

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 823**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99903332 .7**
96 Fecha de presentación: **25.01.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1053256**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.11.2000**

54 Título: **ANTICUERPOS DEL RECEPTOR 4 DE MUERTE (DR4) Y USOS DE LOS MISMOS.**

30 Prioridad:
26.01.1998 US 72481 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.11.2011

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

72 Inventor/es:
CHUNTHARAPAI, Anan y
KIM, Kyung, Jin

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 368 823 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos del receptor 4 de muerte (DR4) y usos de los mismos

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere en general a anticuerpos de DR4 y, en particular, a anticuerpos de DR4 monoclonales agonistas.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Se cree que el control del número de células en mamíferos se determina, en parte, mediante un equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular. Una forma de muerte celular, denominada a veces como muerte celular necrótica, se caracteriza habitualmente como una forma patológica de muerte celular que resulta de algún trauma o lesión celular. Por el contrario, existe otra forma "fisiológica" de muerte celular que normalmente se desarrolla de forma ordenada o controlada. Esta forma de muerte celular ordenada o controlada se denomina a menudo 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 se produce de forma natural en muchos procesos fisiológicos, incluyendo desarrollo embrionario y selección clonal en el sistema inmune [Itoh et al., *Cell*, 66: 233-243 (1991)]. Los niveles reducidos de muerte celular apoptótica se han asociado con diversas afecciones patológicas, incluyendo cáncer, lupus e infección por virus herpes [Thompson, *Science*, 267: 1456-1462 (1995)]. Los niveles aumentados de muerte celular apoptótica pueden asociarse con otras afecciones patológicas, incluyendo SIDA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, retinitis pigmentaria, degeneración cerebelar, anemia aplásica, infarto de miocardio, apoplejía, lesión por reperfusión y enfermedad hepática inducida por toxinas [véase, Thompson, supra].

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

[0004] Diversas moléculas, tales como el factor de necrosis tumoral- α ("TNF- α "), factor de necrosis tumoral- β ("TNF- β " o "linfotóxina- β "), linfotóxina- β ("LT- β "), ligando CD30, ligando CD27, ligando CD40, ligando OX-40, ligando 4-1BB, ligando Apo-1 (también denominado ligando Fas o ligando CD95) y ligando Apo-2 (también denominado TRAIL) han sido identificadas como miembros de la familia de citoquinas del factor de necrosis tumoral ("TNF") [véase, por ejemplo, Gruss y Dower, *Blood*, 85: 3378-3404 (1995); WO 97/25428 publicada el 17 de julio de 1997; WO 97/01633 publicada el 16 de enero de 1997; Pitti et al., *J. Biol. Chem.*, 271: 12687-12690 (1996); Wiley et al., *Immunity*, 3: 673-682 (1995); Browning et al., *Cell*, 72: 847-856 (1993); Armitage et al. *Nature*, 357: 80-82 (1992)]. Entre estas moléculas, se ha descrito que TNF- α , TNF- β , ligando CD30, ligando 4-1BB, ligando Apo-1 y ligando Apo-2 (TRAIL) están implicadas en la muerte celular apoptótica. Se ha descrito que tanto TNF- α como TNF- β inducen la muerte apoptótica en células tumorales susceptibles [Schmid et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 1881 (1986); Dealtry et al., *Eur. J. Immunol.*, 17: 689 (1987)]. Zheng et al. han descrito que 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 eliminación de células T auto-reactivas en el timo [Amakawa et al., *Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Programmed Cell Death*, Abstr. No. 10, (1995)].

[0005] Las mutaciones en los genes del receptor o ligando Fas/Apo-1 de ratón (llamados *lpr* y *gld*, respectivamente) se han asociado con algunos trastornos autoinmunes, lo que indicaba que el ligando Apo-1 puede jugar un papel en la regulación de la eliminación clonal de linfocitos auto-reactivos en la periferia [Krammer et al., *Curr. Op. Immunol.*, 6: 279-289 (1994); Nagata et al., *Science*, 267: 1449-1456 (1995)]. También se ha descrito que el ligando Apo-1 induce 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 agonistas de ratón que se unen específicamente al receptor Apo-1 muestran actividad de destrucción celular que es comparable o similar a la del TNF- α [Yonehara et al., *J. Exp. Med.*, 169: 1747-1756 (1989)].

[0006] Se cree que la inducción de diversas respuestas celulares mediadas por dichas citoquinas de la familia de

TNF se inicia mediante su unión a receptores celulares específicos. Se han identificados dos receptores de TNF distintos de aproximadamente 55 kDa (TNFR1) y 75 kDa (TNFR2) [Hohman et al., J. Biol. Chem., 264: 14927-14934 (1989); Brockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 3127-3131 (1990); EP 417.563, publicada el 20 de marzo de 1991] y se han aislado y caracterizado ADNc humano y de ratón que corresponden a ambos tipos de receptor [Loetscher et al., Cell, 61: 351 (1990); Schall et al., Cell, 61: 361 (1990); Smith et al., Science, 248: 1019-1023 (1990); Lewis et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 2830-2834 (1991); Goodwin et al., Mol. Cell. Biol., 11: 3020-3026 (1991)]. Los polimorfismos extensivos se han asociado con ambos genes del receptor de TNF [véase, por ejemplo, Takao et al., Immunogenetics, 37: 199-203 (1993)]. Ambos TNFR comparten la estructura típica de los receptores de la superficie celular incluyendo regiones extracelular, transmembrana e intracelular. Las partes extracelulares de ambos receptores también se encuentran de forma natural como proteínas solubles de unión a TNF [Nophar, Y. et al., EMBO J., 9: 3269 (1990); y Kohno, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 8331 (1990)]. Más recientemente, la clonación de receptores de TNF solubles recombinantes fue descrita por Hale et al. [J. Cell. Biochem. Supplement 15F, 1991, p. 113 (P424)].

[0007] La parte extracelular de TNFR de tipo 1 y tipo 2 (TNFR1 y TNFR2) contiene un patrón repetitivo de secuencia de aminoácidos de cuatro dominios ricos en cisteína (CRD) denominados de 1 a 4, comenzando a partir del extremo NH₂. Cada CRD tiene aproximadamente 40 aminoácidos de longitud y contiene de 4 a 6 restos de cisteína en 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 CRD son los siguientes: CRD1 - aminoácidos 14 a aproximadamente 53; CRD2 - aminoácidos de aproximadamente 54 a aproximadamente 97; CRD3 - aminoácidos de aproximadamente 98 a aproximadamente 138; CRD4 - aminoácidos de aproximadamente 139 a aproximadamente 167. En TNFR2, CRD1 incluye los aminoácidos 17 a aproximadamente 54; CRD2 - aminoácidos de aproximadamente 55 a aproximadamente 97; CRD3 - aminoácidos de aproximadamente 98 a aproximadamente 140; y CRD4 - aminoácidos de aproximadamente 141 a aproximadamente 179 [Banner et al., Cell, 73: 431-435 (1993)]. El papel potencial de los CRD en la unión a ligandos también ha sido descrito por Banner et al., supra.

[0008] Existe un patrón repetitivo similar de CRD 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 de células B CD40 [Stamenkovic et al., EMBO J., 8: 1403 (1989)], el antígeno de células T OX40 [Mallet et al., EMBO J., 9: 1063 (1990)] y el antígeno Fas [Yonehara et al., supra y Itoh et al., Cell, 66: 233-243 (1991)]. También se encuentran CRD en las proteínas T2 solubles similares a TNFR (sTNFP) de los virus de la viruela Shope y mixoma [Upton et al., Virology, 160: 20-29 (1987); Smith et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 176: 335 (1991); Upton et al., Virology, 184: 370 (1991)]. El alineamiento óptimo de estas secuencias indica que las posiciones de los restos de cisteína están bien conservadas. Estos receptores a veces se denominan colectivamente como miembros de la superfamilia de receptores de TNF/NGF. Estudios recientes sobre p75NGFR mostraron que la eliminación 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)] tenía poco o ningún efecto sobre la unión a NGF [Yan, H. y Chao, M.V., supra]. El p75 NGFR contiene un tramo rico en prolina de aproximadamente 60 aminoácidos, entre su CRD4 y la región transmembrana, que no está implicado 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]. Una región rica en prolina similar se encuentra en TNFR2 pero no en TNFR1.

[0009] Itoh et al. describen que el receptor Apo-1 puede señalizar una muerte celular apoptótica similar a la señalizada por el TNFR1 de 55 kDa [Itoh et al., supra]. También se ha descrito que la expresión del antígeno Apo-1 se regula negativamente junto con la de TNFR1 cuando las células se tratan con TNF- α o un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Apo-1 [Krammer et al., supra; Nagata et al., supra]. Por consiguiente, algunos investigadores plantearon la hipótesis de que las líneas celulares que co-expresan los receptores Apo-1 y TNFR1 pueden mediar en la destrucción celular a través de rutas de señalización comunes [Id.].

