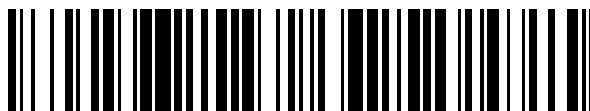


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 654**

51 Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07002962 .4**
96 Fecha de presentación: **14.05.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **1860187**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.11.2007**

54 Título: **RECEPTOR APO-2.**

30 Prioridad:
15.05.1997 US 857216
09.02.1998 US 20746

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.11.2011

73 Titular/es:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:
Ashkenazi, Avi J.;
Adams, Camellia W.;
Chuntharapai, Anan y
Kim, Kyung Jin

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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).

ES 2 368 654 T3

DESCRIPCIÓN

Receptor Apo-2.

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere en general a los anticuerpos anti-polipéptido Apo-2 para utilizar en métodos de tratamiento médico..

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Apoptosis o "Muerte celular programada"

[0002] Se cree que el control del número de células en mamíferos viene determinado, en parte, por un equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular. Una forma de muerte celular, a la que a veces se hace referencia como muerte celular necrótica, se caracteriza habitualmente como una forma patológica de muerte celular causada por algún traumatismo o lesión celular. En cambio, hay otra forma "fisiológica" de muerte celular que habitualmente se produce de una forma ordenada o controlada. A menudo se hace referencia a esta forma de muerte celular ordenada o controlada como "apoptosis" [véase, por ejemplo, Barr et al., Bio/Technology, 12: 487-493 (1994); Steller et al., Science, 267: 1445-1449 (1995)]. La muerte celular apoptótica tiene lugar de forma natural en muchos procesos fisiológicos, incluyendo el desarrollo embrionario y la selección clonal en el sistema inmunitario [Itoh et al., Cell, 66: 233-243 (1991)]. Los índices bajos de muerte celular apoptótica se han asociado con una variedad de condiciones patológicas, incluyendo cáncer, lupus e infección con virus del herpes [Thompson, Science, 267: 1.456-1.462 (1995)]. Los índices elevados de muerte celular apoptótica pueden estar asociados con una variedad de condiciones patológicas, incluyendo SIDA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, retinitis pigmentosa, degeneración cerebelar, anemia aplásica, infarto de miocardio, apoplejía, daño por reperusión, enfermedad hepática inducida por toxinas [véase, Thompson, supra].

[0003] La muerte celular apoptótica habitualmente se acompaña de uno o más cambios morfológicos y bioquímicos característicos en células, tales como la condensación del citoplasma, pérdida de microvellosidades en la membrana plasmática, segmentación del núcleo, degradación del ADN cromosómico o pérdida de la función mitocondrial. Se cree que hay una variedad de señales extrínsecas e intrínsecas que desencadenan o inducen tales cambios celulares morfológicos y bioquímicos [Raff, Nature, 356: 397-400 (1992); Steller, supra; Sachs et al., Blood, 82: 15 (1993)]. Por ejemplo, pueden ser desencadenados por estímulos hormonales, tales como hormonas glucocorticoides para timocitos inmaduros, así como la eliminación de determinados factores de crecimiento [Watanabe-Fukunaga et al., Nature, 356: 314-317 (1992)]. Además, se ha descrito que algunos de oncogenes identificados tales como *myc*, *rel* y *E1A*, y de supresores tumorales, como *p53*, tienen un papel en la inducción de la apoptosis. Asimismo, se ha observado que algunos fármacos quimioterapéuticos y algunas formas de radiación tienen actividad inductora de apoptosis [Thompson, supra].

40 Familia TNF de citoquinas

[0004] Varias moléculas, tales como el factor de necrosis tumoral α ("TNF- α "), el factor de necrosis tumoral β ("TNF- β " o "linfotóxina"), el ligando CD30, el ligando CD27, el ligando CD40, el ligando OX-40, el ligando 4-1BB, el ligando Apo-1 (al que también se hace referencia como ligando Fas o ligando CD95), y el ligando Apo-2 (al que también se hace referencia como TRAIL) se han identificado como miembros de la familia de las citoquinas del factor de necrosis tumoral ("TNF") [véase, por ejemplo, Gruss y Dower, Blood, 85: 3.378-3.404 (1995); Wiley et al., Immunity, 3: 673-682 (1995); Pitti et al., J. Biol. Chem., 271: 12687-12690 (1996); WO 97/01633, publicada el 16 de enero de 1997]. Entre estas moléculas, se ha descrito que el TNF- α , el TNF- β , el ligando CD30, el ligando 4-1BB, el ligando Apo-1 y el ligando Apo-2 (TRAIL) están implicados en la muerte celular apoptótica. Se ha descrito que tanto el TNF- α como el TNF- β inducen muerte apoptótica en células tumorales susceptibles [Schmid et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 83: 1981 (1986); Dealtry et al., Eur. J. Immunol., 17: 689 (1987)]. Zheng et al. han descrito que el TNF- α está implicado en la apoptosis posterior a la estimulación de células T CD8-positivas [Zheng et al., Nature, 377: 348-351 (1995)]. Otros investigadores han descrito que el ligando CD30 puede estar implicado en la delección de células T autorreactivas en el timo [Amakawa et al., Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Programmed Cell Death, Abstr. N.º 10, (1995)].

[0005] Las mutaciones en el receptor de ratón Fas/Apo-1 o en los genes del ligando (denominados *lpr* y *gld*, respectivamente) se han relacionado con algunos trastornos autoinmunitarios, lo que indica que el ligando Apo-1 puede desempeñar algún papel en la regulación de la delección clonal de linfocitos autorreactivos en la periferia [Krammer et al., Curr. Op. Immunol., 6: 279-289 (1994); Nagata et al., Science, 267: 1.449-1.456 (1995)]. También se ha descrito que el ligando Apo-1 induce la apoptosis posterior a la estimulación en linfocitos T CD4-positivos y en linfocitos B, y puede estar implicado en la eliminación de linfocitos activados cuando su función ya no es necesaria [Krammer et al., supra; Nagata et al., supra]. Se ha descrito que los anticuerpos monoclonales de ratón agonistas que se unen específicamente al receptor Apo-1 muestran actividad citotóxica que es comparable o similar a la del

TNF- α [Yonehara et al., J. Exp. Med., 169: 1.747-1.756 (1989)].

Familia de receptores de TNF

- 5 **[0006]** Se cree que la inducción de las diversas respuestas celulares mediadas por dichas citoquinas de la familia de TNF es iniciada por su unión con receptores celulares específicos. Se han identificado dos receptores de TNF distintos de aproximadamente 55 kDa (TNF-R1) y 75 kDa (TNFR2) [Hohman et al., J. Biol. Chem., 264: 14.927-14.934 (1989); Brockhaus et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 3.127-3.131 (1990); EP 417.563, publicada el 20 de marzo de 1991], y se han aislado y caracterizado los ADNc humanos y de ratón correspondientes a ambos tipos de receptores [Loetscher et al., Cell, 61: 351 (1990); Schall et al., Cell, 61: 361 (1990); Smith et al., Science, 248: 1.019-1.023 (1990); Lewis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 2.830-2.834 (1991); Goodwin et al., Mol. Cell. Biol., 11: 3.020-3.026 (1991)]. Se han asociado polimorfismos extensos con ambos genes de receptores de TNF [véase, por ejemplo, Takao et al., Immunogenetics, 37: 199-203 (1993)]. Ambos TNFRs comparten la estructura típica de los receptores de superficie celular incluyendo las regiones extracelular, transmembrana e intracelular. Las partes extracelulares de ambos receptores también se encuentran de forma natural como proteínas de unión a TNF solubles [Nophar, Y. et al., EMBO J., 9:3269 (1990); y Kohno, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:8331 (1990)]. La clonación de receptores de TNF solubles recombinantes fue descrita por Hale et al. [J. Cell. Biochem. Suplemento 25 F, 1991, página 113 (P424)].
- 10
- 15
- 20 **[0007]** La parte extracelular de TNFRs de tipo 1 y de tipo 2 (TNFR1 y TNFR2) contiene un patrón de secuencia de aminoácidos repetitivo de cuatro dominios ricos en cisteína (CRDs) designado de 1 a 4, empezando desde el extremo NH₂. Cada CRD tiene aproximadamente 40 aminoácidos de longitud y contiene de 4 a 6 residuos de cisteína en las posiciones que están bien conservadas [Schall et al., supra; Loetscher et al., supra; Smith et al., supra; Nophar et al., supra; Kohno et al., supra]. En TNFR1, los límites aproximados de los cuatro CRDs son los siguientes: CRD1 – aminoácidos 14 hasta aproximadamente 53; CRD 2 – aminoácidos desde aproximadamente 54 hasta aproximadamente 97; CRD3 - aminoácidos desde aproximadamente 98 hasta aproximadamente 138; CRD4 - aminoácidos desde aproximadamente 139 hasta aproximadamente 167. En TNFR2, CRD1 incluye los aminoácidos 17 hasta aproximadamente 54; CRD 2 – aminoácidos desde aproximadamente 55 hasta aproximadamente 97; CRD 3 – aminoácidos desde aproximadamente 98 hasta aproximadamente 140; y CRD 4 – aminoácidos desde aproximadamente 141 hasta aproximadamente 179 [Banner et al., Cell, 73: 431-435 (1993)]. El papel potencial de los CRDs en la unión de ligando también está descrito por Banner et al., supra.
- 25
- 30
- [0008]** Existe un patrón repetitivo similar de CRDs en otras proteínas de la superficie celular, incluyendo el receptor del factor de crecimiento nervioso p75 (NGFR) [Johnson et al., Cell, 47: 545 (1986); Radeke et al., Nature, 325: 593 (1987)], el antígeno CD40 de células B [Stamenkovic et al., EMBO J., 8: 1403 (1989)], el antígeno OX40 de células T [Mallet et al., EMBO J., 9: 1063 (1990)] y el antígeno de Fas [Yonehara et al., supra e Itoh et al., supra]. Los CRDs también se hallan en las proteínas T2 de tipo TNFR (TNFRs) solubles de los virus de Shope y poxvirus de mixoma [Upton et al., Virology, 160: 20-29 (1987); Smith et al., Biochem. Biophys. Res. Común., 176: 335 (1991); Upton et al., Virology, 184: 370 (1991)]. La alineación óptima de estas secuencias indica que las posiciones de los residuos de cisteínas están bien conservadas. A estos receptores se les hace referencia de forma colectiva como miembros de la superfamilia de receptores de TNF/NGF. Estudios recientes sobre p75NGFR mostraron que la delección de CRD1 [Welcher, A. A. Et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 159-163 (1991)] o una inserción de 5 aminoácidos en este dominio [Yan, H. Y Chao, M. V., J. Biol. Chem. 266: 12099-12104 (1991)] no tenían efecto o bien escaso sobre la unión a NGF [Yan, H. Y Chao, M.V., supra]. El NGFr p75 contiene un tramo rico en prolinas de aproximadamente 60 aminoácidos, ente su CRD4 y la región transmembrana, que no está implicada en la unión a NGF [Peetre, C. et al., Eur. J. Hematol., 41: 414-419 (1988); Seckinger, P. et al., J. Biol. Chem., 264: 11966-11973 (1989); Yan H. y Chao, M.V., supra]. En TNFR2, pero no en TNFR1, se halla una región rica en prolinas similar.
- 35
- 40
- 45
- [0009]** Itoh et al. describen que el receptor de Apo-1 puede señalar una muerte celular apoptótica similar a la señalada por el TNF-R1 de 55 kDa [Itoh et al., supra]. También se ha descrito que la expresión del antígeno de Apo-1 se regula por disminución junto con la de TNF-R1 cuando las células son tratadas con TNF- α o con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Apo-1 [Krammer et al., supra; Nagata et al., supra]. Por consiguiente, algunos investigadores han establecido la hipótesis de que las líneas celulares que co-expresan receptores de Apo-1 y TNF-R1 pueden mediar la muerte celular a través de mecanismos de señalización comunes [Id.].
- 50
- 55
- [0010]** Los ligandos de la familia del TNF identificados hasta la fecha, a excepción de la linfotóxina- α , son proteínas transmembrana de tipo II, cuyo extremo C es extracelular. En cambio, los receptores de la familia de receptores del TNF (TNFR) identificados hasta la fecha son proteínas transmembrana de tipo I. No obstante, en ambas familias de ligandos y receptores de TNF la homología identificada entre los miembros de una familia se ha hallado principalmente en el dominio extracelular ("ECD"). Varias de las citoquinas de la familia del TNF, incluyendo el TNF- α , el ligando Apo-1 y el ligando CD40, se dividen proteolíticamente en la superficie celular; la proteína resultante en cada caso forma habitualmente una molécula homotrimérica que actúa como una citoquina soluble. Las proteínas de la familia de receptores del TNF habitualmente también se dividen proteolíticamente para liberar los ECD del receptor soluble que pueden actuar como inhibidores de las citoquinas análogos.
- 60

[0011] Recientemente, se han identificado otros miembros de la familia de TNFR de mamífero. En Marsters et al., Curr. Biol. 6: 750 (1996), los investigadores describen un polipéptido humano de secuencia nativa de longitud completa, denominado Apo-3, que muestra similitud con la familia de TNFR en sus repeticiones extracelulares ricas en cisteínas y se parece a TNFR1 y CD95 en que contiene una secuencia de dominio citoplásmico de muerte [véase también Marsters et al., Curr. Biol., 6: 1669 (1996)]. A Apo-2 otros investigadores también han hecho referencia como DR3, wsl-1 y TRAMP [Chinnaiyan et al., Science, 274: 990 (1996); Kitson et al., Nature, 384: 372 (1996); Bodmer et al., Immunity, 6: 79 (1997)].

[0012] Pan et al. Han descrito otro miembro de la familia de receptores de TNF al que se hace referencia como "DR4" [Pan et al., Science, 276: 111-113 (1997)]. Se describió que el DR4 contenía un dominio citoplásmico de muerte capaz de participar en el aparato de suicidio celular. Pan et al. Describen que se cree que DR4 es un receptor para el ligando conocido como ligando Apo-2 o TRAIL.

El complejo señalizador inductor de la apoptosis

[0013] Tal como se entiende actualmente, el programa de muerte celular contiene por lo menos tres elementos importantes – activadores, inhibidores y efectores; en *C. elegans*, estos elementos son codificados respectivamente por tres genes, *Ced-4*, *Ced-9* y *Ced-3* [Steller, Science, 267: 1445 (1995); Chinnaiyan et al., Science, 275: 1122-1126 (1997)]. Dos de los miembros de la familia de TNFR, TNFR1 y Fas/Apo1 (CD95), pueden activar la muerte celular apoptótica [Chinnaiyan y Dixit, Current Biology, 6: 555-562 (1996); Fraser y Evan, Cell, 85: 781-784 (1996)]. También se sabe que TNFR1 media en la activación del factor de transcripción, NF- κ B [Tartaglia et al., Cell, 74: 845-853 (1993); Hsu et al., Cell, 84: 299-308 (1996)]. Además de cierta homología de ECD, estos dos receptores comparten homología en su dominio intracelular (ICD) en una zona interfacial de oligomerización conocido como el dominio de muerte [Tartaglia et al., *supra*; Nagata, Cell, 88: 355 (1997)]. Los dominios de muerte también se hallan en varias proteínas "metazoanas" que regulan la apoptosis, concretamente, la proteína de *Drosophila*, Reaper, y las proteínas de mamífero a las que se hace referencia como FADD/MORT1, TRADD y RIP [Cleaveland y Ihle, Cell, 81: 479-482 (1995)]. Utilizando el sistema de dos híbridos de levadura, Raven et al. describen la identificación de la proteína, wsl-1, que se une al dominio de muerte de TNFR1 [Raven et al., Programmed Cell Death Meeting, Septiembre 20-24, 1995, Resumen en la página 127; Raven et al., European Cytokine Network, 7: Resumen 82 en la página 210 (Abril-Junio 1996)]. La proteína wsl-1 se describe como homólogo con respecto a TNFR1 (identidad del 48%) y que tiene una distribución de tejido limitada. Según Raven et al., la distribución de tejido de wsl-1 es significativamente diferente de la proteína de unión a TNFR1, TRADD.

[0014] Tras la unión del ligando y agrupamiento con el receptor, se cree que TNFR1 y CD95 reclutan FADD en un complejo de señalización inductor de la muerte. CD95 supuestamente se une directamente a FADD, mientras que TNFR1 se une a FADD indirectamente a través de TRADD [Chinnaiyan et al., Cell, 81: 505-512 (1995); Boldin et al., J. Biol. Chem., 270: 387-391 (1995); Hsu et al., *supra*; Chinnaiyan et al., J. Biol. Chem. 271, 4961-4965 (1996)]. Se ha descrito que FADD actúa como una proteína adaptadora que recluta la proteasa relacionada con *Ced-3*, MACH α /FLICE (caspasa 8), en el complejo de señalización de la muerte [Boldin et al., Cell, 85: 803-815 (1996); Muzio et al., Cell, 85: 817-827 (1996)]. MACH α /FLICE parece ser el desencadenante que inicia una cascada de proteasas apoptóticas, incluyendo la enzima convertora de interleuquina-1 β (ICE) y CPP32/Yama, que pueden ejecutar algunos aspectos críticos del programa de muerte celular [Fraser y Evan, *supra*].

[0015] Recientemente se ha descrito que la muerte celular programada implica la actividad de miembros de una familia de proteasas de cisteína relacionadas con el gen de la muerte celular de *C-elegans*, *ced-3*, y a la enzima convertora de IL-1 de mamífero, ICE. La actividad de las proteasas ICE y CPP32/Yama puede ser inhibida por el producto del gen del virus de la viruela de las vacas ("cowpox"), *crmA* [Ray et al., Cell, 69: 597-604 (1992); Tewari et al., Cell, 81: 801-809 (1995)]. Estudios recientes muestran que CrmA puede inhibir la muerte celular inducida por TNFR-1 y C095 [Enari et al., Nature, 375: 78-81 (1995); Tewari et al., J. Biol. Chem., 270: 3255-3260 (1995)].

[0016] Tal como revisó recientemente Tewari et al., TNFR1, TNFR2 y CD40 modulan la expresión de citoquinas proinflamatorias y coestimulantes, los receptores de citoquinas, y las moléculas de adhesión celular a través de la activación del factor de transcripción, NF- κ B [Tewari et al., Curr. Op. Genet. Develop., 6:39-44 (1996)]. NF- κ B es el prototipo de una familia de factores de transcripción dimericos cuyas subunidades contienen regiones Rel conservadas [Verma et al., Genes Develop, 9: 2723-2735 (1996); Baldwin, Ann. Rev. Immunol., 14: 649-681 (1996)]. En su forma latente, NF- κ B se compleja con miembros de la familia de inhibidores I κ B; tras la inactivación del I κ B en respuesta a ciertos estímulos; el NF- κ B se transloca al núcleo donde se une a secuencias de ADN específicas y activa la transcripción de los genes.

[0017] Para una revisión de la familia TNF de citoquinas y sus receptores, véase Gruss y Dower, *supra*.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0018] Los Solicitantes han identificado clones de ADNc que codifican polipéptidos nuevos, designados en la presente invención como "Apo-2". Se cree que Apo-2 es un miembro de la familia de TNFR; el polipéptido Apo-2 humano de secuencia nativa de longitud completa muestra algunas similitudes con algunos TNFRs conocidos,

incluyendo una región de dominio citoplásmico de muerte. El Apo-2 humano de secuencia nativa de longitud completa también muestra similitud con la familia de TNFR en sus repeticiones extracelulares ricas en cisteína. Se ha observado que el polipéptido Apo-2 es capaz de desencadenar la apoptosis dependiente de caspasa y activar NF- κ B. Sorprendentemente, los solicitantes observaron que un dominio extracelular soluble de Apo-2 se une a un ligando de Apo-2 ("Apo-2L") y pueden inhibir la función del ligando de Apo-2. Actualmente se cree que el ligando de Apo-2 puede transmitir señales a través de por lo menos dos receptores diferentes, DR4 y el Apo-2 descrito recientemente en la presente invención. Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal para utilizar en un método de tratamiento, en el que el anticuerpo (a) se une al polipéptido Apo-2 que consiste en los residuos de aminoácidos 1 a 411 de SEC ID No: 1 y (b) induce la apoptosis *in vivo* o *ex vivo* en por lo menos un tipo de célula cancerosa de mamífero que expresa dicho polipéptido Apo-2.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0019]

La figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos de un ADNc de Apo-2 humano de secuencia nativa (SEC ID No: 2) y su secuencia de aminoácidos derivada (SEC ID No: 1).

La figura 2A muestra la secuencia de aminoácidos derivada de Apo-2 humana de secuencia nativa – la secuencia señal putativa está subrayada, el dominio transmembrana putativo está encerrada y la secuencia de dominio de muerte putativa está subrayada de forma discontinua. Las cisteínas de los dos dominios ricos en cisteína están subrayadas de forma individual.

La figura 2B muestra una alineación y comparación de las secuencias de dominio de muerte de Apo-2, DR4, Apo-3/DR3, TNFR1 y Fas/Apo-1 (CD95) humano de secuencia nativa. Los asteriscos indican los residuos que son esenciales para la señalización de la muerte por TNFR1 [Tartaglia et al., *supra*].

La figura 3 muestra la interacción del ECD de Apo-2 con Apo-2L. Los sobrenadantes de células 293 transfectadas con mock o de células 293 transfectadas con ECD de Apo-2 etiquetado con epítipo Flag se incubaron con Apo-2L etiquetado con poli-His y se sometieron a inmunoprecipitación con gránulos de agarosa conjugada con anti-Flag o níquel. Las proteínas precipitadas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, y se detectaron mediante inmunotransferencia con anticuerpo anti-Apo-2L o anti-Flag.

La figura 4 muestra la inducción de apoptosis por Apo-2 y la inhibición de la actividad de Apo-2L por ECD de Apo-2 soluble. Se transfectaron células 293 humanas (A, B) o células HeLa (C) mediante el vector pRK5 o mediante plásmidos basados en pRK5 que codifican Apo-2 y/o CrmA. La apoptosis se valoró mediante la morfología (A), la fragmentación de ADN (B) o mediante FACS (C-E). El Apo-2L soluble se preincubó con tampón o ECD de Apo-2 purificado por afinidad junto con anticuerpo anti-Flag o inmunoconjugado de ECD de Apo-2 o inmunoconjugados de DR4 o TNFR1 y se añaden a células HeLa. Posteriormente se analizó la apoptosis de las células (D). También se determinó el análisis de la respuesta-dosis utilizando Apo-2L con inmunoconjugado de ECD de Apo-2 (E).

La figura 5 muestra la activación de NF- κ B por Apo-2, DR4 y Apo-2L. (A) Las células HeLa se transfectaron con plásmidos de expresión que codificaban las proteínas indicadas. Los extractos nucleares se prepararon y analizaron mediante un ensayo electroforético del desplazamiento de la movilidad. (B) Las células HeLa o MCF7 se trataron con tampón, Apo-2L o TNF- α y se ensayaron para la actividad de NF- κ B. (C) Las células HeLa se preincubaron con tampón, ALLN, o ciclohexamida antes de la adición de Apo-2L. La apoptosis se analizó posteriormente mediante FACS.

La Figura 6A muestra la expresión de ARNm de Apo-2 en tejidos humanos al analizarse mediante hibridación Northern de manchas de poli A ARN de tejido humano.

La figura 6B muestra la expresión de ARNm de Apo-2 en líneas celulares de cáncer humano al analizarse mediante hibridación Northern de manchas de poli A ARN de líneas celulares de cáncer humano.

La figura 7 muestra el análisis FACS de un anticuerpo de Apo-2, 3F11.39.7 (ilustrado por las líneas en negrita) en comparación con los controles de IgG (líneas discontinuas). El anticuerpo 3F11.39.7 reconoció el receptor de Apo-2 expresado en células 9D humanas.

La figura 8 es un gráfico que muestra el porcentaje (%) de apoptosis inducido en células 9D por el anticuerpo de Apo-2 3F11.39.7 en ausencia de Fc de IgG anti-ratón de cabra.

La figura 9 es un diagrama de barras que muestra el porcentaje (%) de apoptosis, en comparación con Apo-2L, en células 9D por el anticuerpo de Apo-2 3F11.39.7 en presencia o ausencia de Fc de IgG anti-ratón de cabra.

La figura 10 es un diagrama de barras que ilustra la capacidad del anticuerpo de Apo-2 3F11.39.7 para bloquear la apoptosis inducida por Apo-2L en células 9D.

La figura 11 es un gráfico que muestra los resultados de la unión en una prueba ELISA de anticuerpo de Apo-2 3F11.39.7 a Apo-2 y a otros receptores Apo-2L conocidos a los que se hace referencia como DR4, DcR1 y DcR2.

La figura 12A es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de unión en un ensayo ELISA del anticuerpo 16E2 a Apo-2, DR4, DcR1, DcR2 y CD4-Ig.

La figura 12B es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de unión en un ensayo ELISA del anticuerpo 20E6 a Apo-2, DR4, DcR1, DcR2 y CD4-Ig.

La figura 12C es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de unión en un ensayo ELISA del anticuerpo 24C4 a Apo-2, DR4, DcR1, DcR2 y CD4-Ig.

La figura 13A es un gráfico que muestra la actividad agonista del anticuerpo 16E2, en comparación con Apo-2L, en un ensayo de apoptosis (tinción de violeta cristal utilizando células SK-MES-1).

La figura 13B es un diagrama de barras que muestra la actividad agonista del anticuerpo 16E2, en comparación con el anticuerpo scFv 7D5 (un anticuerpo de factor antitumoral), en un ensayo de apoptosis (tinción de violeta cristal) utilizando células SK-MES-1.

La figura 13C es un diagrama de barras que muestra la actividad agonista del anticuerpo 16E2, en comparación con el anticuerpo scFv 7D5, en un ensayo de apoptosis (anexina V-biotina/estreptavidina-[S³⁵]) utilizando células SK-MES-1.

La figura 14A es un gráfico que muestra la actividad agonista del anticuerpo 20E6, en comparación con Apo-2L, en un ensayo de apoptosis (tinción de violeta cristal) utilizando células SK-MES-1.

La figura 14B es un gráfico que muestra la actividad agonista del anticuerpo 20E6 por comparación entre los resultados obtenidos en los ensayos de apoptosis de violeta cristal y anexina V-biotina/estreptavidina-[S³⁵].

La figura 14C es un gráfico que muestra la actividad agonista del anticuerpo 16E2 etiquetado con gD, en comparación con Apo-2L, en un ensayo de apoptosis (tinción de violeta cristal) utilizando células SK-MES-1.

La figura 15A muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento del anticuerpo de cadena única (scFv) al que se hace referencia como 16E2 (SEC ID No: 6).

La figura 15B muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento del anticuerpo de cadena única (scFv) al que se hace referencia como 20E6 (SEC ID No: 7).

La figura 15C muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento del anticuerpo de cadena única (scFv) al que se hace referencia como 24C4 (SEC ID No: 8).

La figura 16 muestra fragmentos del anticuerpo de cadena única (scFv) a los que se hace referencia como 16E2, 20E6 y 24C4 con las secuencias de aminoácidos respectivas para la secuencia señal y las regiones CDR de la cadena ligera y pesada identificadas (las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están subrayadas).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

I. Definiciones

[0020] Los términos “polipéptido Apo-2” y “Apo-2” cuando se utilizan en la presente invención comprenden Apo-2 de secuencia nativa y variantes de Apo-2 (que se definen posteriormente en la presente invención). Estos términos comprenden Apo-2 de una serie de mamíferos, incluyendo humanos. El Apo-2 se puede aislar de una serie de fuentes, tales como tipos de tejidos humanos o de otra fuente, o puede prepararse mediante procedimientos recombinantes o sintéticos.

[0021] Un “Apo-2 de secuencias nativa” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un Apo-2 derivado de la naturaleza. De este modo, un Apo-2 de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos de Apo-2 natural de cualquier mamífero. Dicho Apo-2 de secuencia nativa se puede aislar de la naturaleza o se puede producir mediante medios recombinantes o sintéticos. El término “Apo-2 de secuencia nativa” comprende específicamente formas truncadas o secretadas naturales del Apo-2 (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativas) y variantes alélicas naturales del Apo-2. Una forma variante natural del Apo-2 incluye un Apo-2 que tiene una sustitución de aminoácido en el residuo 410 en la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 1 (SEC ID No: 1). En una realización de dicha forma variante natural, el residuo de leucina en la posición 410 está sustituido por un residuo de metionina. En la figura 1 (SEC ID No: 1), el residuo de aminoácido en la posición 410 se identifica como “Xaa” para indicar que el aminoácido puede ser, opcionalmente, leucina o metionina. En la figura 1 (SEC ID No: 2), el nucleótido

en la posición 1367 se identifica como "W" para indicar que el nucleótido puede ser adenina (A) o timina (T) o uracilo (U). En una realización, el Apo-2 de secuencia nativa es un Apo-2 de secuencia nativa maduro o de longitud completa que comprende los aminoácidos 1 a 411 de la figura 1 (SEC ID No: 1). Opcionalmente, el Apo-2 se obtiene o es obtenible mediante la expresión del polipéptido codificado por la inserción de ADNc del vector depositado como ATCC 20921.

[0022] EL "dominio extracelular de Apo-2" o "ECD de Apo-2" se refiere a una forma de Apo-2 que está esencialmente libre de los dominios transmembrana y citoplásmico de Apo-2. Habitualmente, el ECD de Apo-2 tendrá menos de un 1% de dichos dominios transmembrana y/o citoplásmico y, preferiblemente, tendrá menos de un 0,5% de dichos dominios. Opcionalmente, el ECD de Apo-2 comprenderá los residuos de aminoácidos 54 a 182 de la figura 1 (SEC ID No: 1) o los residuos de aminoácidos 1 a 182 de la figura 1 (SEC ID No: 1). Opcionalmente, el ECD de Apo-2 comprenderá uno o más dominios ricos en cisteína y, preferiblemente, uno o ambos de los dominios ricos en cisteína identificados en la presente invención (véase la figura 2A). Un experto en la materia entenderá que el dominio transmembrana identificado para el polipéptido Apo-2 de la presente invención se identifica según el criterio utilizado de forma rutinaria en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio transmembrana puede variar, pero probablemente por no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio mencionado específicamente en la presente invención.

[0023] "Variante de Apo-2" significa un Apo-2 biológicamente activo tal y como se define a continuación, que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el Apo-2 que tiene la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en la figura 1 (SEC ID No: 1) para un Apo-2 humano de secuencia nativa de longitud completa o las secuencias identificadas en la presente invención para el ECD o dominio de muerte de Apo-2. Entre dichas variantes de Apo-2 se incluyen, por ejemplo, polipéptidos Apo-2 en los que se añaden, o se eliminan, uno o más residuos de aminoácidos en el extremo N- o C-terminal de la secuencia de la figura 1 (SEC ID No: 1) o las secuencias identificadas en la presente invención para el ECD o dominio de muerte de Apo-2. Normalmente, una variante de Apo-2 tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos, y aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la figura 1 (SEC ID No: 1) o las secuencias identificadas en la presente invención para el ECD o dominio de muerte de Apo-2.

[0024] El "porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de Apo-2 identificadas en la presente invención se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia de Apo-2, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software ALIGN™ o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan.

[0025] El término "etiquetado en un epítipo" cuando se utiliza en la presente invención hace referencia a un polipéptido quimérico que comprende Apo-2 o el anticuerpo Apo-2, o una secuencia de dominio del mismo, fusionado a un "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene suficientes residuos para proporcionar un epítipo contra el cual puede fabricarse un anticuerpo, aunque es suficientemente corto de manera que no interfiere con la actividad de Apo-2 o anticuerpo de Apo-2. El polipéptido etiqueta es también preferiblemente bastante único, de manera que el anticuerpo sustancialmente no reacciona de forma cruzada con otros epítipos. Los polipéptidos etiquetas adecuados generalmente tienen por lo menos seis residuos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y aproximadamente 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 residuos).

[0026] "Aislado" cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos descritos en la presente invención, significa un polipéptido que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que habitualmente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos interna o del extremo terminal N utilizando un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. Un polipéptido aislado incluye un polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, ya que por lo menos faltará un componente del entorno natural de Apo-2. No obstante, normalmente, el polipéptido aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

[0027] Una molécula de ácidos nucleicos "aislada" de Apo-2 es una molécula de ácidos nucleicos que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácidos nucleicos contaminante con la que generalmente se asocia en la fuente natural del ácido nucleico de Apo-2. Una molécula de ácidos nucleicos "aislada" de Apo-2 difiere en la forma

o el contexto en el cual se halla en la naturaleza. Las moléculas de ácidos nucleicos aisladas de Apo-2 se diferencian por lo tanto de la molécula de ácidos nucleicos de Apo-2 tal como se encuentra en células naturales. No obstante, una molécula de ácidos nucleicos aislada de Apo-2 incluye moléculas de ácidos nucleicos de Apo-2 contenidas en células que generalmente expresan ligando Apo-2 en las que, por ejemplo, la molécula de ácidos nucleicos tiene una localización cromosómica distinta de la de las células naturales.

[0028] El término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

[0029] El ácido nucleico se "une operativamente" cuando se establece una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o de una secuencia líder secretora se une operativamente al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador se une operativamente a una secuencia codificante si influye en la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma se une operativamente a una secuencia codificante si se coloca de manera que facilita la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas, y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. No obstante, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se consigue mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se utilizan adaptadores o conectores sintéticos de oligonucleótidos según la práctica convencional.

[0030] El término "anticuerpo" se utiliza en su sentido más amplio y específicamente abarca anticuerpos monoclonales anti-Apo-2 (incluidos anticuerpos agonistas, antagonistas, y bloqueadores o neutralizantes) y composiciones de anticuerpos anti-Apo-2 con especificidad poliepitópica.

[0031] El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, cada uno de los anticuerpos que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales), que habitualmente incluyen distintos anticuerpos dirigidos contra distintos determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno.

[0032] Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen anticuerpos híbridos y recombinantes producidos mediante corte y empalme de un dominio variable (incluido hipervariable) de un anticuerpo anti-Apo-2 con un dominio constante, o una cadena ligera con una cadena pesada, o una cadena de una especie con una cadena de otra especie, o fusiones con proteínas heterólogas, independientemente de la especie de origen o la designación de la clase o subclase de inmunoglobulina, así como los fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv), con tal que muestren la actividad biológica deseada. Véase, por ejemplo Patente de Estados Unidos No. 4.816.567 y Mage et al., en *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*. páginas. 79-97 (Marcel Dekker, Inc.: Nueva York, 1987).

[0033] De este modo, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo por obtenerse de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse que se requiere la producción de anticuerpos mediante ningún procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar según la presente invención pueden fabricarse mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975), o pueden fabricarse mediante procedimientos de ADN recombinante tales como los descritos en la patente de EE.UU. 4.816.567. Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de bibliotecas de fagos generadas utilizando, por ejemplo, las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990).

[0034] Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "sFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptido. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994). Entre los fragmentos de anticuerpo scFv de la presente invención se incluyen, pero no exclusivamente, los anticuerpos 16E2, 20E6 y 24C4 descritos a continuación con detalle. Dentro del alcance de los anticuerpos ScFv de la presente invención están los anticuerpos scFv que comprenden dominios V_H y V_L que incluyen una o más de las regiones CDR identificadas para los anticuerpos 16E2, 20E6 y 24C4.

[0035] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de

inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador) tal como un ratón, una rata o un conejo que presentan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de armazón ("framework region") (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana son sustituidos por los residuos no humanos correspondientes. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR importada ni en las secuencias de armazón. Estas modificaciones se realizan para refinar y optimizar el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos, de por lo menos un dominio variable, y habitualmente dos, en el cual todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana.

