

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 392**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/525 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00950255 .0**

96 Fecha de presentación: **26.06.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1194555**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.04.2002**

54 Título: **Métodos para producir ligando Apo-2 utilizando iones metálicos divalentes**

30 Prioridad:

28.06.1999 US 141342 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

10.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

10.12.2012

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**ASHKENAZI, AVI J.;
HYMOWITZ, SARAH;
KELLEY, ROBERT F.;
KOUMENIS, IPHEGENIA;
LEUNG, SUSAN;
O'CONNELL, MARK;
PAI, ROGER;
SHAHROKH, ZAHRA y
SIMMONS, LAURA**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 392 392 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

Métodos para producir ligando apo-2 utilizando iones metálicos divalentes.

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere en general a la producción de ligando Apo-2 y formulaciones de ligando Apo-2 utilizando ion cinc divalente. También se proporciona la utilización de dicho ligando Apo-2 y formulaciones de ligando Apo-2 que presentan la formación y estabilidad mejorada de trímeros de Apo-2L.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El control de la cantidad de células en los mamíferos se cree que está determinado, en parte, por un equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular. Una forma de muerte celular, a veces denominada muerte celular necrótica, se caracteriza habitualmente como una forma patológica de muerte celular resultante de algún trauma o daño celular. En cambio, existe otra forma "fisiológica" de muerte celular que normalmente procede de una manera ordenada o controlada. Esta forma ordenada o controlada de muerte celular 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 tiene lugar de forma natural en muchos procesos fisiológicos, incluyendo el desarrollo embrionario y la selección clonal en el sistema inmune [Itoh et al., *Cell*, 66:233-243 (1991)].

15

20

[0003] Se han identificado varias moléculas, tales como el factor α de necrosis tumoral ("TNF- α "), factor de necrosis tumoral β ("TNF- β " o "linfotóxina- α "), linfotóxina- β ("LT- β "), ligando CD30, ligando CD27, ligando CD40, ligando OX-40, ligando 4-1BB, ligando Apo-1 (también referido como ligando Fas o ligando CD95), ligando Apo-2 (también referido como TRAIL, AIM-1 o AGP-1), y ligando Apo-3 (también referido como TWEAK), como miembros de la familia de citoquinas del factor de necrosis tumoral ("TNF") [véase, por ejemplo, Gruss y Dower, *Blood*, 85:3378-3404 (1995); Pitti et al., *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996); Wiley et al., *Immunity*, 3:673-682 (1995); Browning et al., *Cell*, 72:847-856 (1993); Armitage et al. *Nature*, 357:80-82 (1992), WO 97/01633 publicada el 16 de enero de 1997; WO 97/25428 publicada el 17 de Julio de 1997; WO 97/46686 publicada el 11 de diciembre de 1997; WO 97/33899 publicada el 18 de septiembre de 1997; Marsters et al., *Curr. Biol.*, 8:525-528 (1998); Chicheportiche et al., *Biol. Chem.*, 272:32401-32410 (1997)]. Entre estas moléculas, se ha descrito que TNF- α , TNF- β , ligando CD30, ligando 4-1BB, ligando Apo-1, ligando Apo-2 (TRAIL) y ligando Apo-3 (TWEAK) están implicadas en la muerte celular apoptótica.

25

30

35

[0004] La inducción de diversas respuestas celulares mediadas por estas citoquinas de la familia del TNF se cree que se inicia por su unión a receptores celulares específicos. Se han identificado 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 de humano y ratón correspondiente a ambos tipos de receptores [Loetscher et al., *Cell*, 61:351 (1990); Schall et al., *Cell*, 61:361 (1990); Smith et al., *Science*, 248:1019-1023 (1990); Lewis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:2830-2834 (1991); Goodwin et al., *Mol. Cell. Biol.*, 11:3020-3026 (1991)]. Se han asociados amplios polimorfismos con ambos genes de receptores de TNF [véase, por ejemplo, Takao et al., *Immunogenetics*, 37:199-203 (1993)]. Ambos TNFR comparten la estructura típica de receptores de la superficie celular que incluyen regiones extracelular, transmembrana e intracelular. Las partes extracelulares de ambos receptores se hallan naturalmente también como proteínas de unión a TNF solubles [Nophar, Y. et al., *EMBO J.*, 9:3269 (1990); y Kohno, T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:8331 (1990)]. La clonación de receptores de TNF solubles recombinantes fue descrita por Hale et al. [*J. Cell. Biochem. Supplement* 15F, 1991, p. 113 (P424)].