[0010] Los ligandos de la familia de TNF identificados hasta la fecha, con la excepción de la linfotóxina- α , son proteínas transmembrana de tipo II, cuyo extremo C es extracelular. Por el contrario, la mayoría de los receptores en la familia del receptor de TNF (TNFR) identificados hasta la fecha son proteínas transmembrana de tipo I. En las familias del ligando y del receptor de TNF, sin embargo, la homología identificada entre los miembros de la familia se ha observado principalmente en el dominio extracelular ("ECD"). Varias de las citoquinas de la familia de TNF, incluyendo TNF- α , ligando Apo-1 y ligando CD40, se escinden de forma proteolítica en la superficie celular; la proteína resultante en cada caso forma habitualmente una molécula homotrimérica que funciona como una citoquina soluble. Las proteínas de la familia del receptor de TNF también se escinden normalmente de forma proteolítica para liberar ECD del receptor solubles que pueden funcionar como inhibidores de las citoquinas afines.

[0011] Recientemente, se han identificado otros miembros de la familia de TNFR. Dichos miembros recientemente identificados de la familia de TNFR incluyen CAR1, HVEM y osteoprotegerina (OPG) [Brojatsch et al., Cell, 87: 845-855 (1996); Montgomery et al., Cell, 87: 427-436 (1996); Marsters et al., J. Biol. Chem., 272: 14029-14032 (1997); Simonet et al., Cell, 89: 309-319 (1997)]. A diferencia de otras moléculas similares a TNFR conocidas, Simonet et al., supra, describen que OPG no contiene secuencias hidrofóbicas que se extienden a través de la membrana.

- 5 **[0012]** En el documento Masters et al., *Curr. Biol.*, 6: 750 (1996), los investigadores describen un polipéptido humano de secuencia nativa de longitud completa, llamado Apo-3, que muestra similitud con la familia de TNFR en sus repeticiones ricas en cisteína extracelulares y se parece a TNFR1 y CD95 en que contiene una secuencia de dominio de muerte citoplasmática [véase también Marsters et al., *Curr. Biol.*, 6: 1669 (1996)]. Otros autores también se refieren a Apo-3 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)].
- 10 **[0013]** Pan et al. han descrito otro miembro de la familia del receptor TNF denominado "DR4" [Pan et al., *Science*, 276: 111-113 (1997)]. El ADNc de DR4 codifica un marco de lectura abierto de 468 aminoácidos con características características de un receptor de la superficie celular. Pan et al. describen un posible péptido señal presente en el inicio de la molécula (aminoácidos -23 a -1), prediciendo que la proteína madura empieza en el aminoácido 24 (Ala). Los residuos 108 a 206 contienen dos pseudorepeticiones ricas en cisteína que se parecen a las correspondientes regiones en TNFR-1 (cuatro repeticiones), DR3 (cuatro repeticiones), Fas (tres repeticiones) y CAR1 (dos repeticiones). Después del dominio transmembrana está una región intracelular que contiene un tramo de 70 aminoácidos con similitud con los dominios de muerte de TNFR1, DR3, Fas y CAR1. El transcrito de DR4 se detectó en el bazo, leucocitos de sangre periférica, intestino delgado y timo. Además, también se halló la expresión de DR4 en células de eritroleucemia K562, células de carcinoma de mama MCF7 y células T activadas. Pan et al. también describen que se cree que DR4 es un receptor para el ligando conocido como ligando Apo-2 o TRAIL.
- 20 **[0014]** En los documentos Sheridan et al., *Science*, 277: 818-821 (1997) y Pan et al., *Science*, 277: 815-818 (1997), se describe otra molécula que se cree que es un receptor para el ligando Apo-2 (TRAIL). Esta molécula se denomina Apo-2 (como alternativa, también se ha denominado DR5). Al igual que DR4, se ha descrito que Apo-2 contiene un dominio de muerte citoplasmático y es capaz de señalar la apoptosis.
- 25 **[0015]** En el documento Sheridan et al., *supra*, se describe un receptor llamado DcR1 (o como alternativa, Apo-2DcR) como un potencial receptor señuelo para el ligando Apo-2 (TRAIL). Sheridan et al. describen que DcR1 puede inhibir la función del ligando Apo-2 *in vitro*. Véase también, Pan et al., *supra*, para una descripción del receptor señuelo denominado TRID.
- 30 **[0016]** En el documento de Marsters et al., *Curr. Biol.*, 7:1003-1006 (1997), se describe un receptor que se denomina DcR2. Marsters et al. describen que DcR2 contiene una región citoplasmática con un dominio de muerte truncado y puede actuar como un receptor de Apo-2L inhibidor *in vitro*.
- 35 **[0017]** Para una revisión de la familia de citoquinas de TNF y sus receptores, véase Gruss y Dower, *supra*.
- 40 **[0018]** Tal como se entiende actualmente, el programa de muerte celular contiene al menos tres elementos importantes - activadores, inhibidores y efectores; en *C. elegans*, estos elementos están 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); Wang et al., *Cell*, 90: 1-20 (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 alguna homología de ECD, estos dos receptores comparten homología en su dominio intracelular (ICD) en un interfaz de oligomerización conocido como el dominio de muerte [Tartaglia et al., *supra*; Nagata, *Cell*, 88: 355 (1997)]. Los dominios de muerte también se encuentran en varias proteínas de metazoos que regulan la apoptosis, concretamente, la proteína de *Drosophila*, Reaper, y las proteínas de mamífero denominadas FADD/MORT1, TRADD y RIP [Cleaveland e Ihle, *Cell*, 81: 479-482 (1995)]. Después de la unión al ligando y el agrupamiento de receptores, se cree que TNFR1 y CD95 reclutan a FADD en un complejo de señalización que induce la muerte. CD95 supuestamente se une a FADD directamente, mientras que TNFR1 se une a FADD indirectamente mediante 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 de que FADD sirve como proteína adaptadora que recluta a la proteasa relacionada con Ced-3, MACH α /FLICE (caspasa 8), en el complejo señalizador de 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 de conversión de interleucina-1 β (ICE) y CPP32/Yama, que pueden ejecutar algunos aspectos críticos del programa de muerte celular [Fraser y Evan, *supra*].
- 55 **[0019]** Recientemente se describió que la muerte celular programada implica la actividad de miembros de una familia de proteasas de cisteína relacionadas con el gen de muerte celular de *C. elegans*, *ced-3*, y con la enzima de conversión de IL-1 de mamífero, ICE. La actividad de las proteasas ICE y CPP32/Yama puede inhibirse mediante el producto del gen del virus de la viruela de vaca, 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 TNFR1 y CD95 [Enari et al., *Nature*, 375: 78-81 (1995); Tewari et al., *J. Biol. Chem.*, 270: 3255-3260 (1995)].
- 60 **[0020]** Tal como se ha revisado recientemente por Tewari et al., TNFR1, TNFR2 y CD40 modulan la expresión de citoquinas proinflamatorias y coestimuladoras, receptores de citoquina y moléculas de adhesión celular a través de
- 65

la activación del factor de transcripción, NF-κB (Tewari et al., Curr. Op. Genet. Develop., 6: 39-44 (1996)). NF-κB es el prototipo de una familia de factores de transcripción diméricos 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-κB se compleja con miembros de la familia del inhibidor de IκB; después de la inactivación del IκB en respuesta a ciertos estímulos, el NF-κB liberado se transloca al núcleo donde se une a secuencias de ADN específicas y activa la transcripción génica. El documento WO98/32856, citable bajo el Art 54(3)EPC se refiere al polipéptido DR4.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

[0021] La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal agonista aislado que (a) se une específicamente a un polipéptido DR4 que comprende los residuos de aminoácidos 24-218, 1-218, ó 1-468 de Fig. 1 (SEC ID NO:1), (b) induce la apoptosis en por lo menos un tipo de célula de mamífero que expresa el polipéptido DR4 y (c) no se une a DcR1 o DcR2, y de este modo son útiles en el tratamiento de varias enfermedades y afecciones patológicas, incluyendo cáncer.

[0022] La presente invención también proporciona líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales de DR4.

[0023] La presente invención también proporciona composiciones que comprenden uno o más anticuerpos de DR4 y un portador, tal como un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, dicha composición se puede incluir en un artículo de fabricación o kit.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0024]

La figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID No. 2) de un ADNc para DR4 humano y su secuencia de aminoácidos derivada (SEC ID No. 1). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos respectivas para DR4 humano también se describe en Pan et al., Science, 276: 111 (1997).

La figura 2 muestra el análisis por FACS de dos anticuerpos anti-DR4, 4E7.24.3 y 4H6.17.8 (ilustrados por las líneas en negrita) en comparación con los controles de IgG (expresado en puntos) en células 9D humanas.

La figura 3 es un gráfico que muestra el porcentaje (%) de apoptosis inducida en células 9D por anticuerpos de DR4, 4E7.24.3 y 4H6.17.8, en ausencia de Fc de IgG anti-ratón de cabra.