[0036] "Biológicamente activo" y "actividad biológica deseada" para los propósitos de la presente invención significa (1) que tiene la capacidad de modular la apoptosis (ya sea de forma agonística o estimulante o en forma antagonística o de bloqueo) *in vivo* o *ex vivo* en por lo menos un tipo de célula de mamífero; (2) que tiene la capacidad de unirse al ligando Apo-2; o (3) que tiene la capacidad de modular la señalización del ligando Apo-2 y la actividad del ligando Apo-2.

[0037] Los términos "apoptosis" y "actividad apoptótica" se utilizan en un sentido amplio y hacen referencia a la forma ordenada o controlada de muerte celular en mamíferos que habitualmente se acompaña de uno o más cambios celulares característicos, entre los que se incluyen la condensación del citoplasma, la pérdida de microvellosidades de la membrana plasmática, la segmentación del núcleo, la degradación del ADN cromosómico o pérdida de la función mitocondrial. Esta actividad puede determinarse y medirse, por ejemplo, mediante análisis de viabilidad celular, análisis FACS o electroforesis de ADN, todas ellas conocidas en la técnica.

[0038] Los términos "tratar," "tratamiento" y "terapia" tal como se utilizan en la presente se refieren a terapia curativa, terapia profiláctica y terapia preventiva.

[0039] Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la enfermedad fisiológica en mamíferos que habitualmente se caracteriza por un crecimiento celular descontrolado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, pero no exclusivamente, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Algunos ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen el carcinoma de células escamosas, el cáncer microcítico de pulmón, el cáncer no microcítico de pulmón, el blastoma, el cáncer gastrointestinal, el cáncer renal, el cáncer de páncreas, el glioblastoma, neuroblastoma, el cáncer cervical, el cáncer ovárico, el cáncer de hígado, el cáncer de estómago, el cáncer de vejiga urinaria, el hepatoma, el cáncer de mama, el cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de glándulas salivares, el cáncer de riñón, el cáncer de hígado, el cáncer de próstata, el cáncer de vulva, el cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

[0040] El término "mamífero" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a cualquier mamífero clasificado como mamífero, incluidos humanos, vacas, caballos, perros y gatos. En una realización preferida de la invención, el mamífero es un humano.

II. Composiciones y Procedimientos

[0041] La presente descripción proporciona anticuerpos Apo-2 monoclonales para utilizar en métodos de tratamiento de cáncer. En particular, los Solicitantes han identificado y aislado varios polipéptidos Apo-2 humanos. Las propiedades y características de algunos de estos polipéptidos Apo-2 y anticuerpos anti-Apo-2 se describen con mayor detalle en los siguientes Ejemplos. En base a las propiedades y características de los polipéptidos Apo-2 descritos en la presente invención, los Solicitantes creen actualmente que Apo-2 es un miembro de la familia de TNFR.

[0042] A continuación se encuentra la descripción de cómo se pueden preparar el Apo-2, así como moléculas químicas de Apo-2 y anticuerpos anti-Apo-2.

A- Preparación de Apo-2

[0043] La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de Apo-2 mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico del Apo-2. Naturalmente, está contemplado el uso de procedimientos alternativos que son bien conocidos en el estado de la técnica para preparar Apo-2.

1. Aislamiento del ADN que codifica Apo-2

[0044] El ADN que codifica Apo-2 se puede obtener a partir de cualquier biblioteca de ADNc preparada a partir de

tejido que se cree que posee el ARNm de Apo-2 y expresarlo a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN de Apo-2 humano puede obtenerse convenientemente de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejidos humanos, tales como las bibliotecas de bacteriófagos de ADNc de páncreas y riñón humano descritas en el ejemplo 1. El gen que codifica Apo-2 también se puede obtener de una biblioteca genómica o mediante síntesis de oligonucleótidos.

[0045] Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como anticuerpos para Apo-2 u oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado del ADNc o de la biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede realizar utilizando procedimientos estándar, tales como los que se describen en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica Apo-2 es utilizar la metodología PCR [Sambrook et al., *supra*; Dieffenbach et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

[0046] Un procedimiento de cribado preferido utiliza secuencias de oligonucleótidos seleccionadas para analizar bibliotecas de ADNc de diversos tejidos humanos. El ejemplo 1 que se ofrece a continuación describe técnicas para cribar una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían tener suficiente longitud y suficientemente inequívocas, de manera que se minimizan los falsos positivos. Preferiblemente, se marca el oligonucleótido de manera que se puede detectar después de la hibridación a ADN en la biblioteca sometida a cribado. Los procedimientos de marcado son bien conocidos en el estado de la técnica e incluyen el uso de marcadores radioactivos como el ATP marcado con ^{32}P , la biotinización o el marcado enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo la astringencia moderada y astringencia elevada, se describen en Sambrook et al., *supra*.

[0047] El ácido nucleico que presenta toda la secuencia codificante de la proteína se puede obtener mediante cribado de ADNc seleccionado o de bibliotecas genómicas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida descrita en la presente invención por primera vez, y, si es necesario, utilizando procedimientos convencionales de extensión del cebador como los descritos en Sambrook et al., *supra*, para detectar precursores y procesar intermedios de ARNm que es posible que no se transcrita de forma inversa en el ADNc.

[0048] Pueden prepararse variantes de Apo-2 mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en el ADN de Apo-2, o mediante síntesis del polipéptido de Apo-2 deseado. Los expertos en la materia entenderán que los cambios en aminoácidos pueden alterar procesos postraduccionales del Apo-2, tales como el cambio del número o la posición de los sitios de glicosilación o la alteración de las características de anclaje a la membrana.

[0049] Las variaciones en el Apo-2 de secuencia nativa de longitud completa o en varios dominios del Apo-2 descritos en la presente invención pueden realizarse, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas establecidas en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una delección o una inserción de uno o más codones que codifican el Apo-2 que dan lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos del Apo-2 en comparación con el Apo-2 de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es por sustitución de por lo menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios de la molécula de Apo-2. Las variaciones se pueden realizar utilizando procedimientos conocidos en el estado de la técnica, tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida de sitio), rastreo de alaninas y mutagénesis por PCR. Para producir el ADN de la variante de Apo-2 se pueden realizar sobre el ADN clonado una mutagénesis dirigida de sitio [Carter et al., *Nucl. Acids. Res.*, 13: 4331 (1986); Zoller et al., *Nucl. Acids. Res.*, 10: 6487 (1987)], mutagénesis de cassette [Wells et al., *Gene*, 34: 315 (1985)], mutagénesis de selección de restricción [Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London Ser A*, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas.

[0050] El análisis de aminoácidos por rastreo también se puede utilizar para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua que está implicada en la interacción con un ligando o receptor concretos. Entre los aminoácidos de rastreo preferidos están los aminoácidos pequeños y neutros. Entre dichos aminoácidos se incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es el aminoácido de rastreo preferido de este grupo, ya que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante. También se prefiere la alanina, ya que es el aminoácido más habitual. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones escondidas como expuestas [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman and Co., N.Y.), Chothia, J. *Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no produce cantidades adecuadas de variante, se puede utilizar un aminoácido isotérico.

[0051] Una vez se han producido las variantes de Apo-2 seleccionadas, se pueden poner en contacto con, por ejemplo, Apo-2L, y se puede determinar la interacción, si es que la hay. La interacción entre la variante de Apo-2 y Apo-2L se puede medir mediante un ensayo *in vitro*, tal como se describe en los Ejemplos siguientes. Aunque se puede utilizar cualquier cantidad de mediciones analíticas para comparar las actividades y propiedades entre un Apo-2 de secuencia nativa y una variante de Apo-2, una conveniente para la unión es la constante de disociación K_d del complejo formado entre la variante de Apo-2 y Apo-2L en comparación con la K_d para el Apo-2 de secuencia nativa. Generalmente, un aumento o descenso igual o superior a 3 veces en la K_d por residuo sustituido indica que el

residuo o residuos sustituidos son activos en la interacción del Apo-2 de secuencia nativa con el Apo-2L.

[0052] Opcionalmente, los sitios representativos en la secuencia de Apo-2 adecuada para la mutagénesis incluiría sitios en el dominio extracelular, y particularmente, en uno o ambos dominios ricos en cisteína. Dichas variaciones pueden realizarse utilizando los procedimientos descritos anteriormente.

2. Inserción de un ácido nucleico en un vector replicable

[0053] El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica Apo-2 se puede insertar en un vector replicable para su posterior clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Varios vectores se hallan disponibles públicamente. Entre los componentes del vector generalmente se incluyen, pero no exclusivamente, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de finalización de la transcripción, cada uno de los cuales se describe a continuación.

(i) El componente secuencia señal

[0054] El Apo-2 se puede producir de manera recombinante no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio específico de división en el extremo N-terminal de la proteína o el polipéptido maduros. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede formar parte del ADN de Apo-2 que se inserta en el vector. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferiblemente una que sea reconocida y procesada (es decir, dividida por una peptidasa señal) por la célula huésped. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de las líderes de fosfatasa alcalina, la penicilinas, lpp, o estables al calor de la enterotoxina II. En el caso de la secreción de levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, la líder de la invertasa de levadura, la líder del factor alfa (que incluye las líderes del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, la última descrita en la patente de Estados Unidos 5.010.182), o la líder de la fosfatasa ácida, la líder de la glucoamilasa de *C. albicans* (EP 362.179 publicada el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamífero la presecuencia nativa de Apo-2 que normalmente dirige la inserción de Apo-2 en la membrana celular de células humanas *in vivo* es satisfactoria, aunque pueden utilizarse otras secuencias señal de mamíferos para dirigir la secreción de la proteína, tal como las secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o de una especie relacionada, así como las líderes de secreción vírica, por ejemplo, la señal de la glucoproteína D del herpes simplex.

[0055] El ADN para dicha región precursora se halla preferiblemente unido en el marco de lectura al ADN que codifica Apo-2.

(ii) El componente origen de replicación

[0056] Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permiten al vector replicarse en una o más células huésped seleccionadas. Generalmente, en los vectores de clonación, esta secuencia es la que permite al vector replicarse independientemente del ADN cromosómico huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias que se replican de manera autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas para una serie de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayor parte de bacterias gramnegativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para la levadura, y varios orígenes víricos (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. Generalmente, el componente origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión en mamíferos (habitualmente puede utilizarse el origen SV40 porque contiene el promotor temprano).

[0057] La mayor parte de los vectores de expresión son vectores "lanzadera", es decir, son capaces de replicarse en por lo menos una clase de organismos pero se pueden transfectar a otro organismo para su expresión. Por ejemplo, un vector es clonado en *E. coli* y a continuación el mismo vector es transfectado a células de levaduras o mamíferos para su expresión aunque éste no sea capaz de replicarse independientemente del cromosoma de la célula huésped.

[0058] El ADN también puede amplificarse mediante la inserción en el genoma del huésped. Esto se consigue fácilmente utilizando la especie *Bacillus* como huésped, por ejemplo, incluyendo en el vector una secuencia de ADN que es complementaria a una secuencia hallada en el ADN genómico de *Bacillus*. La transfección de *Bacillus* con este vector da lugar a una recombinación homóloga con el genoma y la inserción del ADN de Apo-2. No obstante, la recuperación del ADN genómico que codifica Apo-2 es más compleja que la de un vector replicado de manera exógena porque se requiere la digestión con enzimas de restricción para escindir el ADN de Apo-2.

(iii) El componente gen de selección

[0059] Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un gen de selección, también denominado

marcador seleccionable. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de células huésped transformadas en un medio de cultivo selectivo. Las células huésped no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección habituales codifican proteínas que: (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina; (b) complementan deficiencias auxotróficas; o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles en los medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

[0060] Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que son transformadas satisfactoriamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y, de este modo, sobrevive al régimen de selección. Algunos ejemplos de dicha selección dominante utilizan los fármacos neomicina [Southern et al., J. Molec. Appl. Genet., 1: 327 (1982)], ácido micofenólico (Mulligan et al., Science, 209: 1.422 (1980)) o higromicina [Sugden et al., Mol. Cell. Biol., 5: 410-413 (1985)]. Los tres ejemplos anteriores utilizan genes bacterianos bajo control eucariota para transferir resistencia a los fármacos apropiados G.418 o neomicina (geneticina), xgpt (ácido micofenólico), o higromicina, respectivamente.

[0061] Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para incorporar el ácido nucleico de Apo-2, tal como DHFR o timidina quinasa. Los transformantes celulares de mamífero se colocan bajo condiciones de presión de selección a las que sólo los transformantes están adaptados para sobrevivir por haber incorporado el marcador. La presión de selección viene impuesta por el cultivo de los transformantes en condiciones en las que se modifica sucesivamente la concentración del agente de selección en el medio, conduciendo de este modo a la amplificación tanto del gen de selección como del ADN que codifica Apo-2. La amplificación es el proceso mediante el cual los genes con mayor demanda para la producción de una proteína crítica para el crecimiento son repetidos en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. A partir del ADN amplificado se sintetizan cantidades mayores de Apo-2. Otros ejemplos de genes amplificables son la metalotioneína I y II, la adenosina desaminasa y la ornitina descarboxilasa.

[0062] Las células transformadas con el gen de selección de DHFR se pueden identificar en primer lugar mediante el cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo del DHFR. Una célula huésped adecuada cuando se utiliza DHFR natural es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO), que carece de actividad DHFR, preparada y propagada tal como describen Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4.216 (1980). Las células transformadas son expuestas a continuación a mayores niveles de metotrexato. Esto conduce a la síntesis de múltiples copias del gen de DHFR, y, concomitantemente, a múltiples copias de otro ADN que comprende los vectores de expresión, tales como el ADN que codifica Apo-2. Esta técnica de amplificación puede utilizarse con cualquier otro huésped adecuado, por ejemplo, ATCC N.º CCL61 CHO-K1, a pesar de la presencia de DHFR endógena si, por ejemplo, se utiliza un gen de DHFR mutante que es muy resistente a Mtx (EP 117.060).

[0063] Alternativamente, las células huésped (en particular los huéspedes naturales que contienen DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican Apo-2, la proteína DHFR natural y otro marcador seleccionable, tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH), pueden seleccionarse mediante cultivo celular en un medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo kanamicina, neomicina, o G418. Véase patente de Estados Unidos 4.965.199.

[0064] Un gen de selección adecuado para utilizar en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 [Stinchcomb et al., Nature, 282: 39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7: 141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10: 157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N.º 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85: 12 (1977)]. La presencia de la alteración en *trp1* en el genoma de la célula huésped de la levadura proporciona entonces un entorno efectivo para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. De un modo parecido, las cepas de levadura deficientes en Leu2 (ATCC 20.622 o 38.626) son complementadas por plásmidos conocidos portadores del gen Leu2.

[0065] Además, pueden utilizarse vectores derivados del plásmido circular pKD1 de 1,6 µm para la transformación de levaduras de *Kluyveromyces*.

[0066] [Bianchi et al., Curr. Genet., 12: 185 (1987)]. Más recientemente, se ha descrito un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternera recombinante para *K. lactis* [Van den Berg, Bio/Technology, 8: 135 (1990)]. También se han descrito múltiples copias estables de vectores de expresión para la secreción de albúmina sérica humana madura recombinante por cepas industriales de *Kluyveromyces* [Fleer et al., Bio/Technology, 9: 968-975 (1991)].

(iv) El componente promotor

[0067] Los vectores de expresión y clonación normalmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y se halla unido operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos de Apo-2. Los promotores

son secuencias sin traducir que se localizan en dirección 5' con respecto al codón de inicio de un gen estructural (generalmente en el intervalo de aproximadamente 100 a 1.000 pb) que controlan la transcripción y traducción de una secuencia de ácidos nucleicos concreta, tal como la secuencia de ácidos nucleicos de Apo-2, a la que están unidos operativamente. Dichos promotores habitualmente se clasifican en dos clases: inducibles y constitutivos. Los promotores inducibles son promotores que inician un mayor nivel de transcripción del ADN bajo su control como respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. Actualmente se conocen un gran número de promotores reconocidos por una serie de células huésped potenciales. Estos promotores se hallan unidos operativamente a ADN que codifica Apo-2 eliminando el promotor de la fuente de ADN mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia aislada del promotor en el vector. Para dirigir la amplificación y/o expresión del ADN de Apo-2 puede utilizarse tanto la secuencia nativa del promotor de Apo-2 como muchos de los promotores heterólogos.

[0068] Entre los promotores adecuados para utilizar con huéspedes procariotas se incluyen los sistemas promotores de la β -lactamasa y la lactosa [Chang et al., *Nature*, 275: 615 (1978); Goeddel et al., *Nature*, 281: 544 (1979)], la fosfatasa alcalina, un sistema promotor del triptófano (trp) [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8: 4.057 (1980); EP 36.776] y promotores híbridos tales como el promotor tac [deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 21-25 (1983)]. No obstante, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Sus secuencias de nucleótidos han sido publicadas, lo que permite a un trabajador competente unirlos operativamente al ADN que codifica Apo-2 [Siebenlist et al., *Cell*, 20: 269 (1980)] utilizando conectores o adaptadores para proporcionar cualquier sitio de restricción requerido. Los promotores para utilizar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica Apo-2.

[0069] Las secuencias promotoras son conocidas para eucariotas. Casi todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente entre 25 y 30 bases en dirección 5' desde el inicio de la transcripción. Otra secuencia hallada entre 70 y 80 bases en dirección 5' desde el inicio de la transcripción de muchos genes es una región CXCAAT donde X puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayor parte de genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para añadir la cola poli A en el extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en los vectores de expresión eucariotas.

[0070] Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para utilizar con huéspedes de levaduras se incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, 255: 2073 (1980)] u otras enzimas glucolíticas [Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7: 149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17: 4.900 (1978)], tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucoisomerasa y glucoquinasa.

[0071] Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de que la transcripción se controla mediante las condiciones del cultivo, son las regiones promotoras del alcohol deshidrogenasa 2, el isocitocromo C, las enzimas degradadoras de la fosfatasa ácida asociadas con el metabolismo del nitrógeno, la metalotioneína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y las enzimas responsables del uso de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para utilizar en la expresión de levaduras se describen adicionalmente en EP 73.657. Los potenciadores de levaduras también se utilizan ventajosamente con promotores de levaduras.

[0072] La transcripción de Apo-2 a partir de vectores en células huésped de mamíferos se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos a partir de genomas de virus, tales como el virus del poliovirus, el virus de la viruela aviar (patente del Reino Unido 2.211.504, publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tales como adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y más preferiblemente el virus de los simios 40 (SV40), a partir de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulinas, a partir de promotores del choque térmico y a partir del promotor normalmente asociado con la secuencia de Apo-2, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

[0073] Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico de SV40 [Fiers et al., *Nature*, 273: 113 (1978); Mulligan y Berg, *Science*, 209: 1.422-1.427 (1980); Pavlakis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 7.399-7.402 (1981)]. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E [Greenaway et al., *Gene*, 18: 355-360 (1982)]. En la patente de Estados Unidos 4.419.446 se describe un sistema para expresar ADN en huéspedes mamíferos que utiliza el virus del papiloma bovino como vector. Una modificación de este sistema se describe en la patente de Estados Unidos 4.601.978 [véase también Gray et al., *Nature*, 295: 503-508 (1982) relativa a la expresión de ADNc que codifica el interferón inmunitario en células de mono; Reyes et al., *Nature*, 297: 598-601 (1982) relativa a la expresión de ADNc de interferón β humano en células de ratón bajo el control de un promotor de la timidina quinasa del virus del herpes simplex; Canaani y Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 5.166-5.170 (1982) relativa a la expresión del gen del interferón humano en células cultivadas de ratón y de conejo; y Gorman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 6.777-6.781 (1982) relativa a la expresión de secuencias bacterianas CAT en células renales de mono CV-1, fibroblastos

de embrión de pollo, células ováricas de hámster chino, células HeLa y células de ratón NIH-3T3 que utilizan como promotor la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous].

(v) El componente elemento potenciador

[0074] La transcripción de un ADN que codifica Apo-2 por eucariotas superiores puede aumentarse mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN de acción cis, habitualmente de aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Los potenciadores tienen una orientación y posición relativamente independientes, habiéndose hallado en posición 5' [Laimins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 993 (1981)] y 3' [Lusky et al., Mol. Cell Bio., 3: 1.108 (1983)] con respecto a la unidad de transcripción, dentro de un intrón [Banerji et al., Cell, 33: 729 (1983)], así como dentro de la propia secuencia codificante [Osborne et al., Mol. Cell Bio., 4: 1.293 (1984)]. Actualmente se conocen muchas secuencias potenciadoras de

[0075] genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Habitualmente, no obstante, se utilizará un potenciador de un virus de una célula eucariota. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador SV40 en el extremo tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del poliovirus en el extremo tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature, 297: 17-18 (1982) sobre potenciación de elementos para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede empalmarse en el vector en la posición 5' o 3' con respecto a la secuencia que codifica Apo-2, pero se localiza preferiblemente en el sitio 5' del promotor.

(vi) El componente finalización de la transcripción

[0076] Los vectores de expresión utilizados en células huésped eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán las secuencias necesarias para la finalización de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias se hallan habitualmente disponibles en las regiones sin traducir 5' y, ocasionalmente 3', de ADNs o ADNcs eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte sin traducir del ARNm que codifica Apo-2.

(vii) Construcción y análisis de vectores

[0077] La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes mencionados anteriormente utiliza técnicas de ligación estándar. Para generar los plásmidos necesarios los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se dividen, se adaptan y se vuelven a unir en la forma deseada.

[0078] Para el análisis de confirmación de las secuencias correctas en plásmidos construidos, pueden utilizarse mezclas de unión para transformar la cepa 294 de *E. coli* K12 (ATCC 31.446) y los transformantes satisfactorios seleccionados por la resistencia a ampicilina o tetraciclina si es adecuado. Los plásmidos de los transformantes se preparan, se analizan mediante digestión con una endonucleasa de restricción y/o se secuencian mediante el procedimiento de Messing et al., Nucleic Acids Res., 9: 309 (1981) o mediante el procedimiento de Maxam et al., Methods in Enzymology, 65: 499 (1980).

(viii) Vectores de expresión transitoria

[0079] Pueden emplearse vectores de expresión que proporcionan la expresión transitoria en células de ADN de mamíferos que codifican Apo-2. En general, la expresión transitoria implica el uso de un vector de expresión que es capaz de replicarse de manera eficaz en una célula huésped, de manera que la célula huésped acumula muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetiza una concentración elevada de un polipéptido deseado codificado por el vector de expresión [Sambrook et al., *supra*]. Los sistemas de expresión transitoria, que comprenden un vector de expresión y una célula huésped adecuada, permiten la identificación positiva conveniente de polipéptidos codificados por ADNs clonados, así como el cribado rápido de dichos polipéptidos para las propiedades biológicas o fisiológicas deseadas. De este modo, los sistemas de expresión transitoria son particularmente útiles para los propósitos de identificar variantes de Apo-2.

(ix) Ejemplos de vectores celulares vertebrados adecuados

[0080] Otros procedimientos, vectores y células huésped adecuados para su adaptación a la síntesis de Apo-2 en un cultivo de células recombinantes de vertebrados se describen en Gething et al., Nature, 293: 620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281: 40-46 (1979); EP 117.060 y EP 117.058.

3. Selección y transformación de células huésped

[0081] Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención son las células de procariotas, las levaduras, o las células de eucariotas superiores descritas

anteriormente. Entre los procariotas adecuados para este propósito se incluyen, pero no exclusivamente, eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, enterobacterias tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266.710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Preferiblemente, la célula huésped debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas.

[0082] Además de procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican Apo-2. Entre los microorganismos huésped eucariotas inferiores, *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común, es el que se utiliza más habitualmente. No obstante, para la presente invención son útiles y están disponibles un conjunto de otros géneros, especies y cepas.

[0083] Las células huésped adecuadas para la expresión de Apo-2 glicosilado derivan de organismos multicelulares. Dichas células huésped son capaces de procesados complejos y actividades de glicosilación. En principio, cualquier cultivo celular de eucariotas superiores sirve, independientemente de si procede de un cultivo de vertebrados o de invertebrados. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas y variedades de baculovirus y las correspondientes células huésped de insecto facultativas de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca del vinagre) y *Bombyx mori* [véase, por ejemplo, Luckow et al., Bio/Technology, 6: 47-55 (1988); Miller et al., en: Genetic Engineering, Setlow et al., eds., Vol. 8 (Plenum Publishing, 1986), págs. 277-279; y Maeda et al., Nature, 315: 592-594 (1985)]. Están disponibles públicamente una serie de cepas víricas para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de un NPV de *Autographa californica* y cepa Bm-5 de un NPV de *Bombyx mori*.

[0084] Los cultivos celulares vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco pueden utilizarse como huéspedes. Habitualmente, las células vegetales se transfectan mediante incubación con determinadas cepas de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Durante la incubación del cultivo celular vegetal con *A. tumefaciens*, se puede transferir el ADN que codifica Apo-2 a la célula vegetal huésped, de manera que se transfecta, y, en las condiciones apropiadas, expresará el ADN que codifica Apo-2. Además, están disponibles secuencias reguladoras y señal compatibles con células vegetales, tales como el promotor de la nopalina sintetasa y las secuencias señal de poliadenilación [Depicker et al., J. Mol. Appl. Gen., 1: 561 (1982)]. Además, los segmentos de ADN aislados de la región en dirección 5' del gen ADN-T 780 son capaces de activar o aumentar el nivel de transcripción de los genes expresables en vegetales en el tejido vegetal que contiene el ADN recombinante [EP 321.196 publicada el 21 de junio de 1989].

[0085] La propagación de células de vertebrados en un cultivo (cultivo tisular) también es bien conocida en el estado de la técnica [véase, por ejemplo, Tissue Culture. Academic Press, Kruse y Patterson, editores (1973)]. Entre los ejemplos de líneas de células huésped de mamíferos útiles se incluyen una línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); una línea de riñón embrionario humano (células 293 o células 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen Virol., 36: 59 (1977)); células renales de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células ováricas de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4.216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251 (1980)); células renales de mono (CV1 ATCC CCL 70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; y células FS4.

[0086] Las células huésped son transfectadas y preferiblemente transformadas con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de Apo-2 y cultivadas en medios de nutrientes convencionales modificados, según sea apropiado, para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

[0087] La transfección hace referencia a la captación de un vector de expresión por una célula huésped independientemente de que se exprese cualquier secuencia codificante. El experto en la materia conoce numerosos procedimientos de transfección, por ejemplo, CaPO_4 y electroporación. Generalmente se sabe que la transfección es satisfactoria cuando cualquier indicación de la actividad de este vector tiene lugar dentro de la célula huésped.

[0088] Transformación significa introducir ADN en un organismo, de manera que el ADN es replicable, bien como elemento extracromosómico o como integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que utiliza cloruro de calcio, tal como se describe en Sambrook et al., *supra*, o electroporación se utiliza generalmente para células procariotas u otras células que contienen sustanciales barreras en la pared celular. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de determinadas células vegetales, tal como se describe en Shaw et al., Gene, 23: 315 (1983) y en el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Además,

las plantas pueden ser transfectadas utilizando un tratamiento de ultrasonidos tal como se describe en el documento WO 91/00358 publicado el 10 de junio de 1991.

[0089] En el caso de las células de mamífero sin dichas paredes celulares, se prefiere el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978). Los aspectos generales de la transformación de un sistema de células huésped de mamífero se han descrito en la patente de Estados Unidos 4.399.216. Las transformaciones en levaduras se realizan habitualmente según el procedimiento de Van Solingen et al., *J. Bact.*, 130: 946 (1977) y Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3.829 (1979). No obstante, para introducir ADN a células, también pueden utilizarse otros procedimientos tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policones, por ejemplo, polibreno, polioritina. Para diversas técnicas de transformación de células de mamífero, véase Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 (1990) y Mansour et al., *Nature*, 336: 348-352 (1988).

4. Cultivo de las células huésped

[0090] Las células procariotas utilizadas para producir Apo-2 se pueden cultivar en medios adecuados tal como se describe en general en Sambrook et al., *supra*.

[0091] Las células huésped de mamífero utilizadas para producir Apo-2 se pueden cultivar en una serie de medios. Entre los ejemplos de medios comercialmente disponibles se incluyen medio F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ("MEM", Sigma), medio RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ("DMEM", Sigma). Cualquiera de dichos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tal como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco Gentamicina), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos que están habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo de micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas para los expertos en la materia. Las condiciones del cultivo, tales como la temperatura, el pH, y similares, son las utilizadas anteriormente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el técnico en la materia.

[0092] En general, los principios, los protocolos y las técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares de mamíferos pueden hallarse en *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991).

[0093] Las células huésped a las que hace referencia en esta descripción comprenden las células del cultivo, así como las células que están dentro de un animal huésped.

5. Detección de la amplificación/expresión génica

[0094] La amplificación y/o expresión génicas pueden medirse en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5.201-5.205 (1980)], transferencia en mancha (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, en base a las secuencias proporcionadas en la presente invención. Se pueden utilizar varios marcadores, con mayor frecuencia radioisótopos y en particular ³²P. No obstante, también se pueden emplear otras técnicas, tales como la utilización de nucleótidos modificados con biotina para introducirlos en un polinucleótido. A continuación, la biotina actúa como el sitio de unión a la avidina o a anticuerpos, que pueden estar marcados con una amplia variedad de marcadores, tales como radionucleótidos, fluorescentes o enzimas. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer dobles cadenas específicas, incluyendo dobles cadenas de ADN, dobles cadenas de ARN, y dobles cadenas híbridas de ARN-ADN o dobles cadenas de proteína-ADN. A su vez, los anticuerpos pueden estar marcados y el ensayo puede llevarse a cabo en el lugar donde la doble cadena está unida a la superficie, de manera que tras la formación de la doble cadena en la superficie, puede detectarse la presencia de anticuerpo unido a la doble cadena.

[0095] Alternativamente, la expresión génica puede medirse mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones tisulares y el ensayo de cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión de un producto génico. Con técnicas de tinción inmunohistoquímica, se prepara una muestra celular, habitualmente mediante deshidratación y fijación, seguido de reacción con anticuerpos marcados específicos para el producto génico acoplado, en la que los marcadores suelen ser visualmente detectables, tales como marcadores enzimáticos, marcadores fluorescentes o marcadores luminescentes.

[0096] Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el análisis de fluidos de la muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido Apo-2 de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente invención o contra una secuencia exógena fusionada al ADN de Apo-2 y que codifica un epítipo de anticuerpo específico.

6. Purificación de polipéptido Apo-2

[0097] Se pueden recuperar formas de Apo-2 del medio de cultivo o de lisados de células huésped. Si el Apo-2 está unido a la membrana, puede liberarse de la membrana utilizando una solución detergente adecuada (por ejemplo Triton-X 100) o puede liberarse su región extracelular mediante división enzimática.

[0098] Cuando el Apo-2 es producido en una célula recombinante distinta de una célula de origen humano, el Apo-2 carece de proteínas o polipéptidos de origen humano. No obstante, puede desearse purificar Apo-2 de proteínas o polipéptidos celulares recombinantes para obtener preparados que son sustancialmente homogéneos en relación a Apo-2. En una primera etapa, el medio de cultivo o lisado puede centrifugarse para eliminar residuos de partículas celulares. A continuación, se purifica el Apo-2 de proteínas y polipéptidos solubles contaminantes, y los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatofocalización; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; y columnas Sefarosa de proteína A para eliminar contaminantes tales como IgG.

[0099] Las variantes de Apo-2 en las que se han eliminado, insertado o sustituido residuos, se pueden recuperar del mismo modo que el Apo-2 de secuencia nativa, teniendo en cuenta los cambios en las propiedades ocasionados por la variación. Por ejemplo, la preparación de una fusión de Apo-2 con otra proteína o polipéptido, por ejemplo, un antígeno bacteriano o vírico, secuencia de inmunoglobulina, o secuencia del receptor, puede facilitar la purificación; puede utilizarse una columna de inmovinoafinidad que contiene anticuerpo para la secuencia para adsorber el polipéptido de fusión. También se pueden utilizar otros tipos de matrices de afinidad.

[0100] Un inhibidor de la proteasa tal como el fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF) también puede ser útil para inhibir la degradación proteolítica durante la purificación, y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes fortuitos. Un experto en la materia entenderá que los procedimientos de purificación adecuados para Apo-2 de secuencia nativa pueden requerir modificaciones para tener en cuenta cambios en el carácter de Apo-2 o en sus variedades después de la expresión en cultivo celular recombinante.

7. Modificaciones covalentes de polipéptidos Apo-2

[0101] Son posibles modificaciones covalentes de Apo-2.

[0102] Un tipo de modificación covalente del Apo-2 se introduce en la molécula haciendo reaccionar residuos de aminoácidos marcados del Apo-2 con un agente orgánico de derivatización que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los residuos terminales N o C del Apo-2.

[0103] La derivatización con agentes bifuncionales es útil para reticular Apo-2 con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua que se utilizará en el procedimiento de purificación de anticuerpos anti-Apo-2, y viceversa. La derivatización con uno o más agentes bifuncionales también será útil para reticular moléculas de Apo-2 para generar dímeros de Apo-2. Dichos dímeros pueden aumentar la avidez de unión y extender la vida media de la molécula *in vivo*. Entre los agentes de reticulación utilizados habitualmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azido salicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluidos disuccinimidil ésteres tales como 3,3'-ditiobis (succinimidilpropionato) y maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Agentes de derivatización tales como metil-3-[(p-acidofenil)ditio]propioimidato producen intermedios fotoactivables que son capaces de formar retículas en presencia de luz. Alternativamente, para inmovilizar las proteínas se utilizan matrices reactivas insolubles en agua tales como carbohidratos activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes de Estados Unidos 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537, y 4.330.440.

[0104] Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos de glutaminilo y asparaginilo a los residuos correspondientes de glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, la metilación de los grupos α -amino de cadenas laterales de lisina, arginina, e histidina [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, págs. 79-86 (1983)], la acetilación de la amina del extremo N-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxílico del extremo C-terminal.

[0105] Otro tipo de modificación covalente del polipéptido Apo-2 comprende alterar el patrón nativo de glicosilación del polipéptido. Para los propósitos de la presente invención, "alterar el patrón de glicosilación nativo" significa eliminar una o más grupos carbohidrato hallados en Apo-2 de secuencia nativa y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el Apo-2 de secuencia nativa.

[0106] La glicosilación de polipéptidos se realiza habitualmente mediante unión a N o a O. Unión a N se refiere a la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias

de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un potencial sitio de glicosilación. La glicosilación mediante unión a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un ácido hidroxilamino, más habitualmente serina o treonina, aunque también puede utilizarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

[0107] La adición de sitios de glicosilación al polipéptido Apo-2 puede llevarse a cabo alterando la secuencia de aminoácidos de tal modo que contenga uno o más de las secuencias de tripéptido mencionadas anteriormente (para sitios de glicosilación mediante unión a N). La alteración también puede hacerse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en el Apo-2 de secuencia nativa (para sitios de glicosilación mediante unión a O). La secuencia de aminoácidos de Apo-2 puede alterarse opcionalmente a través de cambios a nivel del ADN, en particular produciendo mutaciones en el ADN que codifica el polipéptido Apo-2 en bases preseleccionadas, de manera que generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados. La mutación de mutaciones de ADN se pueden realizar utilizando los procedimientos descritos anteriormente y en la patente de EE.UU. US 5.364.934, *supra*.

[0108] Otra forma de aumentar el número de grupos carbohidrato en el polipéptido Apo-2 es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido. Dependiendo de la modalidad de acoplamiento utilizada, el azúcar o azúcares pueden unirse a: (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrido libres tales como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de la serina, treonina, o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de la fenilalanina, la tirosina, o el triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos procedimientos se describen en el documento WO 87/05330, publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306 (1981).

[0109] La eliminación de los grupos carbohidrato presentes en el polipéptido Apo-2 puede llevarse a cabo química o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones que codifican para los residuos de aminoácidos que actúan como dianas para la glicosilación. Por ejemplo, la desglicosilación química mediante exposición del polipéptido al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o a un compuesto equivalente, puede dar lugar a la división de la mayor parte o de todos los azúcares excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras el polipéptido permanece intacto. La desglicosilación química está descrita por Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987) y por Edge et al., Anal. Biochem., 118: 131 (1981). La división enzimática de los grupos carbohidrato en polipéptidos puede conseguirse mediante el uso de una variedad de endo y exoglucosidasas tal como describen Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138: 350 (1987).