40

45

[0005] La parte extracelular de TNFR de tipo 1 y tipo 2 (TNFR1 y TNFR2) contiene un patrón de secuencia de aminoácidos repetitivo de cuatro dominios ricos de cisteína (CRD) designados 1 a 4, empezando desde el extremo terminal NH₂. Cada CRD tiene aproximadamente 40 aminoácidos de largo y contiene 4 a 6 residuos de cisteína en las posiciones que están bien conservadas [Schall et al., supra; Loetscher et al., supra; Smith et al., supra; Nophar et al., supra; Kohno et al., supra]. En TNFR1, los límites aproximados de los cuatro CRD son los siguientes: CRD1 aminoácidos 14 a aproximadamente 53; CRD2 aminoácidos de aproximadamente 54 a aproximadamente 97; CDR3 aminoácidos de aproximadamente 98 a aproximadamente 138; CDR4 aminoácidos de aproximadamente 139 a aproximadamente 167. En TNFR2, CRD2 incluye aminoácidos 17 a aproximadamente 54; CDR2 aminoácidos de aproximadamente 55 a aproximadamente 97; CDR3 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 ligando también se describe en Banner et al., supra.

50

55

60

[0006] Un patrón repetitivo similar de CRD existe en varias 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., *J. Exp. Med.*, 169:1747-1756 (1989) e Itoh et al., *Cell*, 66:233-243 (1991)]. Los CRD también se hallan en las proteínas T2 del tipo TNFR (sTNFR) de poxvirus de Shope y mixoma [Upton et al., *Virology*, 160:20-29 (1987); Smith et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,

65

176:335 (1991); Upton et al., *Virology*, 184: 370 (1991)]. La alineación óptima de estas secuencias indica que las posiciones de los residuos de cisteína están bien conservadas. Estos receptores se denominan a veces colectivamente como miembros de la superfamilia de receptores TNF/NGF. Estudios recientes en p75NGFR mostraron que la delección de CDR1 [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)] presentaban un efecto escaso o nulo en la unión a NGF [Yan, H. y Chao, M.V., *supra*]. EL NGFR p75 contiene un tramo rico en prolina de aproximadamente 60 aminoácidos, entre su CRD4 y 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 halla en TNFR 2, pero no en TNFR1.

[0007] Los ligandos de la familia de TNF identificados hasta la fecha, con la excepción de la linfotóxina α , son proteínas transmembrana del tipo II, cuyo extremo C-terminal es extracelular. En cambio, la mayoría de receptores en la familia de receptores TNF (TNFR) identificados hasta la fecha son proteínas transmembrana de tipo I. Tanto en las familias de ligandos de TNF como los receptores, se ha observado homología entre los miembros de la familia principalmente en el dominio extracelular ("ECD"). Varias de las citoquinas de la familia de TNF, incluyendo TNF- α , el ligando Apo-1 y el ligando CD40, se separan proteolíticamente en la superficie celular; la proteína resultante en cada caso forma habitualmente una molécula homotrimérica que funciona como citoquina soluble. Las proteínas de la familia de receptores de TNF también se separan normalmente proteolíticamente para liberar los ECD de receptores solubles que pueden funcionar como inhibidores de las citoquinas afines.

[0008] Recientemente, se han identificado otros miembros de la familia de TNFR. Dichos miembros de la familia de TNFR recientemente identificados incluyen CAR1, HVEM y osteoprotegerina (OPG) [Brojtsch 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 de tipo TNFR conocidas, Simonet et al., *supra*, describen que la OPG no contiene una secuencia que abarca la transmembrana hidrofóbica. Se cree que la OPG actúa como un receptor señuelo tal como se describe a continuación.