La figura 4 es un diagrama de barras que muestra el porcentaje (%) de apoptosis, en comparación con Apo-2L en células 9D por anticuerpos de DR4, 4E7.24.3 y 4H6.17.8, en presencia o ausencia de Fc de IgG anti-ratón de cabra.

La figura 5 es un diagrama de barras que muestra la capacidad del anticuerpo de DR4 4H6.17.8 de bloquear la apoptosis inducida por Apo-2L en células 9D.

La figura 6 es un gráfico que muestra los resultados de un ELISA que analiza la unión de anticuerpos de DR4, 4E7.24.3 y 4H6.17.8, a DR4 y a otros receptores de Apo-2L conocidos, referidos como Apo-2, DcR1, y DcR2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

I. Definiciones

[0025] Tal como se utiliza en la presente invención, el término "ligando Apo-2" o "Apo-2L" (también conocido como TRAIL) se refiere a un miembro específico de la familia de ligandos del factor de necrosis tumoral (TNF) que induce apoptosis en un conjunto de linajes celulares [véase WO 97/25428 publicada el 17 de julio de 1997; Pitti et al., J. Biol. Chem, 271:12687 (1996); Marsters et al., Curr. Biol., 6: 79 (1997); Wiley, S. et al., Immunity, 3:637 (1995)].

[0026] Se ha identificado un receptor para Apo-2L y se le ha denominado DR4, un miembro de la familia de receptores de TNF que contiene un "dominio de muerte" citoplasmático capaz de atraer el aparato suicida de la célula [véase Pan et al., Science, 276:111 (1997)]. El término "Receptor de muerte 4" o "DR2", cuando se utiliza en la presente invención, comprende DR4 de secuencia nativa y variantes de DR4 (que se definen posteriormente aquí). Estos términos comprenden DR4 expresado en una variedad de mamíferos, incluyendo humanos. DR4 se puede expresar de forma endógena tal como aparece de forma natural en una variedad de linajes de tejido humano o se puede expresar mediante métodos recombinantes o sintéticos. Un "DR4 de secuencias nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un DR4 derivado de la naturaleza. De este modo, un DR4 de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos de DR4 natural de cualquier mamífero. Dicho DR4 de secuencia nativa se puede aislar de la naturaleza o se puede producir mediante medios recombinantes o sintéticos. El término "DR4 de secuencia nativa" comprende específicamente formas truncadas o secretadas

naturales del DR4 (por ejemplo, una forma soluble que contiene, por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativas) y variantes alélicas naturales del DR4. En una realización de la invención, el DR4 de secuencia nativa es un DR4 de secuencia nativa maduro o de longitud completa que comprende los aminoácidos 1 a 468 de la figura 1 (SEC ID No. 1)

[0027] Los términos “dominio extracelular” o “ECD” se refiere en la presente invención a una forma de DR4 que está esencialmente libre de los dominios transmembrana y citoplásmico de DR4. Habitualmente, el ECD de DR4 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 DR4 comprenderá los residuos de aminoácidos 1 a 218 o los residuos 24 a 218 de la figura 1 (SEC ID No: 1).

[0028] “Variante de DR4” significa un DR4 biológicamente activo que tiene por lo menos aproximadamente un 80% ó un 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el DR4 que tiene la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en la figura 1 (SEC ID No: 1) para un DR4 humano de secuencia nativa de longitud completa. Entre dichas variantes de DR4 se incluyen, por ejemplo, polipéptidos DR4 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). Normalmente, una variante de DR4 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).

[0029] El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias de DR4 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 DR4, 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 alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan.

[0030] “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 DR4. No obstante, normalmente, el polipéptido aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

[0031] Los términos “agonista” y “agonístico” cuando se utilizan en la presente invención se refieren o describen una molécula que es capaz, directa o indirectamente, de inducir, provocar o aumentar sustancialmente la actividad biológica o activación de DR4.

[0032] Los términos “antagonista” y “antagonístico” cuando se utilizan en la presente invención se refieren o describen una molécula que es capaz, directa o indirectamente, de contrarrestar, reducir o inhibir sustancialmente la actividad biológica o activación de DR4.

[0033] El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales anti-DR4 individuales (incluyendo agonista, antagonista, y anticuerpos neutralizantes y bloqueantes) y composiciones de anticuerpos anti-DR4 con especificidad poliepitópica. “Anticuerpo”, tal como se utiliza en la presente invención, incluye moléculas de inmunoglobulina o anticuerpo intactas anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (es decir, anticuerpos biespecíficos formados a partir de por lo menos dos anticuerpos intactos) y fragmentos de inmunoglobulinas (tales como Fab, F(ab')₂, o Fv), siempre que muestren cualquiera de las propiedades agonísticas deseadas descritas en la presente invención.

[0034] Los anticuerpos son habitualmente proteínas o polipéptidos que muestran especificidad de unión a un antígeno específico. Los anticuerpos nativos son normalmente glicoproteína heterotetraméricas, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Habitualmente, cada cadena ligera se une a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de un conjunto de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo

(VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que hay residuos de aminoácidos concretos que forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada [Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 186: 651-663 (1985); Novotny and Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:4592-4596 (1985)]. Las cadenas ligeras de anticuerpos de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (6) y lambda (8), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, y varios de estos se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3, e IgG-4; IgA-1 e IgA-2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, epsilon, gamma, y mu, respectivamente.

[0035] "Fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, generalmente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Ente los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv, diabodies, moléculas de anticuerpo de cadena única y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

[0036] El término "variable" se utiliza en la presente invención para describir ciertas partes de los dominios variables que difieren en la secuencia entre los anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad normalmente no está distribuida de forma uniforme a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra habitualmente en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan el armazón ("framework") (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan mayoritariamente una configuración de lámina β, conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte, de la estructura de lámina β. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos [véase, Kabat, E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987)]. Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

[0037] El término "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza en la presente invención, 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.

[0038] Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, híbridos y recombinantes producidos mediante corte y empalme de un dominio variable (incluido hipervariable) de un anticuerpo anti-DR4 con un dominio constante (por ejemplo, "anticuerpos humanizados"), o una cadena ligera con una cadena pesada, o una cadena de una especie con una cadena de otra especie, o fusiones con proteínas heterólogas, 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).

[0039] 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).

[0040] 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

sustituídos 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 importadas 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 de CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima por lo menos una parte de una región o dominio constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana.

[0041] "Biológicamente activo" y "actividad biológica deseada" para los propósitos de la presente invención significa 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.

[0042] 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.

[0043] Los términos "tratar," "tratamiento" y "terapia", tal como se utilizan en la presente invención, se refieren a terapia curativa, terapia profiláctica y terapia preventiva.

[0044] 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 métodos de la invención

A. Anticuerpos de DR4

[0045] La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales agonistas que (a) se unen específicamente a un polipéptido DR4 que comprende los residuos de aminoácidos 24-218, 1-218, ó 1-468 de la figura 1 (SEC ID NO:1), (b) inducen la apoptosis en por lo menos un tipo de célula de mamífero que expresa el polipéptido DR4, y (c) no se unen a DcR1 o DcR2. A modo de referencia se describen a continuación otros tipos de anticuerpo.

1. Anticuerpos policlonales

[0046] 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 DR4 (o un ECD de DR4) o una proteína de fusión del mismo. 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 se incluyen, pero sin limitación, hemocianina de la lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. 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 extraerse 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

[0047] Los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos monoclonales.

[0048] 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 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*.

[0049] El agente inmunizante incluirá habitualmente el polipéptido DR4 (o un ECD de DR4) o una proteína de fusión

del mismo, tal como una proteína de fusión ECD de DR4-IgG. El agente inmunizante puede comprender alternativamente un fragmento o una parte de DR4 que tiene uno o más aminoácidos que participan en la unión de Apo-2L a DR4. En una realización preferida, el agente inmunizante comprende una secuencia del dominio extracelular de DR4 fusionada a una secuencia de IgG, tal como se describe en el ejemplo 1.

[0050] Generalmente, se utilizan linfocitos de sangre periférica ("PLBs") si se desean células de origen humano, o se utilizan células de bazo o células de nódulos linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. A continuación, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academia Press, (1986), páginas 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas 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 inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (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.

[0051] Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquéllas que se fusionan de manera eficaz, apoyan 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 inmortalizadas 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. Un ejemplo de dicha línea celular de mieloma murino es P3X63AgU.1 descrita en el ejemplo 2 más abajo. 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].

[0052] A continuación, en el medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se puede analizar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra DR4. 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).

[0053] Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitantes 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 fluido ascítico en un mamífero.