[0110] La glicosilación en potenciales sitios de glicosilación puede prevenirse utilizando el compuesto tunicamicina tal como describen Duskin et al., J. Biol. Chem., 257: 3.105 (1982). La tunicamicina bloquea la formación de uniones proteína-N-glucósido.

[0111] Otro tipo de modificación covalente de Apo-2 comprende unir el polipéptido Apo-2 a uno de una serie de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, o polioxialquilenos, de la manera establecida anteriormente, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192, o 4.179.337.

8. Quimeras de Apo-2

[0112] Las quimeras de Apo-2 comprenden una fusión de una secuencia de Apo-2 con otra secuencia polipeptídica o aminoácida heteróloga.

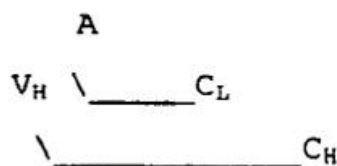
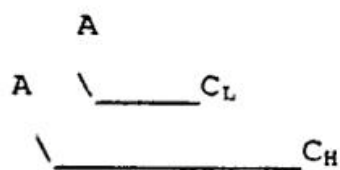
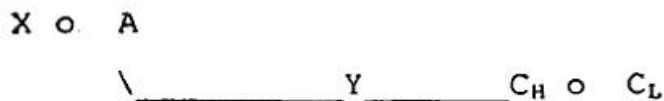
[0113] En un ejemplo, la molécula quimérica comprende una fusión del Apo-2 con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al cual puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. El epítipo etiqueta generalmente se coloca en el extremo amino o carboxilo del Apo-2. La presencia de dichas formas etiquetadas en el epítipo del Apo-2 pueden detectarse utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la provisión del epítipo etiqueta permite purificar fácilmente el Apo-2 mediante purificación de afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se una al epítipo etiqueta.

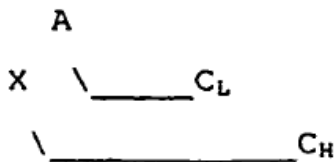
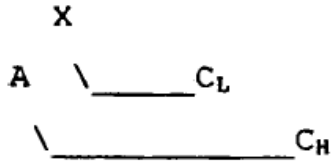
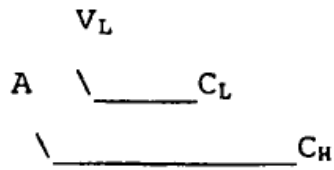
[0114] Varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos son bien conocidos en el estado de la técnica. Entre los ejemplos se incluyen el polipéptido etiqueta de la gripe HA y su anticuerpo 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8: 2.159-2.165 (1988)]; la etiqueta c-myc y sus anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5: 3.610-3.616 (1985)]; y la etiqueta de la glucoproteína D (gD) del virus del herpes simplex y su anticuerpo [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6): 547-553 (1990)]. Otros polipéptidos etiqueta incluyen el péptido Flag [Hopp et al., BioTechnology, 6: 1.204-1.210 (1988)]; el péptido epítipo KT3 [Martin et al., Science, 255: 192-194 (1992)]; un péptido epítipo de la α -tubulina [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266: 15.163-15.166 (1991)], y la etiqueta del péptido proteínico del gen 10 del T7 [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6.393-6.397 (1990)]. Una vez se ha seleccionado el polipéptido etiqueta, puede generarse su anticuerpo utilizando las técnicas descritas en la presente invención.

[0115] Generalmente, el Apo-2 etiquetado en el epítipo puede construirse y producirse según los procedimientos descritos anteriormente. El Apo-2 etiquetado en el epítipo también se describe en los Ejemplos siguientes. Las fusiones polipéptido *etiqueta*-Apo-2 se construyen preferiblemente mediante la fusión de la secuencia de ADNc que codifica la parte de Apo-2 en marco con la secuencia de ADN del polipéptido *etiqueta* y la expresión de la construcción de la fusión de ADN resultante en células huésped apropiadas. Normalmente, cuando se preparan las quimeras polipéptido *etiqueta*-Apo-2, el ácido nucleico que codifica el Apo-2 se fusionará en su extremo 3' con el ácido nucleico que codifica el extremo N-terminal del polipéptido *etiqueta*; no obstante, las fusiones 5' también son posibles. Por ejemplo, una secuencia de polihistidina de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 residuos de histidina se pueden fusionar al extremo N-terminal o C-terminal y se pueden utilizar como una agarre en la purificación en cromatografía de afinidad.

[0116] El Apo-2 etiquetado en el epítipo puede purificarse mediante cromatografía de afinidad utilizando el anticuerpo anti-etiqueta. La matriz a la cual se une el anticuerpo de afinidad puede incluir, por ejemplo, agarosa, cristal de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno). A continuación, el Apo-2 etiquetado en el epítipo puede eluirse de la columna de afinidad utilizando técnicas conocidas en el estado de la técnica.

[0117] En otra realización, la molécula quimérica comprende un polipéptido Apo-2 fusionado a una secuencia de inmunoglobulina. La molécula quimérica también puede comprender una secuencia de dominio particular de Apo-2, tal como una secuencia de dominio extracelular de Apo-2, fusionada a una secuencia de inmunoglobulina. Esto incluye quimeras en formas monoméricas, homo- o heteromultiméricas, y particularmente, homo- O heterodiméricas, o tetraméricas; opcionalmente, las quimeras pueden estar en formas diméricas o formas de cadena pesada homodiméricas. Generalmente, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán unidades estructurales conocidas tal y como se representan mediante los siguientes diagramas.





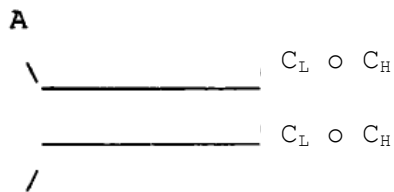
[0118] Una unidad estructural básica de cuatro cadenas está en la forma en que IgG, IgD e IgE existen. Una unidad de cuatro cadenas se repite en las inmunoglobulinas de peso molecular más elevado; IgM existe generalmente como un pentámero de unidades básicas de cuatro cadenas mantenidas unidas mediante puentes disulfuro. La globulina IgA, y ocasionalmente la globulina IgG, también pueden existir en el suero en una forma multimérica. En el caso de multímeros, cada unidad de cuatro cadenas puede ser la misma o diferente.

[0119] Los siguientes diagramas representan algunos ejemplos de estructuras de monómeros, homo- y heterodímeros y homo- y heteromultímeros. Estos diagramas son meramente ilustrativos y las cadenas de los multímeros se cree que están unidos por puentes disulfuro de la misma manera que las inmunoglobulinas nativas.

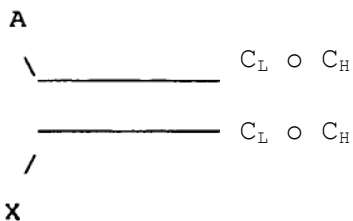
Monómero:



Homodímero:



Heterodímero:



cadena ligera pueden tener como origen la misma o diferente inmunoglobulina. Se pueden utilizar todas las posibles permutaciones de las estructuras ilustradas y similares.

[0122] En general, las moléculas quiméricas se pueden construir de una forma similar a los anticuerpos quiméricos donde un dominio variable de un anticuerpo de una especie se sustituye por el dominio variable de otra especie. Véase, por ejemplo EP 0125023; EP 173,494; Munro, Nature, 312: 597 (13 de diciembre de 1984); Neuberger et al., Nature, 312: 604-608 (13 de diciembre de 1984); Sharon et al., Nature, 309: 364-367 (24 de mayo de 1984); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984); Morrison et al., Science, 229: 1202-1207 (1985); Boulianne et al., Nature, 312: 643-646 (13 de diciembre de 1984); Capon et al., Nature, 337: 525-531 (1989); Traunecker et al., Nature, 339: 68-70 (1989).

[0123] alternativamente, las moléculas quiméricas se pueden construir de la siguiente manera. El ADN que incluye una región que codifica la secuencia deseada, tal como una secuencia de Apo-2 y/o TNFR, se divide mediante un enzima de restricción en el extremo 3' o próximo al mismo del ADN que codifica el dominio o dominios de tipo inmunoglobulina y en un punto en el ADN o próximo al mismo que codifica el extremo N-terminal del polipéptido Apo-2 o TNFR (donde se contempla el uso de una secuencia líder diferente) en la región codificante del extremo N-terminal para TNFR o próximo a la misma (donde se utiliza la señal nativa). A continuación, este fragmento de ADN se inserta fácilmente de forma proximal al ADN que codifica una región constante de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina y, si es necesario, la construcción resultante se adapta mediante mutagénesis de delección. Preferiblemente, la Ig es una inmunoglobulina humana cuando la molécula quimérica se pretende utilizar para una terapia *in vivo* para humanos. El ADN que codifica las regiones constantes de cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas es conocido o está fácilmente disponible a partir de bibliotecas de ADNc o se sintetiza. Véase, por ejemplo, Adams et al., Biochemistry, 19: 2711-2719 (1980); Gough et al., Biochemistry, 19: 2702-2710 (1980); Dolby et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 6027-6031 (1980); Rice et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 79: 7862-7865 (1982); Falkner et al., Nature, 298: 286-288 (1982); y Morrison et al., Ann. Rev. Immunol., 2: 239-256 (1984).

[0124] En las publicaciones que se refieren a la preparación de inmunoadhesinas se encuentran más detalles de cómo preparar dichas fusiones. Las inmunoadhesinas, en general, y las moléculas de fusión CD4-Ig específicamente se describen en el documento WO 89/02922, publicado el 6 de abril de 1989. Las moléculas que comprenden la parte extracelular de CD4, el receptor para el virus de inmunodeficiencia humano (VIH) unido a una región constante de cadena pesada de IgG, son conocidas en el estado de la técnica y se ha observado que tienen una vida media notablemente más larga y un menor aclaramiento que la parte extracelular soluble de CD4 [[Capon et al., supra; Byrn et al., Nature, 344: 667 (1990)]. La construcción de moléculas quiméricas específicas TNFR-IgG también se describe en Ashkenazi et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 10535-10539 (1991); Lesslauer et al. [J. Cell. Biochem. Supplement 15F, 1991, página 115 (P 432)]; y Peppel y Beutler, J. Cell. Biochem. Suplemento 15F, 1991, página 118 (P 439)].

B. Usos terapéuticos y no terapéuticos para Apo-2

[0125] El Apo-2, tal como se describe en la presente memoria, se puede utilizar terapéuticamente para inducir la apoptosis en células de mamífero. Esta terapia puede realizarse, por ejemplo, utilizando técnicas de terapia génica *in vivo* o *ex vivo* e incluye la utilización de las secuencias de dominio de muerte descritas en la presente invención. Las moléculas quiméricas de Apo-2 (incluyendo las moléculas quiméricas que contienen una secuencia de dominio extracelular de Apo-2) que comprenden secuencias de inmunoglobulina también se pueden utilizar terapéuticamente para inhibir la apoptosis o inducción de NF- κ B por Apo-2L o por otro ligando al que se une Apo-2.

[0126] El Apo-2 también es útil en aplicaciones no terapéuticas. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el Apo-2 pueden utilizarse como diagnóstico para la tipificación específica de tejido. Por ejemplo, pueden utilizarse procedimientos tales como la hibridación *in situ*, la transferencia Northern y Southern, y el análisis por PCR para determinar si el ADN y/o el ARN que codifica el Apo-2 está presente en el tipo o tipos celular que se evalúan. El ácido nucleico de Apo-2 también será útil para la preparación de Apo-2 mediante técnicas recombinantes descritas en la presente invención.

[0127] El Apo-2 aislado puede utilizarse en ensayos de diagnóstico cuantitativo como control frente al cual se pueden preparar muestras que contengan cantidades desconocidas de Apo-2. Los preparados de Apo-2 también son útiles para generar anticuerpos como referencias en ensayos de Apo-2 (por ejemplo, marcando el Apo-2 para utilizarlo como referencia en un radioinmunoensayo, un ensayo con radioreceptor, o inmunoensayo unido a enzima), en técnicas de purificación por afinidad, y en ensayos de unión al receptor de tipo competitivo cuando se ha marcado, por ejemplo, con yodo radioactivo, enzimas, o fluoróforos.

[0128] Las formas modificadas del Apo-2, tales como las moléculas quiméricas Apo-2-IgG (inmunoadhesinas) descritas anteriormente, se pueden utilizar como inmunógenos en la producción de anticuerpos anti-Apo-2.

[0129] Los ácidos nucleicos que codifican Apo-2 o sus formas modificadas también se pueden utilizar para generar animales transgénicos o animales "*knock out*" que, a su vez, son útiles en el desarrollo y el cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal que tiene células que

contienen un transgén, el cual fue introducido en el animal o en un ancestro del animal en una etapa prenatal, por ejemplo, en una etapa embrionaria. Un transgén es un ADN que se halla integrado en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico. En una realización, el ADNc que codifica Apo-2 o una secuencia apropiada del mismo (tal como Apo-2-IgG) se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifica Apo-2 según las técnicas establecidas y usar las secuencias genómicas para generar animales transgénicos que contengan células que expresen ADN que codifica Apo-2. Los procedimientos para generar animales transgénicos, en particular animales tales como ratones o ratas, han pasado a ser convencionales en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 4.736.866 y 4.870.009. Habitualmente, se identificarían células particulares para la incorporación de un transgén de Apo-2 con potenciadores específicos de tejido. Pueden utilizarse animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica Apo-2 introducido en la línea germinal del animal en una etapa embrionaria, para examinar el efecto del aumento en la expresión de ADN que codifica Apo-2. Dichos animales pueden utilizarse como animales de prueba para reactivos pensados para conferir protección de, por ejemplo, condiciones patológicas asociadas con una apoptosis excesiva. Según esta estrategia, se trata un animal con el reactivo y una incidencia reducida de la condición patológica, en comparación con animales no tratados que llevan el transgén, indicaría una potencial intervención terapéutica para la condición patológica. En otra realización, los animales transgénicos que portan una forma soluble de Apo-2, tal como un ECD de Apo-2 o una quimera de inmunoglobulina de dicha forma podría construirse para probar el efecto de la neutralización crónica de Apo-2L, un ligando de Apo-2.

[0130] Alternativamente, se pueden utilizar homólogos no humanos de Apo-2 para construir un animal "*knock out*" con Apo-2 que presenta un gen defectuoso o alterado que codifica Apo-2 como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica Apo-2 y el ADN genómico alterado que codifica el Apo-2 introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica Apo-2 se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifica Apo-2 según las técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica Apo-2 se puede eliminar o sustituir por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que se puede utilizar para monitorizar la integración. Habitualmente, en el vector se incluyen varias kilobases de ADN flanqueante sin alterar (ambos en los extremos 5' y 3') [véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, Cell, 51: 503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homóloga]. El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado de forma homóloga con el ADN endógeno [véase por ejemplo, Li et al., Cell, 69: 915 (1992)]. A continuación, se inyectan las células seleccionadas en un blastocito de un animal (por ejemplo, un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación [véase por ejemplo, Bradley, en: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), páginas 113-152]. A continuación, se puede implantar un embrión quimérico en una hembra adoptiva pseudopreñada adecuada y hacer nacer el embrión para crear un animal "*knock out*". La progenie que alberga el ADN recombinado de forma homóloga en sus células germinales puede identificarse mediante técnicas estándar y utilizarse para criar animales en los que todas las células del animal contengan el ADN recombinado de forma homóloga. Los animales *knockout* se pueden caracterizar, por ejemplo, por su capacidad de defensa contra determinadas enfermedades patológicas y por su desarrollo de enfermedades patológicas debido a la ausencia del polipéptido Apo-2, incluyendo por ejemplo, el desarrollo de tumores.

C. Preparación de anticuerpos anti-Apo-2

[0131] La presente invención proporciona además anticuerpos anti-Apo-2. Los anticuerpos contra Apo-2 se pueden preparar tal y como se indica a continuación. Entre los anticuerpos de ejemplo se incluyen anticuerpos, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. Anticuerpos policlonales

[0132] Los anticuerpos Apo-2 pueden comprender anticuerpos policlonales. Los procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos para el experto en la materia. Los anticuerpos policlonales se pueden desarrollar en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Habitualmente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante inyecciones múltiples subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido Apo-2 o una proteína de fusión del mismo. Un ejemplo de un agente inmunizante adecuado es una proteína de fusión Apo-2-IgG, tal como una proteína de fusión ECD de Apo-2-IgG. También se pueden utilizar células que expresan Apo-2 en su superficie. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante a una proteína que se sabe que es inmunogénica en el mamífero que se inmuniza. Entre los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas que se pueden utilizar se incluyen, pero no exclusivamente, a hemocianina de la lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. También se puede utilizar un agente de agregación, tal como alumbre para potenciar la respuesta inmunitaria del mamífero. Entre los ejemplos de adyuvantes que se pueden utilizar se incluyen el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización se puede seleccionar por un experto en la materia sin una gran experimentación. A continuación, puede sacarse sangre al mamífero y analizar el suero en busca de titulación de anticuerpos. Si se desea, puede volverse a estimular el mamífero hasta que aumente la titulación de anticuerpos o hasta que alcance un nivel constante ("plateaus").

2. Anticuerpos monoclonales

[0133] Los anticuerpos Apo-2 pueden ser, alternativamente, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, supra. En un procedimiento de hibridoma, se inmuniza (tal como se ha descrito anteriormente) habitualmente un ratón, un hámster u otro animal huésped apropiado con un agente inmunizante para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

[0134] El agente inmunizante incluirá habitualmente el polipéptido Apo-2 o una proteína de fusión del mismo. Un ejemplo de un agente inmunizante adecuado es una proteína de fusión o molécula quimérica Apo-2-IgG. Un ejemplo específico de un inmunógeno ECD de Apo-2-IgG se describe en el siguiente ejemplo 9. También se pueden utilizar células que expresan Apo-2 en su superficie. Generalmente, se utilizan linfocitos de sangre periférica ("PLBs") si se desean células de origen humano, o células de bazo o se utilizan células de nódulos linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. A continuación, los linfocitos se fusionan con una línea celular immortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academia Press, (1986), páginas 59-103]. Las líneas celulares immortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Habitualmente, se utilizan líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células immortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

[0135] Las líneas celulares immortalizadas preferidas son aquéllas que se fusionan de manera eficaz, soportan un nivel de expresión elevado estable del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas celulares immortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que se pueden obtener, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) páginas, 51-63].

[0136] A continuación, en el medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se puede ensayar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra Apo-2. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en el estado de la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

[0137] Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y se pueden desarrollar mediante procedimientos estándar [Goding, supra]. Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como ascitis en un mamífero.

[0138] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar del medio de cultivo o fluido de ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefrosa, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

[0139] Los anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden aislar fácilmente y secuenciar utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante la utilización de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede situar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de ningún modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias homólogas murinas [Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison et al., supra] o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido que no es inmunoglobulina. Dicho polipéptido que no es

inmunoglobulina se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo de la presente invención, o se pueden sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

[0140] Tal y como se describe en los siguientes ejemplos, se han preparado anticuerpos monoclonales anti-Apo-2. Uno de estos anticuerpos, 3F11.39.7 se ha depositado con la ATCC y se le ha asignado el no. de acceso de depósito HB-12456. En una realización, los anticuerpos monoclonales de la presente invención tendrán las mismas características biológicas que los anticuerpos monoclonales secretados por la línea o líneas de células de hibridoma depositadas bajo el no. de Acceso HB-12456. El término "características biológicas" se utiliza para referirse a las actividades o propiedades *in vitro* y/o *in vivo* del anticuerpo monoclonal, tales como la capacidad para unirse específicamente a Apo-2 o para bloquear, inducir o potenciar sustancialmente la activación de Apo-2. Tal y como se describe en la presente memoria, el anticuerpo monoclonal 3F11.39.7 (HB-12456) se caracteriza por tener actividad agonista para inducir la apoptosis, unirse al receptor de Apo-2, tener la actividad de bloqueo según se describe en los siguientes ejemplos y tener cierta reactividad cruzada con DR4, pero no en DcR1 o DcR2. Opcionalmente, el anticuerpo monoclonal se unirá al mismo epítipo que el anticuerpo 3F11.39.7 descrito en la presente invención. Esto se puede determinar mediante la realización de diversos ensayos, tales como los descritos en la presente invención y en los Ejemplos. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo monoclonal tiene la misma especificidad que el anticuerpo 3F11.39.7 descrito específicamente, se puede comparar la actividad en los ensayos de bloqueo de Apo-2 y la inducción de la apoptosis, tales como los descritos en los ejemplos siguientes.

[0141] Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos monovalentes. Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes son conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de la cadena ligera y la cadena pesada modificada de la inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc para evitar la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína pertinentes se sustituyen por otro residuo de aminoácido o se eliminan para evitar la reticulación.

[0142] Los procedimientos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab, se puede realizar utilizando técnicas rutinarias conocidas en el estado de la técnica. Por ejemplo, la digestión se puede realizar con papaína. Algunos ejemplos de digestión con papaína se describen en WO 94/29348 publicada el 22/12/94 y la Patente de Estados Unidos No. 4.342.566. La digestión con papaína de anticuerpos habitualmente produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, denominados fragmentos Fab, cada uno con un solo sitio de unión al antígeno, y un fragmento residual Fc. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación al antígeno y que aún es capaz de formar reticulaciones con el antígeno.

[0143] Los fragmentos Fab producidos en la digestión del anticuerpo también contienen los dominios constantes de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH₁) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH₁ de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente invención para un Fab' en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos F(ab')₂ de los anticuerpos originalmente fueron producidos como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

3. Anticuerpos humanizados

[0144] Los anticuerpos Apo-2 de la presente invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Entre los anticuerpos humanizados se incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo destinatario) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del destinatario se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del armazón de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo destinatario ni en las secuencias de la CDR o el armazón importados. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de forma óptima también comprenderá por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992)].

[0145] Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en el estado de la técnica.

Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo de un origen que es no humano. A estos residuos de aminoácidos no humanos se les hace referencia frecuentemente como residuos "importados", que se adquieren habitualmente de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)], mediante la sustitución de CDRs o secuencias de CDR de roedor por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable intacto humano ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

[0146] La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para utilizarlos en la fabricación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el procedimiento de "ajuste óptimo", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda una biblioteca de secuencias de dominio variable humanas conocidas. A continuación, se acepta la secuencia humana más cercana a la de un roedor como la región de armazón (FR) humana para el anticuerpo humanizado [Sims et al., J. Immunol., 151: 2.296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)]. Otro procedimiento utiliza una región de armazón particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede utilizarse la misma región de armazón para diversos anticuerpos humanizados diferentes [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4.285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151: 2.623 (1993)].

[0147] Además es importante que los anticuerpos se humanicen conservando una afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y de varios productos conceptuales humanizados que utilizan modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de la inmunoglobulina se encuentran normalmente disponibles y son conocidos por los expertos en la materia. Hay disponibilidad de programas informáticos que ilustran y muestran probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La exploración de estas estructuras permite analizar el probable papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de la inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los residuos FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de la secuencia de consenso y la secuencia de importación, de modo que se consigue la característica deseada del anticuerpo, tal como un aumento de la afinidad por el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno [véase, documento WO 94/04679 publicado el 3 de marzo de 1994].

[0148] Pueden utilizarse animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, después de la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. La transferencia de la serie de genes de la inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos después de la estimulación de antígenos [véase, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2.551-255 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno., 7: 33 (1993)].

[0149] Los anticuerpos humanos también se pueden producir en bibliotecas de expresión de fagos [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1992); Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cote et al. y Boerner et al. también se encuentran disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cote et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985) y Boerner et al., J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991)). Se han revisado algunos procedimientos adecuados para la preparación de bibliotecas de fagos y se describen en Winter et al., Annu. Rev. Immunol., 12: 433-55 (1994); Soderlind et al., Immunological Reviews, 130: 109-123 (1992); Hoogenboom, Tibtech Febrero 1997, Vol. 15; Neri et al., Cell Biophysics, 27: 47-61 (1995). Las bibliotecas de anticuerpos de cadena única también se pueden preparar mediante los procedimientos descritos en los documentos WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 y WO 95/15388. Las bibliotecas de anticuerpos también están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Cambridge Antibody Technologies (C.A.T.), Cambridge, Reino Unido.

[0150] Tal y como se describe en los siguientes Ejemplos, se han identificado anticuerpos Fv de cadena única (scFv) anti-Apo-2 utilizando una biblioteca de expresión de fagos. Tres de estos anticuerpos, a los que se hace referencia en la presente invención como 16E2, 24C4 y 20E6 se han secuenciado y caracterizado. Las respectivas secuencias de ADN y aminoácidos y regiones determinantes de complementariedad de estos anticuerpos se muestran en las figuras 15A-15C y 16. En una realización de la presente invención, los anticuerpos de Apo-2 scFv tendrán las mismas características biológicas que los anticuerpos 16E2, 24C4 o 20E6 identificados en la presente invención. El término "características biológicas" se utiliza para referirse a las actividades o propiedades *in vitro* y/o *in vivo* del anticuerpo scFv, tal como la capacidad para unirse específicamente a Apo-2 o para inducir o aumentar sustancialmente la activación de Apo-2. Tal y como se describe en la presente memoria, los anticuerpos 16E2, 24C4 y 20E6 se caracterizan por la unión a Apo-2, por tener actividad agonista para inducir la apoptosis y por no tener

reactividad cruzada con DR4 u otras moléculas reconocidas por el ligando de Apo-2. Opcionalmente, el anticuerpo de Apo-2 scFv se unirá al mismo epítipo u epítopos reconocidos por los anticuerpos 16E2, 24C4 y 20E6 descritos en la presente invención. Esto se puede determinar mediante la realización de varios ensayos, tales como los descritos en la presente invención y en los Ejemplos. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo scFv tiene la misma especificidad que los anticuerpos 16E2, 24C4 y 20E6 descritos específicamente, se puede comparar la actividad en los ensayos de inducción de apoptosis, tales como los descritos en los Ejemplos siguientes.

[0151] Opcionalmente, los anticuerpos scFv para Apo-2 pueden incluir anticuerpos que contienen una cadena VH y VL que incluyen una o más secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) identificadas en la figura 16 para los anticuerpos 16E2, 20E6 o 24C4.

4. Anticuerpos biespecíficos

[0152] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidad de unión para por lo menos dos antígenos distintos. En el presente caso, una de las especificidades de unión es por Apo-2, la otra es por cualquier otro antígeno, y preferiblemente por una proteína de la superficie celular o receptor o una subunidad de receptor.

[0153] Los procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en el estado de la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadenas ligeras/cadenas pesadas de la inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades distintas [Millstein y Cuello, Nature, 305: 537-539 (1983)]. A causa de la distribución aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una potencial mezcla de diez moléculas de anticuerpo distintas, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta normalmente se lleva a cabo mediante etapas de cromatografía de afinidad. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker et al., EMBO J., 10: 3.655-3.659 (1991).

[0154] Según un enfoque distinto y más preferido, los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseada (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de los dominios constantes de la inmunoglobulina. La fusión tiene lugar, preferiblemente, con un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de la bisagra, CH2, y las regiones CH3. Se prefiere que tenga la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para unirse a la cadena ligera presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan a un organismo huésped adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad a la hora de ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. No obstante, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen una importancia particular. En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada/cadena ligera de una inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se observó que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones no deseadas de cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este enfoque se describe en el documento WO 94/04690 publicado el 3 de marzo de 1994. Para más detalles sobre cómo generar anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986).

5. Anticuerpos heteroconjugados

[0155] Los anticuerpos heteroconjugados también se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos han sido propuestos, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario hacia células no deseadas [Patente de Estados Unidos 4.676.980] y para el tratamiento de la infección por VIH [documento WO 91/00360; documento WO 92/200373; EP 03089]. Se contempla que se pueden preparar los anticuerpos *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluidos aquellos que implican agentes reticulantes. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito se incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 4.676.980.

6. "Triabodies"

[0156] Los "triabodies" también se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Dichos anticuerpos están descritos por ejemplo en Iliades et al., FEBS Letters, 409: 437-441 (1997) y Korrt et al., Protein Engineering, 10: 423-

433 (1997).

7. Otras modificaciones

[0157] Se contemplan otras modificaciones de los anticuerpos Apo-2. Por ejemplo, se puede desear modificar los anticuerpos de la presente invención con respecto a la función efectora, con el fin de aumentar la efectividad terapéutica de los anticuerpos. Por ejemplo, se pueden introducir el residuo o residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación en esta región de enlaces disulfuro entre cadenas. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una mayor citólisis mediada por complemento [véase, por ejemplo, Caron et al., J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992); Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos también se pueden preparar utilizando reticulantes heterobifuncionales tal y como se describen en Wolf et al., Cancer research, 53: 2560-2565 (1993). Ghetie et al., Proc. Natl Acad. Sci., 94: 7509-7514 (1997), describen además la preparación de homodímeros IgG-IgG y dan a conocer que dichos homodímeros pueden aumentar la actividad apoptótica en comparación con los monómeros. Alternativamente, los anticuerpos se pueden diseñar para que tengan regiones Fc duales [véase, Stevenson et al., AntiCancer Drug design, 3: 219-230 (1989)].

[0158] Se puede desear la modificación de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en la presente invención. Las secuencias de las regiones determinantes de complementariedad scFv o enlazadoras (tal como se muestra en la figura 16) se pueden modificar, por ejemplo, para modular las actividades biológicas de estos anticuerpos. Las variaciones en la secuencia scFv de longitud completa o en varios dominios de las moléculas scFv descritos en la presente invención se pueden realizar, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas establecidas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más codones que codifican una scFv que da lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos de scFv en comparación con scFv de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es mediante sustitución de por lo menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios de la molécula scFv. Las variaciones se pueden realizar utilizando procedimientos conocidos en el estado de la técnica, tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida de sitio), rastreo de alaninas y mutagénesis por PCR. Para producir el ADN de la variante scFv se pueden realizar sobre el ADN clonado una mutagénesis dirigida de sitio [Carter et al., Nucl. Acids. Res., 13: 4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids. Res., 10: 6487 (1987)], mutagénesis de cassette [Wells et al., Gene, 34 315 (1985)], mutagénesis de selección de restricción [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas.

[0159] Los anticuerpos se pueden opcionalmente unir covalentemente o conjugarse a uno o más grupos químicos. Un poliol, por ejemplo, se pueden conjugar a una molécula de anticuerpo en uno o más residuos de aminoácidos, incluyendo residuos de lisina tal y como se describe en WO 93/00109. Opcionalmente, el poliol es un poli (alquilenglicol), tal como poli (etilenglicol) (PEG), aunque, otros expertos en la materia saben que se pueden utilizar otros polioles, tales como, por ejemplo, poli (propilenglicol) y copolímeros polietileno-polipropilenglicol utilizando técnicas para conjugar PEG a polipéptidos. Se han descrito un conjunto de procedimientos para incorporar PEG a polipéptidos. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 4.179.337 que describe la conjugación de un conjunto de hormonas y enzimas a PEG y propilenglicol para producir composiciones fisiológicamente activas que tienen inmunogenicidades reducidas.

[0160] Los anticuerpos también se pueden fusionar o unir a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heteróloga, tal como una etiqueta epítipo. Los polipéptidos etiquetas epítipo y procedimientos para su utilización se describen anteriormente en la Sección A, párrafo 8. Cualquiera de las etiquetas descritas en la presente invención pueden estar unidas a los anticuerpos. Los Ejemplos siguientes, por ejemplo, describen anticuerpos de cadena única etiquetados con His y gD.

D. Usos terapéuticos para anticuerpos de Apo-2

[0161] Los anticuerpos de Apo-2 de la presente invención tienen utilidad terapéutica. Los anticuerpos de Apo-2 agonistas, por ejemplo, se pueden utilizar para activar o estimular la apoptosis en células de cáncer. Por consiguiente, la descripción proporciona anticuerpos de Apo-2 para utilizar en métodos de tratamiento de cáncer.

[0162] Naturalmente, se contempla que los procedimientos de la presente invención se pueden utilizar combinados con otras técnicas terapéuticas tales como la cirugía.

[0163] El agonista se administra preferiblemente al mamífero en un portador. Los portadores adecuados y sus formulaciones se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., 1980, Mack Publishing Co., editado por Oslo et al. Habitualmente, en la formulación se utiliza una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable para que la formulación sea isotónica. Entre los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables se incluyen solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, y más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. Algunos portadores adicionales incluyen preparados de liberación controlada, tales como matrices semipermeables

de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el agonista, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Para los expertos en la materia será evidente que determinados portadores pueden ser más preferibles dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración y la concentración de agonista que se administra.

[0164] El anticuerpo agonista puede administrarse al mamífero mediante inyección (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular), o mediante otros procedimientos, tales como infusión, que aseguran su liberación al torrente circulatorio de manera eficaz. El agonista también se puede administrar mediante las vías intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional para ejercer efectos terapéuticos locales, así como sistémicos. Se prefiere la inyección local o intravenosa.

[0165] Se pueden determinar empíricamente dosificaciones y pautas eficaces para la administración del anticuerpo agonista, y hacer tales determinaciones forma parte de la experiencia en la materia. Los expertos en la materia entenderán que la dosificación de agonista que debe administrarse variará dependiendo, por ejemplo, del mamífero que recibirá el agonista, la vía de administración, el tipo particular de agonista utilizado y otros fármacos que se administran al mamífero. Las directrices para seleccionar las dosis apropiadas para los anticuerpos agonistas se encuentran en la literatura en los usos terapéuticos de los anticuerpos, por ejemplo, Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone et al., eds., Noyes Publications, Park Ridge, N.J., (1985), capítulo 22 y páginas 303-357; Smith et al, Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al., eds., Raven Press, Nueva York (1977), páginas 365-389. Una dosificación diaria habitual del agonista utilizado solo podría variar entre aproximadamente 1 µg/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los factores mencionados anteriormente.

[0166] El anticuerpo agonista también se puede administrar al mamífero combinado con cantidades eficaces de uno o más agentes terapéuticos o conjuntamente con tratamiento de radiación. Entre los agentes contemplados se incluyen agentes quimioterapéuticos, así como inmunoadyuvantes y citoquinas. Entre las quimioterapias contempladas por la presente invención se incluyen sustancias químicas o fármacos que son conocidos en el estado de la técnica y que se hallan comercialmente disponibles, tales como doxorrubicina, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citoxina, taxol, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina y carboplatino. El agonista se puede administrar de manera secuencial o simultáneamente con uno o más de otros agentes terapéuticos. Las cantidades de agonista y agente terapéutico dependerán, por ejemplo, de qué tipo de fármacos se utilizan, el cáncer de tratamiento, y las pautas y vías de administración, pero, en general, serían inferiores que si se utilizaran individualmente.

[0167] Después de la administración de agonista al mamífero, el cáncer del mamífero y la condición fisiológica se puede seguir de varias maneras conocidas para un profesional en la materia. Por ejemplo, la masa tumoral se puede observar físicamente o mediante técnicas de imagen por rayos X estándar.

[0168] Los anticuerpos de Apo-2 de la presente invención pueden ser útiles en el aumento de la muerte celular inducida por el sistema inmune de células que expresan Apo-2, por ejemplo, a través de la fijación de complemento o ADCC. Alternativamente, los anticuerpos antagonistas se pueden utilizar para bloquear la apoptosis excesiva (por ejemplo, en una enfermedad neurodegenerativa) o para bloquear los potenciales efectos autoinmunes/inflamatorios de Apo-2 resultante de la activación de NF-κB. Dichos anticuerpos antagonistas se pueden utilizar según los procedimientos terapéuticos y técnicas descritas anteriormente.