[0009] Se ha identificado en ratón otro nuevo miembro de la familia de receptores TNF/NGF, un receptor referido como GTR para "gen relacionado con la familia de receptores del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides" [Nocentini et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:6216-6221 (1997)]. El receptor GTR de ratón es una proteína transmembrana de tipo I de 228 aminoácidos que se expresa en linfocitos T del timo, bazo y nódulos linfáticos en ratones normales. La expresión del receptor GTR de ratón se indujo en linfocitos T tras la activación con anticuerpos anti-CD3, Con A o forbol 12-miristato 13-acetato.

[0010] En Marsters et al., *Curr. Biol.*, 6:750 (1996), los investigadores describen un polipéptido humano de secuencia nativa de longitud completa, denominado Apo-3, que muestra similitud con la familia de TNFR en sus repeticiones extracelulares ricas en cisteína 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)]. También se ha referido a Apo-3 por otros investigadores como DR3, wsl-1, TRAMP, y LARD [Chinnaiyan et al., *Science*, 274:990 (1996); Kitson et al., *Nature*, 384:372 (1996); Bodmer et al., *Immunity*, 6:79 (1997); Screaton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:4615-4619 (1997)].

[0011] Pan et al. han descrito otro miembro de la familia de receptores de TNF referido como "DR4" [Pan et al., *Science*, 276: 111-113 (1997)]. Se describió que el DR4 contenía un dominio de muerte citoplasmática capaz de atraer el aparato del suicidio celular. Pan et al. describen que el DR4 se cree que es un receptor para el ligando conocido como ligando Apo-2 o TRAIL.

[0012] En Sheridan et al., *Science*, 277:818-821 (1997) y Pan et al., *Science*, 277:815-818 (1997), se describe otra molécula que se cree que es un receptor para el ligando Apo-2 (TRAIL). Esa molécula se refiere como DR5 (también se ha referido alternativamente como Apo-2; TRAIL-R2, TRICK2 o KILLER [Screaton et al., *Curr. Biol.*, 7:693-696 (1997); Walczak et al., *EMBO J.*, 16:5386-5387 (1997); Wu et al., *Nature Genetics*, 17:141-143 (1997)]. Como DR4, se describe que DR5 contiene un dominio de muerte citoplasmática y es capaz de señalizar la apoptosis.

[0013] Recientemente se identificó otro receptor que contiene el dominio de muerte, DR6 [Pan et al., *FEBS Letters*, 431: 351-356 (1998)]. A parte de contener cuatro posibles dominios extracelulares y un dominio de muerte citoplasmática, se cree que DR6 contiene una posible secuencia de cremalleras de leucina que se solapa con un motivo rico en prolina en la región citoplasmática. El motivo rico en prolina se parece a las secuencias que se unen a los dominios src-homología-3, que se hallan en muchas moléculas de transducción de señales intracelulares.

[0014] Un grupo adicional de miembros de la familia de TNFR identificados recientemente, que se refieren como "receptores señuelo", se cree que funcionan como inhibidores en lugar de transductores de señales. Este grupo incluye DCR1 (también referido como TRID, LIT o TRAIL-R3) [Pan et al., *Science*, 276:111-113 (1997); Sheridan et al., *Science*, 272:818-821 (1997); Mc-Farlane et al., *J. Biol. Chem.*, 272:25417-25420 (1997); Schneider et al., *FEBS Letters*, 416:329-334 (1997); Degli-Esposti et al., *J. Exp. Med.*, 186:1165-1170 (1997); y Mongkolsapaya et al., *J. Immunol.*, 160:3-6 (1998)] y DCR2 (también denominado TRUND o TRAIL-R4) [Marsters et al., *Curr. Biol.*, 7:1003-1006 (1997); Pan et al., *FEBS Letters*, 424: 41-45 (1998); Degli-Esposti et al., *Immunity*, 7:813-820 (1997)], ambas

moléculas de la superficie celular, así como OPG [Simonet et al., supra] y DCR3 [Pitti et al., Nature, 396:699-703 (1998)], ambas son proteínas solubles secretadas.