[0054] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar del medio de cultivo o fluido ascítico mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefariosa, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

[0055] 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 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 puede sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

[0056] Tal y como se describe en los siguientes ejemplos, se han identificado y preparado varios anticuerpos monoclonales anti-DR4. Algunos de estos anticuerpos, referidos aquí como 4E7.24.3 y 4H6.17.8, se han depositado

con la ATCC y se les ha asignado los no. de acceso de depósito HB-12454 y HB-12455, respectivamente. 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 los no. de Acceso HB-12454 o HB-12455. 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 DR4 o para bloquear, inducir o potenciar la activación de DR4 (o actividades relacionadas de DR4). Tal y como se describe en la presente memoria, el anticuerpo monoclonal 4E7.24.3 se caracteriza por unirse específicamente a DR4 (y no tener especificidad de unión por Apo-2, DcR1 o DcR2), capaz de inducir la apoptosis, y no ser capaz de bloquear DR4. El anticuerpo monoclonal 4H6.17.8 se caracteriza por unirse específicamente a DR4 (y no tener cierta reactividad cruzada con Apo-2, pero no con DcR1 o DcR2), capaz de inducir la apoptosis y capaz de bloquear DR4. Opcionalmente, los anticuerpos monoclonales de la presente invención se unirán al mismo epítipo o epítopos que los anticuerpos 4E7.24.3 o 4H6.17.8 descritos 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 los anticuerpos 4E7.24.3 ó 4H6.17.8 descritos específicamente, se puede comparar su actividad en los ensayos de bloqueo de DR4 y la inducción de la apoptosis, tales como los descritos en los ejemplos siguientes.

[0057] Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender también 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.

[0058] 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 Fc residual. 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.

[0059] 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.

[0060] También se pueden producir fragmentos Fv de cadena única, tal como se describe en Iliades et al., FEBS Letters, 409:437-441 (1997). El acoplamiento de dichos fragmentos de cadena única que utilizan varios enlazadores se describe en Kortt et al., Protein Engineering, 10:423-433 (1997).

[0061] Además de los anticuerpos descritos anteriormente, se contempla que los anticuerpos quiméricos o híbridos se pueden preparar *in vitro* utilizando métodos conocidos en química sintética de proteínas, que incluye los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este objetivo se incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptoputirimidato.

3. Anticuerpos humanizados

[0062] Los anticuerpos DR4 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 receptor) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo 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 receptor ni en las secuencias importadas de la CDR o el armazón. 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 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)].

[0063] 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); Verhoeven 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.

[0064] 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)].

[0065] 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 una 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 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].

[0066] 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. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión (JH) de la cadena pesada de anticuerpo en ratones quiméricos mutantes en la línea germinal da lugar a una inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. 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); Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993)]. 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)).

4. Anticuerpos biespecíficos

[0067] 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 DR4, la otra es por cualquier otro antígeno, y preferiblemente por una proteína de la superficie celular o receptor o una subunidad de receptor.

[0068] Los procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en el estado de la técnica. Habitualmente, 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 híbridos (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).

[0069] Los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseada (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar 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. Para más detalles sobre cómo generar anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

5. Anticuerpos heteroconjugados

[0070] 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 sintética de proteínas, 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

[0071] Los "triabodies" también se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Dichos anticuerpos están descritos por ejemplo en Iliades et al., *supra* y Korrt et al., *supra*.

B. Usos para los anticuerpos de DR4

[0072] Los anticuerpos de DR4 de la presente invención presentan varias utilidades. Por ejemplo, los anticuerpos agonísticos de DR4 se pueden utilizar en métodos para el tratamiento de condiciones patológicas, tales como tumores malignos. El diagnóstico de dichas condiciones se encuentra en la capacidad habitual de un médico o clínico. En los métodos, el anticuerpo agonístico de DR4 se administra a un mamífero, solo o en combinación con otros agentes terapéuticos o técnicas.

[0073] El anticuerpo se administra preferiblemente al mamífero en un portador; preferiblemente un portador farmacéuticamente aceptable. 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 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 prolongada, 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 anticuerpo que se administra.

[0074] El anticuerpo puede administrarse al mamífero mediante inyección (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intraportal), o mediante otros procedimientos, tales como infusión, que aseguran su liberación al torrente circulatorio de manera eficaz. El anticuerpo también se puede administrar mediante técnicas de perfusión aislada, tales como perfusión de tejido aislado, para ejercer efectos terapéuticos locales. Se prefiere la inyección local o intravenosa.

[0075] Se pueden determinar empíricamente dosificaciones y pautas eficaces para la administración del anticuerpo, y la realización tales determinaciones forma parte de la capacidad del experto en la materia. Los expertos en la materia entenderán que la dosificación de anticuerpo que debe administrarse variará dependiendo, por ejemplo, del

- 5 mamífero que recibirá el anticuerpo, la vía de administración, el tipo particular de anticuerpo utilizado y otros fármacos que se administran al mamífero. Las directrices para seleccionar las dosis apropiadas para los anticuerpos 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 anticuerpo 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.
- 10 **[0076]** El anticuerpo también se puede administrar al mamífero combinado con cantidades eficaces de uno o más de otros agentes terapéuticos. Entre el uno o más de otros agentes terapéuticos o terapias se pueden incluir, pero sin limitación, quimioterapia, radioterapia, inmunoadyuvantes y citoquinas. También se pueden utilizar otros agentes conocidos por inducir la apoptosis en células de mamífero y dichos agentes incluyen TNF-alfa, TNF-beta, ligando CD30, ligando 4-1BB y ligando Apo-2.
- 15 **[0077]** 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, etopósido, camptotecina, Leucovorina, arabinósido de citosina, ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citoxina, taxol, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina y carboplatino. Las pautas de preparación y dosificación para dicha quimioterapia se pueden utilizar según las instrucciones del fabricante o determinado empíricamente por el técnico en la materia. Las pautas de preparación y dosificación para dicha quimioterapia también se describen en
- 20 Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).
- 25 **[0078]** La quimioterapia se administra preferiblemente en un portador farmacéuticamente aceptable, tal como los descritos anteriormente. El modo de administración de la quimioterapia puede ser la misma que la utilizada para el anticuerpo de DR4 o se puede administrar al mamífero a través de un modo diferente. Por ejemplo, el anticuerpo de DR4 se puede inyectar mientras se administra la quimioterapia oralmente al mamífero.
- 30 **[0079]** La radioterapia se puede administrar al mamífero según los protocolos utilizados habitualmente en la técnica y conocidos por el experto en la materia. Dicha terapia puede incluir radiación con cesio, iridio, yodo o cobalto. La radioterapia se puede ser radiación en todo el cuerpo, o se puede dirigir de forma local a un sitio o tejido específico en o sobre el cuerpo. Habitualmente, la radioterapia se administra en pulsos durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 semanas. La radioterapia se puede administrar, sin embargo, durante periodos de tiempo más largos. Opcionalmente, la radioterapia se puede administrar como una dosis única o como dosis secuenciales múltiples.
- 35 **[0080]** El anticuerpo se puede administrar secuencialmente o simultáneamente con el otro o más agentes terapéuticos. Las cantidades de anticuerpo y agente terapéutico dependen, por ejemplo, del tipo de fármaco utilizado, la condición patológica en tratamiento y las pautas y rutas de administración, pero, en general, serían inferiores que si se utilizan cada uno individualmente.
- 40 **[0081]** Después de la administración del anticuerpo al mamífero, se puede hacer un seguimiento de la condición fisiológica del mamífero de varias maneras conocidas por el experto en la materia.
- 45 **[0082]** Se contempla que el bloqueo de anticuerpos de DR4 también se puede utilizar en terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de DR4 de bloqueo se puede administrar a un mamífero (tal como se ha descrito anteriormente) para bloquear la unión del receptor a Apo-2L, incrementando así la biodisponibilidad de Apo-2L para inducir la apoptosis.
- 50 **[0083]** En otra realización, se proporcionan métodos para utilizar el anticuerpo en ensayos de diagnóstico. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden utilizar también en ensayos de diagnóstico para la detección de la sobreexpresión de DR4 en células y tejidos específicos. Se pueden utilizar diversas técnicas de ensayos diagnósticos conocidas en el estado de la técnica, tales como ensayos de imagen in vivo, 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 agonistas 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, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, o ¹²⁵I, 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).
- 60 **[0084]** Los anticuerpos de DR4 también son útiles para la purificación por afinidad de DR4 de un cultivo celular recombinante o de origen natural. En este proceso, se inmovilizan los anticuerpos contra DR4 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 DR4
- 65

a purificar, y después se limpia el soporte con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material de la muestra excepto el DR4 que está unido al anticuerpo inmovilizado. Por último, se lava el soporte con otro disolvente adecuado que liberará el DR4 del anticuerpo.

5 [0085] En una realización adicional, se proporcionan artículos de fabricación y kits que contienen materiales útiles para el tratamiento de condiciones patológicas o la detección o purificación DR4. 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 el tratamiento de condiciones patológicas o la detección o purificación DR4. El agente activo en la composición es un anticuerpo de DR4 y preferiblemente, comprende anticuerpos monoclonales para DR4. La etiqueta en el recipiente indica que la composición se utiliza para el tratamiento de condiciones patológicas o la detección o purificación de DR4, y también puede indicar directrices para el uso *in vivo* o *in vitro*, tales como se describe anteriormente.