E. Usos no terapéuticos de los anticuerpos de Apo-2

[0169] Los anticuerpos de Apo-2 se pueden utilizar también en ensayos de diagnóstico para el Apo-2, por ejemplo, la detección de su expresión en células, tejidos, o suero específicos. Se pueden utilizar diversas técnicas de ensayos diagnósticos conocidas en el estado de la técnica, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos "sandwich" directos o indirectos y ensayos de inmunoprecipitación realizados en fases heterogéneas o en fases homogéneas [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) páginas 147-158]. Los anticuerpos utilizados en los ensayos diagnósticos pueden estar marcados con una parte detectable. La parte detectable debería ser capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, la parte detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , o ^{125}I , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina, o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. Para conjugar el anticuerpo con la parte detectable se puede utilizar cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica, incluidos aquellos procedimientos descritos por Hunter et al., Nature, 144: 945 (1962); David et al., Biochemistry, 13: 1.014 (1974); Pain et al., J. Immunol, Meth., 40: 219 (1981); y Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30: 407 (1982).

[0170] Los anticuerpos de Apo-2 también son útiles para la purificación por afinidad de Apo-2 de un cultivo celular recombinante o de fuentes naturales. En este proceso, se inmovilizan los anticuerpos contra Apo-2 en un soporte adecuado, tal como una resina Sephadex o un papel de filtro, utilizando procedimientos bien conocidos en el estado de la técnica. A continuación, el anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el Apo-2 a purificar, y después se limpia el soporte con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material de la muestra excepto el Apo-2 que está unido al anticuerpo inmovilizado. Por último, se lava el soporte con

otro disolvente adecuado que liberará el Apo-2 del anticuerpo.

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

- 5 **[0171]** Los anticuerpos de Apo-2 descritos en la presente invención se pueden proporcionar en kits o como artículos de fabricación para las aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas descritas anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente con una etiqueta. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados de una serie de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que incluye un agente activo que es eficaz para aplicaciones terapéuticas y
- 10 no terapéuticas, tales como las descritas anteriormente. El agente activo en la composición es Apo-2 o un anticuerpo de Apo-2. La etiqueta en el recipiente indica que la composición se utiliza para una terapia o aplicación no terapéutica específicas y también puede indicar directrices para el uso *in vivo* o *in vitro*, tales como las descritas anteriormente.
- 15 **[0172]** El kit comprenderá habitualmente el recipiente descrito anteriormente y uno o más recipientes que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos del envase con las instrucciones de uso.
- 20 **[0173]** Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente con propósitos ilustrativos y no pretenden de ningún modo limitar el alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

- 25 **[0174]** Todas las enzimas de restricción a las que se hace referencia en los ejemplos se obtuvieron de New England Biolabs y se utilizaron según las instrucciones del fabricante. Todos los demás reactivos comercialmente disponibles a los que se hace referencia en los ejemplos se utilizaron según las instrucciones del fabricante a no ser que se indique lo contrario. La fuente de las células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de la memoria, por los números de acceso ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

30 EJEMPLO 1

Aislamiento de clones de ADNc que codifica Apo-2 humano

- 35 **[0175]** Se buscaron en bases de datos de ADN de etiquetas de secuencias expresadas (EST) (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) y se identificó una EST que mostraba homología con el dominio de muerte del receptor de Apo-3 [Marsters et al., Curr. Biol. 6: 750 (1996)]. Se unieron bibliotecas de ADNc de bacteriófagos Igt10 de páncreas y riñón humanos (ambos adquiridos en Clontech) en vectores pRK5 tal como se indica a continuación. Se añadieron juntos los reactivos y se incubaron a 16°C durante 16 horas: 5X tampón de T4 ligasa (3 ml); vector pRK5 digerido con Xho1, Not1, 0,5 mg, 1 ml); ADNc (5 ml) y agua destilada (6 ml). Posteriormente, se añadieron
- 40 agua destilada adicional (70 ml) y 10 mg/ml de ARNt (0,1 ml) y se extrajo la reacción completa mediante fenol:cloroformo:isoamil alcohol (25:24:1). Se extrajo la fase acuosa, se recogió y se diluyó en NaCl 5 M (10 ml) y etanol absoluto (-20°C, 250 ml). A continuación, se centrifugó durante 20 minutos a 14.000 x g, se decantó y los pélets se resuspendieron en etanol al 70% (0,5 ml) y se centrifugó de nuevo durante 2 minutos a 14.000 x g. A continuación, el pélet de ADN se secó en un "speedvac" y se eluyó en agua destilada (3 ml) para utilizar en el
- 45 siguiente procedimiento.

- [0176]** El ADN del ADNc ligado/vector pRK5 preparado previamente se enfrió sobre hielo al que se añadió bacterias DH10B electrocompetentes (Life Tech, 20 ml). A continuación, la mezcla de vector con bacterias se electroporó según la recomendación de los fabricantes. Posteriormente, se añadió medio SOC (1 ml) y la mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos. A continuación, los transformantes se emplacaron en placas LB de 150 mm de estándar 20 que contenían ampicilina y se incubaron durante 16 horas (37°C) para permitir el crecimiento de las colonias. A continuación, las colonias positivas se rascaron y se aisló el ADN del pélet bacteriano utilizando protocolos de gradiente Cs-Cl.

- 55 **[0177]** A continuación, se construyó una biblioteca rica en 5'-ADNc para obtener una parte de fragmentos de ADNc que preferencialmente representa los extremos 5' de los ADNc contenidos en la biblioteca. Se combinaron 10 mg de la agrupación de ADN plásmido aislado de biblioteca de longitud completa (41 ml) con el tampón de restricción Not1 (New England Biolabs, 5 ml) y Not1 (New England Biolabs, 4 ml) y se incubaron a 37°C durante una hora. La reacción se extrajo mediante fenol:cloroformo:isoamil alcohol (25:24:1, 50 ml), se extrajo la fase acuosa, se recogió y se diluyó en NaCl 5 M (5 ml) y etanol absoluto (-20°C, 150 ml). A continuación, se centrifugó durante 20 minutos a 14.000 x g, se decantó y se resuspendió en etanol al 70% (0,5 ml) y se centrifugó de nuevo durante 2 minutos a 14.000 x g. A continuación, se extrajo el sobrenadante, el pélet se secó en un "speedvac" y se resuspendió en agua destilada (10 ml).

- 65 **[0178]** Se mezclaron los siguientes reactivos y se incubaron a 37°C durante 2 horas: agua destilada (3 ml); biblioteca de ADN linealizado (1 mg, 1 ml); mezcla de ribonucleótidos (Invitrogen, 10 ml); tampón de transcripción (Invitrogen, 2

ml) y mezcla de enzimas Sp6. A continuación, la reacción se extrajo mediante fenol:cloroformo:isoamil alcohol (25:24:1, 50 ml) y la fase acuosa se extrajo, se recogió y se resuspendió en NaCl 5 M (5 ml) y etanol absoluto (-20°C, 150 ml) y se centrifugó durante 20 minutos a 14.000 x g. A continuación, el pélet se decantó y se resuspendió en etanol al 70% (0,5 ml), se centrifugó de nuevo durante 2 minutos a 14.000 x g, se decantó, se secó en un "speedvac" y se resuspendió en agua destilada (10 ml).

[0179] Se mezclaron los siguientes reactivos y se incubaron a 16°C durante 16 horas: 5X tampón de T4 ligasa (Life Tech., 3 ml); vector pRK5 digerido con Cla-Sal, 0,5 mg, 1 ml); ADNc (5 ml); agua destilada (6 ml). Posteriormente, se añadieron agua destilada adicional (70 ml) y 10 mg/ml de ARNt (0,1 ml) y se extrajo la reacción completa mediante fenol:cloroformo:isoamil alcohol (25:24:1, 100 ml). Se extrajo la fase acuosa, se recogió y se diluyó en NaCl 5 M (10 ml) y etanol absoluto (-20°C, 250 ml) y se centrifugó durante 20 minutos a 14.000 x g. El pélet de ADN se decantó, se resuspendió en etanol al 70% (0,5 ml) y se centrifugó de nuevo durante 2 minutos a 14.000 x g. Se extrajo el sobrenadante y el pélet de residuo se secó en un "speedvac" y se resuspendió en agua destilada (3 ml). El ADN del ADNc ligado/vector pSST-amy.1 se enfrió sobre hielo al que se añadió bacterias DH10B electrocompetentes (Life Tech., 20 ml). A continuación, la mezcla de vector con bacterias se electroporó según la recomendación del fabricante. Posteriormente, se añadió medio SOC (Life Tech., 1 ml) y la mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos. A continuación, los transformantes se emplacaron en placas LB de 150 mm de estándar 20 que contenían ampicilina y se incubaron durante 16 horas (37°C). Las colonias positivas se rascaron de las placas y se aisló el ADN del pélet bacteriano utilizando protocolos estándar, por ejemplo, de gradiente Cs-Cl.

[0180] Las bibliotecas de ADNc se cribaron mediante hibridación con una sonda de oligonucleótidos sintética: GGGAGCCGCTCATGAGGAAGTTGGCCTCATGGACAATGAGATAAAGGTGGCTAAAGCTGAGGCAGC GGG (SEC ID No: 3) basada en la EST.

[0181] Se secuenciaron tres clones de ADNc en su totalidad. Las regiones codificantes solapantes de los ADNc eran idénticas a excepción del codón 410 (utilizando el sistema de numeración para la figura 1); esta posición codificaba un residuo de leucina (TTG) en ambos ADNc pancreáticos, y un residuo de metionina (ATG) en el ADNc de riñón, posiblemente debido a un polimorfismo.

[0182] La secuencia completa de nucleótidos de Apo-2 se muestra en la figura 1 (SEC ID No: 2). El clon 27868 (al que también se hace referencia como pRK5-Apo-2 depositado como ATCC 209021, tal como se indica a continuación) contiene un único marco de lectura abierto con un sitio de iniciación traduccional aparente en las posiciones de nucleótidos 140-142 [Kozak, et al., *supra*] y de finalización en el codón de parada hallado en las posiciones de nucleótidos 1373-1375 (figura 1; SEC ID No: 2). El precursor del polipéptido previsto tiene 411 aminoácidos de largo, una proteína transmembrana de tipo I, y tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 45 kDa. El análisis de hidropatía (no mostrado) sugirió la presencia de una secuencia señal (residuos 1-53), seguida por un dominio extracelular (residuos 54-182), un dominio transmembrana (residuos 183-208) y un dominio intracelular (residuos 209-411) (figura 2A; SEC ID No: 1). El análisis N-terminal de las secuencias de aminoácidos de Apo-2-IgG expresadas en células 293 mostró que el polipéptido maduro empieza en el residuo de aminoácido 54, indicando que la secuencia señal real comprende los residuos 1-53. El polipéptido Apo-2 se obtiene o es obtenible mediante la expresión de la molécula codificada por el inserto de ADNc del vector ATCC 209021 depositado.

[0183] Las proteínas de la familia de receptores de TNF se caracterizan habitualmente por la presencia de múltiples (habitualmente cuatro) dominios ricos en cisteína en sus regiones extracelulares – teniendo cada dominio rico en cisteína aproximadamente 45 aminoácidos de largo y conteniendo aproximadamente 6 residuos de cisteína, espaciados de forma regular. En base a la estructura cristalina del receptor de TNF de tipo 1, las cisteínas de cada dominio forman habitualmente tres enlaces disulfuro en los que habitualmente las cisteínas 1 y 2, 3 y 5, y 4 y 6 están emparejadas. Al igual que DR4, Apo-2 contiene dos pseudorepeticiones ricos en cisteínas extracelulares (figura 2A), mientras que otros miembros de la familia de TNF de mamífero identificados contienen tres o más de dichos dominios [Smith et al., Cell, 76: 959 (1994)].

[0184] La región citoplasmática de Apo-2 contiene un dominio de muerte (residuos de aminoácidos 324-391 mostrados en la figura 1; véase también la figura 2A) que muestra significativamente más identidad en la secuencia de aminoácidos con el dominio de muerte de DR4 (64%) que el dominio de muerte de TNFR1 (30%); CD95 (19%); o Apo-3/DR3 (29%) (figura 2B). Cuatro de los seis aminoácidos del dominio de muerte que son necesarios para la señalización por TNFR1 [Tartaglia et al., *supra*] se conservan en Apo-2, mientras que los otros dos residuos se semiconservan (véase la figura 2B).

[0185] En base al análisis de alineación (utilizando el programa informático ALIGNTM) de la secuencia de longitud completa, Apo-2 muestra más identidad en la secuencia con DR4 (55%) que los otros receptores unidos a apoptosis, tales como TNFR1 (19%); CD95 (17%); o Apo-3 (al que también se ha hecho referencia como DR3, WSL-1 o TRAMP) (29%).

EJEMPLO 2A. Expresión de ECD de Apo-2

[0186] Se preparó una construcción de fusión de dominio extracelular (ECD) soluble. Se obtuvo un ECD de Apo-2 (residuos de aminoácidos 1-84 mostrados en la figura 1) mediante PCR y se fusionó a una etiqueta epítipo Flag C-terminal (Sigma). La construcción de ECD de Apo-2 incluía los residuos 183 y 184 mostrados en la figura 1 para proporcionar flexibilidad en la unión, aunque los residuos 183 y 184 se prevé que estén en la región transmembrana). A continuación, la molécula etiquetada con epítipo Flag se insertó en pRK5 y se expresó mediante

transfección transitoria en células 293 humanas (ATCC CRI 1573).

[0187] Después de una incubación de 48 horas, los sobrenadantes de células se recogieron y se utilizaron directamente para estudios de coprecipitación (véase el ejemplo 3) o se sometieron a purificación del ECD con Flag de Apo-2 mediante cromatografía de afinidad sobre gránulos de agarosa anti-Flag, según las instrucciones del fabricante (Sigma).

B. Expresión de ECD de Apo-2 como Inmunoadhesina

[0188] Se preparó una construcción de inmunoadhesina con ECD de Apo-2. El ECD de Apo-2 (aminoácidos 1-184 mostrados en la figura 1) se fusionó a la región bisagra y Fc de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana G₁ en pRK5 tal y como se ha descrito anteriormente [Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 10535-10539 (1991)]. La inmunoadhesina se expresó mediante transfección transitoria en células 293 y se purificó de sobrenadantes celulares mediante cromatografía de afinidad de proteína A, tal y como se ha descrito por Ashkenazi et al., *supra*.

EJEMPLO 3Ensayo de inmunoprecipitación que muestra la interacción de unión entre Apo-2 y ligando de Apo-2

[0189] Para determinar si Apo-2 y Apo-2L interaccionan o se asocian entre sí, se incubaron los sobrenadantes de células 293 transfectadas con mock o de células 293 transfectadas con ECD con Flag de Apo-2 (descrito en el ejemplo 2 anterior) (5 ml) con 5 µg de APO-2L soluble etiquetado con poli-histidina [Pitti et al., *supra*] durante 30 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se analizó para la formación de complejo mediante un ensayo de coprecipitación.

[0190] Las muestras se sometieron a inmunoprecipitación utilizando 25 µl de gránulos de agarosa conjugados con anti-Flag (Sigma) o gránulos de agarosa conjugados con níquel (Qiagen). Después de una incubación de 1,5 horas a 4°C, se centrifugaron los gránulos y se lavaron cuatro veces en tampón fosfato salino (PBS). Mediante la utilización de agarosa anti-Flag, el Apo-2L se precipitó mediante ECD de Apo-2 etiquetado con Flag; mediante la utilización con níquel-agarosa, el ECD de Apo-2 se precipitó mediante el Apo-2L etiquetado con His. Las proteínas precipitadas se liberaron mediante la ebullición de las perlas durante 5 minutos en tampón SDS-PAGE, se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% y, a continuación, se detectaron mediante inmunotransferencia con anticuerpo anti-Apo-2L o anti-Flag (2 µg/ml) según se ha descrito en Marsters et al., J. Biol. Chem. (1997).

[0191] Los resultados mostrados en la figura 3 indican que el ECD de Apo-2 y Apo-2L se pueden asociar entre sí.

[0192] La interacción de unión se analizó posteriormente mediante purificación del ECD de Apo-2L de los sobrenadantes de células 293 transfectadas con gránulos anti-Flag (véase ejemplo 2) y, a continuación, el análisis de las muestras en un instrumento BIACORE™. El análisis con BIACORE™ indicó una constante de disociación (K_d) de aproximadamente 1 nM. El análisis con BIACORE™ también mostró que el ECD de Apo-2 no es capaz de unirse a otros miembros de la familia de TNF inductores de apoptosis, concretamente TNF-alfa (Genentech, Inc., Pennica et al., Nature, 312: 712 (1984), linfotoxina-alfa (Genentech, Inc) o ligando Fas/Apo-1 (Alexis Biochemicals). De este modo, los datos muestran que el Apo-2 es un receptor específico para Apo-2L.

EJEMPLO 4Inducción de apoptosis por Apo-2

[0193] Dado que los dominios de muerte pueden actuar como zona interfacial de oligomerización, la sobreexpresión de receptores que contienen dominios de muerte puede conducir a la activación de la señalización en ausencia de ligando [Frazer et al., *supra*, Nagat et al., *supra*]. Para determinar si Apo-2 era capaz de inducir la muerte celular, se transfectaron transitoriamente células 293 o células HeLa humanas (ATCC CCI 2.2) mediante precipitación con fosfato de calcio (células 293) o electroporación (células HeLa) con un vector pRK5 o plásmidos basados en pRK5 que codifican Apo-2 y/o CrmA. Cuando es aplicable, la cantidad total de ADN de plásmido se ajustó mediante la adición ADN del vector. La apoptosis se evaluó 24 horas después de la transfección mediante morfología (figura 4A); fragmentación del ADN (figura 4B); o mediante análisis FACS de exposición a fosfatidilserina (figura 4C) tal y como se ha descrito en Marsters et al., Curr. Biol., 6: 1669 (1996). Tal y como se muestra en las figuras 4A y 4B, las

células 293 transfectadas con Apo-2 experimentaron una notable apoptosis.

[0194] Para muestras ensayadas mediante FACS, las células HeLa se cotransfectaron con pRK5-CD4 como marcador para la transfección y se determinó la apoptosis en células que expresaban CD4; FADD se cotransfectó con el plásmido de Apo-2; los datos son la media $\pm$ SEM de por los menos tres experimentos, tal y como se ha descrito en Marsters et al., Curr. Biol., 6: 1669 (1996). Los inhibidores de caspasa, DEVD-fmk (Enzima Systems) o z-VAD-fmk (Research Biochemicals, Intl.) se añadieron en 200 μ M en el momento de la transfección. Tal y como se muestra en la figura 4C, los inhibidores de caspasa CrmA, DEVD-fmk y z-VAD-fmk bloquearon la inducción de apoptosis por Apo-2, indicando la implicación de proteasas del tipo Ced-3 en esta respuesta.

[0195] FADD es una proteína adaptadora que media en la activación de la apoptosis por CD95, TNFR1 y Apo-3/DR3 [Nagata et al. supra], pero no parece necesaria para la inducción de la apoptosis por Apo-2L [Marsters et al., supra] o por DR4 [Pan et al., supra]. Una forma mutante dominante negativa de FADD, que bloquea la inducción de la apoptosis por CD95, TNFR1 o Apo-3/DR3 [Frazer et al. supra; Nagata et al. supra; Chinnayian et al. supra] no inhibió la inducción de la apoptosis por Apo-2 cuando se se transfectó en células HeLa con Apo-2 (figura 4C). Estos resultados sugieren que el Apo-2 induce la apoptosis independientemente de FADD. En concordancia con esta conclusión, una proteína de fusión de glutatión-S-transferasa que contenía la región citoplasmática de Apo-2 no se unió *in vitro* a FADD transcrita y traducida (datos no mostrados).

EJEMPLO 5

Inhibición de la actividad de Apo-2L mediante el ECD de Apo-2 soluble

[0196] El Apo-2 soluble (0,5 μ g/ml, preparado tal y como se ha descrito en Pitti et al., supra) se preincubó durante 1 hora a temperatura ambiente con tampón PBS o ECD de Apo-2 purificado por afinidad (5 μ g/ml) junto con anticuerpo anti-Flag (Sigma) (1 μ g/ml) y se añadió a células HeLa. Después de una incubación durante 5 horas, se analizó la apoptosis de las células mediante FACS (como se ha indicado anteriormente) (figura 4D).

[0197] El Apo-2L indujo una apoptosis notable en células HeLa, y el ECD de Apo-2 soluble era capaz de bloquear la acción de Apo-2L (figura 4D), confirmando una interacción específica entre Apo-2L y Apo-2. Se obtuvieron resultados similares con la inmunoadhesina de ECD de Apo-2 (figura 4D). El análisis dosis-respuesta mostró una inhibición semi máxima en aproximadamente 0,3 nM de inmunoadhesina de Apo-2 (figura 4E).

EJEMPLO 6

Activación de NF- κ B por Apo-2

[0198] Se llevó a cabo un ensayo para determinar si Apo-2 activa a NF- κ B.

[0199] Se transfectaron células HeLa con plásmidos de expresión pRK5 que codifican la secuencia nativa de longitud completa de Apo-2, DR4 o Apo-3 y se recogieron 24 horas después de la transfección. Se prepararon extractos nucleares y se hizo reaccionar 1 μ g de proteína nuclear con una sonda de oligonucleótidos sintéticos específicos de NF- κ B marcados con 32 P ATCAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCG (SEC ID No:4) [véase, también, MacKay et al., J. Immunol., 153:5274-5284 (1994)], sola o junto con un exceso de 50 veces la sonda no marcada, o con un oligonucleótido sintético marcado con 32 P irrelevante AGGATGGGAAGTGTGTGATATATCCTTGAT (SEC ID No. 5). En algunas muestras, se añadió anticuerpo para subunidades de p65/RelA de NF- κ B (1 μ g/ml; Santa Cruz Biotechnology). Se analizó la unión a ADN mediante un ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética tal y como ha descrito Hsu et al., supra; Masters et al., supra, y MacKay et al., supra.

[0200] Los resultados se muestran en la Figura 5. Tal y como se muestra en la Figura 5A, después de la transfección en las células HeLa, tanto Apo-2 como DR4 indujeron una activación de NF- κ B significativa tal y como se midió mediante el ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética; el nivel de activación fue comparable a la activación observada para Apo-3/DR3. El anticuerpo para la subunidad p65/RelA de NF- κ B inhibió la movilidad de la sonda NF- κ B, implicando a p65 en la respuesta a los 3 receptores.

[0201] También se llevó a cabo un ensayo para determinar si la propia Apo-2L puede regular la actividad de NF- κ B. Las células HeLa o las células MCF7 (línea celular de adenocarcinoma de mama humana, ATCC HTB 22) se trataron con tampón de PBS, Apo-2L soluble (Pitti et al., supra) o el TNF-alfa (Genentech, Inc., ver Pennica et al.; Nature, 312:721 (1984)) (1 μ g/ml) y se analizó la actividad de NF- κ B tal y como se hizo anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 5B. Apo-2L indujo una activación de NF- κ B significativa en las células HeLa tratadas pero no en las células MCF7; el TNF-alfa indujo una activación más pronunciada en ambas líneas celulares. Diversos estudios han revelado que la activación de NF- κ B por TNF puede proteger a las células contra la apoptosis inducida por TNF [Nagata, supra].

[0202] También se analizaron los efectos de un inhibidor de NF- κ B, ALLN (N-acetil-Leu-Leu-norleucinal) y un inhibidor de la transcripción, la ciclohexamida. Las células HeLa (emplacadas en placas de 6 pocillos) se preincubaron con tampón de PBS, ALLN (Calbiochem) (40 μ g/ml) o ciclohexamida (Sigma) (50 μ g/ml) durante 1 hora antes de añadir Apo-2L (1 μ g/ml). Tras una incubación de 5 horas, se analizó la apoptosis mediante FACS (ver Figura 5C).

[0203] Los resultados se muestran en la Figura 5C. Tanto ALLN como la ciclohexamida incrementaron el nivel de apoptosis inducida por Apo-2L en las células HeLa. Los datos indican que Apo-2L puede inducir a genes protectores dependientes de NF- κ B. Los datos también indican que Apo-2L es capaz de activar el NF- κ B en ciertas líneas de células y que tanto Apo-2 como DR4 pueden mediar en esa función.

EJEMPLO 7

Expresión de Apo-2 en tejidos de mamíferos

A. Análisis de transferencia Northern

[0204] La expresión de ARNm de Apo-2 en tejidos humanos se examinó mediante análisis de transferencia Northern. Las transferencias de ARN humano se hibridaron a una sonda de ADN marcado con 32 P de 4,6 kilobases basado en el ADNc de Apo-2 de longitud completa; la sonda se generó mediante la digestión del plásmido pRK5-Apo-2 con EcoRI. La transferencia de ARN fetal humano MTN (Clontech), la transferencia de ARN adulto humano MTN-II (Clontech) y la transferencia de ARN de la línea celular de cáncer humano (Clontech) se incubaron con las sondas de ADN. Las transferencias se incubaron con las sondas en tampón de hibridación (5X SSPE; 2X solución de Denhardt; 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado fragmentado; 50% de formamida; SDS al 2%) durante 60 horas a 42°C. Las transferencias se lavaron varias veces en 2X SSC; SDS al 0,05% durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de un lavado de 30 minutos en 0,1X SSC; SDS al 0,1% a 50°C. Las transferencias se desarrollaron después de la exposición durante toda la noche.

[0205] Tal y como se muestra en la figura 6A, se detectó un transcrito de ARNm predominante de aproximadamente 4,6 kb en múltiples tejidos. La expresión fue relativamente elevada en hígado y pulmón fetal y humano y en ovario y leucocitos de sangre periférica (PBL) adultos, mientras que no se detectó expresión de ARNm en cerebro fetal y adulto. Se observaron niveles intermedios de expresión en colon, intestino delgado, testículos, próstata, timo, páncreas, riñón, músculo esquelético, placenta y corazón adultos. Se ha observado previamente que diversos tejidos adultos que expresan Apo-2, por ejemplo, PBL, ovario y bazo expresan DR4 [Pan et al., *supra*], aunque, los niveles relativos de expresión de cada ARNm de receptor parecen ser diferentes.

[0206] Tal y como se muestra en la figura 6B, el ARNm de Apo-2 se expresó de forma relativamente elevada en 6 de 8 líneas de células cancerígenas humanas examinadas, concretamente, leucemia promielocítica HL60, carcinoma cervical S3 de HeLa, leucemia mielógena crónica K562, adenocarcinoma colorrectal SW 480, carcinoma de pulmón A549 y melanoma G361. También hubo una expresión detectable en células de linfoma de Burkitt (Raji). De este modo, Apo-2 puede ser útil como diana para inducir la apoptosis en células de cáncer de linfoma así como tumores que no son de linfoides.

B. Hibridación *in situ*

[0207] La expresión de Apo-2 en tejidos humanos normales y cancerosos se examinó mediante hibridación *in situ*. Además, se examinó la expresión de Apo-2 en diversos tejidos diferentes de monos rhesus y chimpancé. Entre estos tejidos se incluyen: tejidos fetales humanos (semanas E12-E16) – placenta, cordón umbilical, hígado, riñón, glándula adrenal, tiroides, pulmón, corazón, vasos grandes, esófago, estómago, intestino delgado, bazo, timo, páncreas, cerebro, ojo, médula espinal, pared corporal, pelvis y limbo inferior; tejidos humanos adultos – riñón, vejiga, glándula adrenal, bazo, nódulo linfático, páncreas, pulmón, piel, retina, hígado; tejidos de chimpancé – glándulas salivares, estómago, tiroides, paratiroides, lengua, timo, ovario, nódulo linfático y nervios periféricos; tejidos de mono rhesus – córtex cerebral, hipocampo, cerebelo y pene; tejidos tumorales humanos – adenocarcinoma de pulmón, testículos, carcinoma de pulmón, carcinoma de mama, fibroadenoma, sarcoma de tejido blando.

[0208] Las muestras de tejido se incrustaron en parafina y se seccionaron. Posteriormente, los tejidos seccionados se desparafinaron y los portaobjetos se colocaron en agua. Los portaobjetos se enjuagaron dos veces durante cinco minutos a temperatura ambiente en 2X SSC. Después del enjuague, los portaobjetos se colocaron en 20 μ g/ml de proteinasa K (en tampón sin ARNasa) durante 15 minutos a 37°C (para tejidos fetales) o 8X proteinasa K durante 30 minutos a 37°C.

[0209] (para tejidos en formalina). A continuación, los portaobjetos se enjuagaron de nuevo en 0,5X SSC y se deshidrataron. Antes de la hibridación, los portaobjetos se colocaron en una caja de plástico recubierta de papel de filtro saturado con tampón (4X SSC, formamida al 50%). Los tejidos se cubrieron con 50 μ l de tampón de hibridación (3,75 g de sulfato de dextrano más 6 ml de agua; se centrifugó y calentó durante 2 minutos; se enfrió sobre hielo y

se añadieron 18,75 ml de formamida, 3,75 ml 20X SSC y 9 ml de agua) y se incubaron a 42°C durante 1 a 4 horas.

[0210] La hibridación se realizó utilizando una sonda marcada con ³²P que consistía en los oligonucleótidos 706-1259 de la SEC ID No: 2. La sonda se añadió a los portaobjetos en el tampón de hibridación y se incubó durante toda la noche a 55°C. A continuación, se realizaron múltiples etapas de lavado de forma secuencial tal como se indica a continuación: dos veces durante 10 minutos a temperatura ambiente en 2X SSC, tampón de EDTA (400 ml de 20X SSC, 16 ml de EDTA 0,25 M); una vez durante 30 minutos a 37°C en 20 µg/ml de ARNasa A; dos veces durante 10 minutos a temperatura ambiente en 0,5X SSC, tampón de EDTA; una vez cada dos horas a 55°C en 0,1XSSC, tampón de EDTA; dos veces durante 10 minutos a temperatura ambiente en 0,5X SSC. La deshidratación se llevó a cabo durante 2 minutos cada vez con EtOH al 50%, 70%, 90% que contenía NH₄Ac 0,3 M. finalmente, los portaobjetos se secaron al aire durante 2 horas y se expusieron a la película.

[0211] La expresión de Apo-2 en los tejidos fetales pareció más fuerte sobre hepatocitos del hígado, glomérulos en desarrollo en el riñón, córtex adrenal, y el epitelio del tracto gastrointestinal. Se observó una expresión moderada sobre las células epiteliales del pulmón y en puntos de vascularización de una placa de crecimiento óseo. Se observó un nivel de expresión relativamente bajo sobre las células epiteliales de tiroides y las células de los ventrículos cardíacos. Se observó expresión sobre células de linfoides en la médula del timo, glándulas linfáticas en desarrollo y células de citotrofoblastos de placenta.

[0212] Se observó expresión de Apo-2 en tejidos adultos sobre los oocitos restantes en folículos primordiales y niveles bajos sobre células de la granulosa de folículos en desarrollo en ovario de chimpancé. Se observó expresión en hígados cirróticos sobre hepatocitos en el extremo de los nódulos (es decir, área de daño en hígado de adulto normal era negativo). Otros tejidos fueron negativos en la expresión.

[0213] En los tejidos de cáncer examinados, se halló expresión de Apo-2 en dos adenocarcinomas de pulmón y dos tumores de células germinales de los testículos. Dos carcinomas de pulmón adicionales (uno escamoso) fueron negativos. Uno de los cinco carcinomas de mama fue positivo (hubo expresión en el tejido de mama normal). En un fibroadenoma, pareció haber expresión sobre ambos elementos epiteliales y estromales. Un sarcoma de tejido blando también fue positivo. Otros tejidos examinados fueron negativos.

EJEMPLO 8

Localización cromosómica del gen de Apo-2

[0214] La localización cromosómica del gen de Apo-2 humano se examinó mediante un análisis en conjunto de híbridos de radiación (RH). El mapeo de RH se realizó mediante PCR utilizando un panel de híbridos de radiación de células de humano-ratón (Research Genetics) y cebadores basados en la región codificante de ADNc de Apo-2 [Gelb et al., Hum. Genet., 98: 141 (1996)]. El análisis de los datos de la PCR utilizando la Base de Datos del Centro de Genoma Humano de Stanford indica que el Apo-2 está unido al marcador D8S481, con un LOD de 11,05; D8S481 está unido a su vez a D8S2055, que mapea el cromosoma humano 8p21. Un análisis similar de DR4 mostró que DR4 está unido al marcador D8S2127 (con un LOD de 13,00), que también mapea el cromosoma humano 8p21.

[0215] Para el conocimiento actual de los Solicitantes, hasta la fecha, ningún otro miembro de la familia de genes de TNFR ha sido localizado en el cromosoma 8.

EJEMPLO 9

Preparación de anticuerpos monoclonales específicos para Apo-2

[0216] Se inmunizaron ratones Balb/c (obtenidos de los Laboratorios Charles River) mediante la inyección de 0,5 µg/50 µl de una proteína de inmunoadhesina de ECD de Apo-2 (diluida en adyuvante MPL-RDM adquirido de Ribi Immunochemical Research Inc., Hamilton, MT) 11 veces en cada pata trasera en intervalos de 3-4 días. La proteína de inmunoadhesina de ECD de Apo-2 se generó mediante la fusión de una secuencia de dominio extracelular de Apo-2 (aminoácidos 1-184 mostrados en la figura 1) a la región bisagra y Fc de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana G₁ en pRK5 tal y como se ha descrito previamente [Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 10535-10539 (1991)]. La proteína de inmunoadhesina se expresó mediante la transfección transitoria en células 293 humanas y se purificó a partir de sobrenadantes celulares mediante cromatografía de afinidad con proteína A, tal y como se ha descrito por Ashkenazi et al., supra (Véase también el ejemplo 2B anterior).

[0217] Tres días después de la estimulación final, se extrajeron de los ratones los nódulos linfáticos popliteales y se preparó una suspensión de células individuales en medio DMEM (obtenido de Biowhitakker Corp.) complementado con un 1% de penicilina-estreptomicina. A continuación, las células de los nódulos linfáticos se fusionaron con células de mieloma murino P3X63AgU.1 (ATTC CRL 1597) utilizando polietilenglicol al 35% y se cultivaron en placas de cultivo de 96 pocillos. Se seleccionaron los hibridomas resultantes de la fusión en medio HAT. Diez después de la fusión, se cribaron los sobrenadantes del cultivo de hibridomas en un ELISA para analizar la presencia de anticuerpos monoclonales que se unen a la proteína de inmunoadhesina de ECD de Apo-2.

[0218] En el ELISA, las placas de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorb; Nunc, Kamstrup, Dinamarca) se recubrieron mediante la adición de 50 µl de 2 µg/ml de Fc de IgG de cabra antihumano (adquirida de Cappel Laboratories) en PBS a cada pocillo y la incubación a 4°C durante toda la noche. A continuación, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (PBS que contenía 0,05% de Tween 20). A continuación, los pocillos de las placas de microtitulación se bloquearon con 50 µl de albúmina de suero bovino al 2,0% en PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, las placas se lavaron de nuevo tres veces con tampón de lavado.

[0219] Después de la etapa de lavado, se añadieron 50 µl de 0,4 µg/ml de proteína de inmunoadhesina de ECD de Apo-2 (tal y como se ha descrito anteriormente) en un tampón de ensayo a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un aparato de agitación, seguido de tres lavados con tampón de lavado.

[0220] Después de las etapas de lavado, se añadieron 100 µl de los sobrenadantes de hibridoma o anticuerpo purificado (utilizando columnas de proteína A-sefarosa) (1 µg/ml) a las células designadas en presencia de CD4-IgG. Se añadieron 100 µl de medio acondicionado con células de mieloma P3X63AgU.1 a otros pocillos designados como controles. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en un aparato de agitación y, a continuación, se hicieron tres lavados con tampón de lavado.