5 [0015] Para una revisión de la familia de TNF de citoquinas y sus receptores, véase Ashkenazi et al., Science, 281:1305-1308 (1998); Golstein, Curr. Biol., 7:750-753 (1997); y Gruss y Dower, supra.

10 [0016] Aunque se ha observado que los sitios de unión a cinc juegan papeles estructurales en las interacciones proteína-proteína en ciertas proteínas que implican diversas interfases [Feese et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 91:3544-3548 (1994); Somers et al., Nature, 372:478-481 (1994); Raman et al., Cell, 95:939-950 (1998)], ninguno de los miembros previamente caracterizados estructuralmente de la familia de TNF (ligando CD40, TNF-alfa, o TNF-beta) se une a metales. La utilización de iones metálicos, tales como cinc, en formulaciones de varias hormonas, tales como la hormona del crecimiento humano (hGH) se ha descrito en la literatura. [Véase, por ejemplo, WO 92/17200 publicada el 15 de octubre de 1992]. Así mismo, la implicación del cinc en la unión de hGH a receptores se describió en WO92/03478 publicada el 5 de marzo de 1992. Los papeles de la unión del cinc en los dímeros de interferón-alfa y dímeros de interferón-beta se describieron en Walter et al., Structure, 4:1453-1463 (1996) y Karpusas et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 94:11813-11818 (1997), respectivamente.

20 [0017] Las estructuras y papeles biológicos de varios iones metálicos, tales como cinc, han sido revisados en la técnica, véase, por ejemplo, Christianson et al., Advances in Protein Chemistry, 42:281-355 (1991).

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

25 [0018] La presente invención se basa en el descubrimiento de que la inclusión de uno o más iones metálicos divalentes en métodos o procesos para producir ligando Apo-2, o formulaciones que contienen ligando Apo-2, da lugar a un rendimiento incrementado y estabilidad de trímeros de ligando Apo-2. Actualmente se cree que dicha inclusión de uno o más iones metálicos divalentes también puede mejorar el plegamiento del ligando Apo-2 o el ensamblaje del trímero de Apo-2L tras la expresión en un cultivo celular recombinante. En medios oxidativos, las cisteínas libres en los monómeros de Apo-2L pueden formar puentes disulfuro intermoleculares, que ocasionan dímeros de Apo-2L independientes, así como especies de dímeros de Apo-2L unidos por disulfuro en formas triméricas de Apo-2L. Dicha formación de dímeros de Apo-2L puede conducir a la agregación, precipitación y/o desactivación de Apo-2L. La presencia de iones metálicos divalentes en los métodos y formulaciones aquí descritas puede mejorar contra dicha formación de enlaces disulfuro. Parece que la inclusión de iones metálicos divalentes durante el proceso de síntesis y ensamblaje de trímeros de Apo-2L puede mejorar adicionalmente la acumulación y recuperación de Apo-2L homotrimérico plegado correctamente. Los solicitantes han descubierto que los trímeros de ligando Apo-2 son aproximadamente 10 veces más activos (en actividad citotóxica en células cancerosas de mamífero) en comparación con dímeros de Apo-2L unidos por disulfuro.

40 [0019] Aunque la presente descripción está principalmente dirigida a ligando Apo-2, se contempla la utilización de iones metálicos divalentes para producir o estabilizar trímeros de otras proteínas. Dichas otras proteínas incluyen particularmente aquellas proteínas que requieren la formación de trímeros para la actividad biológica, por ejemplo, varios miembros de la familia de TNF.