10
15 [0086] El kit comprenderá el recipiente descrito anteriormente y un segundo recipiente que comprende un tampón. Se pueden incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos del envase con las instrucciones de uso.

20 [0087] La invención se entenderá de forma más completa mediante la referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

[0088] Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente con propósitos ilustrativos y no pretenden de ningún modo limitar el alcance de la presente invención.

25 EJEMPLOS

[0089] Los 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, Virginia.

30 EJEMPLO 1

35 Expresión de ECD de DR4 como inmunoadhesina

[0090] Se preparó una construcción de inmunoadhesina con ECD de DR4. Se clonó una secuencia de ECD de DR4 madura (aminoácidos 1-218 mostrados en la figura 1) en un vector Flag pCMV-1 (Kodak) en dirección 3' de la secuencia señala Flag y fusionada a la región CH1, bisagra y Fc de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana G1 tal como se ha descrito anteriormente [Aruffo et al., Cell, 61:1303-1313 (1990)]. La inmunoadhesina se expresó mediante transfección transitoria en células 293 humanas y se purificó de sobrenadantes celulares mediante cromatografía de afinidad de proteína A, tal y como se ha descrito por Ashkenazi et al., supra.

40 EJEMPLO 2

45 Preparación de anticuerpos monoclonales específicos para DR4

[0091] 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 con ECD de DR4 (descrita en el ejemplo 1 anterior) (diluida en adyuvante MPL-RDM adquirido de Ribi Immunochemical Research Inc., Hamilton, MT) 11 veces en cada planta de las patas traseras en intervalos de 3-4 días.

50 [0092] 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-estreptomina. 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 con ECD de DR4 (descrita en el ejemplo 1).

60 [0093] 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.

[0094] Después de la etapa de lavado, se añadieron a cada pocillo 50 μ l de 0,4 μ g/ml de proteína de inmuno adhesina con ECD de DR4 en un tampón de ensayo. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un aparato de agitación, seguido de tres lavados con tampón de lavado.

[0095] Después de las etapas de lavado, se añadieron 100 μ l de los sobrenadantes de hibridoma o anticuerpo purificado con columnas de proteína G-sefarosa (10 μ g/ml) a los pocillos designados. Se añadieron 100 μ l 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.

[0096] A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 μ l 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% 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 μ l de sustrato (sustrato de peroxidasa en micropocillos de TMB, Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD) y la incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición a cada pocillo de 50 μ l de solución de detención de componente en TMB-1 (dietilglicol, Kirkegaard & Perry) y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación automatizado.

[0097] Se consideraron los sobrenadantes de los hibridomas cribados inicialmente en el ELISA por su capacidad de unirse a DR4-IgG, pero no a CD4-IgG. Los sobrenadantes que dieron positivo en el ELISA se analizaron posteriormente mediante análisis FACS utilizando células 9D (una línea de células B linfoides humana que expresa DR4; 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 μ l 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 μ l de sobrenadante de cultivo o anticuerpo purificado (10 μ g/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 μ l 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 μ l de tampón clasificador de células y, a continuación, se analizaron mediante FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

[0098] La figura 2 muestra la tinción en FACS de células 9D. Dos anticuerpos particulares 4E7.24.3 y 4H6.17.8, reconocieron el receptor DR4 en las células 9D.

EJEMPLO 3

Ensayo de la capacidad de anticuerpos de DR4 para inducir agonísticamente la apoptosis

[0099] Se analizaron los sobrenadantes de hibridoma y los anticuerpos purificados (tal y como se describe en el Ejemplo 2 anterior) por su actividad para inducir la apoptosis mediada por DR4 en las células 9D. Se incubaron las células 9D (5×10^5 células/0,5 ml) con 1 μ g de mAbs de DR4 (4E7.24.3 o 4H6.17.8; véase el ejemplo 2 anterior) o anticuerpos de control IgG en 200 μ l de medio RPMI completo a 4°C durante 15 minutos. A continuación, se incubaron las células durante 5 minutos a 37°C con o sin 10 μ g de anticuerpo Fc de IgG anti-ratón de cabra (ICN Pharmaceuticals) en 300 μ l de RPMI completo. En este punto, se incubaron las células toda la noche a 37°C y 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 μ l de tampón de unión. Se añadieron a las células 10 μ l de anexina-V-FITC (1 μ g/ml) y 10 μ l de yoduro de propidio. Después de la incubación durante 15 minutos en la oscuridad, se analizaron las células 9D mediante FACS.

[0100] Tal y como se muestra en la Figura 3, ambos anticuerpos de DR4 (en ausencia del Fc de IgG anti-ratón de cabra) indujeron la apoptosis en las células 9D en comparación con los anticuerpos de control. Sin embargo, la actividad agonística de ambos anticuerpos de DR4 aumentó mediante la reticulación del receptor de DR4 en presencia de Fc de IgG anti-ratón de cabra (ver Figura 4). Esta mayor apoptosis (Figura 4) por ambos anticuerpos de DR4 es comparable con la actividad apoptótica de Apo-2L en células 9D (datos no mostrados).

EJEMPLO 4

Ensayo de la capacidad del anticuerpo de DR4 para bloquear la apoptosis de 9D inducida por Apo-2L

[0101] Se analizaron los sobrenadantes de hibridoma y los anticuerpos purificados (tal y como se describe en el Ejemplo 2 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/0,5 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. Se suspendieron en medio RPMI completo 0,5 ml de Apo-2L (1 µg/ml; Apo-2L etiquetado con His soluble preparado tal y como se describe en WO 97/25428), se preincubaron con anticuerpo de DR4 (4H6.17.8) diluido en serie y/o un anticuerpo Apo-2 (mAb 3F11, Genentech, Inc.), y a continuación se añadieron en los tubos que contenían las células 9D. Se incubaron las células 9D en hielo durante 15 min y a continuación se incubaron 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.

[0102] Los resultados se muestran en la Figura 5. 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 DR4 o el receptor referido como Apo-2. De este modo, para detectar cualquier actividad de bloqueo de los anticuerpos de DR4, se necesitó bloquear la interacción entre Apo-2 y Apo-2L. En combinación con el anticuerpo anti-Apo-2, 3F11, el anticuerpo de DR4 4H6.17.8 fue 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 la actividad agonística de los anticuerpos de DR4 solos, tal y como se muestra en la figura 5. Por consiguiente, se cree que el anticuerpo 4H6.17.8 es un anticuerpo de bloqueo de DR4.

EJEMPLO 5

Isotipado de anticuerpos

[0103] Los isotipos de los anticuerpos 4H6.17.8 y 4E7.24.3 (tal y como se han descrito anterior) se determinaron 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 2 anterior). A continuación, se bloquearon los pocillos de las placas de microtitulación con 200 µl de albúmina sérica bovina al 2% y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron de nuevo las placas tres veces con tampón de lavado.

[0104] A continuación, se añadieron 100 µl de 5 µg/ml de anticuerpos de DR4 purificados o 100 µl del sobrenadante de cultivo del hibridoma 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.

[0105] El análisis de isotipado mostró que los anticuerpos 4H6.17.8 y 4E7.24.3 son anticuerpos IgG1.

EJEMPLO 6

Ensayo ELISA para analizar la unión de los anticuerpos de DR4 a otros receptores de Apo-2L

[0106] Se realizó un ELISA para determinar si los dos anticuerpos de DR4 descritos en el ejemplo 2 eran capaces de unirse a otros receptores de Apo-2L conocidos además de DR4. Específicamente, se analizaron los anticuerpos de DR4 para la unión a Apo-2 [véase, por ejemplo, Sheridan et al., Science, 277:818-821 1 (1997)], DcR1 [Sheridan et al., supra], y DcR2 [Marsters et al., Curr. Biol., al., 7:1003-1006 (1997)]. El ELISA se realizó esencialmente tal y como se ha descrito en el ejemplo 2 anterior.

[0107] Los resultados se muestran en la figura 6. El anticuerpo de DR4 4E7.24.3 se unió a DR4, pero no a ninguno de los otros receptores Apo-2L, Apo-2, DcR1 o DcR2. En cambio, el anticuerpo de DR4 4H6.17.8 mostró cierta reactividad cruzada con Apo-2, pero no con DcR1 o DcR2.

Depósito de material

[0108] 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
4E7.24.3	HB-12454	13 de enero de 1998
4H6.17.8	HB12455	13 de enero de 1998

[0109] 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

5 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 dejarse 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).

10 **[0110]** 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 debe interpretarse como una licencia para realizar la invención contraviniendo los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patente.