[0221] A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 µl de Fc de IgG anti-ratón de cabra conjugada a HRP (adquirido en Cappel Laboratories), diluidos 1:1000 en tampón de ensayo (albúmina de suero bovino al 0,5%, Tween-20 al 0,05%, Thimersol al 0,01% en PBS) y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un aparato de agitación. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado seguido de la adición a cada pocillo de 50 µl de sustrato (sustrato de peroxidasa en micropocillos de TMB, Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD) y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición a cada pocillo de 50 µl de solución de detención de 1 componente en TMB (dietilglicol, Kirkegaard & Perry) y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación automatizado.

[0222] De los sobrenadantes de los hibridomas cribados en el ELISA, 22 sobrenadantes dieron positivo (calculado como aproximadamente 4 veces por encima del valor base). Los sobrenadantes que dieron positivo en el ELISA se analizaron posteriormente mediante análisis FACS utilizando células 9D (una línea de células de linfocito B humano que expresa Apo-2; Genentech, Inc.) e IgG de cabra anti-ratón conjugada con FITC. Para este análisis, se añadieron a pocillos de microtitulación con base en forma de U, 25 µl de células suspendidas (a 4×10^6 células/ml) en tampón clasificador de células (PBS que contiene FCS al 1% y NaN_3 al 0,02%), se mezclaron con 100 µl de sobrenadante de cultivo o anticuerpo purificado (purificado en columnas de Proteína A-sefarosa) (10 µg/ml) en tampón clasificador de células y se incubaron durante 30 minutos sobre hielo. A continuación, las células se lavaron y se incubaron con 100 µl de IgG de cabra anti-ratón conjugada con FITC durante 30 minutos a 4°C. A continuación, las células se lavaron dos veces, se resuspendieron en 150 µl de tampón clasificador de células y, a continuación, se analizaron mediante FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA). El análisis por FACS mostró que 8/22 de los sobrenadantes fueron positivos para anticuerpos anti-Apo-2. La figura 7 muestra la tinción en FACS de células 9D incubadas con uno de los anticuerpos de Apo-2, al que se hace referencia como 3F11.39.7. Tal y como se muestra en la figura 7, el anticuerpo 3F11.39.7 reconoce el receptor de Apo-2 expresado en células 9D.

EJEMPLO 10

Ensayo de la capacidad de Abs de Apo-2 para inducir agonísticamente la apoptosis

[0223] Se ensayaron los sobrenadantes de hibridoma y los anticuerpos purificados (tal y como se describe en el Ejemplo 9 anterior) por su actividad para inducir la apoptosis mediada por Apo-2 en las células 9D. Se incubaron las células 9D (5×10^5 células/0,1 ml) con concentraciones variables de anticuerpos en 100 µl de medio RPMI completo a 4°C durante 15 minutos. A continuación, se incubaron las células durante 5 minutos a 37°C y se añadieron a algunas de las muestras de células 10 µg de anticuerpo Fc de IgG anti-ratón de cabra (Cappel Laboratories) en 300 µl de RPMI completo. En este punto, se incubaron las células toda la noche a 37°C en presencia de un 7% de CO_2 . A continuación, se recogieron las células y se lavaron una vez con PBS. Se determinó la viabilidad de las células mediante la tinción de la unión de FITC-anexina V a fosfatidilserina de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Clontech). Se lavaron las células en PBS y se resuspendieron en 200 µl de tampón de unión. Se añadieron a las células 10 µl de anexina-V-FITC (1 µg/ml) y 10 µl de yoduro de propidio. Después de la incubación durante 15 minutos en la oscuridad, se analizaron las células 9D mediante FACS.

[0224] Tal y como se muestra en la Figura 8, el anticuerpo 3F11.39.7 (en ausencia del Fc de IgG anti-ratón de cabra) indujo la apoptosis en las células 9D en comparación con los anticuerpos de control. Sin embargo, la actividad agonística aumentó mediante la reticulación del receptor de Apo-2 en presencia de Fc de IgG anti-ratón de cabra (ver Figura 9). Esta mayor apoptosis (Figura 9) por la combinación de anticuerpos es comparable con la actividad apoptótica de Apo-2L en células 9D (datos no mostrados).

EJEMPLO 11**Ensayo de la capacidad del anticuerpo para bloquear la apoptosis inducida por el ligando de Apo-2**

[0225] Se ensayaron los sobrenadantes de hibridoma y los anticuerpos purificados (tal y como se describe en el Ejemplo 9 anterior) por su actividad para bloquear la apoptosis inducida por el ligando de Apo-2 en las células 9D. Se suspendieron las células 9D (5×10^5 células/0,1 ml) en medio RPMI completo (RPMI más FCS al 10%, glutamina, aminoácidos no esenciales, penicilina, estreptomycin, piruvato sódico) y se colocaron en tubos Falcon 2052 individuales. A continuación, se incubaron las células con 10 µg de anticuerpos en 200 µl de medio durante 15 minutos sobre hielo. Se suspendieron en medio RPMI completo 0,2 ml de ligando de Apo-2 (2,5 µg/ml) (Apo-2L etiquetado con His soluble preparado tal y como se describe en WO 97/25428; véase también Pitti et al., *supra*), y a continuación se añadió en los tubos que contenían las células 9D. Se incubaron las células 9D durante la noche a 37°C y en presencia de un 7% de CO₂. A continuación, se recogieron las células incubadas y se lavaron una vez con PBS. Se determinó la viabilidad de las células mediante la tinción de la unión de la FITC-anexina V a fosfatidilserina de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Clontech). De manera específica, se lavaron las células en PBS y se resuspendieron en 200 µl de tampón de unión. Se añadieron a las células 10 µl de anexina-V-FITC (1 µg/ml) y 10 µl de yoduro de propidio. Después de la incubación durante 15 minutos en la oscuridad, se analizaron las células 9D mediante FACS.

[0226] Los resultados se muestran en la Figura 10. Dado que las células 9D expresan más de un receptor de la Apo-2L, el Apo-2L puede inducir la apoptosis en las células 9D mediante la interacción con Apo-2 o el receptor de DR4. De este modo, para detectar cualquier actividad de bloqueo de los anticuerpos de Apo-2, la interacción entre DR4 y Apo-2L necesitó ser bloqueada. En combinación con el anticuerpo anti-DR4, 4H6.17.8 (ATCC HB-12455), el anticuerpo Apo-2 3F11.39.7 era capaz de bloquear aproximadamente el 50% de la apoptosis inducida por Apo-2L. La actividad apoptótica restante de aproximadamente el 50% se cree que es debida a las actividades agonísticas de estos dos anticuerpos por sí mismos, tal y como se muestra en la figura 10. Por consiguiente, se cree que el anticuerpo 3F11.39.7 es un anticuerpo Apo-2 de bloqueo o un anticuerpo que se une a Apo-2 de un modo que compite con la unión entre el ligando de Apo-2 y Apo-2.

EJEMPLO 12**Ensayo ELISA para analizar la unión de los anticuerpos de Apo-2 a otros receptores de ligandos de Apo-2**

[0227] Se realizó un ELISA para determinar si el anticuerpo monoclonal descrito en el ejemplo 9 era capaz de unirse a otros receptores de Apo-2L además de Apo-2. Específicamente, se analizó el anticuerpo 3F11.39.7 en la unión a DR4 [Pan et al., *supra*], DcR1 [Sheridan et al., *supra*] y DcR2 [Marsters et al., Curr. Biol., 7: 1003-1006 (1997)]. El ELISA se realizó esencialmente tal y como se ha descrito en el ejemplo 9 anterior.

[0228] Los resultados se muestran en la figura 11. El anticuerpo de Apo-2 3F11.39.7 se unió a Apo-2. El anticuerpo 3F11.39.7 también mostró cierta reactividad cruzada con DR4, pero no con DcR1 o DcR2.

EJEMPLO 13**Isotipado de anticuerpos**

[0229] El isotipo del anticuerpo 3F11.39.7 (tal y como se ha descrito anterior) se determinó cubriendo las placas de microtitulación con Ig de cabra anti-ratón específica para el isotipo (Fisher Biotech, Pittsburgh, PA) durante toda la noche a 4 °C. A continuación, se lavaron las placas con tampón de lavado (tal y como se ha descrito en el ejemplo 9 anterior). A continuación, se bloquearon los pocillos de las placas de microtitulación con 200 µl de albúmina sérica bovina (BSA) al 2% y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron de nuevo las placas tres veces con tampón de lavado. A continuación, se añadieron 100 µl de 5 µg/ml de anticuerpo 3F11.39.7 purificado a los pocillos designados. Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 30 minutos y, a continuación, se añadieron a cada pocillo 50 µl de IgG de cabra anti-ratón conjugada con HRP (tal y como se ha descrito anteriormente). Se incubaron las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente. El nivel de HRP unido a la placa se detectó utilizando sustrato HRP tal y como se ha descrito anteriormente.

[0230] El análisis de isotipado mostró que el anticuerpo 3F11.39.7 es un anticuerpo IgG1.

EJEMPLO 14**Anticuerpos de Apo-2 de cadena única****A. Selección de fagos para anticuerpos utilizando perlas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina**

[0231] Se seleccionó una biblioteca de fagos utilizando antígeno biotinilado soluble y perlas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina. El antígeno, una inmunoadhesina de ECD de Apo-2 preparada tal y como se ha

descrito anteriormente en el Ejemplo 2B, se biotiniló utilizando IMMUNOPURE NHS-biotin (biotini-N-hidroxisuccinimida, Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0232] Se realizaron dos experimentos de rastreo ("panning"). El primer experimento se diseñó para aislar clones de fagos específicos para Apo-2 y que no reaccionaron de forma cruzada con DR4 o DcR1. Se llevaron a cabo tres rondas de rastreo. Para la primera ronda, se bloquearon 10 µl de la biblioteca de fagos de la Cambridge Antibody Technologies con 1 ml de MPBST (3% de leche en polvo seca, 1X de PBS, 0,2% de TWEEN) que contenía 800 µg de CD4-Ig, 300 µg de DR4-Ig y 200 µg de DcR1-Ig durante 1 hora en una rueda de rotación a temperatura ambiente (CD4-Ig, DR4, y DcR1 están descritos en Capon et al., *Nature*, 337:525 (1989); Pan et al., *supra*; y Sheridan et al., *supra*). A continuación, se añadió inmunoadhesina de ECD de Apo-2 biotinilada hasta una concentración final de 100 nM, y se dejó que el fago se uniera al antígeno durante una hora a 37°C. Mientras tanto, se lavaron 3 veces con 1 ml de MPBST 300 µl de DYNABEADS M-280, recubiertas de estreptavidina (DYNAL) (utilizando un Concentrador de Partículas Magnéticas DYNAL) y, a continuación, se bloqueó durante 2 horas a 37°C con 1 ml de MPBST nuevo en un rotador. Las perlas se recogieron con el MPC, se resuspendieron en 50 µl de MPBST, y se añadieron a la solución de fago-más-antígeno. El mezclado continuó en una rueda a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se lavaron los DYNABEADS y el fago unido un total de 7 veces: 3 veces con 1 ml de PBS-TWEEN, una con MPBS, seguido de 3 veces con PBS.

[0233] Se eluyeron los fagos de las perlas mediante la incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente con 300 µl de 100 mM de trietilamina. El sobrenadante que contenía fagos se extrajo y se neutralizó con 150 µl de 1 M de Tris-HCl (pH 7,4). Los fagos neutralizados se utilizaron para infectar células huésped TG1 semilogarítmicas y se emplacaron en agar 2YT complementado con glucosa al 2% y 100 µg/ml de carbenicilina. Después del crecimiento durante toda la noche a 30°C, se rascaron las colonias en 10 ml de 2YT. Se utilizaron 50 µl de esta solución para inocular 25 ml de 2YT con carbenicilina y glucosa y se incubaron, agitando durante 2 horas a 37°C. Se añadieron fagos auxiliares M13K07 (Pharmacia) a una m.o.i. de 10. Después de la adsorción, las células se pusieron en gránulos y se resuspendieron en 25 ml de 2YT con carbenicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml) y continuó el desarrollo a 30°C durante 4 horas. Se extrajo el *E. coli* de los fagos mediante centrifugación, y se utilizó 1 ml de estos fagos (aproximadamente 10^{12} c.f.u.) en las rondas posteriores de selección.

[0234] Para la segunda ronda de selección, el ml de fagos recogidos se ajustó hasta el 3% de leche en polvo, 1X de PBS, 0,2% de TWEEN y, a continuación, se añadieron para el bloqueo 100 µg de DR4-Ig, 65 µg de DcR1-Ig, y 500 µg de CD4-Ig. Para la selección, se añadió Apo-2 biotinilado a 10 nM. Se incrementó la astringencia del lavado hasta dos ciclos de 7 lavados.

[0235] Para la tercera ronda de selección, se bloquearon los fagos sólo con MPBST. Se añadió Apo-2 biotinilado hasta 1 nM, y la astringencia del lavado se incrementó hasta tres ciclos de 7 lavados. Se obtuvieron relativamente pocos clones en esta ronda, por tanto se realizó el Panel 2B, Ronda 3 utilizando 5 nM de Apo-2 biotinilado con todas las otras condiciones repetidas tal y como se hizo anteriormente.

[0236] Se realizó un segundo experimento de rastreo de forma similar al anterior con la excepción de que en las Rondas 1 y 2 el bloqueo de las soluciones de fagos se llevó a cabo con MPBST que contenía 1,0 mg/ml de CD4-Ig (ninguna otra inmunoadhesina) y la Ronda 3 se bloqueó tan sólo con MPBST. Se añadió el Apo-2 biotinilado a 200 nM en la Ronda 1, a 60 nM en la Ronda 2, y a 12 nM en la Ronda 3. En cada ronda, se eluyeron los fagos de las perlas magnéticas con 300 µl de trietilamina 100 nM, a continuación con 300 µl de Tris-HCl a 0,1 M (pH 7,5) y, a continuación, 300 µl de glicina-HCl a 0,1 M (pH 2,2) que contenía 1 mg/ml de BSA. Los fagos obtenidos de las tres eluciones secuenciales se agruparon y utilizaron para infectar el huésped de la cepa TG1 tal y como se ha explicado anteriormente.

B. Exploración ELISA de clones seleccionados

[0237] Después de cada ronda de selección, se cribaron las colonias individuales resistentes a carbenicilina mediante ELISA para identificar aquellas que producían fagos de unión a Apo-2. Sólo aquellos clones que dieron positivo en dos o más formatos de ensayo fueron estudiados con mayor profundidad.

[0238] Los clones individuales se inocularon en 2TY con glucosa al 2% y carbenicilina a 100 µg/ml en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos y se desarrollaron hasta turbidez. A continuación, se infectaron los cultivos a una m.o.i. de 10 con el fago auxiliar M12K07, y las células infectadas se transfirieron a medio 2YT que contenía carbenicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml) para desarrollarse durante toda la noche a 30°C con agitación suave.

[0239] Las placas de microtitulación NUNC MAXISORP se recubrieron con 50 µl por pocillo de la inmunoadhesina de ECD de Apo-2, o CD4-IgG, a 2 µg/ml en 50 nM de tampón de carbonato (pH 9,6), a 4°C durante toda la noche. Después de retirar el antígeno, se bloquearon las placas con un 3% de leche en polvo en PBS (MPBS) durante 2 horas a temperatura ambiente.

[0240] Se centrifugaron los cultivos de fagos y se bloquearon 100 µl de sobrenadantes que contenían fagos con 20

µl de 6 x PBS / 18% de leche en polvo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se extrajo el bloqueo de las placas de titulación y se añadieron los fagos bloqueados y se dejó que se unieran durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el lavado, se detectaron los fagos con una dilución 1:5000 de anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa de rábano picante (Pharmacia) en MPBS seguido de 3',3',5',5'-tetrametilbenzidina (TMB). Las reacciones se detuvieron mediante la adición de H₂SO₄ y las lecturas se realizaron restando A_{405nm} de A_{450nm}.

C. Huellas dactilares del ADN de clones

[0241] La diversidad de clones de unión a Apo-2 se determinó mediante la amplificación por PCR de la inserción de scFv utilizando los cebadores pUC19R (5'AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG 3') (SEC. ID. No: 12) que se hibrida en dirección 5' de la secuencia líder y fdtetseq (5' GTC GTC TTT CCA GAC GGT AGT 3') (SEC. ID. No: 13) que se hibrida en el extremo 5' del gen II, seguido de la digestión con la enzima de restricción de corte frecuente BstNI.

[0242]

Huellas dactilares del ADN: Protocolo		
Mezcla A:	dH ₂ O	67 µl
	10 x tampón ampliTaQ	10
	25 mM de MgCl ₂	10
	DMSO, 50%	2
	Cebador directo	1
Mezcla B:	2,5 mM de dNTPs	8 µl
	AMPLITAQ	0,5
	Cebador inverso	1,0

[0243] Se colocaron 90 µl de la Mezcla A en un tubo de reacción y, a continuación, se inocularon con una parte muy pequeña de colonia de *E. coli* utilizando una punta amarilla. A continuación, se calentó la mezcla de reacción en un bloque de PCR hasta los 98°C, durante 3 minutos, se extrajo y se colocó sobre hielo. A continuación se añadieron 10 µl de Mezcla B y la mezcla de la reacción se termocicló a 95°C, 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 1 minuto 20 segundos, durante 25 ciclos en un termociclador Perkin Elmer 2400. A continuación, se extrajeron 10 µl del producto de reacción resultante y se le hizo pasar por un gel de agarosa al 1% para analizar una banda de 1 kB. La mezcla restante se llevó a un tampón de reacción 1 x BstNI, se añadieron 5 unidades de BstNI y se dejó que el ADN se digiriera durante 2 horas a 60°C. Las muestras resultantes se sometieron a continuación a electroforesis en un gel de acrilamida al 12,5% GeneGel Excel (Pharmacia Biotech).

D. Secuenciación de clones

[0244] Se obtuvieron las secuencias de nucleótidos de clones representativos de cada modelo de huella dactilar. Las colonias se inocularon en 50 ml de medio LB complementado con glucosa al 2% y 100 µg/ml de carbenicilina, y se desarrollaron durante toda la noche a 30°C. Se aisló el ADN utilizando Qiagen Tip-100s y el protocolo del fabricante y el ciclo se secuenció con terminaciones de cadena didesoxi fluorescente (Applied Biosystems). Se hicieron pasar las muestras por un Secuenciador de ADN Automatizado Applied Biosystems 373^a y se analizaron las secuencias utilizando el programa "Sequencher" (Gene Codes Corporation). Las secuencias de nucleótidos de los anticuerpos seleccionados 16E2, 20E6 y 24C4 se muestran en SEC. ID. No: 6, SEC. ID. No: 7, y SEC. ID. No: 8, respectivamente, (en las Figuras 15^a, 15B y 15C respectivamente). Las secuencias de aminoácidos correspondientes de los anticuerpos 16E2, 20E6 y 24C4 se muestran en SEC. ID. No: 9, SEC. ID. No: 10, y SEC. ID. No: 11, respectivamente (y en la Figura 16). Además, la Figura 16 identifica la región señal, y las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada y la ligera (subrayado) de estas moléculas scFv. Las regiones CDR mostradas en la Figura 16 fueron asignadas de acuerdo con los procedimientos de Kabal y otros, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," NIH Publ. N° 91-3242, 5^a Edición.

E. Purificación de scFvs con (his)₆

[0245] Para la purificación proteica del anticuerpo soluble, la cepa 33D3 de *E. coli* se transformó con ADN de fagémido. Se utilizaron 5 ml de 2YT con carbenicilina y glucosa para desarrollar cultivos durante toda una noche a 30°C. Se diluyeron 2,5 ml de estos cultivos en 250 ml del mismo medio y se desarrollaron hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 1,2. Se agruparon las células en pélets y se resuspendieron en 500 ml de 2YT que contenía IPTG (1mM) y carbenicilina (100 µg/ml) para inducir la expresión y se desarrollaron durante 16 horas más a 22°C. Se recogieron los pélets de células y se congelaron a -20°C.

[0246] Se purificaron los anticuerpos mediante la cromatografía de afinidad a quelato metálico inmovilizado (IMAC). Los pélets congelados se resuspendieron en 10 ml de tampón de "shockate" enfriado con hielo (25 mM de TRIS-HCl, 1 mM de EDTA, 500 mM de NaCl, sacarosa al 20%, 1 mM de PMSF) mediante agitación sobre hielo durante 1 hora. Se añadió imidazol hasta 20 mM y se extrajeron restos de células mediante centrifugación. Los sobrenadantes se ajustaron hasta 1 mM de MgCl₂ y 50 mM de tampón fosfato de pH 7,5. Se utilizó una resina de agarosa Ni-NTA de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La resina se equilibró con 50 mM de tampón de fosfato

de sodio de pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 mM de imidazol y el “shockate” añadido. La unión ocurrió de modo discontinuo o en una columna de flujo gravitacional. A continuación, la resina se lavó dos veces con 10 volúmenes de lecho de tampón de equilibrio, y dos veces con el tampón que contenía imidazol aumentado hasta 50 mM. La elución de proteínas fue con 50 mM de tampón fosfato de pH 7,5, 500 mM de NaCl y 250 mM de imidazol. Se extrajeron las sales y el imidazol excedentes en una columna PD-10 (Pharmacia), y se concentraron las proteínas utilizando un Centricom 10 hasta un volumen de aproximadamente 1 ml.

[0247] Se estimó la concentración de espectrofotométricamente suponiendo una A_{280} nm de 1,0 = 0,6 mg/ml.

F. Ensayos para determinar la especificidad de la unión de scFvs anti-Apo-2

[0248] Para evaluar la especificidad de cada uno de los clones de scFv, se realizaron ensayos ELISA para evaluar la unión de 16E2, 20E6 y 24C4 a Ig de ECD de Apo-2, Ig de DR4, Ig de DcR1, Ig de DcR2 e Ig de CD4 (descritos anteriormente y en el Ejemplo 12).

[0249] Brevemente, se recubrieron las placas NUNC ELISA con 50 μ l de una molécula de inmunoadhesina de Ig-receptor de 1 μ g/ml en 0,05 M de tampón de carbonato de sodio, pH 9,5, y se dejaron incubando durante toda la noche a 4°C. A continuación, se bloquearon las placas con 285 μ l de diluyente ELISA (PBS complementado con BSA al 0,5%, Tween 20 al 0,05%, pH 7,4) durante por lo menos una hora a temperatura ambiente. Se añadieron 50 μ l de las scFvs a las placas en una dilución en serie 1:5 y se dejó incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras esta hora de dilución, se lavaron las placas 6 veces con PBS/Tween al 0,05%. Tras la unión a las placas recubiertas de antígeno, se detectó scFv soluble mediante la adición en cada pocillo de 50 μ l de Mab 9E10 de 1 μ g/ml (un anticuerpo anti-c-myc; ATCC CRL 1729) y se dejaron incubando las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar las placas 6 veces con PBS/Tween al 0,05%, se añadieron a las placas 50 μ l de una dilución 1:5000 de anticuerpo IgG anti-murino conjugado con peroxidasa de rábano picante (catálogo Cappel: 55569) en MPBS y se dejaron incubando durante 1 hora. Se generó una señal observable mediante la adición de 50 μ l de sustrato peroxidasa de 3',3',5',5'-tetrametilbencidina (TMB) (catálogo KPL #: 50-76-00). Las reacciones se detuvieron mediante la adición de H_2SO_4 y las lecturas se realizaron restando A_{405nm} de A_{450nm} .

[0250] Tal y como se ilustra en las Figuras 12^a, 12B y 12C, los ensayos ELISA mostraron que cada uno de estos anticuerpos exhibieron un grado de especificidad relativamente elevado para Apo-2.

[0251] Los ensayos adicionales utilizando células transfectadas también mostraron la especificidad del anticuerpo 16E2 por Apo-2. Específicamente, se realizaron experimentos inmunohistoquímicos para evaluar la especificidad de unión del anticuerpo 16E2 por Apo-2 y células CHO transfectadas con DR4. Las células CHO se transfectaron con un único vector o un vector que contenía el gen para Apo-2 o DR4. Las células transfectadas se extrajeron de las placas de cultivo, se agruparon en pélets, y se lavaron dos veces con PBS. Los pélets se resuspendieron a continuación en O.C.T. (Fisher), se congelaron rápidamente en isopentano y LN_2 , y posteriormente se segmentaron utilizando los protocolos estándar. Se realizó la tinción de las células segmentadas utilizando un kit de Vectastain Elite ABC. Se incubaron los segmentos con un anticuerpo anti-Apo-2 16E2 o un anticuerpo de cadena única de control negativo. El anticuerpo secundario utilizado fue un anticuerpo 9E10 anti-c-myc biotinilado o un anticuerpo His anti-Penta (Qiagen) seguido de IgG anti-ratón biotinilado.

[0252] El ensayo de la inmunohistoquímica mostró una tinción específica de las células trasfectadas con Apo-2 pero no de las células transfectadas con DR4. La tinción celular fue predominantemente citoplasmática.

EJEMPLO 15

Ensayo de la capacidad de scFvs etiquetados con His para inducir apoptosis agonísticamente

A. Ensayos en 96 pocillos de anexina V-biotina/Estreptavidina-[S-35]

[0253] Se examinó la capacidad de inducir apoptosis mediada por Apo-2 por parte de los anticuerpos ScFv purificados (tal y como se describe anteriormente en el ejemplo 14).

[0254] Brevemente, se pusieron en alícuotas en placas de 96 pocillos células SK-MES-1 (línea celular de carcinoma de pulmón humano; ATCC HTB 58) o células HCT 116 (línea celular de carcinoma de colon humano; ATCC CCL 247) (4×10^4 células/pocillo) en medio de ensayo (mezcla 1:1 de medio $\square$ onti modificado por Dulbecco libre de rojo de fenol y mezcla de nutriente F-12 de Ham libre de rojo de fenol complementado con suero bovino fetal al 10%, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin) y se dejó que se unieran durante toda la noche a 37°C. A continuación, se extrajo el medio y se añadió a los pocillos 0,1 ml de medio de ensayo que contenía scFv con una concentración final de 50 μ g/ml (16E2 ó 20E6) (diluciones en serie de 1:2 realizadas en las placas) y se dejaron incubando durante una hora a temperatura ambiente. Se utilizaron otros anticuerpos de cadena única como controles negativos: un clon de scFv anti-factor tisular, 7D5, o un scFv al que se hace referencia como 19B8. Tras la incubación de 1 hora con anticuerpo scFv, se añadieron en los pocillos apropiados 0,1 ml de clon de anti-His a 10 μ g/ml, (Qiagen, cat. N° 1007671) o anticuerpos anti-c-myc. Los pocillos que no recibían un anticuerpo

reticulante recibieron sólo medio. A continuación, las placas se dejaron incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación de 30 minutos, se añadieron a los pocillos apropiados 0,1 ml de IgG anti-ratón de cabra a 10 µg/ml (ICN cst. N° 67-029). Los pocillos que no recibían un anticuerpo anti-IgG recibieron sólo medio. A continuación, se colocaron las placas en una incubadora durante 15 minutos para permitir que el pH volviera a 7,0. Para los controles positivos, se añadió a los pocillos apropiados 2 µg/ml de solución de ligando de Apo-2 (Apo-2L) (preparado tal y como se describe en el Ejemplo 11) en un tampón de fosfato de potasio de pH 7,0, con diluciones de 2 veces en serie llevadas a cabo en la placa. Los pocillos del control negativo recibieron sólo medio. A continuación, se incubaron las células durante toda la noche a 37°C en presencia de un 5% de CO₂. Se añadieron a continuación a los pocillos 0,05 ml de anexina V-biotina (1 µg/ml) en 2X de tampón de unión a Ca²⁺ (NeXins B. V.) y entonces se dejó mezclar en un agitador durante 30 minutos. A continuación, se añadieron a los pocillos 0,05 ml de estreptavidina-[S-35] (concentración final de 2,5 x 10⁴ cpm/pocillo) (Amersham) en 2X de tampón de unión a Ca²⁺ y, a continuación, se dejó mezclar en un agitador durante 30 minutos. A continuación, las placas se sellaron y se centrifugaron durante 4 minutos a 1500 rpm. Con el fin de evaluar la extensión de la apoptosis, se hizo entonces el recuento sobre las placas en un Trialux Microbeta Counter (Wallace) para obtener valores de cpm correspondientes a la unión a Anexina-V.

[0255] Tal y como se muestra en las Figuras 13C y 14B, los anticuerpos 16E2 y 20E6 indujeron agonísticamente apoptosis en células SK-MES-1.

B. Ensayos con violeta cristal

[0256] Además del ensayo de la anexina V-biotina/estreptavidina-[S-35] descrito anteriormente, se ensayaron los anticuerpos scFv (tal y como se describe en el Ejemplo 14 anterior) por la actividad de inducir apoptosis mediada por Apo-2 mediante ensayos que utilizan violeta cristal.

[0257] Brevemente, se emplacaron las células SK-MES-1 a 4x10⁴ células/pocillo en medio de ensayo (descrito en la Sección A anterior) y se dejó que se unieran durante toda la noche a 37°C. Se extrajo el medio y se añadieron a los pocillos apropiados 0,1 ml de medio de ensayo que contenía scFv (tal y como se describe en la Sección A anterior) a una concentración final de 50 µg/ml (los pocillos sin scFv añadido recibieron un cambio de medio). Los pocillos seleccionados recibieron muestras "pre-complejadas" en las cuales se combinó 10 µg/ml de scFv de 16E2 con 100µg/ml anticuerpo anti-His durante 5 horas a 4°C con mezclado continuo antes de la adición a la placa. Las placas se dejaron incubando durante 1 hora a temperatura ambiente.

[0258] Se extrajo el medio de scFv y se añadieron a los pocillos 0,1 ml de anticuerpos anti-His 10 µg/ml (Qiagen, cat. N° 1007671) o anticuerpos anti-c-myc diluidos en el medio de ensayo (los pocillos sin reticulante reciben un cambio de medio). Las placas se dejaron incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente.

[0259] A continuación, se extrajo el medio y se añadieron a los pocillos apropiados 0,1 ml de IgG de cabra anti-ratón a 10 µg/ml (fragmento Fc específico-ICN cst. N° 67-029) diluido en medio de ensayo (los pocillos sin anti-Fc reciben un cambio de medio). A continuación, se colocaron las placas en la incubadora durante 15 minutos para permitir que el pH volviese a 7,0.

[0260] Se diluyó Apo-2L (disponible a 100 µg/ml en un tampón de fosfato de potasio de pH 7,0) hasta 2 µg/ml y se añadieron 0,1 ml a los pocillos apropiados. Las diluciones de dos veces en serie se llevaron a cabo en la placa. A continuación, se incubaron las placas durante toda la noche a 37°C.

[0261] Se extrajo todo el medio de los pocillos y las placas se llenaron a continuación de solución de violeta cristal. Se dejó que las placas se tiñeran durante 15 minutos. Se retiró el violeta cristal llenando las placas con agua corriente del grifo. A continuación, las placas se dejaron secar durante toda la noche.

[0262] Se leyeron las placas en un lector de placas SLT a 540 nm y se analizaron los datos utilizando un macro Excel y un ajuste 4p.

[0263] Tal y como se muestra en las Figuras 13^a, 13B, 14^a y 14B, los anticuerpos 16E2 y 20E6 indujeron apoptosis agonísticamente en las células SK-MES-1.

EJEMPLO 16

Ensayo de la capacidad de los scFvs etiquetados con gD para inducir la apoptosis agonísticamente

[0264] Se analizó la capacidad de inducir apoptosis mediada por Apo-2 por una forma de scFv de 16E2 etiquetada con gD y purificada en un ensayo con violeta cristal tal y como se describe en el Ejemplo 15 anterior.

A. Construcción de scFv con la etiqueta gD

[0265] El fragmento de Sfil a Not I de la forma scFv de 16E2 se subclonó en un derivado de pAK19 (Carter et al.,

Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 3: 183-192 (1991)) que contenía el promotor *phoA* y la secuencia señal stII en lugar del promotor lacZ y la secuencia señal híbrida de la biblioteca original. Para mayor facilidad en la purificación, se sintetizó un fragmento de ADN que codificaba para 12 aminoácidos (met-ala-asp-pro-asn-arg-phe-arg-gly-lys-asp-leu SEC. ID No: 14) derivados de la glicoproteína D de tipo 1 del virus del herpes α ontinu (Lasky et al., DNA, 3: 23-29 (1984)) y se insertó en el extremo 3' del dominio VL en el lugar de (his)₆ y el epítipo c-myc presente originalmente en los clones de las bibliotecas de Cambridge Antibody Technologies.

B. Expresión en *E. coli*

[0266] El plásmido que contenía el gen para el gD de scFv de 16E2 se transformó en una cepa 33D3 de *E. coli* para la expresión en cultivos en matraces de agitación. Se utilizaron 5 ml de 2YT con carbenicilina y glucosa para hacer crecer cultivos durante toda la noche a 30°C. Se diluyeron 2,5 ml de estos cultivos en 250 ml del mismo medio y crecieron hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 1,0. Las células se agruparon en pélets y se resuspendieron en 500 ml de Medio Mínimo AP-5 Modificado que contenía carbenicilina (100 µg/ml) y crecieron durante unas 16 horas adicionales a 30°C. A continuación, las células se agruparon en pélets y se congelaron.

C. Purificación de scFv con la etiqueta gD

[0267] Se resuspendió la pasta de células congeladas en 1 mg/10ml de tampón de "shockate" (25 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 500 mM de NaCl, sacarosa al 20%, 1 mM de PMSF, pH 7,2) y se agitó suavemente en hielo durante 4 horas. A continuación, la suspensión de células se procesó a través de un microfluidizador Polytron (Brinkman). Se extrajeron los restos de células mediante una centrifugación a 10.000 x g durante 30 minutos. Tras la filtración a través de un filtro de 0,22 micras, se cargó el sobrenadante en una columna de afinidad (2,5 x 9,0 cm) que consistía en un anticuerpo 5B6 anti-gD (Paborsky et al., Protein Engineering, 3: 597-553 (1990)) acoplado a CnBr Sefarosa la cual había sido equilibrada con PBS. La columna se lavó 18 horas con PBS hasta que la absorbancia del efluente de la columna era equivalente a la línea base. Todas las etapas se realizaron a 4°C a una velocidad de flujo lineal de 25 cm/hora. La elución se realizó con 0,1 M de ácido acético, 0,5 M de NaCl, pH 2,9. Las fracciones de la columna se monitorizaron mediante la absorbancia a 280 nm y las fracciones de los picos se juntaron, se neutralizaron con 1,0 M de Tris, pH 8,0, se dializaron contra el PBS y el filtrado estéril. Se analizaron las preparaciones de proteína resultantes mediante SDS-PAGE no reductor.

D. Ensayo de violeta cristal

[0268] El ensayo de apoptosis se realizó esencialmente tal y como se describe en el Ejemplo 15(B) anterior excepto que las muestras fueron diluidas en serie 1:3 en las placas y se analizó el anticuerpo 16E2 etiquetado con gD además de otras dos preparaciones de scFv de 16E2 (a las que se hace referencia como Prep. A y Prep. B en la Figura 14C). Los resultados del ensayo que muestran una inducción de la apoptosis en las células SK-MES-1 por el anticuerpo 16E2 con gD se ilustran en la Figura 14C.

Depósito de material

[0269] Los siguientes materiales se han depositado con la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manasssas, Virginia, Estados Unidos (ATCC):

Material	ATCC Dep. No.	Fecha del depósito
pRK5-Apo-2	209021	8 de mayo de 1997
3F11.39.7	HB-12456	13 de enero de 1988

[0270] Este depósito se realizó según lo estipulado en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes y el Reglamento bajo el mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha del depósito. El depósito estará disponible mediante la ATCC según los términos del Tratado de Budapest, y están sujetos a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricción de la progenie del cultivo del depósito al uso público tras la publicación de la respectiva patente estadounidense o tras ponerse abierta a la inspección pública de cualquier solicitud de patente estadounidense o extranjera, la que sea primera, y asegura la disponibilidad de la progenie para alguien determinado por el Comisionario de Patentes y Marcas de Estados Unidos para tener el derecho a la misma de acuerdo con 35 USC § 122 y las normas del Comisionario según las mismas (incluyendo 37 CFR § 1.14 con referencia concreta a 886 OG 638).