45 [0020] En una realización, la presente invención proporciona un método de producción de ligando Apo-2 utilizando uno o más iones divalentes tal como se define en las reivindicaciones. Los métodos incluyen las etapas de proporcionar una célula huésped que comprende un vector replicable que contiene un ácido nucleico que codifica el ligando Apo-2, proporcionar medios de cultivo que contienen uno o más iones metálicos divalentes, cultivar la célula huésped en el medio de cultivo bajo condiciones suficientes para expresar el ligando Apo-2 y recuperar el ligando Apo-2 de las células huésped o los medios de cultivo celular tal como se define en las reivindicaciones. Opcionalmente, se utilizan uno o más iones metálicos divalentes durante el proceso de recuperación o purificación tal como se define en las reivindicaciones.

55 [0021] En otra realización, la presente invención proporciona una formulación que comprende ligando Apo-2 y uno o más iones metálicos divalentes tal como se define en las reivindicaciones. La composición puede ser una formulación farmacéuticamente aceptable útil, por ejemplo, en la inducción o estimulación de la apoptosis en células cancerosas de mamífero.

60 [0022] También se describen aquí artículos de fabricación y kits que incluyen dichas formulaciones de ligando Apo-2 que contienen uno o más iones metálicos divalentes. Los artículos de fabricación y los kits incluyen un recipiente, una etiqueta en el recipiente y una formulación contenida en el recipiente. La etiqueta en el recipiente indica que la formulación se puede utilizar para ciertas aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas. La formulación contiene ligando Apo-2 y uno o más iones metálicos divalentes.

65 [0023] También se describen aquí polipéptidos ligando Apo-2 producidos según los métodos aquí descritos. Dichos polipéptidos ligando Apo-2 pueden comprender los aminoácidos 114-281 de la figura 1 (SEQ ID NO:1), los aminoácidos 1-281 de la figura 1 (SEQ ID NO:1), así como fragmentos biológicamente activos o variantes de las mismas.

[0024] También se describen aquí variantes de ligando Apo-2. Particularmente, las variantes de ligando Apo-2 comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en la secuencia nativa del ligando Apo-2 (Figura 1; SEQ ID NO:1). Las variantes de ligando Apo-2 que comprenden sustituciones de alanina se proporcionan en la tabla I siguiente. También se describen aquí moléculas de ácido nucleico que codifican dichas variantes de Apo-2L y vectores y células huésped que contienen moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de Apo-2L.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0025]

La figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos de ADNc de ligando Apo-2 humano (SEQ ID NO:2) y su secuencia de aminoácidos derivada (SEQ ID NO: 1). "N" en la posición de nucleótido 447 (en SEQ ID NO:2) se utiliza para indicar base nucleotídica puede ser una "T" o "G".

La figura 2 proporciona la estructura cristalina de Apo-2L. La figura 2A muestra una vista del trímero a lo largo del eje de tres pliegues. Cada monómero es idéntico. La estructura de la proteína ordenada comienza en el residuo 120, los residuos 131-141 están desordenados, al igual que los residuos 195-201 (marcada como líneas discontinuas). El sitio de unión a cinc que incluye las cisteínas relacionadas con la triple simetría y el ligando disolvente se muestran como diagramas de relleno de espacio. La figura 2B proporciona una vista próxima estereo con ojos cruzados del sitio de unión a cinc; los ángulos entre $S\gamma$ -cinc- $S\gamma$ son 112° y los ángulos $S\gamma$ -cinc-disolvente son 107° con distancias de enlace cinc-azufre de 2,3 Angstrom y cinc-disolvente de 2,3 Angstrom. Las figuras 2 (y 5) se desarrollaron con los programas Molscrip [Kraulis et al., J. Appl. Cryst., 24:946-950 (1991)] y Raster3D [Merrit et al., Acta Cyst., D50: 869-873 (1994)]. La figura 2C proporciona un resumen de los datos cristalográficos del experimento descrito en el ejemplo 2.

