. Current Protocols in Immunology, 1992, 10.19.1 - 10.19.11 [0049]
- **Landschulz et al.** Science, 1988, vol. 240, 1759 [0053]
- 5 • **Beutler ; Huffel.** Science, 1994, vol. 264, 667 [0054]
- **Banner et al.** Cell, 1993, vol. 73, 431 [0054]
- **Hoppe et al.** FEBS Letters, 1994, vol. 344, 191 [0054]
- **Pouwels et al.** Cloning Vectors: A Laboratory Manual. Elsevier, 1995 [0059]
- **Chang et al.** Nature, 1978, vol. 275, 615 [0062]
- 10 • **Goeddel et al.** Nature, 1979, vol. 281, 544 [0062]
- **Goeddel et al.** Nucl. Acids Res., 1980, vol. 8, 4057 [0062]
- **Maniatis.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 412 [0062]
- **Hitzeman et al.** J. Biol. Chem, 1980, vol. 255, 2073 [0063]
- **Hess et al.** J. Adv. Enzyme Reg., 1968, vol. 7, 149 [0063]
- 15 • **Holland et al.** Biochem., 1978, vol. 17, 4900 [0063]
- **Russell et al.** J. Biol. Chem., 1982, vol. 258, 2674 [0063]
- **Beier et al.** Nature, 1982, vol. 300, 724 [0063]
- **Kurjan et al.** Cell, 1982, vol. 30, 933 [0064]
- **Bitter et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, vol. 81, 5330 [0064]
- 20 • **Hinnen et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, vol. 75, 1929 [0065]
- **Luckow ; Summers.** Bio/Technology, 1988, vol. 6, 47 [0067]
- **Gluzman et al.** Cell, 1981, vol. 23, 175 [0067]
- **McMahan et al.** EMBO J., 1991, vol. 10, 2821 [0067] [0146]
- **Fiers et al.** Nature, 1978, vol. 273, 113 [0068]
- 25 • **Okayama ; Berg.** Mol. Cell. Biol., 1983, vol. 3, 280 [0069]
- **Cosman et al.** Mol. Immunol., 1986, vol. 23, 935 [0069]
- **Cosman et al.** Nature, 1984, vol. 312, 768 [0069] [0072]
- **Urdal et al.** J. Chromatog., 1984, vol. 296, 171 [0082]
- **Kromer.** Advances in Immunology, 1995, vol. 58, 211 [0085]
- 30 • **Groux et al.** J. Exp. Med, 1992, vol. 175, 331 [0085]
- **Sachs ; Lotem.** Blood, 1993, vol. 82, 15 [0085]
- **Groux et al.** J. Exp. Med., 1992, vol. 175, 331 [0086]
- **Stein; Cohen.** Cancer Res., 1988, vol. 48, 2659 [0103]
- **van der Krol et al.** BioTechniques, 1988, vol. 6, 958 [0103]
- 35 • **Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses.** Plenum Press, 1980 [0110]
- **Antibodies: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 [0110]
- **Riechmann et al.** Nature. 1988, vol. 332, 323 [0112]
- **Liu et al.** PNAS, 1987, vol. 84, 3439 [0112]
- **Larrick et al.** Bio/Technology, 1989, vol. 7, 934 [0112]
- 40 • **Winter ; Harris.** TIPS, May 1993, vol. 14, 139 [0112]
- **Kwaan, H.C.** Semin. Hematol., 1987, vol. 24, 71 [0115]
- **Thompson et al.** Blood, 1992, vol. 80, 1890 [0115]
- **Torok et al.** Am. J. Hematol., 1995, vol. 50, 84 [0115]
- **Laurence et al.** Blood, 15 April 1996, vol. 87, 3245 [0116]
- 45 • **Moake, J.L.** Lancet, 1994, vol. 343, 393 [0117]
- **Melnyk et al.** Arch. Intern. Med, 1995, vol. 155, 2077 [0117]
- **Laurence et al.** Blood, 1996, vol. 87, 3245 [0122] [0190]
- **Mosley et al.** Cell, 1989, vol. 59, 335 [0137]
- **Engvall et al.** Immunochem., 1971, vol. 8, 871 [0144]
- 50 • **Dower et al.** J. Immunol, 1989, vol. 142, 4314 [0146]
- **Weiss et al.** J. Immunol, 1984, vol. 133, 123 - 128 [0150]
- **Fischer et al.** Blood, 1988, vol. 72, 234 [0158] [0179]
- **Hopp et al.** Biotechnology, 1988, vol. 6, 1204 - 1210 [0161]
- **Alderson et al.** J. Exp. Med, 1995, vol. 181, 71 [0168]

- **Flick ; Gifford.** J. Immunol. Methods, 1984, vol. 68, 167 - 175 **[0177] [0180]**
  - **Goodwin et al.** Cell, 1993, vol. 73, 447 **[0179]**
  - **Oyaizu et al.** Blood, 1993, vol. 82, 3392 **[0191]**
  - **Nicoletti et al.** J. Immunol. Methods, vol. 139, 271 **[0191]**
- 5 • **Laurence et al.** Blood, 1990, vol. 75, 696 **[0191]**