[0271] El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en el depósito muriera o se perdiera o se destruyera cuando se cultiva en las condiciones adecuadas, los materiales serán inmediatamente reemplazados en una notificación por otros iguales. La disponibilidad del material depositado no se interpreta como una licencia para realizar la invención contraviniendo los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patente.

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

- 5 (i) SOLICITANTE: Genentech, Inc.
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Receptor de Apo-2
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 14
- (iv) DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA:
- 15 (A) DIRECCIÓN: Genentech, Inc.
(B) CALLE: 1 DNA Way
(C) CIUDAD: San Francisco Sur
(D) ESTADO: California
(E) PAÍS: EEUU
(F) CP: 94080
- 20 (v) TIPO DE LECTURA POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete 3,5 pulgadas, 1,44 Mb
(B) ORDENADOR: PC compatible con IBM
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
25 (D) SOFTWARE: WinPatin (Genentech)
- (vi) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD:
- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
(C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:
- 35 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/857216
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 15-mayo-1997
- (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:
- 40 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 09/020746
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 9-febrero-1998
- (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/REPRESENTANTE:
- 45 (A) NOMBRE : Marschang, Diane L.
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 35.600
(C) NÚMERO DE INFORME/EXPEDIENTE: P1101R2PCT
- (ix) INFORMACIÓN PARA TELECOMUNICACIONES:
- 50 (A) TELÉFONO: 650/225-5416
(B) TELEFAX: 650/952-9881

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 1:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 411 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No: 1:

Met	Glu	Gln	Arg	Gly	Gln	Asn	Ala	Pro	Ala	Ala	Ser	Gly	Ala	Arg	1	5	10	15
Lys	Arg	His	Gly	Pro	Gly	Pro	Arg	Glu	Ala	Arg	Gly	Ala	Arg	Pro	20	25	30	
Gly	Leu	Arg	Val	Pro	Lys	Thr	Leu	Val	Leu	Val	Val	Ala	Ala	Val	35	40	45	
Leu	Leu	Leu	Val	Ser	Ala	Glu	Ser	Ala	Leu	Ile	Thr	Gln	Gln	Asp	50	55	60	
Leu	Ala	Pro	Gln	Gln	Arg	Ala	Ala	Pro	Gln	Gln	Lys	Arg	Ser	Ser	65	70	75	
Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	Cys	Pro	Pro	Gly	His	His	Ile	Ser	Glu	Asp	80	85	90	
Gly	Arg	Asp	Cys	Ile	Ser	Cys	Lys	Tyr	Gly	Gln	Asp	Tyr	Ser	Thr	95	100	105	
His	Trp	Asn	Asp	Leu	Leu	Phe	Cys	Leu	Arg	Cys	Thr	Arg	Cys	Asp	110	115	120	
Ser	Gly	Glu	Val	Glu	Leu	Ser	Pro	Cys	Thr	Thr	Thr	Arg	Asn	Thr	125	130	135	
Val	Cys	Gln	Cys	Glu	Glu	Gly	Thr	Phe	Arg	Glu	Glu	Asp	Ser	Pro	140	145	150	
Glu	Met	Cys	Arg	Lys	Cys	Arg	Thr	Gly	Cys	Pro	Arg	Gly	Met	Val	155	160	165	
Lys	Val	Gly	Asp	Cys	Thr	Pro	Trp	Ser	Asp	Ile	Glu	Cys	Val	His	170	175	180	
Lys	Glu	Ser	Gly	Ile	Ile	Ile	Gly	Val	Thr	Val	Ala	Ala	Val	Val	185	190	195	
Leu	Ile	Val	Ala	Val	Phe	Val	Cys	Lys	Ser	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	200	205	210	
Val	Leu	Pro	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ile	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp	215	220	225	
Pro	Glu	Arg	Val	Asp	Arg	Ser	Ser	Gln	Arg	Pro	Gly	Ala	Glu	Asp	230	235	240	
Asn	Val	Leu	Asn	Glu	Ile	Val	Ser	Ile	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Val	245	250	255	
Pro	Glu	Gln	Glu	Met	Glu	Val	Gln	Glu	Pro	Ala	Glu	Pro	Thr	Gly	260	265	270	
Val	Asn	Met	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Ser	Glu	His	Leu	Leu	Glu	Pro	275	280	285	
Ala	Glu	Ala	Glu	Arg	Ser	Gln	Arg	Arg	Arg	Leu	Leu	Val	Pro	Ala	290	295	300	
Asn	Glu	Gly	Asp	Pro	Thr	Glu	Thr	Leu	Arg	Gln	Cys	Phe	Asp	Asp	305	310	315	
Phe	Ala	Asp	Leu	Val	Pro	Phe	Asp	Ser	Trp	Glu	Pro	Leu	Met	Arg	320	325	330	
Lys	Leu	Gly	Leu	Met	Asp	Asn	Glu	Ile	Lys	Val	Ala	Lys	Ala	Glu	335	340	345	

Ala	Ala	Gly	His	Arg	Asp	Thr	Leu	Tyr	Thr	Met	Leu	Ile	Lys	Trp
				350					355					360
Val	Asn	Lys	Thr	Gly	Arg	Asp	Ala	Ser	Val	His	Thr	Leu	Leu	Asp
				365					370					375
Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Gly	Glu	Arg	Leu	Ala	Lys	Gln	Lys	Ile	Glu
				380					385					390
Asp	His	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Lys	Phe	Met	Tyr	Leu	Glu	Gly	Asn
				395					400					405
Ala	Asp	Ser	Ala	Xaa	Ser									
				410	411									

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- 5 (A) LONGITUD: 1799 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) HEBRA: única
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No: 2:

```

CCCACGCGTC CGCATAAATC AGCACGCGGC CGGAGAACCC CGCAATCTCT 50
GCGCCCACAA AATACACCGA CGATGCCCGA TCTACTTTAA GGGCTGAAAC 100
CCACGGGCCT GAGAGACTAT AAGAGCGTTC CCTACCGCC  ATG GAA 145
                                                Met Glu
                                                1
CAA CGG GGA CAG AAC GCC CCG GCC GCT TCG GGG GCC CGG 184
Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg
          5                10                15
AAA AGG CAC GGC CCA GGA CCC AGG GAG GCG CGG GGA GCC 223
Lys Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala
          20                25
AGG CCT GGG CTC CGG GTC CCC AAG ACC CTT GTG CTC GTT 262
Arg Pro Gly Leu Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val
          30                35                40
GTC GCC GCG GTC CTG CTG TTG GTC TCA GCT GAG TCT GCT 301
Val Ala Ala Val Leu Leu Leu Val Ser Ala Glu Ser Ala
          45                50
CTG ATC ACC CAA CAA GAC CTA GCT CCC CAG CAG AGA GCG 340
Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln Gln Arg Ala
          55                60                65
GCC CCA CAA CAA AAG AGG TCC AGC CCC TCA GAG GGA TTG 379
Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu
          70                75                80
TGT CCA CCT GGA CAC CAT ATC TCA GAA GAC GGT AGA GAT 418
Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp
          85                90

```

TGC	ATC	TCC	TGC	AAA	TAT	GGA	CAG	GAC	TAT	AGC	ACT	CAC	457
Cys	Ile	Ser	Cys	Lys	Tyr	Gly	Gln	Asp	Tyr	Ser	Thr	His	
	95					100					105		
TGG	AAT	GAC	CTC	CTT	TTC	TGC	TTG	CGC	TGC	ACC	AGG	TGT	496
Trp	Asn	Asp	Leu	Leu	Phe	Cys	Leu	Arg	Cys	Thr	Arg	Cys	
			110					115					
GAT	TCA	GGT	GAA	GTG	GAG	CTA	AGT	CCC	TGC	ACC	ACG	ACC	535
Asp	Ser	Gly	Glu	Val	Glu	Leu	Ser	Pro	Cys	Thr	Thr	Thr	
120					125					130			
AGA	AAC	ACA	GTG	TGT	CAG	TGC	GAA	GAA	GGC	ACC	TTC	CGG	574
Arg	Asn	Thr	Val	Cys	Gln	Cys	Glu	Glu	Gly	Thr	Phe	Arg	
		135					140					145	
GAA	GAA	GAT	TCT	CCT	GAG	ATG	TGC	CGG	AAG	TGC	CGC	ACA	613
Glu	Glu	Asp	Ser	Pro	Glu	Met	Cys	Arg	Lys	Cys	Arg	Thr	
				150					155				
GGG	TGT	CCC	AGA	GGG	ATG	GTC	AAG	GTC	GGT	GAT	TGT	ACA	652
Gly	Cys	Pro	Arg	Gly	Met	Val	Lys	Val	Gly	Asp	Cys	Thr	
	160					165					170		
CCC	TGG	AGT	GAC	ATC	GAA	TGT	GTC	CAC	AAA	GAA	TCA	GGC	691
Pro	Trp	Ser	Asp	Ile	Glu	Cys	Val	His	Lys	Glu	Ser	Gly	
			175					180					
ATC	ATC	ATA	GGA	GTC	ACA	GTT	GCA	GCC	GTA	GTC	TTG	ATT	730
Ile	Ile	Ile	Gly	Val	Thr	Val	Ala	Ala	Val	Val	Leu	Ile	
					190					195			
GTG	GCT	GTG	TTT	GTT	TGC	AAG	TCT	TTA	CTG	TGG	AAG	AAA	769
Val	Ala	Val	Phe	Val	Cys	Lys	Ser	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	
		200					205					210	
GTC	CTT	CCT	TAC	CTG	AAA	GGC	ATC	TGC	TCA	GGT	GGT	GGT	808
Val	Leu	Pro	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ile	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	
				215					220				
GGG	GAC	CCT	GAG	CGT	GTG	GAC	AGA	AGC	TCA	CAA	CGA	CCT	847
Gly	Asp	Pro	Glu	Arg	Val	Asp	Arg	Ser	Ser	Gln	Arg	Pro	
	225					230					235		
GGG	GCT	GAG	GAC	AAT	GTC	CTC	AAT	GAG	ATC	GTG	AGT	ATC	886
Gly	Ala	Glu	Asp	Asn	Val	Leu	Asn	Glu	Ile	Val	Ser	Ile	
			240					245					
TTG	CAG	CCC	ACC	CAG	GTC	CCT	GAG	CAG	GAA	ATG	GAA	GTC	925
Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Val	Pro	Glu	Gln	Glu	Met	Glu	Val	
					255					260			
CAG	GAG	CCA	GCA	GAG	CCA	ACA	GGT	GTC	AAC	ATG	TTG	TCC	964
Gln	Glu	Pro	Ala	Glu	Pro	Thr	Gly	Val	Asn	Met	Leu	Ser	
		265					270					275	
CCC	GGG	GAG	TCA	GAG	CAT	CTG	CTG	GAA	CCG	GCA	GAA	GCT	1003
Pro	Gly	Glu	Ser	Glu	His	Leu	Leu	Glu	Pro	Ala	Glu	Ala	
				280					285				
GAA	AGG	TCT	CAG	AGG	AGG	AGG	CTG	CTG	GTT	CCA	GCA	AAT	1042
Glu	Arg	Ser	Gln	Arg	Arg	Arg	Leu	Leu	Val	Pro	Ala	Asn	
	290					295					300		

GAA GGT GAT CCC ACT GAG ACT CTG AGA CAG TGC TTC GAT 1081
 Glu Gly Asp Pro Thr Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp
 305 310

GAC TTT GCA GAC TTG GTG CCC TTT GAC TCC TGG GAG CCG 1120
 Asp Phe Ala Asp Leu Val Pro Phe Asp Ser Trp Glu Pro
 315 320 325

CTC ATG AGG AAG TTG GGC CTC ATG GAC AAT GAG ATA AAG 1159
 Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu Ile Lys
 330 335 340

GTG GCT AAA GCT GAG GCA GCG GGC CAC AGG GAC ACC TTG 1198
 Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu
 345 350

TAC ACG ATG CTG ATA AAG TGG GTC AAC AAA ACC GGG CGA 1237
 Tyr Thr Met Leu Ile Lys Trp Val Asn Lys Thr Gly Arg
 355 360 365

GAT GCC TCT GTC CAC ACC CTG CTG GAT GCC TTG GAG ACG 1276
 Asp Ala Ser Val His Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Thr
 370 375

CTG GGA GAG AGA CTT GCC AAG CAG AAG ATT GAG GAC CAC 1315
 Leu Gly Glu Arg Leu Ala Lys Gln Lys Ile Glu Asp His
 380 385 390

TTG TTG AGC TCT GGA AAG TTC ATG TAT CTA GAA GGT AAT 1354
 Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met Tyr Leu Glu Gly Asn
 395 400 405

GCA GAC TCT GCC WTG TCC TAAGTGTG ATTCTCTTCA GGAAGTGAGA 1400
 Ala Asp Ser Ala Xaa Ser
 410 411

CCTTCCCTGG TTTACCTTTT TTCTGGAAAA AGCCCAACTG GACTCCAGTC 1450

AGTAGGAAAG TGCCACAATT GTCACATGAC CGGTACTGGA AGAAACTCTC 1500

CCATCCAACA TCACCCAGTG GATGGAACAT CCTGTAACCTT TTCACTGCAC 1550

TTGGCATTAT TTTTATAAGC TGAATGTGAT AATAAGGACA CTATGGAAAT 1600

GTCTGGATCA TTCCGTTTGT GCGTACTTTG AGATTTGGTT TGGGATGTCA 1650

TTGTTTTTAC AGCACTTTTT TATCCTAATG TAAATGCTTT ATTTATTTAT 1700

TTGGGCTACA TTGTAAGATC CATCTACAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAAG 1750

GGCGGCCGCG ACTCTAGAGT CGACCTGCAG AAGCTTGGCC GCCATGGCC 1799

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

5

(A) LONGITUD: 70 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

- (C) HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No: 3:

5

GGGAGCCGCT CATGAGGAAG TTGGGCCTCA TGGACAATGA GATAAAGGTG 50
GCTAAAGCTG AGGCAGCGGG 70

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

10

- (A) LONGITUD: 29 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No: 4:

ATCAGGGACT TTCCGCTGGG GACTTTCCG 29

20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No: 5:

AGGATGGGAA GTGTGTGATA TATCCTTGAT 30

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 930 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35

40

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No: 6:

ES 2 368 654 T3

ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TTT	GGA	GCC	TTT	TTT	36
Met	Thr	Met	Ile	Thr	Pro	Ser	Phe	Gly	Ala	Phe	Phe	
1				5					10			
TTG	GAG	ATT	TTC	AAC	GTG	AAA	AAA	TTA	TTA	TTC	GCA	ATT 75
Leu	Glu	Ile	Phe	Asn	Val	Lys	Lys	Leu	Leu	Phe	Ala	Ile
	15					20						25
CCT	TTA	GTT	GTT	CCT	TTC	TAT	GCG	GCC	CAG	CCG	GCC	ATG 114
Pro	Leu	Val	Val	Pro	Phe	Tyr	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Met
				30					35			
GCC	GAG	GTG	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GGA	GGT	GTG	GAA 153
Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Glu
	40					45					50	
CGG	CCG	GGG	GGG	TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT 192
Arg	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser
			55					60				
GGA	TTC	ACC	TTT	GAT	GAT	TAT	GGC	ATG	AGC	TGG	GTC	CGC 231

Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	
65					70					75			
CAA	GCT	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTC	TCT	GGT	ATT	270
Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Gly	Ile	90
		80					85						
AAT	TGG	AAT	GGT	GGT	AGC	ACA	GGA	TAT	GCA	GAC	TCT	GTG	309
Asn	Trp	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
			95					100					
AAG	GGC	CGA	GTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAC	GCC	AAG	AAC	348
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	
	105					110					115		
TCC	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GCC	GAG	GAC	387
Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
			120					125					
ACG	GCC	GTA	TAT	TAC	TGT	GCG	AAA	ATC	CTG	GGT	GCC	GGA	426
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Ile	Leu	Gly	Ala	Gly	
	130				135					140			
CGG	GGC	TGG	TAC	TTC	GAT	CTC	TGG	GGG	AAG	GGG	ACC	ACG	465
Arg	Gly	Trp	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp	Gly	Lys	Gly	Thr	Thr	
		145					150					155	
GTC	ACC	GTC	TCG	AGT	GGT	GGA	GGC	GGT	TCA	GGC	GGA	GGT	504
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
				160					165				
GGC	AGC	GGC	GGT	GGC	GGA	TCG	TCT	GAG	CTG	ACT	CAG	GAC	543
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Glu	Leu	Thr	Gln	Asp	
	170					175					180		
CCT	GCT	GTG	TCT	GTG	GCC	TTG	GGA	CAG	ACA	GTC	AGG	ATC	582
Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Leu	Gly	Gln	Thr	Val	Arg	Ile	
			185					190					
ACA	TGC	CAA	GGA	GAC	AGC	CTC	AGA	AGC	TAT	TAT	GCA	AGC	621
Thr	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu	Arg	Ser	Tyr	Tyr	Ala	Ser	
	195				200					205			
TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	CCA	GGA	CAG	GCC	CCT	GTA	CTT	GTC	660
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	
		210					215					220	
ATC	TAT	GGT	AAA	AAC	AAC	CGG	CCC	TCA	GGG	ATC	CCA	GAC	699
Ile	Tyr	Gly	Lys	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	
				225					230				
CGA	TTC	TCT	GGC	TCC	AGC	TCA	GGA	AAC	ACA	GCT	TCC	TTG	738
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	
		235				240					245		
ACC	ATC	ACT	GGG	GCT	CAG	GCG	GAA	GAT	GAG	GCT	GAC	TAT	777
Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	
			250					255					
TAC	TGT	AAC	TCC	CGG	GAC	AGC	AGT	GGT	AAC	CAT	GTG	GTA	816
Tyr	Cys	Asn	Ser	Arg	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	His	Val	Val	
	260				265					270			

TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT GCG GCC 855
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala
275 280 285

GCA CAT CAT CAT CAC CAT CAC GGG GCC GCA GAA CAA AAA 894
Ala His His His His His His Gly Ala Ala Glu Gln Lys
290 295

CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA TAG 930
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
300 305 309

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- 5 (A) LONGITUD: 939 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) HEBRA: única
(D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No: 7:

ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TTT	GGA	GCC	TTT	TTT	36	
Met	Thr	Met	Ile	Thr	Pro	Ser	Phe	Gly	Ala	Phe	Phe		
1				5					10				
TTG	GAG	ATT	TTC	AAC	GTG	AAA	AAA	TTA	TTA	TTC	GCA	ATT	75
Leu	Glu	Ile	Phe	Asn	Val	Lys	Lys	Leu	Leu	Phe	Ala	Ile	
	15					20						25	
CCT	TTA	GTT	GTT	CCT	TTC	TAT	GCG	GCC	CAG	CCG	GCC	ATG	114
Pro	Leu	Val	Val	Pro	Phe	Tyr	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Met	
				30					35				
GCC	GGG	GTG	CAG	CTG	GTG	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	TTG	GTC	153
Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	
	40					45					50		
CAG	CCT	GGG	GGG	TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	192
Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	
			55					60					
GGA	TTC	ACC	TTT	AGT	AGC	TAT	TGG	ATG	AGC	TGG	GTC	CGC	231
Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	
65				70					75				
CAG	GCT	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTG	GCC	AAC	ATA	270
Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Asn	Ile	
		80					85					90	
AAG	CAA	GAT	GGA	AGT	GAG	AAA	TAC	TAT	GTG	GAC	TCT	GTG	309
Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	Glu	Lys	Tyr	Tyr	Val	Asp	Ser	Val	
				95					100				
AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAC	GCC	AAG	AAC	348
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	
	105					110					115		
TCA	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GCC	GAG	GAC	387
Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
			120					125					

ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	GAT	CTT	TTA	AAG	GTC	426
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Leu	Leu	Lys	Val	
130					135					140			
AAG	GGC	AGC	TCG	TCT	GGG	TGG	TTC	GAC	CCC	TGG	GGG	AGA	465
Lys	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Trp	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Arg	
		145				150						155	
GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCG	AGT	GGT	GGA	GGC	GGT	TCA	504
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
				160					165				
GGC	GGA	GGT	GGT	AGC	GGC	GGT	GGC	GGA	TCG	TCT	GAG	CTG	543
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Glu	Leu	
	170					175					180		
ACT	CAG	GAC	CCT	GCT	GTG	TCT	GTG	GCC	TTG	GGA	CAG	ACA	582
Thr	Gln	Asp	Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Leu	Gly	Gln	Thr	
			185					190					
GTC	AGG	ATC	ACA	TGC	CAA	GGA	GAC	AGC	CTC	AGA	AGC	TAT	621
Val	Arg	Ile	Thr	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu	Arg	Ser	Tyr	
	195				200					205			
TAT	GCA	AGC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	CCA	GGA	CAG	GCC	CCT	660
Tyr	Ala	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	
		210					215					220	
GTA	CTT	GTC	ATC	TAT	GGT	AAA	AAC	AAC	CGG	CCC	TCA	GGG	699
Val	Leu	Val	Ile	Tyr	Gly	Lys	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	
				225					230				
ATC	CCA	GAC	CGA	TTC	TCT	GGC	TCC	AGC	TCA	GGA	AAC	ACA	738
Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	
	235					240					245		
GCT	TCC	TTG	ACC	ATC	ACT	GGG	GCT	CAG	GCG	GAA	GAT	GAG	777
Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	
			250					255					
GCT	GAC	TAT	TAC	TGT	AAC	TCC	CGG	GAC	AGC	AGT	GGT	AAC	816
Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Ser	Arg	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	
	260				265					270			
CAT	GTG	GTA	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	CTG	ACC	GTC	CTA	855
His	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	
		275					280					285	
GGT	GCG	GCC	GCA	CAT	CAT	CAT	CAC	CAT	CAC	GGG	GCC	GCA	894
Gly	Ala	Ala	Ala	His	His	His	His	His	His	Gly	Ala	Ala	
				290					295				
GAA	CAA	AAA	CTC	ATC	TCA	GAA	GAG	GAT	CTG	AAT	GGG	GCC	933
Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	
	300					305					310		
GCA	TAG												
Ala													
312													

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 8:
(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

5

(A) LONGITUD: 933 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: única
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No: 8:

ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TTT	GGA	GCC	TTT	TTT	36	
Met	Thr	Met	Ile	Thr	Pro	Ser	Phe	Gly	Ala	Phe	Phe		
1				5					10				
TTG	GAG	ATT	TTC	AAC	GTG	AAA	AAA	TTA	TTA	TTC	GCA	ATT	75
Leu	Glu	Ile	Phe	Asn	Val	Lys	Lys	Leu	Leu	Phe	Ala	Ile	
	15					20						25	
CCT	TTA	GTT	GTT	CCT	TTC	TAT	GCG	GCC	CAG	CCG	GCC	ATG	114
Pro	Leu	Val	Val	Pro	Phe	Tyr	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Met	
				30					35				
GCC	CAG	GTG	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GGA	GGC	GTG	GTC	153
Ala	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	
	40					45					50		
CAG	CCT	GGG	CGG	TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCT	TCT	192
Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	
			55					60					
GGG	TTC	ATT	TTC	AGT	AGT	TAT	GGG	ATG	CAC	TGG	GTC	CGC	231
Gly	Phe	Ile	Phe	Ser	Ser	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	
	65				70					75			
CAG	GCT	CCA	GGC	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTG	GCA	GGT	ATT	270
Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Gly	Ile	
		80					85					90	
TTT	TAT	GAT	GGA	GGT	AAT	AAA	TAC	TAT	GCA	GAC	TCC	GTG	309
Phe	Tyr	Asp	Gly	Gly	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
				95					100				
AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAT	TCC	AAG	AAC	348
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	
	105					110					115		
ACG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GCT	GAG	GAC	387
Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
			120					125					
ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	GAT	AGG	GGC	TAC	TAC	426
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Arg	Gly	Tyr	Tyr	
	130				135					140			
TAC	ATG	GAC	GTC	TGG	GGC	AAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	465
Tyr	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Lys	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	
		145				150						155	
TCC	TCA	GGT	GGA	GGC	GGT	TCA	GGC	GGA	GGT	GGC	TCT	GGC	504
Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
				160					165				
GGT	GGC	GGA	TCG	CAG	TCT	GTG	TTG	ACG	CAG	CCG	CCC	TCA	543
Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	
	170					175					180		

GTG	TCT	GGG	GCC	CCA	GGA	CAG	AGG	GTC	ACC	ATC	TCC	TGC	582
Val	Ser	Gly	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	
			185					190					
ACT	GGG	AGA	AGC	TCC	AAC	ATC	GGG	GCA	GGT	CAT	GAT	GTA	621
Thr	Gly	Arg	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ala	Gly	His	Asp	Val	
195					200					205			
CAC	TGG	TAC	CAG	CAA	CTT	CCA	GGA	ACA	GCC	CCC	AAA	CTC	660
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	
		210					215					220	
CTC	ATC	TAT	GAT	GAC	AGC	AAT	CGG	CCC	TCA	GGG	GTC	CCT	699
Leu	Ile	Tyr	Asp	Asp	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	
				225					230				
GAC	CGA	TTC	TCT	GGC	TCC	AGG	TCT	GGC	ACC	TCA	GCC	TCC	738
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	
	235					240					245		
CTG	GCC	ATC	ACT	GGG	CTC	CAG	GCT	GAA	GAT	GAG	GCT	GAT	777
Leu	Ala	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	
			250					255					
TAT	TAC	TGC	CAG	TCC	TAT	GAC	AGC	AGC	CTG	AGG	GGT	TCG	816
Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Tyr	Asp	Ser	Ser	Leu	Arg	Gly	Ser	
260					265					270			
GTA	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	GTC	ACT	GTC	CTA	GGT	GCG	855
Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Ala	
		275					280					285	
GCC	GCA	CAT	CAT	CAT	CAC	CAT	CAC	GGG	GCC	GCA	GAA	CAA	894
Ala	Ala	His	His	His	His	His	His	Gly	Ala	Ala	Glu	Gln	
				290					295				
AAA	CTC	ATC	TCA	GAA	GAG	GAT	CTG	AAT	GGG	GCC	GCA		930
Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala		
	300					305					310		
TAG 933													

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

5

- (A) LONGITUD: 309 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 9:

ES 2 368 654 T3

Met	Thr	Met	Ile	Thr	Pro	Ser	Phe	Gly	Ala	Phe	Phe	Leu	Glu	Ile
1				5					10					15
Phe	Asn	Val	Lys	Lys	Leu	Leu	Phe	Ala	Ile	Pro	Leu	Val	Val	Pro
				20					25					30
Phe	Tyr	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln
				35					40					45
Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Glu	Arg	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser
				50					55					60

Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	Gly	Met	Ser	Trp	65	70	75
Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Gly	Ile	80	85	90
Asn	Trp	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	95	100	105
Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	110	115	120
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	125	130	135
Ala	Lys	Ile	Leu	Gly	Ala	Gly	Arg	Gly	Trp	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp	140	145	150
Gly	Lys	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	155	160	165
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Glu	Leu	Thr	Gln	170	175	180
Asp	Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Leu	Gly	Gln	Thr	Val	Arg	Ile	Thr	185	190	195
Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu	Arg	Ser	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Tyr	Gln	200	205	210
Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr	Gly	Lys	Asn	215	220	225
Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	230	235	240
Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	Gln	Ala	Glu	Asp	245	250	255
Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Ser	Arg	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	His	260	265	270
Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Ala	Ala	275	280	285
Ala	His	His	His	His	His	His	Gly	Ala	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	290	295	300
Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala							305	309	

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

5

(A) LONGITUD: 312 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No:

Met	Thr	Met	Ile	Thr	Pro	Ser	Phe	Gly	Ala	Phe	Phe	Leu	Glu	Ile
1				5					10					15

10:

Phe	Asn	Val	Lys	Lys	Leu	Leu	Phe	Ala	Ile	Pro	Leu	Val	Val	Pro
				20					25					30
Phe	Tyr	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Val	Glu
				35					40					45
Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser
				50					55					60
Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp	Met	Ser	Trp
				65					70					75
Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Asn	Ile
				80					85					90
Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	Glu	Lys	Tyr	Tyr	Val	Asp	Ser	Val	Lys	Gly
				95					100					105
Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu
				110					115					120
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				125					130					135
Ala	Arg	Asp	Leu	Leu	Lys	Val	Lys	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Trp	Phe
				140					145					150
Asp	Pro	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly
				155					160					165
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Glu
				170					175					180
Leu	Thr	Gln	Asp	Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Leu	Gly	Gln	Thr	Val
				185					190					195
Arg	Ile	Thr	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu	Arg	Ser	Tyr	Tyr	Ala	Ser
				200					205					210
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
				215					220					225
Gly	Lys	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly
				230					235					240
Ser	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	Gln
				245					250					255
Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Ser	Arg	Asp	Ser	Ser
				260					265					270
Gly	Asn	His	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu
				275					280					285
Gly	Ala	Ala	Ala	His	His	His	His	His	His	Gly	Ala	Ala	Glu	Gln
				290					295					300
Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala			
				305					310					312

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 310 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No: 11:

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

Ala Ala His His His His His His Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu
290 295 300

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
305 310

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- 5 (A) LONGITUD: 23 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) HEBRA: única
(D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No: 12:

AGCGGATAAC AATTTACAC AGG 23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- 15 (A) LONGITUD: 21 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) HEBRA: única
20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No: 13:

GTCGTCTTTC CAGACGGTAG T 21

25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- 30 (A) LONGITUD: 12 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No: 14:

Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asp Leu
1 5 10 12

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Anticuerpo monoclonal para utilizar en un método de tratamiento, en el que el anticuerpo (a) se une al polipéptido Apo-2 que consiste en los residuos de aminoácidos 1 a 411 de la SEC ID No: 1 y (b) induce la apoptosis en por lo menos un tipo de células cancerosas de mamífero *in vivo* o *ex vivo* que expresa dicho polipéptido Apo-2.
- 10 2.- Anticuerpo monoclonal para utilizar en un método de tratamiento según la reivindicación 1, que se une a una secuencia de dominio extracelular de un polipéptido Apo-2 que consiste en los aminoácidos 54 a 182 de la SEC ID No: 1.
- 15 3.- Anticuerpo monoclonal para utilizar en un método de tratamiento según la reivindicación 1, que se une a una secuencia de dominio extracelular de un polipéptido Apo-2 que consiste en los aminoácidos 1 a 182 de la SEC ID No: 1.
- 20 4.- Anticuerpo monoclonal para utilizar en un método de tratamiento según la reivindicación 1 que (a) se une a la secuencia del dominio extracelular del polipéptido Apo-2 que consiste en los aminoácidos 54 a 182 de la SEC ID No: 1 y (b) induce la apoptosis en por lo menos un tipo de células cancerosas de mamífero *in vivo* o *ex vivo*.
- 25 5.- Anticuerpo monoclonal para utilizar en un método de tratamiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
- 6.- Anticuerpo monoclonal para utilizar en un método de tratamiento según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo está fusionado a una secuencia de aminoácidos heteróloga.
- 7.- Anticuerpo monoclonal para utilizar en un método de tratamiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- 8.- Anticuerpo monoclonal para utilizar en un método de tratamiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano.