15 **[0111]** La memoria escrita anteriormente se considera que es suficiente para permitir a un experto en la materia realizar la invención. La presente invención no se limita en su alcance por la construcción depositada, ya que la realización depositada pretende ser una ilustración individual de ciertos aspectos de la presente invención y cualquier construcción que sea funcionalmente equivalente se encuentra en el alcance de la invención. El depósito del material de la presente invención no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en la
20 presente invención sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el modo óptimo de la misma, ni se interpreta como limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa. De hecho, para los expertos en la materia serán evidentes diversas modificaciones de la presente invención a partir de la descripción anterior, además de las mostradas y descritas en el presente
25 documento, y se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo monoclonal agonista aislado que (a) se une específicamente a un polipéptido receptor de muerte 4 (DR4) que comprende los residuos de aminoácidos 24-218, 1-218, ó 1-468 de la figura 1 (SEC ID NO:1), (b) induce la apoptosis en por lo menos un tipo de célula de mamífero que expresa el polipéptido DR4 y (c) no se une a los receptores señuelo DcR1 o DcR2,
- 10 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, que es un anticuerpo humano.
3. Anticuerpo según la reivindicación 1, que es un anticuerpo quimérico.
4. Anticuerpo según la reivindicación 1, que es un anticuerpo humanizado.
- 15 5. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que dicha célula de mamífero es una célula cancerosa.
6. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se une al mismo epítipo que (1) el epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo la American Type Culture Collection de Número de Acceso ATCC HB-12454 o (2) el epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo la American Type Culture Collection de Número de Acceso ATCC
20 HB-12455.
7. Línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo según la reivindicación 1 o la reivindicación 6.
- 25 8. Línea celular de hibridoma según la reivindicación 7, que ha sido depositada bajo la American Type Culture Collection de Números de Acceso ATCC HB-12454 o ATCC HB12455.
9. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, producido por la línea celular de hibridoma según la reivindicación 8.
- 30 10. Ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de DR4 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
11. Composición que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un portador.
- 35 12. Composición según la reivindicación 11, en la que dicho portador es un portador farmacéuticamente aceptable.
13. Método de inducción in vitro o ex vivo de la apoptosis en células de mamífero que comprende exponer las células de mamífero a una cantidad eficaz de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 40 14. Método según la reivindicación 13, en el que dichas células de mamífero son células cancerosas.
15. Utilización de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la fabricación de un medicamento para inducir la apoptosis en células de mamífero.
- 45 16. Utilización según la reivindicación 15, en la que dichas células de mamífero son células cancerosas.
17. Artículo de fabricación, que comprende un recipiente y una composición contenida en dicho recipiente, en el que la composición incluye un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 50 18. Molécula dimérica que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 unida a una inmunoglobulina heteróloga.

ES 2 368 823 T3

1 ATGGCGCCAC CACCAGCTAG AGTACATCTA GGTGCGTTCC TGGCAGTGAC
 TACCGCGGTG GTGGTCGATC TCATGTAGAT CCACGCAAGG ACCGTCACTG
 1 MetAlaProP roProAlaAr gValHisLeu GlyAlaPheL euAlaValTh

 51 TCCGAATCCC GGGAGCGCAG CGAGTGGGAC AGAGGCAGCC GCGGCCACAC
 AGGCTTAGGG CCCTCGCGTC GCTCACCCCTG TCTCCGTCGG CGCCGGTGTG
 rProAsnPro GlySerAlaA laSerGlyTh rGluAlaAla AlaAlaThrPro

 101 CCAGCAAAGT GTGGGGCTCT TCCGCGGGGA GGATTGAACC ACGAGGCGGG
 GGTGTTTCA CACCCCGAGA AGGCGCCCCT CCTAACTTGG TGCTCCGCC
 35 SerLysVa lTrpGlySer SerAlaGlyA rgIleGluPr oArgGlyGly

 151 GGCCGAGGAG CGCTCCCTAC CTCCATGGGA CAGCACGGAC CCAGTGCCCG
 CCGGCTCCTC GCGAGGGATG GAGGTACCCT GTCGTGCCTG GGTACGCGGC
 GlyArgGlyA laLeuProTh rSerMetGly GlnHisGlyP roSerAlaArg

 201 GGCCCGGGCA GGGCGCGCCC CAGGACCCAG GCCGGCGCGG GAAGCCAGCC
 CCGGGCCCGT CCGCGCGGGG GTCCTGGGTC CGGCCGCGCC CTTCGGTCCG
 68 AlaArgAla GlyArgAlaP roGlyProAr gProAlaArg GluAlaSerP

 251 CTCGGCTCCG GGTCCACAAG ACCTTCAAGT TTGTCGTCGT CGGGGTCCTG
 GAGCCGAGGC CCAGGTGTTC TGGAAATTCA AACAGCAGCA GCCCCAGGAC
 roArgLeuAr gValHisLys ThrPheLysP heValValVa lGlyValLeu

 301 CTGCAGGTCG TACCTAGCTC AGCTGCAACC ATGATCAATC AATTGGCACA
 GACGTCCAGC ATGGATCGAG TCGACGTTGG TAGTTTGAAG TACTAGTTAG
 101 LeuGlnValV alProSerSe rAlaAlaThr IleLysLeuH isAspGlnSe

 351 AATTGGCACA CAGCAATGGG AACATAGCCC TTTGGGAGAG TTGTGTCCAC
 TTAACCGTGT GTCGTTACCC TTGTATCGGG AAACCCCTCTC AACACAGGTG
 rIleGlyThr GlnGlnTrpG luHisSerPr oLeuGlyGlu LeuCysProPro

 401 CAGGATCTCA TAGATCAGAA CGTCCCTGGAG CCTGTAACCG GTGCACAGAG
 GTCCTAGAGT ATCTAGTCTT GCAGGACCTC GGACATTGGC CACGTGTCTC
 135 GlySerHi sArgSerGlu ArgProGlyA laCysAsnAr gCysThrGlu

 451 GGTGTGGGTT ACACCAATGC TTCCAACAAT TTGTTTGCTT GCCTCCCATG
 CCACACCCAA TGTGGTTACG AAGGTTGTTA AACAAACGAA CGGAGGGTAC
 GlyValGlyT yrThrAsnAl aSerAsnAsn LeuPheAlaC ysLeuProCys

 501 TACAGCTTGT AAATCAGATG AAGAAGAGAG AAGTCCCTGC ACCACGACCA
 ATGTCGAACA TTTAGTCTAC TTCTTCTCTC TTCAGGGACG TGGTGTGGT
 168 ThrAlaCys LysSerAspG luGluGluAr gSerProCys ThrThrThrA

 551 GGAACACAGC ATGTCAGTGC AAACCAGGAA CTTTCCGGAA TGACAATTCT
 CCTTGTGTGC TACAGTCACG TTTGGTCCTT GAAAGGCCTT ACTGTTAAGA
 rgAsnThrAl aCysGlnCys LysProGlyT hrPheArgAs nAspAsnSer

 601 GCTGAGATGT GCCGGAAGTG CAGCACAGGG TGCCCCAGAG GGATGGTCAA
 CGACTCTACA CGGCCTTCAC GTCGTGTCCC ACGGGGTCTC CCTACCAGTT
 201 AlaGluMetC ysArgLysCy sSerThrGly CysProArgG lyMetVally

 651 GGTC AAGGAT TGTACGCCCT GGAGTGACAT CGAGTGTGTC CACAAAGAAT
 CCAGTTCCTA ACATGCGGGA CCTCACTGTA GTCACACAG GTGTTTCTTA
 sValLysAsp CysThrProT rpSerAspIl eGluCysVal HisLysGluSer