La figura 3 muestra una alineación de secuencias de los miembros de la familia de TNF seleccionados: Apo2L (SEQ ID NO:1); TNF-beta (SEQ ID NO:3); TNP-alfa (SEQ ID NO:4); CD40L (SEQ ID NO:5); FasL (SEQ ID NO:6); RANKL (SEQ ID NO:7). Las flechas sobre la secuencia indican las cadenas beta en Apo2L. La numeración sobre las secuencias alineadas corresponde a la numeración de secuencias de Apo2L proporcionada en la figura 1 (SEQ ID NO:1).

La figura 4 proporciona datos de bioensayo que muestran la importancia funcional del sitio de unión a cinc. La viabilidad de células SK-MES-1 se determinó mediante un ensayo de fluorescencia de la actividad metabólica después de la incubación durante la noche con varias concentraciones de Apo-2L (forma 114-281), o Apo-2L (forma 114-281) tratada con agentes quelantes para eliminar el cinc.

La figura 5 muestra el análisis mutacional mapeado sobre un modelo de relleno de espacios de Apo-2L. El trímero está orientado como en la figura 2. Los residuos con un descenso de más de 5 veces en la bioactividad cuando mutan a alanina están marcados y sombreados intensos. Otros residuos que han sido mutados se muestran con un sombreado medio y varios de estos residuos también están marcados.

La figura 6 muestra espectros dicróicos circulares de Apo-2L (forma 114-281) antes y después del tratamiento para eliminar el cinc unido.

La figura 7 muestra la desnaturalización térmica de Apo-2L antes y después de la eliminación de cinc controlada por dicroísmo circular a 225 nm. El voltaje por dínodo se indica para soluciones 2 micromolar de Apo-2L.

La figura 8 muestra el efecto (evolución con el tiempo) de soluciones de $ZnSO_4$ en la acumulación de producto de Apo-2L soluble (gm/L) en un sistema de expresión de E. Coli utilizando un promotor AP.

La figura 9 muestra los perfiles de elución a partir de la cromatografía MPHS de lisados celulares del sistema de expresión de E. Coli (véase el ejemplo 8) realizado en presencia o ausencia de $ZnSO_4$.

La figura 10 muestra el efecto (evolución con el tiempo) de la adición de $ZnSO_4$ en la acumulación de producto de Apo-2L soluble (gm/L) en un sistema de expresión de E. Coli utilizando un promotor trp.

La figura 11 muestra el efecto (evolución con el tiempo) de la adición de $CoCl_2$ en la acumulación de producto de Apo-2L soluble (gm/L) en un sistema de expresión de E. Coli utilizando un promotor AP.

La figura 12 muestra el constructo plasmídico pAPApo2-P2RU.

La figura 13 muestra el constructo plasmídico pAPOK5.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Definiciones

[0026] Los términos "ligando Apo2", "Apo-2L" y "TRAIL" se usan en este documento para referirse a una secuencia polipeptídica que incluye los residuos de aminoácidos 114-281, inclusivos, los residuos 95-281, inclusivos, los residuos 92-281, inclusivos, los residuos 91-281, inclusivos, los residuos 41-281, inclusivos, los residuos 15-281, inclusivos o los residuos 1-281, inclusivos, de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID No: 1), así como fragmentos biológicamente activos, variantes de delección, inserción o sustitución de las secuencias anteriores. En una realización, la secuencia polipeptídica comprende los residuos 114-281 de la figura 1 (SEQ ID NO:1). Opcionalmente, la secuencia polipeptídica comprende los residuos 92-281 o los residuos 91-281 de la figura 1 (SEQ ID NO:1). Los polipéptidos Apo-2L pueden estar codificados por la secuencia de nucleótidos nativa mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO:2). Opcionalmente, el codón que codifica el residuo Pro119 (figura 1; (SEQ ID NO:2)) puede ser "CCT" o "CCG". En otra realización preferida, los fragmentos o variantes son biológicamente activos y tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 80%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 90% e, incluso más preferiblemente, una identidad de secuencia de al menos el 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% con cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente. La definición abarca las variantes de sustitución de ligando Apo2 en las que al menos uno de sus aminoácidos nativos está sustituido por un residuo de alanina. Entre las variantes de sustitución preferidas se incluyen una o más de las sustituciones de residuos identificadas en la Tabla I siguiente. La definición también abarca una secuencia nativa de ligando Apo2 aislada de una fuente de ligando Apo2 o preparada mediante procedimientos recombinantes o sintéticos. El ligando Apo2 de la invención incluye los polipéptidos referidos como ligando Apo2 o TRAIL descritos en las publicaciones WO97/01633, publicada el 16 de enero de 1997, y WO97/25428, publicada el 17 de julio de 1997. Los términos "ligando Apo2" o "Apo2L" se usan para referirse generalmente a formas del ligando Apo2 que incluyen formas monoméricas, diméricas o triméricas del polipéptido. Todas las numeraciones de los residuos de aminoácidos hacen referencia a la secuencia de Apo2L usada en la numeración según la figura 1 (SEQ ID NO:1), a menos que específicamente no se indique lo contrario. Por ejemplo, "D203" o "Asp203" se refieren al residuo de ácido aspártico en la posición 203 de la secuencia proporcionada en la figura 1 (SEQ ID NO:1)