1 CCACAGCGTC CGCATAAATC AGCACGCGC CGAGAACCC CGCAATCTCT GCGCCACAA AATACACGA CGATGCCCGA TCTACTTTAA GGGCTGAAAC
 GGGTGGCAG CCGTATTAG TCGTGGCCG GCCTCTGGG GCGTTAGAGA CCGGGGTGTT TTATGTGGCT GCTACGGGCT AGATGAAATT CCCGACTTTG

 101 CCACGGGCT GAGAGACTAT AAGAGCGTTC CCTACGCCA TGGAAACAAG GGGACAGAAC GCGCCGGCGG CTTCGGGGG CCGAAAAGG CACGGCCCG
 GTGCCCCGA CTCTCTGATA TTCTCGCAAG GGATGGCGGT ACCTTGTTGC CCCTGTCTTG CCGGGCCGCG GAAGCCCCG GGCCTTTTCC GTGCCGGTC
 1 M etGluGlnAr gGlyGlnAsn AlaProAlaA laSerGlyAl aArgLysArg HisGlyProGly
 201 GACCCAGGGA GCGCGGGGA GCCAGGCTG GCCTCGGGT CCCAAGACC CTGTGCTCG GTTCTGCGG GGTCTGCTG TTGCTCTCAG CTGAGTCTGC
 CTGGGTCCCT CCGCGCCCT CGTCCGGAC CCGAGGCCA GGGTCTCTG GAACACGAGC AACAGCGCG CCAGGACGAC AACAGAGTC GACTCAGACG
 22 ProArgI uAlaArgGly AlaArgProG lyLeuArgVa lProLysThr LeuValLeuV alValAlaAl aValLeuLeu LeuValSerA laGluSerAla

 301 TCTGATCACC CAACAAGACC TAGTCCCCA GCAGAGAGC GCGCCACAAC AAAAGAGGTC CAGCCCCCTCA GAGGATTGT GTCCACCTGG ACACCATATC
 AGACTAGTGG GTTGTCTGG ATCGAGGGT CGTCTCTCG CGGGTGTG TTCTCTCCAG GTCTGGGAGT CTCCCTAACA CAGGTGACC TGTGGTATAG
 55 LeuIleThr GlnGlnAspL euAlaProG l nGlnArgAla AlaProGlnG l nLysArgSe rSerProSer GluGlyLeuC ysProProG l yHisHisIle

 401 TCAGAAGACG GTAGAGATTG CATCTCTGC AAATATGGAC AGGACTATAG CACTCAGTGG ANTACCTCC TTTTCTGCTT GCGTGCACC AGGTGTGATT
 AGTCTTCTGC CATCTCTAAC GTAGAGAGC TTATACCTG TCCTGATATC GTAGTGACC TTACTGGAGG AAAAGAGAA CCGACGTGG TCCACACTAA
 88 SerGluAspG lyArgAspCy sIleSerCys LysTyrGlyG l nAspTyrSe rThrHisTrp AsnAspLeuL euPheCysLe uArgCysThr ArgCysAspSer

 501 CAGGTGAAGT GGAGCTAAGT CCCTGCACCA CGACAGAAA CACAGTGTGT CAGTGGGAG AAGGCACCTT CCGGGAAGAA GATTCTCCTG AGATGTGCCG
 GTCCACTTCA CCTCGATTCA GGGACGTGGT GCTGCTCTTT GTGTACACA GTACCGCTTC TTCCGTGGAA GCGCTTCTT CTAAGAGGAC TCTACACGGC
 122 GlyGluVa lGluLeuSer ProCysThrT hrThrArgAs nThrValCys GlnCysGluG luGlyThrPh eArgGluGlu AspSerProG luMetCysArg

 601 GAAGTCCGC ACAGGGTGTG CCAGAGGGAT GGTCAGGTC GGTGATTGTA CACCCTGGAG TGACATCGAA TGTGTCCACA AAGAATCAGG CATCATCATA
 CTTACACGGC GTGCCACAG GGTCTCCCTA CCAGTTCCAG CCCTAACAT GTGGACCTC ACTGTAGCTT ACACAGGTGT TTCTTAGTCC GTAGTAGTAT
 155 LysCysArg ThrGlyCysP roArgGlyMe tValLysVal GlyAspCysT hrProTrpSe rAspIleGlu CysValHisL ysGluSerG l yIleIleIle

 701 GGAGTCACAG TTGCAGCGT AGTCTTGATT GTGGTGTGT TTGTTTGAA GTCTTTACTG TGAAGAAG TCCTTCTCTA CCTGAAAGGC ATCTGCTCAG
 CCTCAGTGTG AACGTGGCA TCAGAACTAA CACCCACACA CACCAAGCTT CAGAAATGAC ACCTTCTTTC AGGAAGAAT GGACTTTCCG TAGACGAGTC
 188 GlyWalThrV alAlaAlaVa lValIleIle ValAlaValP heValCysL ys sSerLeuLeu TrpLysLysV alLeuProTy rLeuLysGly IleCysSerGly

Figura 1A

801 GTGGTGGTGG GGACCCCTGAG CGTGTGGACA GAAGCTCACA ACGACCTGGG GCTGAGGACA ATGTCTCTCAA TGAGATCGTG AGTATCTTTGC AGCCCCACCA
 CACCACCACC CCTGGGACTC GCACACCTGT CTTCGAGTGT TGCCTGGACCC CGACTCTCTGT TACAGGAGTT ACTCTAGCAC TCATAGAACG TCGGGTGGGT
 222 GlyGlyGly yAspProGlu ArgValAspA rgSerSerGln nArgProGly AlaGluAspA snValLeuAs nGluIleVal SerIleLeuG InProThrGln
 901 GGTCCTCTGAG CAGGAAATGG AAGTCCAGGA GCCAGCAGAG CCAACAGGTG TCAACATGTT GTCCCCCGGG GAGTCAGAGC ATCTGCTGGA ACCGGCAGAA
 CCAGGACTC GTCCTTTACC TTCAGGTCTT CCGTGTCTC GGTGTGCCAC AGTTGTACAA CAGGGGGCCC CTCAGTCTCG TAGACGACCT TGGCCGTCTT
 255 ValProGlu GlnGluMetG luValGlnGlu uProAlaGlu ProThrGlyV alAsnMetLe uSerProGly GluSerGluH isLeuLeuGlu uProAlaGlu
 1001 GCTGAAAGGT CTCAGAGGAG GAGGTGCTG GTTCCAGCAA ATGAAGGTGA TCCCACTGAG ACTCTGAGAC AGTGCTTCCA TGACTTTTCCA GACTTGTGTC
 CGACTTTCCA GAGTCTCCTC CTCCGACGAC CAAGGTCTGT TACTTCCACT AGGTGACTC TGAGACTCTG TCACGAAGCT ACTGAAACGT CTCGAACACG
 288 AlaGluArgS erGlnArgAr gArgLeuLeu ValProAlaA snGluGlyAs pProThrGlu ThrLeuArgG InCysPheAs pAspPheAla AspLeuValPro
 1101 CCTTTGACTC CTGGGAGCCG CTCATGAGGA AGTTGGGCT CATGGACAAT GAGATAAAGG TGGCTAAAGC TGAGGCAGCG GCCACAGGG ACACCTTGTA
 GGAAACTGAG GACCTCGGC GAGTACTCTT TCAACCCGA GTACTCTGTA CTCTATTTC ACCGATTTCG ACTCCGTCG CCGGTGTCCC TGTGGAACAT
 322 PheAspSe rTrpGluPro LeuMetArgL ysLeuGlyLe uMetAspAsn GluIleIysV alAlaLysAl aGluAlaAla GlyHisArgA spThrLeuTyr
 1201 CACGATGCTG ATAAAGTGGG TCAACAAAC CGGCGGAGAT GCCTCTGTCC ACACCTCTCT GATGCCCTTG GAGACGCTGG GAGAGAGACT TGCCAAGCAG
 GTGCTACGAC TATTTCACCC AGTTGTTTTG GCCGCTCTA CGGAGACAGG TGTGGGACGA CCTACGGAC CTCTGCGACC CTCTCTCTGA ACGTTTCGTC
 355 ThrMetLeu IleLysTrpV alAsnLysTh rGlyArgAsp AlaSerValH isThrLeuLe uAspAlaLeu GluThrLeuG lyGluArgLe uAlaLysGln
 1301 AAGATTGAGG ACCACTTGTG GAGCTCTGGA AAGTTCTATGT ATCTAGAAGG TAATGCAGAC TCTGCCWTGT CCTAAGTGTG ATTCTCTTCA GGAAGTGAGA
 TTCTAACTCC TGGTGAACAA CTCGAGACCT TTCAAGTACA TAGATCTTCC ATTACGCTTG AGACGGACGA GGATTCACAC TAAGAGAGAT CCTTCACCTT
 388 LysIleGluA spHisLeuLe uSerSerGly LysPheMetT yrLeuGluGlu yAsnAlaAsp SerAlaXaaS erOC*
 1401 CCTTCCCTGG TTTTACCTTTT TTCTGGAAAA AGCCCAACTG GACTCCAGTC AGTAGGAAAG TGCCACAATT GTCACATGAC CGGTACTGGA AGAACTCTC
 GGAAGGGACC AAATGGAAAA AAGACCTTTT TCGGGTTGAC CTGAGGTGAC TCATCTTTTC ACGGTGTAA CAGTGTACTG GCCATGACCT TCCTTGAGAG
 1501 CCATCCAACA TCACCCAGTG GATGGAACAT CCTCTAATTT TTCACTGCAC TTGGCATTTAT TTTTATTAAG TCAATGTGAT AATAAGGACA CTATGGAAT
 GGTAGGTTGT AGTGGGTAC CTACCTTGTA GGACATTGAA AAGTGACGTG AACCGTAATA AAAATATTTCG ACTTACACTA TTATTCTCTGT GATACCTTTA

Figura 1B

1601 GTCTGGATCA TTCCGTTTGT GCGTACTTGT AGATTGGTT TGGGATGTCA TTGTTTTCAC AGCACTTTTT TATCTAATG TAAATGCTTT ATTTATTTAT
CAGACCTAGT AAGGCAACA CGCATGAAC TCTAAACCA ACCCTACAGT AACAAAAGTG TCGTGAATAA ATAGATTAC ATTTACGAAA TAAATAAATA

1701 TTGGGCTACA TTGTAAGATC CATCTACAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA GCGCGCCCG ACTCTAGAGT CGACCTGCAG AAGCTTGCC GCCATGGCC
AACCCGATGT AACATTCTAG GTAGATGTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT CCGCGCGCG TGAGATCTCA GCTGACGTC TTCGAACCG CGGTACCGG

--- . -

Figura 1C

1 MEQRGQNA PAASGAR KRGHPGPREARGAR PGLRVPKTLVLVAAVLLLVSAESALITQQD
61 LAPQRAAPQOKRSSPSEGLCPPGHHISEDGRDCISCKYQDYSTHWNLLFLCRCTRCD
121 SGEVELSPCTTTRNTVCQCEGTFREEDSPENCRKCRGTGCPGMVKVGDCTPWSDIECVH
181 KESGIIIGTVAAVVLIVAVFCKSLMKKVLPLYKGICSGGGDPERVDRSSQRPGEAD
241 NVLNEIVSILQPTQVPEQEMEVEQEPAEPTGVNMLSPGESEHLLPEAEASQRRLVPA
301 NEGDPETLRQCFDADFADLPVFDSEWELMRKLGMDNEIKVAKAEAAAGHRDLYTMLIKW
361 VNKTGRDASVHTLLDALETGLERLAKQKIEDHLLSSGKFMYLEGNADSALS

Figura 2A

Apo2	FADLVPPFDSWEPLMRKLGLM	DNEIKVAKAEA	--GHRDTL
DR4	FANIVPFDSWDQLMRQL	LTKNEIDVVRA	CTA--GPGDAL
Apo3/DR3	VMDAVPARRWKKEFVRT	LGLREAEIEAVVE	EIGR--FRDQQ
TNFR1	VVENVPPLRWKKEFVRR	LGLSDHEIDRLEL	QNGR--CLREAQ
Fas/Apo1	IAGVMTLSQVKGEVRKNG	VNEAKIDEIKNDN	VQDTAEQKV

Apo2	YTMLIKWVNKTGRD	ASVHTLLDALET	LGERLAKQKIED
DR4	YAMLKWKVNKTGRN	ASHTLLDALERM	MEERHAKKIQD
Apo3/DR3	YEMLKRRWRQQQP	--AGLGAVYAALERM	GLDGCVEDLRS

Figura 2B

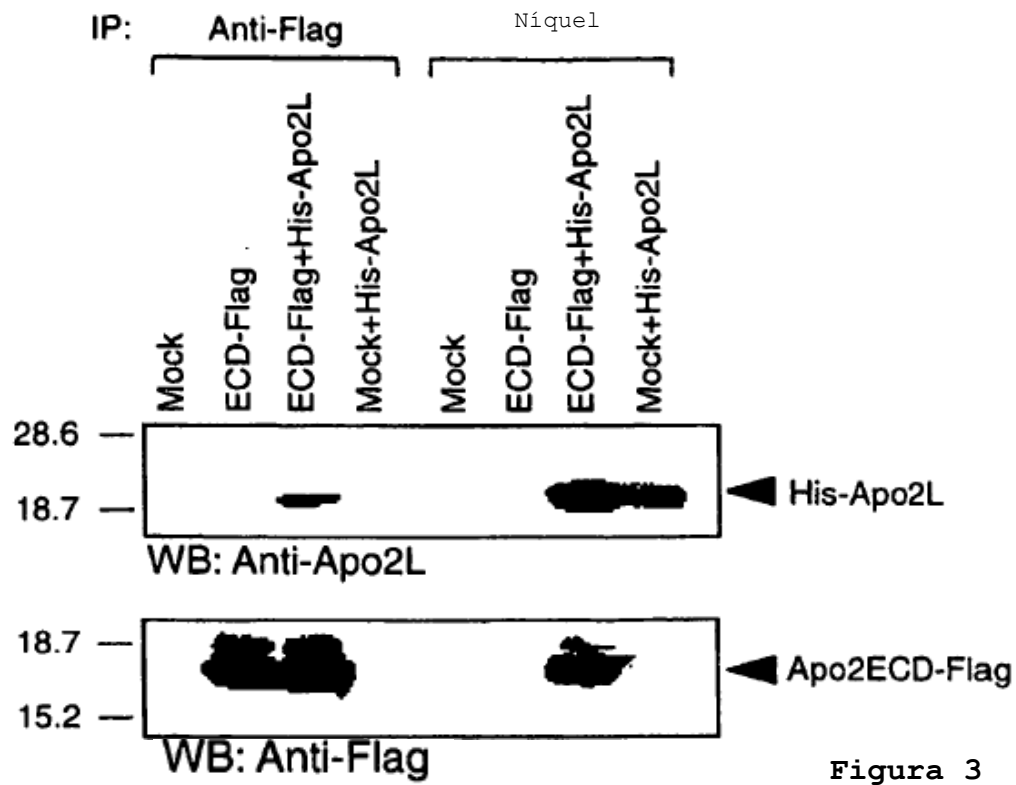


Figura 3

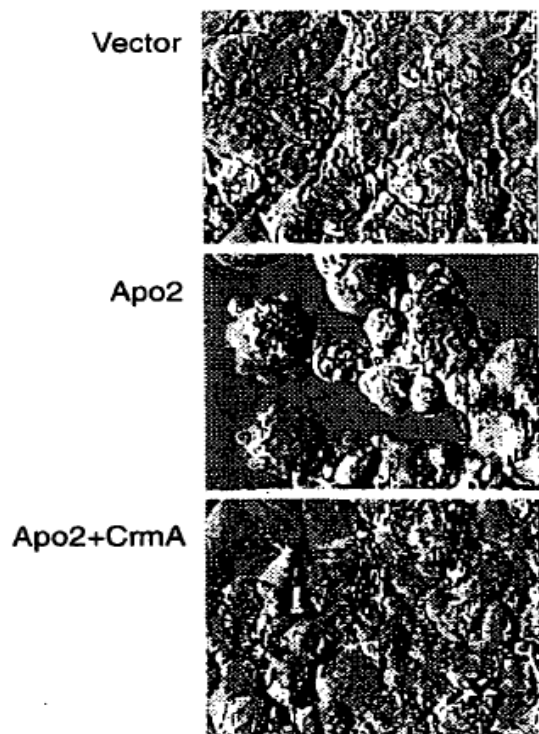


Figura 4A

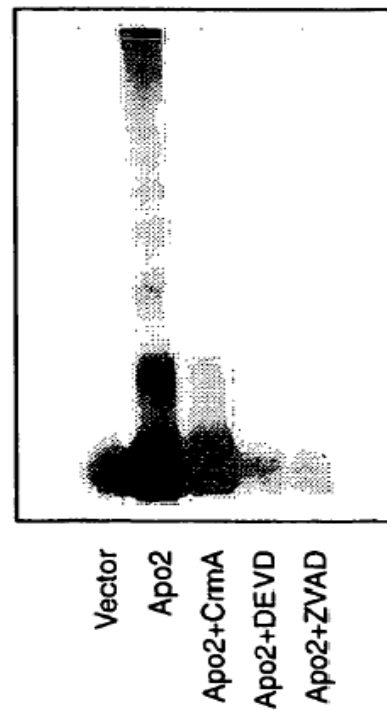


Figura 4B

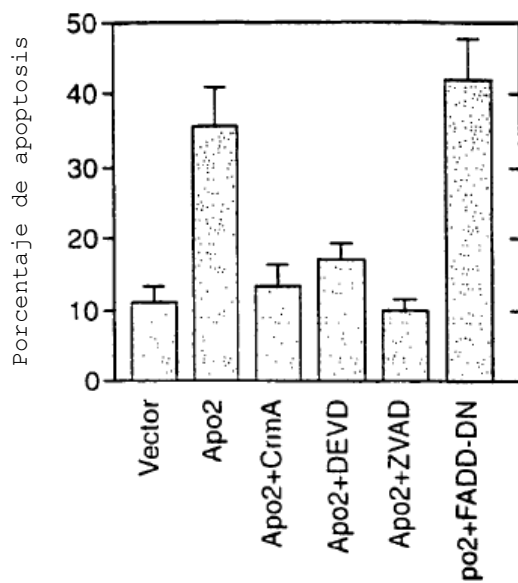


Figura 4C

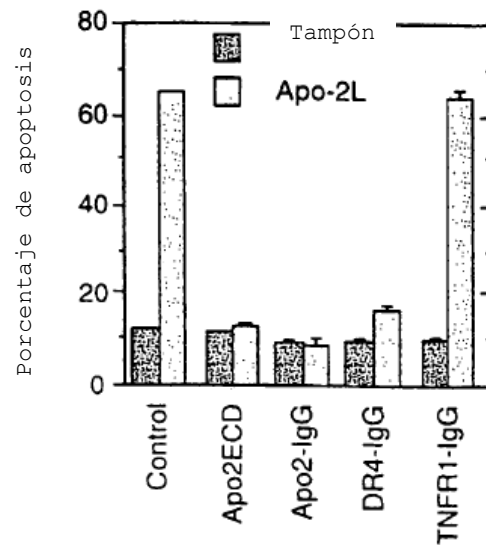


Figura 4D

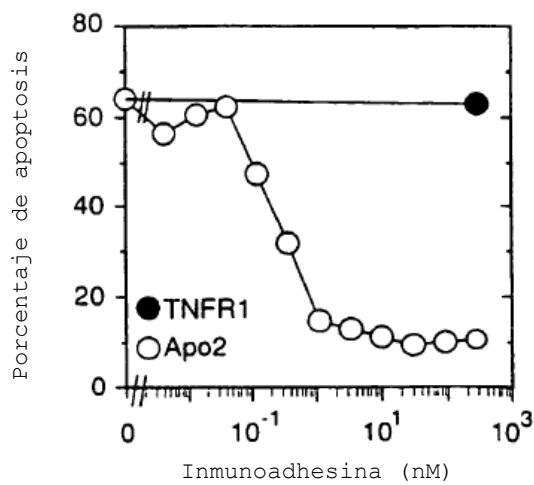


Figura 4E

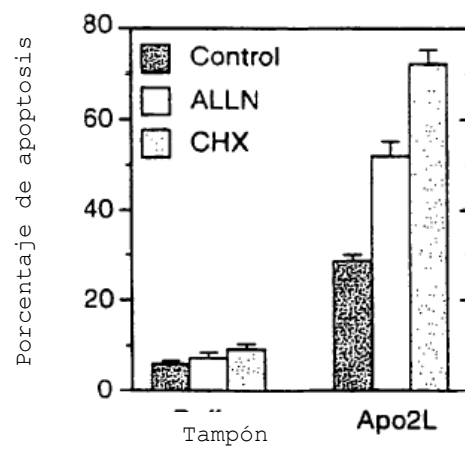


Figura 5C

Sonda no marcada	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sonda marcada	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anti-p65	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

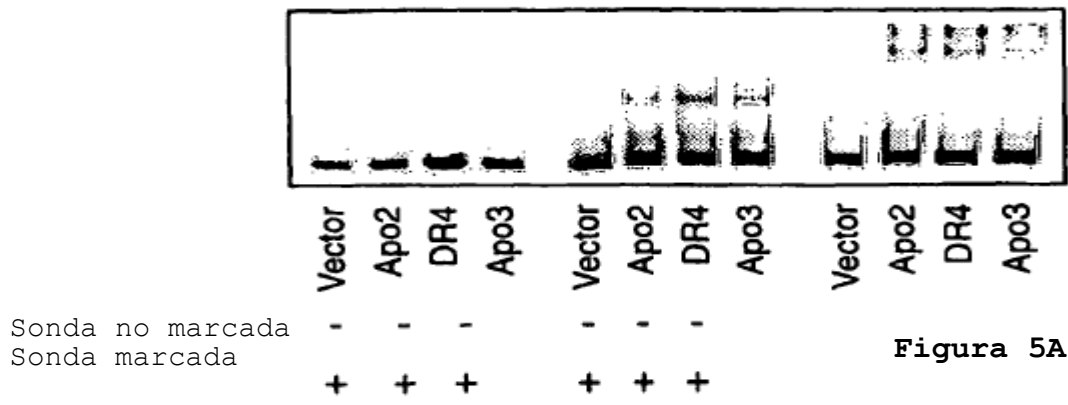


Figura 5A

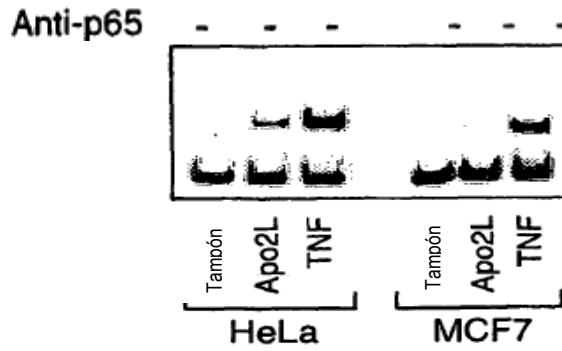


Figura 5B

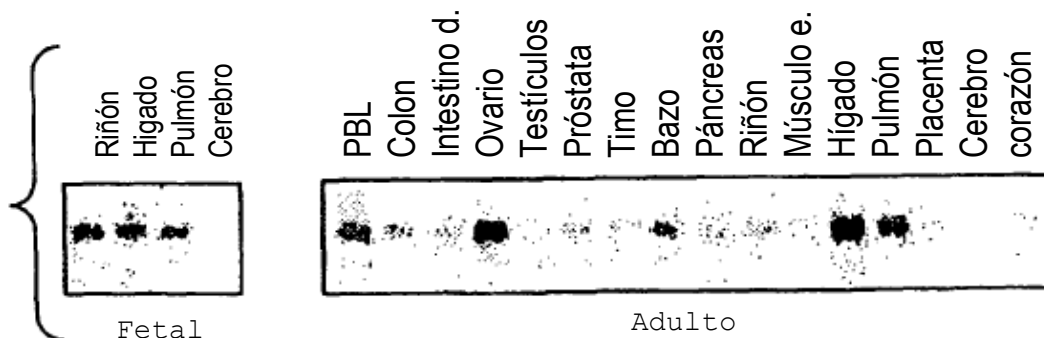


Figura 6A

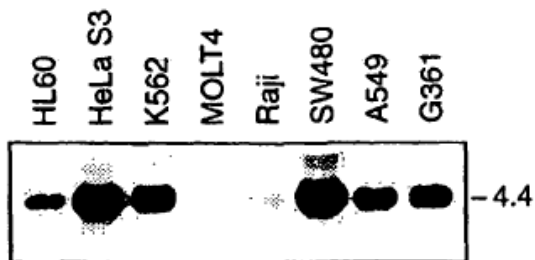


Figura 6B

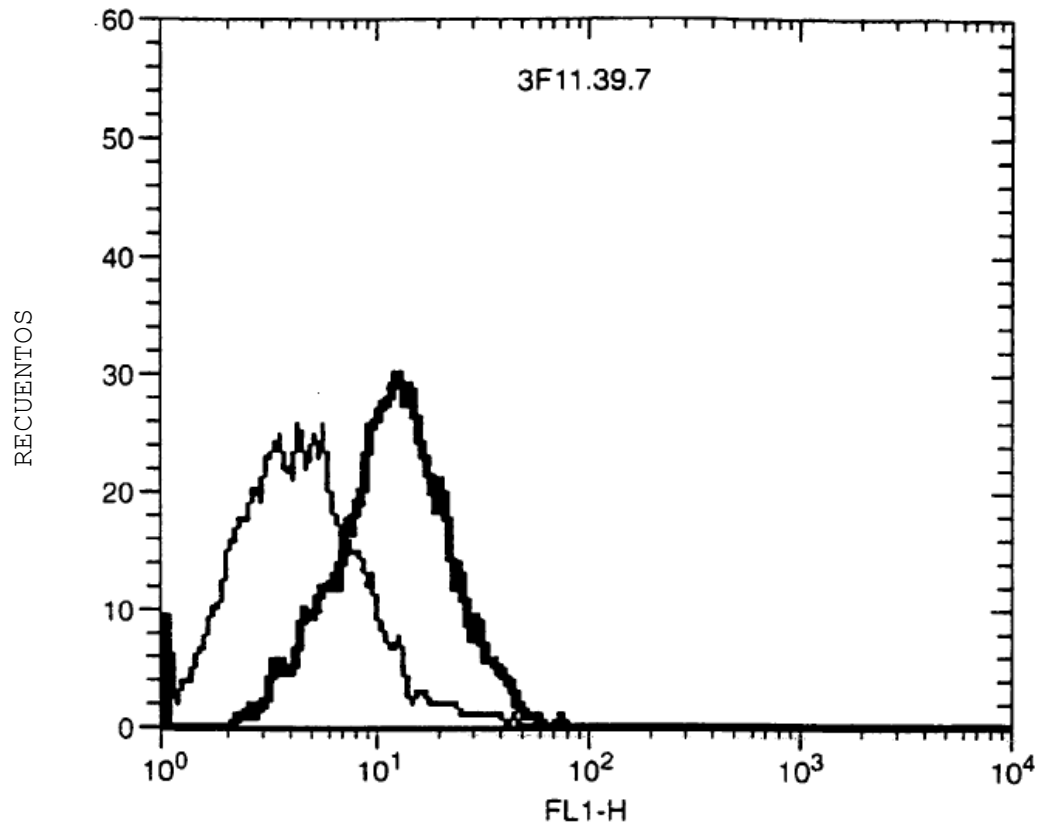


Figura 7

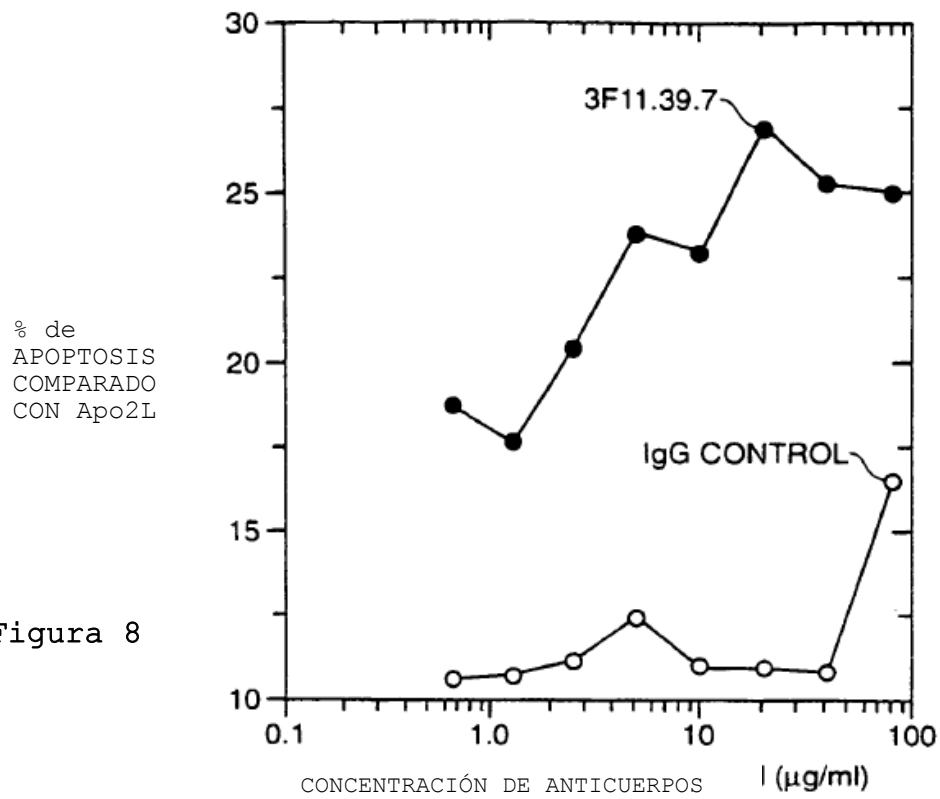
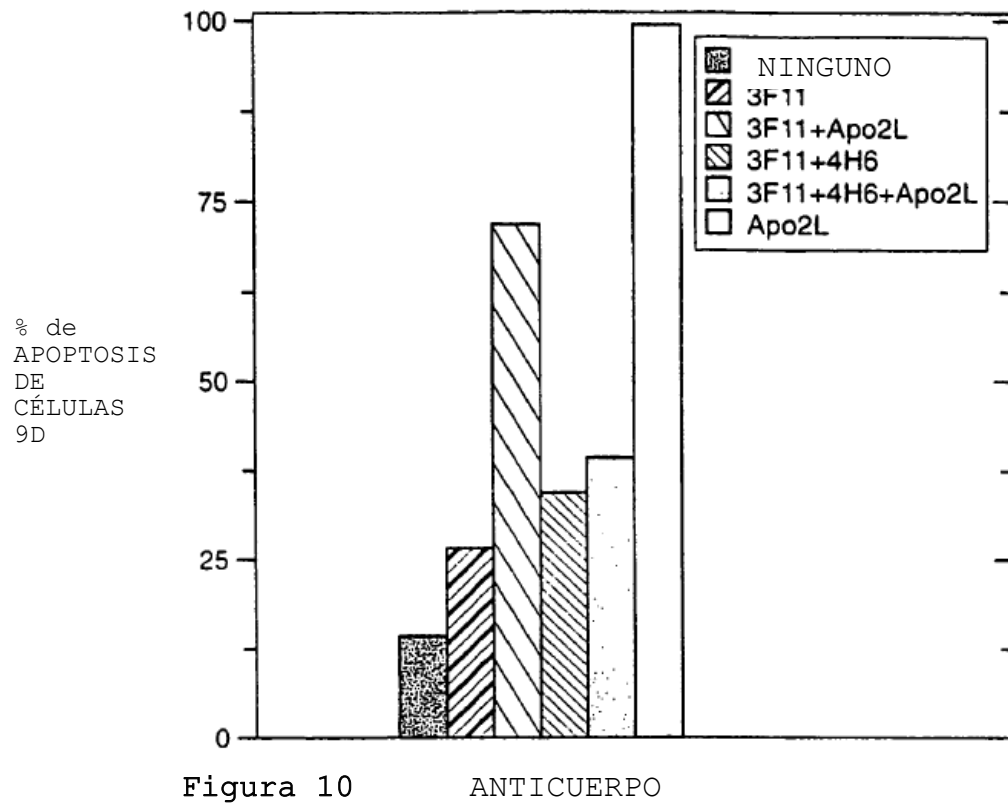
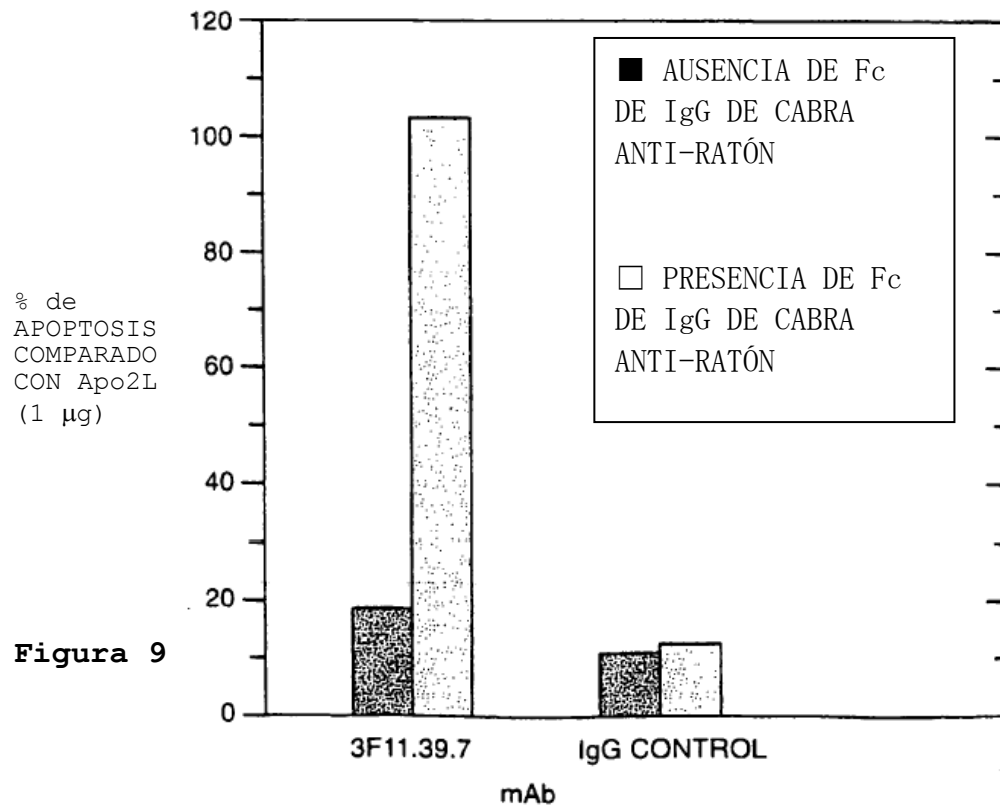
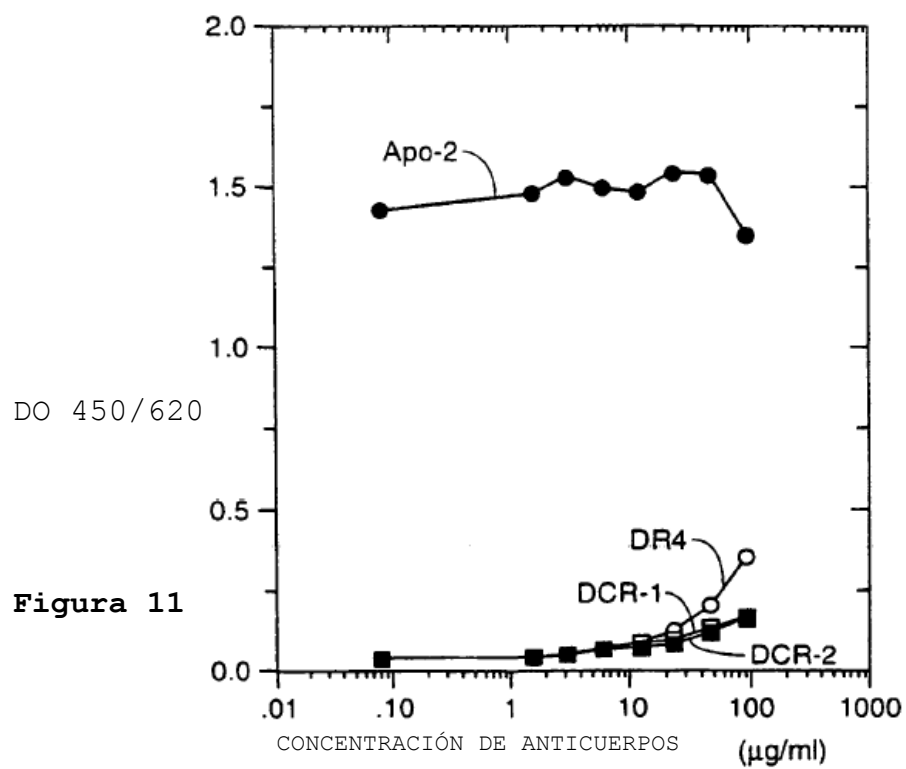