FIG. 1A

ES 2 368 823 T3

```

701 CAGGCAATGG ACATAATATA TGGGTGATTT TGGTTGTGAC TTTGTTGTGT
GTCCGTTACC TGTATTATAT ACCCACTAAA ACCAACACTG AAACCAACAA
235 GlyAsnGl yHisAsnIle TrpValIleL euValValTh rLeuValVal

751 CCGTTGCTGT TGGTGGCTGT GCTGATTGTC TGTGTTGCA TCGGCTCAGG
GGCAACGACA ACCACCGACA CGACTAACAG ACAACAACGT AGCCGAGTCC
ProLeuLeuL euValAlaVa lLeuIleVal CysCysCysI leGlySerGly

801 TTGTGGAGGG GACCCCAAGT GCATGGACAG GGTGTGTTTC TGGCGCTTGG
AACACCTCCC CTGGGGTTCA CGTACCTGTC CCACACAAG ACCCGGAACC
268 CysGlyGly AspProLysC ysMetAspAr gValCysPhe TrpArgLeuG

851 GTCTCCTACG AGGGCCTGGG GCTGAGGACA ATGCTCACAA CGAGATTCTG
CAGAGGATGC TCCCGGACCC CGACTCCTGT TACGAGTGT GCTCTAAGAC
lyLeuLeuAr gGlyProGly AlaGluAspA snAlaHisAs nGluIleLeu

901 AGCAACGCAG ACTCGCTGTC CACTTTCGTC TCTGAGCAGC AAATGGAAAG
TCGTTGCGTC TGAGCGACAG GTGAAAGCAG AGACTCGTCG TTACCTTTC
301 SerAsnAlaA spSerLeuSe rThrPheVal SerGluGlnG lnMetGluSe

951 CCAGGAGCCG GCAGATTGA CAGGTGTCAC TGTACAGTCC CCAGGGGAGG
GGTCCTCGGC CGTCTAAACT GTCCACATGT ACATGTCAGG GGTCCCCTCC
rGlnGluPro AlaAspLeuT hrGlyValTh rValGlnSer ProGlyGluAla

1001 CACAGTGTCT GCTGGGACCG GCAGAAGCTG AAGGGTCTCA GAGGAGGAGG
GTGTCACAGA CGACCCTGGC CGTCTTCGAC TTCCCAGAGT CTCCTCCTCC
335 GlnCysLe uLeuGlyPro AlaGluAlaG luGlySerGl nArgArgArg

1051 CTGCTGGTTC CAGCAAATGG TGCTGACCCC ACTGAGACTC TGATGCTGTT
GACGACCAAG GTCGTTTACC ACGACTGGGG TGACTIONGAG ACTACGACAA
LeuLeuValP roAlaAsnGl yAlaAspPro ThrGluThrL euMetLeuPhe

1101 CTTTGACAAG TTGCAAACA TCGTGCCCTT TGACTIONGAG GACCAGTCA
GAAACTGTTC AAACGTTTGT AGCACGGGAA ACTGAGGACC CTTGGTCGAGT
368 PheAspLys PheAlaAsnI leValProPh eAspSerTrp AspGlnLeuM

1151 TGAGGCAGCT GGACCTCACG AAAAATGAGA TCGATGTGGT CAGAGCTGGT
ACTCCGTCGA CCTGGAGTGC TTTTACTCT AGCTACACCA GTCTCGACCA
etArgGlnLe uAspLeuThr LysAsnGluI leAspValVa lArgAlaGly

1201 ACAGCAGGCC CAGGGGATGC CTTGTATGCA ATGCTGATGA AATGGGTCAA
TGTCGTCCGG GTCCCTACG GAACATACGT TACGACTACT TTACCCAGTT
401 ThrAlaGlyP roGlyAspAl aLeuTyrAla MetLeuMetL ysTrpValAs

1251 CAAAAGTGA CGGAACGCCT CGATCCACAC CCTGCTGGAT GCCTGGAGA
GTTTTGACCT GCCTTGCGGA GCTAGGTGTG GGACGACCTA CGGAACCTCT
nLysThrGly ArgAsnAlaS erIleHisTh rLeuLeuAsp AlaLeuGluArg

1301 GGATGGAAGA GAGACATGGA AAAGAGAAGA TTCAGGACCT CTTGGTGGAC
CCTACCTTCT CTCTGTACGT TTTCTTCT AAGTCTGGA GAACCACTG
435 MetGluGl uArgHisAla LysGluLysI leGlnAspLe uLeuValAsp

1351 TCTGGAAAGT TCATCTACTT AGAAGATGGC ACAGGCTCTG CCGTGTCTTT
AGACCTTCA AGTAGATGAA TCTTCTACCG TGTCCGAGAC GGCACAGGAA
SerGlyLysP heIleTyrLe uGluAspGly ThrGlySerA laValSerLeu

1401 GGAGTGA
CCTCACT
468 GluOP*