Figura 8





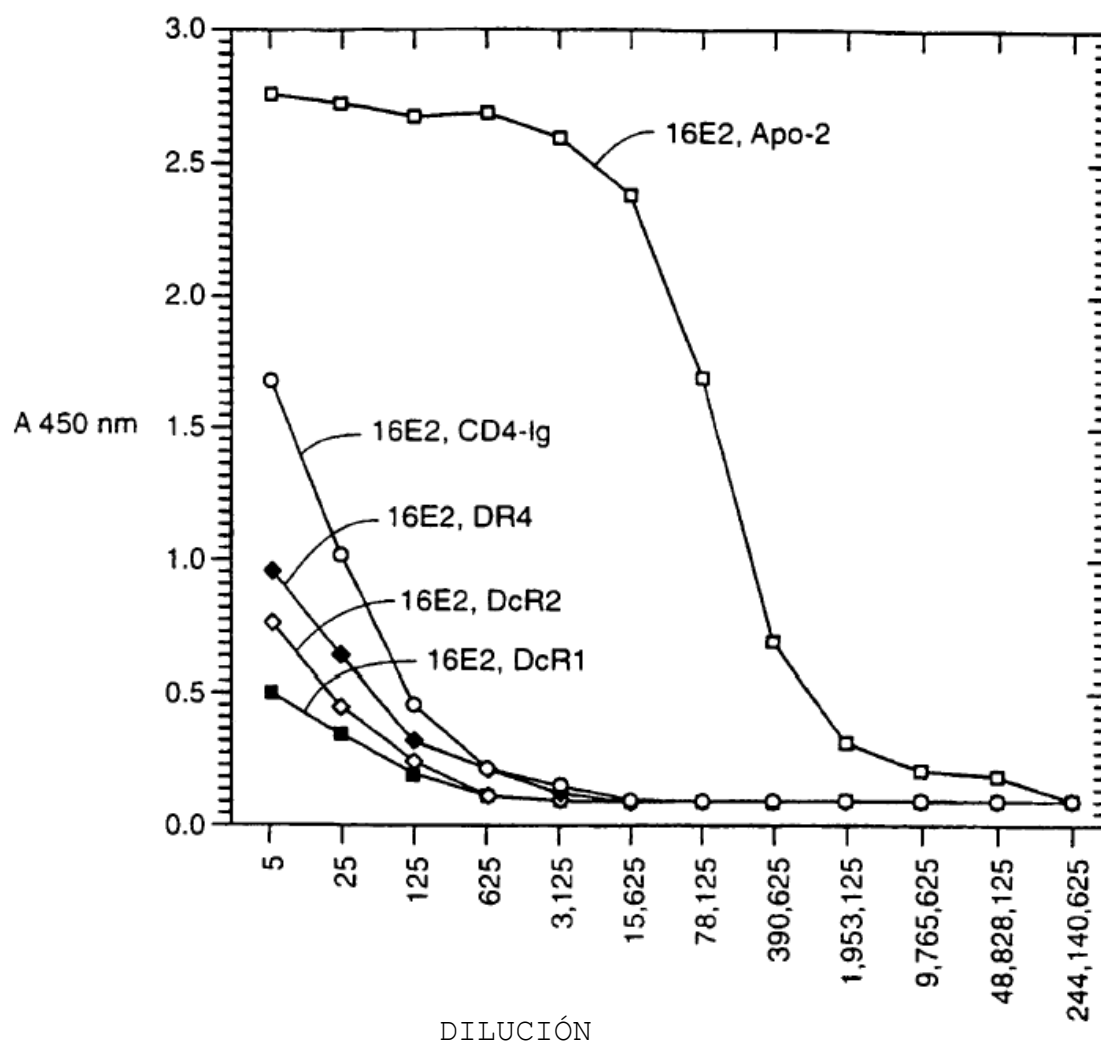


Figura 12A

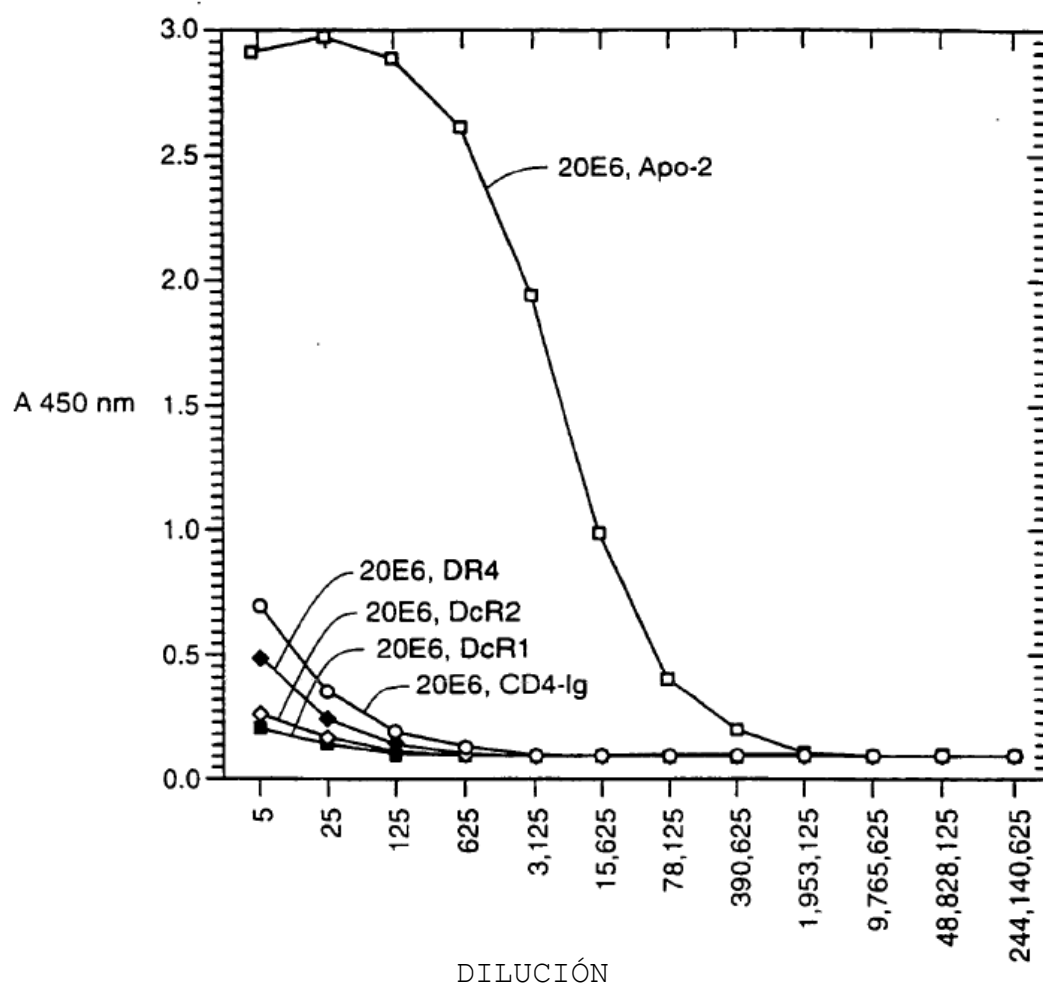


Figura 12B

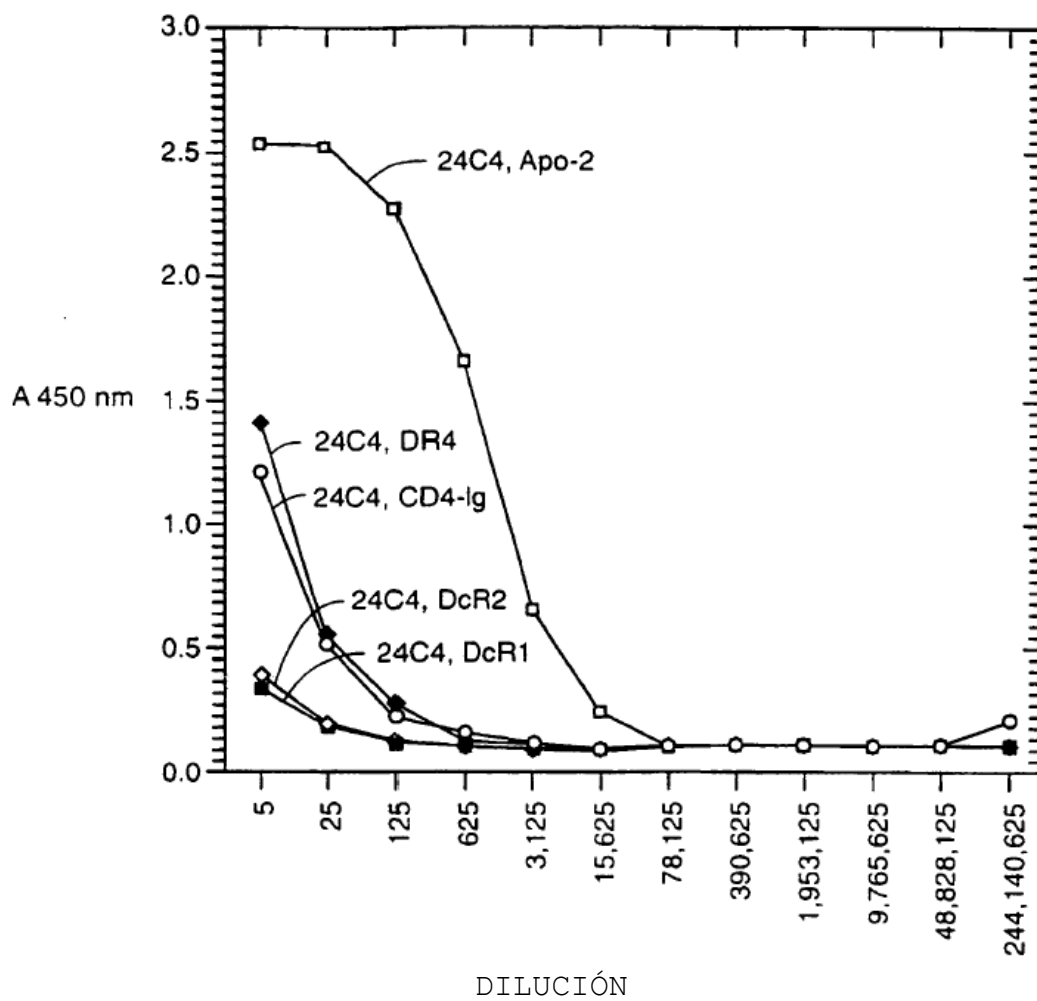


Figura 12C

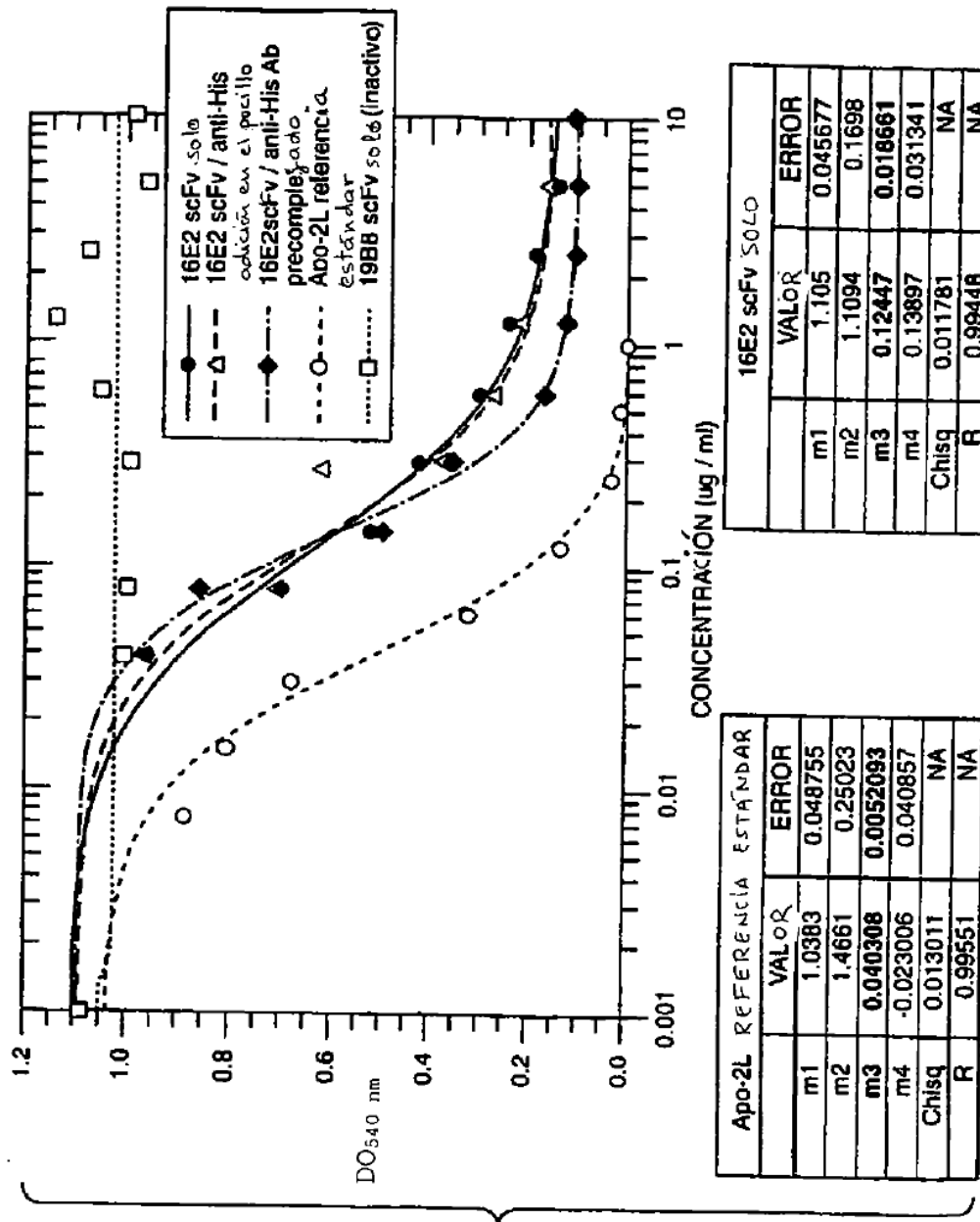


Figura 13A

Figura 13B

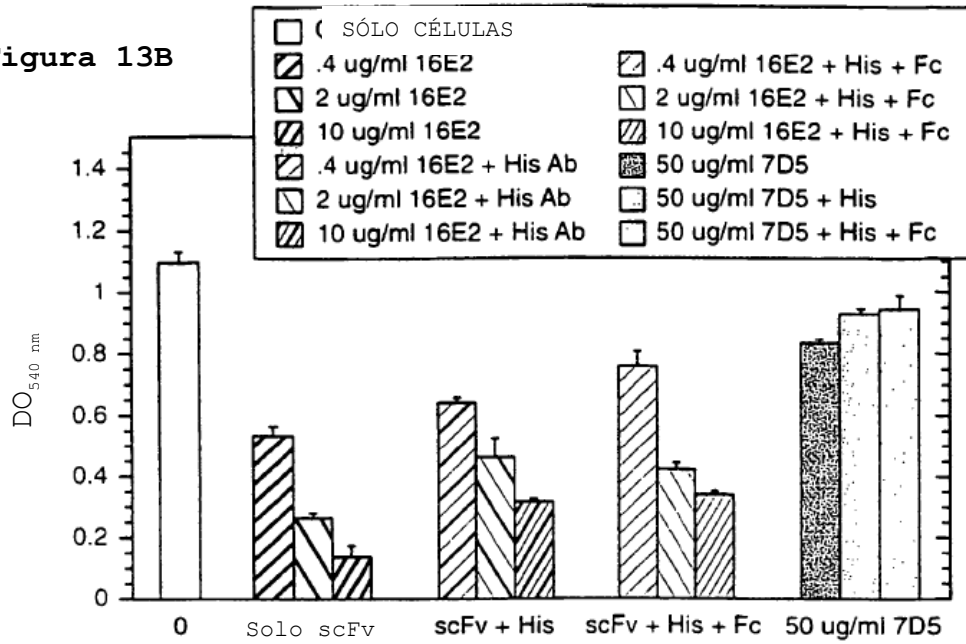
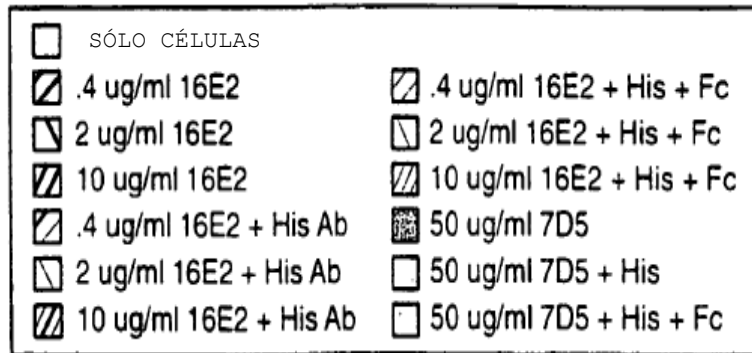
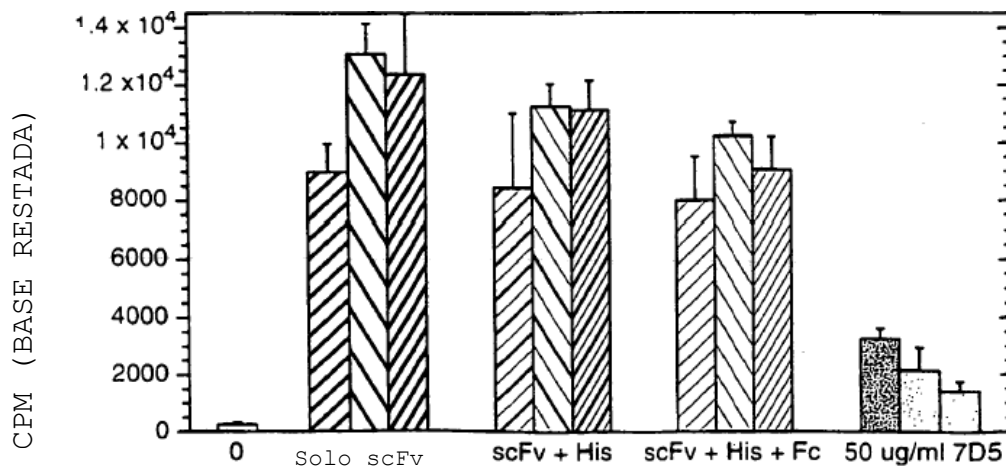


Figura 13C



5



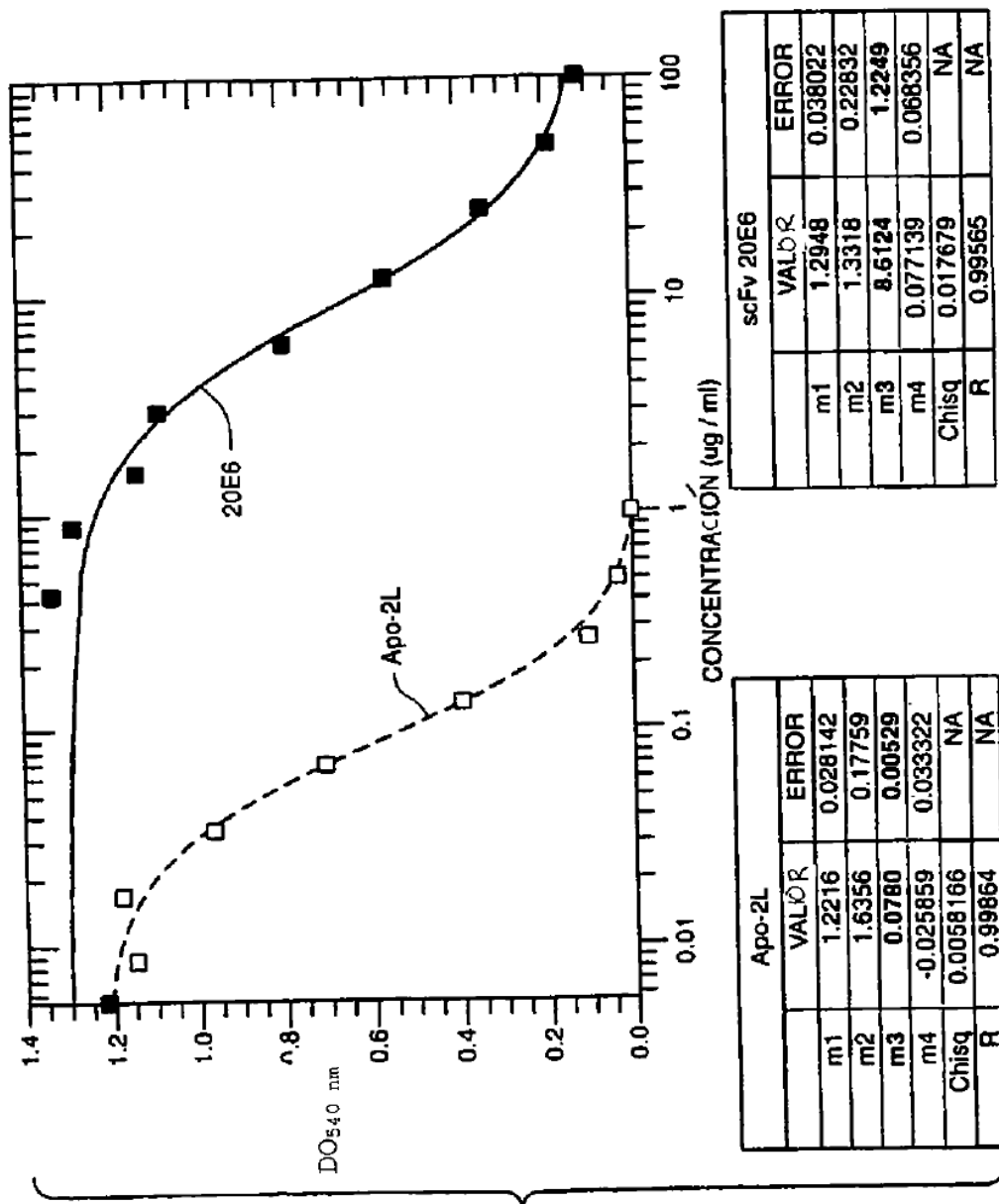


Figura 14A

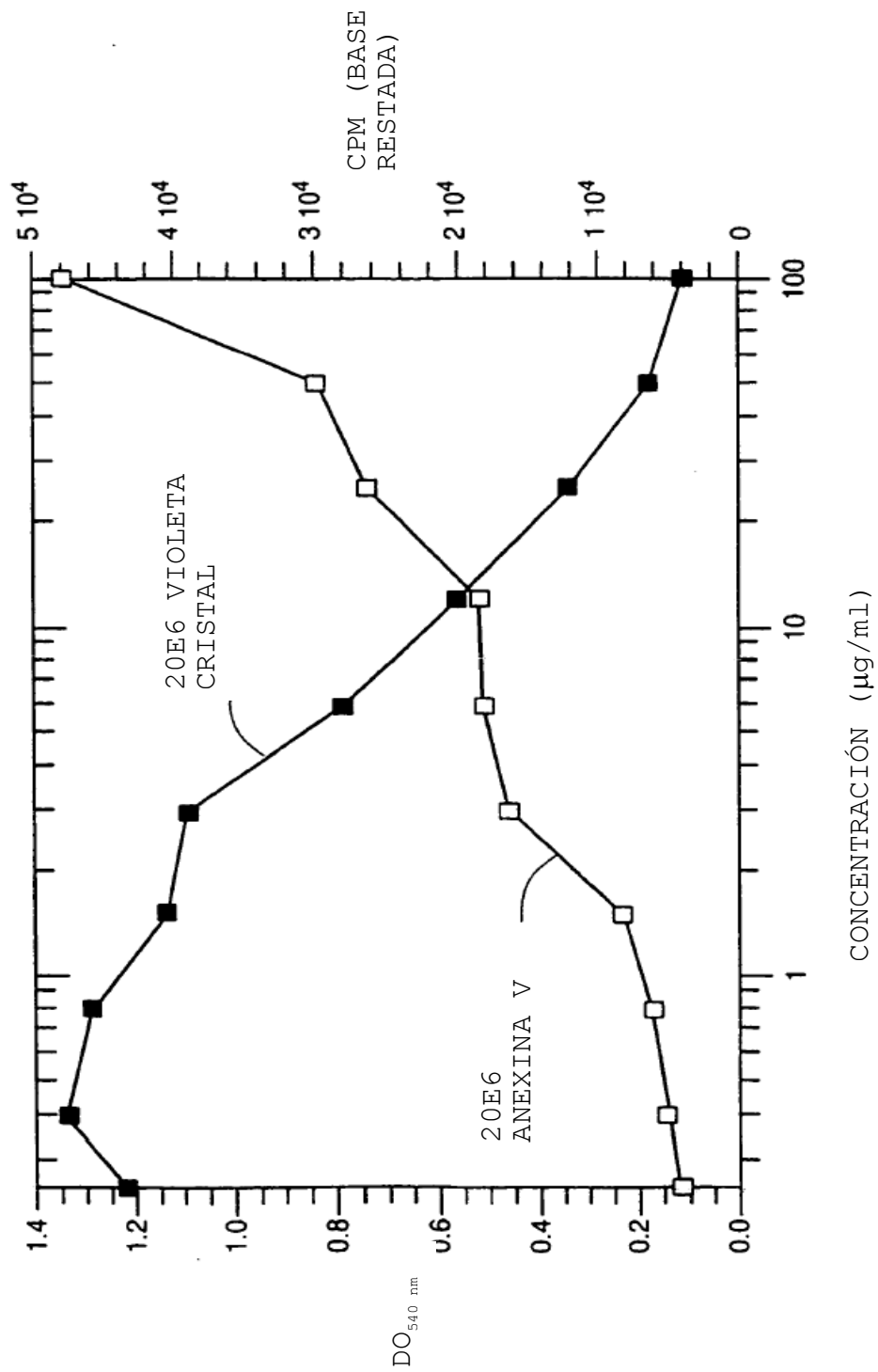


Figura 14B

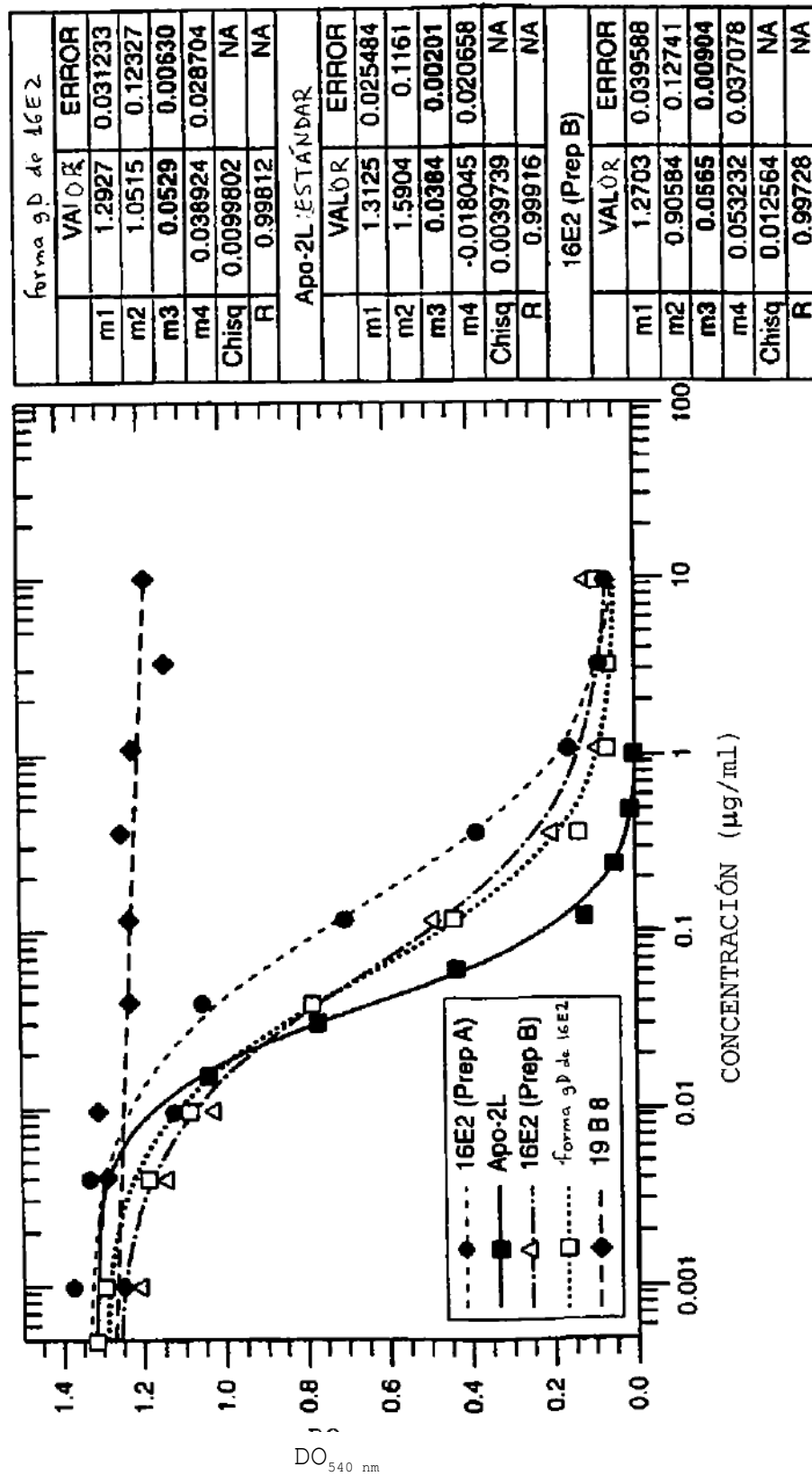


Figura 14C

```

ATGACCATGA TTACGCCAAG CTTTGGAGCC TTTT TTTTGG AGATTTTCAA 50
CGTGAAAAAA TTATTATTCG CAATTCCTTT AGTTGTTCTT TTCTATGCGG 100
CCCAGCCGGC CATGGCCGAG GTGCAGCTGG TGCAGTCTGG GGGAGGTGTG 150
GAACGGCCGG GGGGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTAC 200
CTTTGATGAT TATGGCATGA GCTGGGTCCG CCAAGCTCCA GGGGAAGGGGC 250
TGGAGTGGGT CTCTGGTATT AATTGGAATG GTGGTAGCAC AGGATATGCA 300
GACTCTGTGA AGGGCCGAGT CACCATCTCC AGAGACAACG CCAAGAACTC 350
CCTGTATCTG CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCCGTATATT 400
ACTGTGCGAA AATCCTGGGT GCCGGACGGG GCTGGTACTT CGATCTCTGG 450
GGGAAGGGGA CCACGGTCAC CGTCTCGAGT GGTGGAGGCG GTTCAGGCGG 500
AGGTGGCAGC GGCGGTGGCG GATCGTCTGA GCTGACTCAG GACCCTGCTG 550
TGTCTGTGGC CTTGGGACAG ACAGTCAGGA TCACATGCCA AGGAGACAGC 600
CTCAGAAGCT ATTATGCAAG CTGGTACCAG CAGAAGCCAG GACAGGCCCC 650
TGTACTTGTC ATCTATGGTA AAAACAACCG GCCCTCAGGG ATCCCAGACC 700
GATTCTCTGG CTCCAGCTCA GGAAACACAG CTTCTTTGAC CATCACTGGG 750
GCTCAGGCGG AAGATGAGGC TGACTATTAC TGTAAC TCCC GGGACAGCAG 800
TGGTAACCAT GTGGTATTCG GCGGAGGGAC CAAGCTGACC GTCCTAGGTG 850
CGGCCGCACA TCATCATCAC CATCACGGGG CCGCAGAACA AAAACTCATC 900
TCAGAAGAGG ATCTGAATGG GGCCGCATAG 930

```

Figura 15A

```

ATGACCATGA TTACGCCAAG CTTTGGAGCC TTTT TTTTGG AGATTTTCAA 50
CGTGAAAAAA TTATTATTCG CAATTCCTTT AGTTGTTCTT TTCTATGCGG 100
CCCAGCCGGC CATGGCCGGG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCTTG 150
GTCCAGCCTG GGGGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTAC 200
CTTTAGTAGC TATTGGATGA GCTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGGGAAGGGGC 250
TGGAGTGGGT GGCCAACATA AAGCAAGATG GAAGTGAGAA ATACTATGTG 300
GACTCTGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAACG CCAAGAACTC 350
ACTGTATCTG CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT 400
ACTGTGCGAG AGATCTTTTA AAGGTCAAGG GCAGCTCGTC TGGGTGGTTC 450
GACCCCTGGG GGAGAGGGAC CACGGTCACC GTCTCGAGTG GTGGAGGCGG 500
TTCAGGCGGA GGTGGTAGCG GCGGTGGCGG ATCGTCTGAG CTGACTCAGG 550
ACCCTGCTGT GTCTGTGGCC TTGGGACAGA CAGTCAGGAT CACATGCCAA 600
GGAGACAGCC TCAGAAGCTA TTATGCAAGC TGGTACCAGC AGAAGCCAGG 650
ACAGGCCCTT GTACTTGTCA TCTATGGTAA AAACAACCGG CCCTCAGGGA 700
TCCCAGACCG ATTCTCTGGC TCCAGCTCAG GAAACACAGC TTCCTTGACC 750
ATCACTGGGG CTCAGGCGGA AGATGAGGCT GACTATTACT GTAAC TCCC 800
GGACAGCAGT GGTAACCATG TGGTATTCGG CCGAGGGACC AAGCTGACCG 850
TCCTAGGTGC GGCCGCACAT CATCATCACC ATCACGGGGC CGCAGAACAA 900
AAACTCATCT CAGAAGAGGA TCTGAATGGG GCCGCATAG 939

```

Figura 15B

```

ATGACCATGA TTACGCCAAG CTTTGGAGCC TTTTTTTTGG AGATTTTCAA 50
CGTGAAAAAA TTATTATTCG CAATTCCTTT AGTTGTTTCCT TTCTATGCGG 100
CCCAGCCGGC CATGGCCCAG GTGCAGCTGG TGCAGTCTGG GGGAGGCGTG 150
GTCCAGCCTG GGCGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCTT CTGGGTTCAT 200
TTTCAGTAGT TATGGGATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC 250
TGGAGTGGGT GGCAGGTATT TTTTATGATG GAGGTAATAA ATACTATGCA 300
GACTCCGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC 350
GCTGTATCTG CAAATGAACA GCCTGAGAGC TGAGGACACG GCTGTGTATT 400
ACTGTGCGAG AGATAGGGGC TACTACTACA TGGACGTCTG GGGCAAAGGG 450
ACCACGGTCA CCGTCTCCTC AGGTGGAGGC GGTTCAGGCG GAGGTGGCTC 500
TGGCGGTGGC GGATCGCAGT CTGTGTTGAC GCAGCCGCCC TCAGTGTCTG 550
GGGCCCCAGG ACAGAGGGTC ACCATCTCCT GCACTGGGAG AAGCTCCAAC 600
ATCGGGGCAG GTCATGATGT ACACTGGTAC CAGCAACTTC CAGGAACAGC 650
CCCCAACTC CTCATCTATG ATGACAGCAA TCGGCCCTCA GGGGTCCCTG 700
ACCGATTCTC TGGCTCCAGG TCTGGCACCT CAGCCTCCCT GGCCATCACT 750
GGGCTCCAGG CTGAAGATGA GGCTGATTAT TACTGCCAGT CCTATGACAG 800
CAGCCTGAGG GGTTCGGTAT TCGGCGGAGG GACCAAGGTC ACTGTCCTAG 850
GTGCGGCCGC ACATCATCAT CACCATCACG GGGCCGCAGA AAAAAAATC 900
ATCTCAGAAG AGGATCTGAA TGGGGCCGCA TAG 933

```

Figura 15C

Apo-2.16E2.his	Señal	1	MTMITPSFGAFFLEIFNVKLLFAIPLVVFFYAAQPA ^{cadena pesada} MAEVQLVQSGGGV
Apo-2.20E6.his		1	MTMITPSFGAFFLEIFNVKLLFAIPLVVFFYAAQPA ^{cadena pesada} MAEVQLVQSGGGV
Apo-2.24C4.his		1	MTMITPSFGAFFLEIFNVKLLFAIPLVVFFYAAQPA ^{cadena pesada} MAEVQLVQSGGGV
Apo-2.16E2.his		51	ERPGGSLRLSCAASGFTFDDYGM ^{cadena ligera} SVTRQAPCKGLEWVSGINMNGSGSTGYA
Apo-2.20E6.his		51	VQPGGSLRLSCAASGFTFSEY ^{cadena ligera} NH ^{cadena ligera} WVRQAPCKGLEWVANIKQDGEKYYV
Apo-2.24C4.his		51	VQPGSLRLSCAASGFTFSS ^{cadena ligera} YGMH ^{cadena ligera} WVRQAPCKGLEWVAGIFYDGGNKYYA
Apo-2.16E2.his		101	DSVKGRVTISRDNAKNSLYLQMN ^{cadena ligera} SLRAEDTAVYYCAKIL---GAGRGWY
Apo-2.20E6.his		101	DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN ^{cadena ligera} SLRAEDTAVYYCARDLLKVGSSSGW-
Apo-2.24C4.his		101	DSVKGRFTISRDN ^{cadena ligera} SKNTLYLQMN ^{cadena ligera} SLRAEDTAVYYCARD-----RGYY
Apo-2.16E2.his		147	F-DLWGKGT ^{cadena ligera} TVTVSSGGSGGGSGGGSGGS-SELTDPAVSV ^{cadena ligera} ALGQTVRI
Apo-2.20E6.his		150	F-DPWGRGT ^{cadena ligera} TVTVSSGGSGGGSGGGSGGGGS-SELTDPAVSV ^{cadena ligera} ALGQTVRI
Apo-2.24C4.his		143	YMDVWGKGT ^{cadena ligera} TVTVSSGGSGGGSGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSGAPGQRTVI
Apo-2.16E2.his		195	TCQGD ^{cadena ligera} SLR---SY ^{cadena ligera} YASWYQKPGQAPVLVIY ^{cadena ligera} GKNRPSGIPDRFSGSSSG
Apo-2.20E6.his		198	TCQGD ^{cadena ligera} SLR---SY ^{cadena ligera} YASWYQKPGQAPVLVIY ^{cadena ligera} GKNRPSGIPDRFSGSSSG
Apo-2.24C4.his		193	SC ^{cadena ligera} TGRSSNIGAGHDV ^{cadena ligera} HWYQQLPGTAPKLLIY ^{cadena ligera} DDSNRPSGVPDRFSGSRSG
Apo-2.16E2.his		242	NTASLTITGAQAED ^{cadena ligera} EADYYCNSRDSSGNHVVFGGCTKLT ^{cadena ligera} VLGAAAHHHH
Apo-2.20E6.his		245	NTASLTITGAQAED ^{cadena ligera} EADYYCNSRDSSGNHVVFGGCTKLT ^{cadena ligera} VLGAAAHHHH
Apo-2.24C4.his		243	TSASLAITGLQAED ^{cadena ligera} EADYYCQSDSSLRG ^{cadena ligera} SVFGGCTKVT ^{cadena ligera} VLGAAAHHHH
Apo-2.16E2.his		292	HGA ^{cadena ligera} AEQKLISEEDLN ^{cadena ligera} GAA
Apo-2.20E6.his		295	HGA ^{cadena ligera} AEQKLISEEDLN ^{cadena ligera} GAA
Apo-2.24C4.his		293	HGA ^{cadena ligera} AEQKLISEEDLN ^{cadena ligera} GAA

Figura 16