```

FIG. 1B

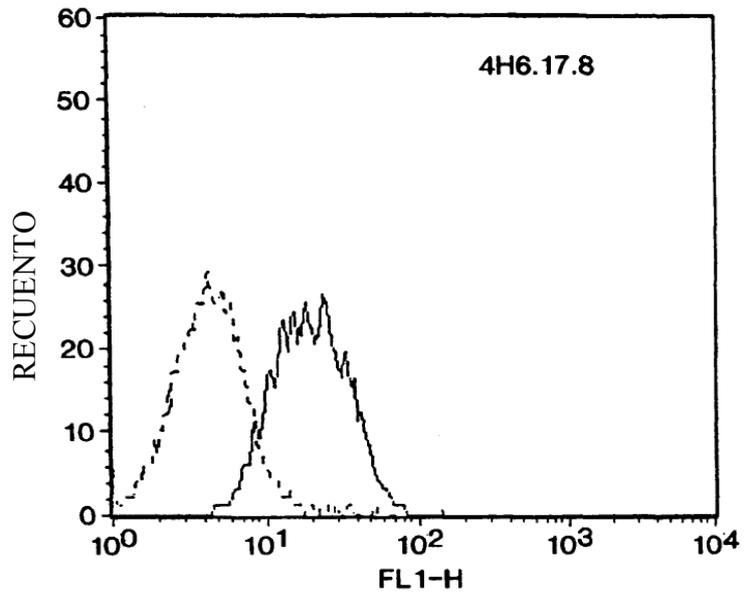


FIG. 2A

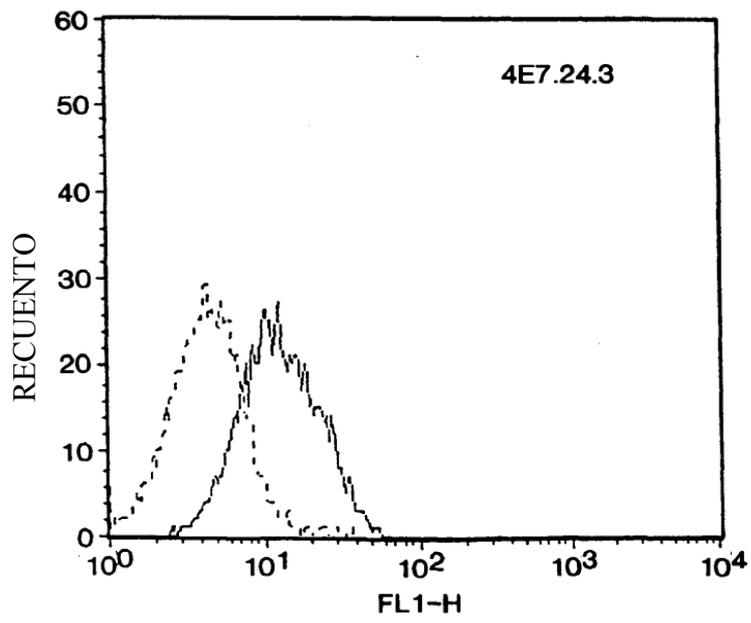


FIG. 2B

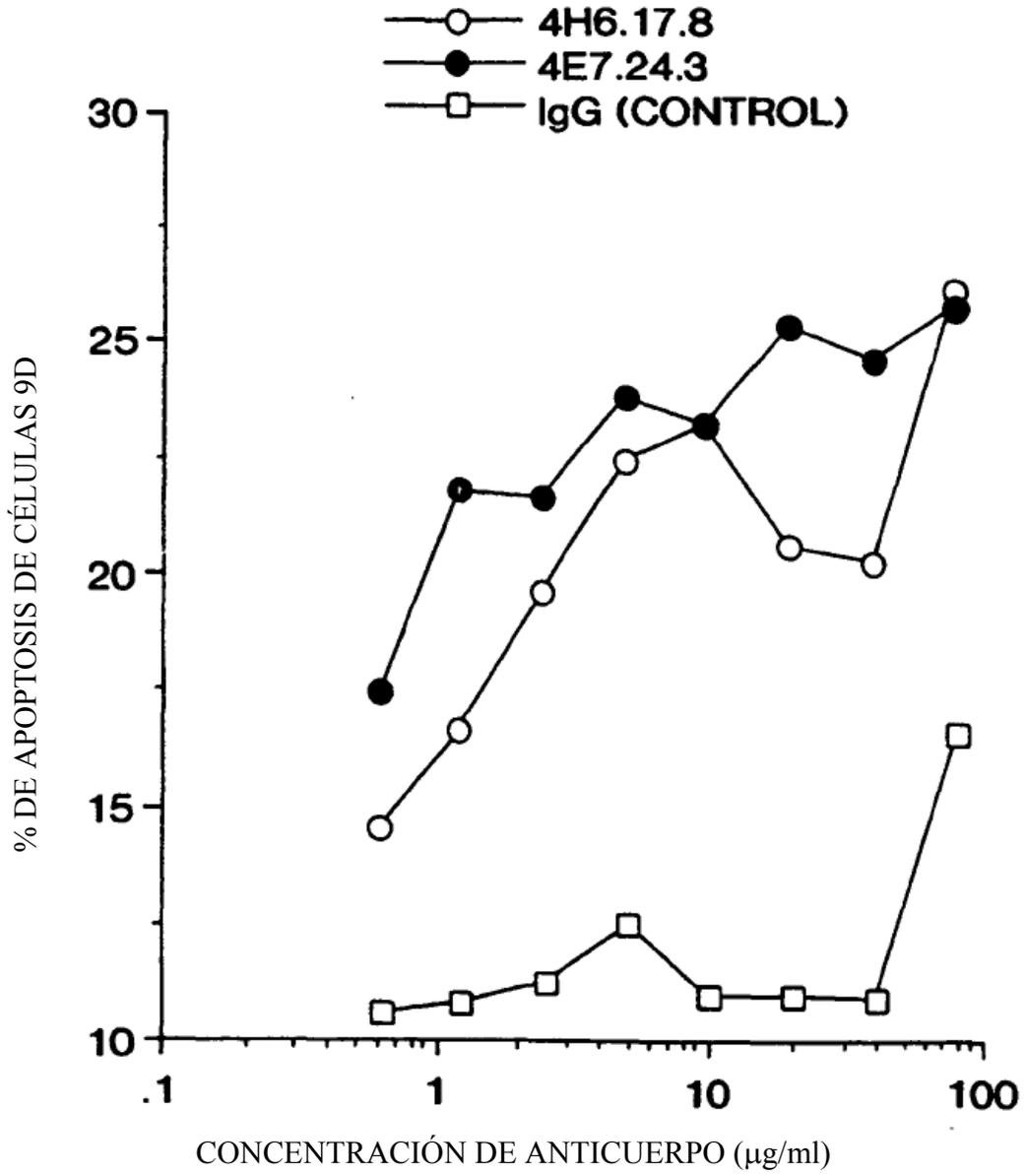


FIG. 3

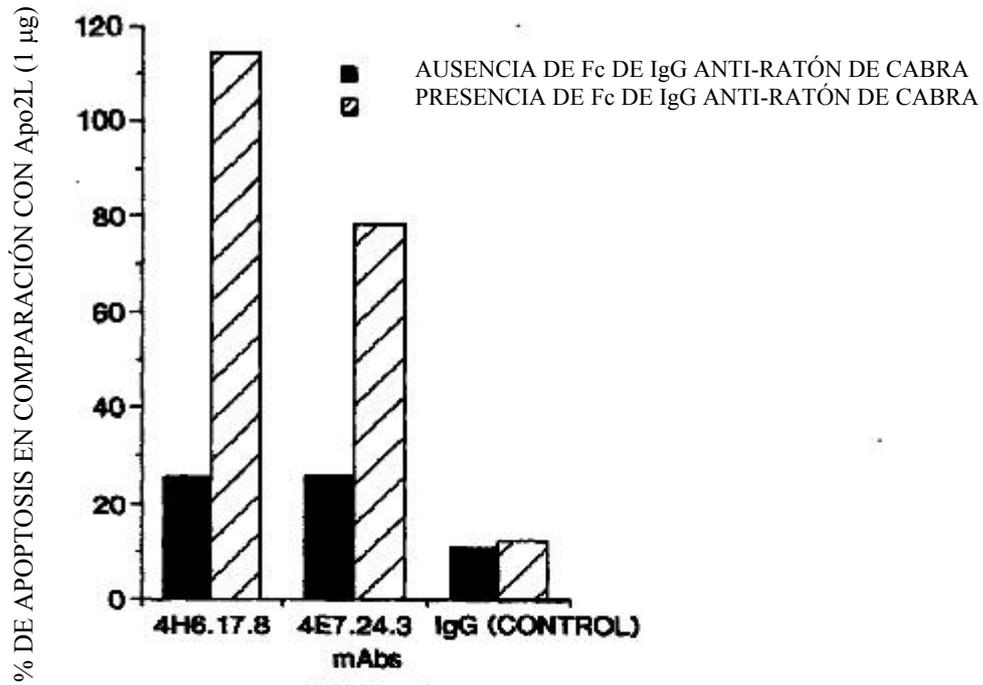


FIG. 4

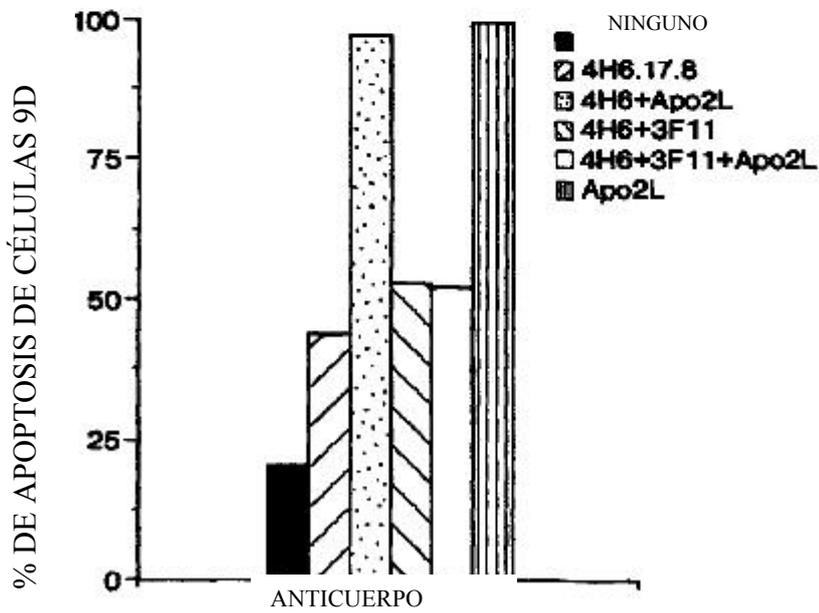


FIG. 5

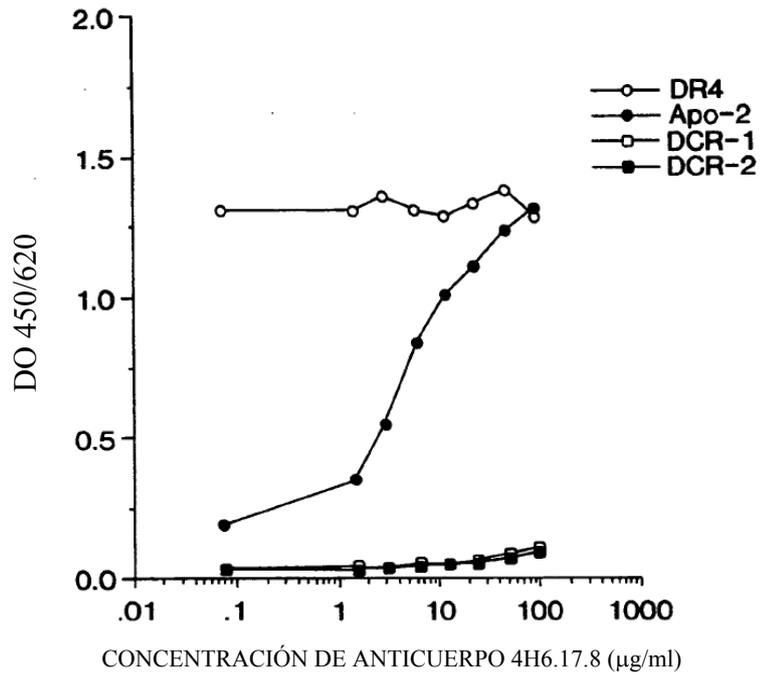


FIG 6 A

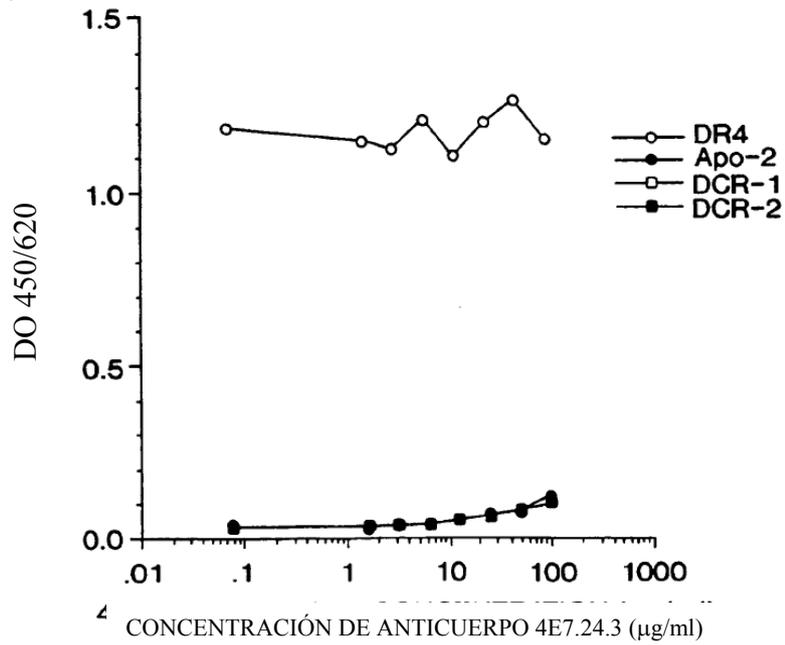


FIG 6 B