[0027] El término "dominio extracelular de ligando Apo2" o "ECD de ligando Apo2" se refiere a una forma de ligando Apo2 que está esencialmente libre de dominios transmembrana y citoplasmático. Generalmente, el ECD tendrá menos del 1% de estos dominios transmembrana y citoplasmático y, preferiblemente, tendrá menos del 0,5% de dichos dominios.

[0028] El término "monómero de ligando Apo2" o "monómero de Apo2L" se refiere a una cadena covalente de una secuencia del dominio extracelular de Apo2L.

[0029] El término "dímero de ligando Apo2" o "dímero de Apo2L" se refiere a dos monómeros de Apo2L unidos mediante enlace covalente a través de un enlace disulfuro. El término, según se usa en este documento, incluye dímeros de Apo2L que se mantienen libres y dímeros de Apo2L que están en formas triméricas de Apo2L (es decir, asociados con otro monómero de Apo2L).

[0030] El término "trímero de ligando de Apo2" o "trímero de Apo2L" se refiere a tres monómeros de Apo2L que están asociados no covalentemente.

[0031] "Miembro de la familia de TNF" se utiliza en el sentido más amplio para referirse a varios polipéptidos que comparten cierta similitud con el factor de necrosis tumoral (TNF) con respecto a la estructura o la función. Ciertas características estructurales y funcionales asociadas con la familia de polipéptidos de TNF son conocidas en la técnicas y están descritas, por ejemplo, en la sección anterior de Antecedentes de la invención. Dichos polipéptidos incluyendo, pero sin limitación, aquellos polipéptidos referidos en la técnica como TNF-alfa, TNF-beta, ligando CD40, ligando CD30, ligando CD27, ligando OX-40, ligando 4-1BB, ligando Apo-1 (también referido como ligando Fas o ligando CD95), ligando Apo-2 (también referido como TRAIL), ligando Apo-3 (también referido como TWEAK), APRIL, ligando OPG (también referido como ligando RANK, ODF, o TRANCE), y TALL-1 (también referido como BlyS, BAFF o THANK) [Véase, por ejemplo, Gruss y Dower, Blood, 85:3378-3404 (1995); Pitti et al., J. Biol. Chem., 271:12687-12690 (1996); Wiley et al., Immunity, 3:673-682 (1995); Browning et al., Cell, 72:847-856 (1993); Armitage et al. Nature, 357:80-82 (1992), WO 97/01633 publicada el 16 de enero de 1997; WO 97/25428 publicada el 17 de julio de 1997; Marsters et al., Curr. Biol., 8:525-528 (1998); Chicheportiche et al., Biol. Chem., 272:32401-32410 (1997); Hahne et al., J. Exp. Med., 188:1185-1190 (1998); WO98/28426 publicada el 2 de Julio de 1998; WO98/46751 publicada el 22 de octubre de 1998; WO/98/18921 publicada el 7 de mayo de 1998; Moore et al., Science, 285:260-263 (1999); Shu et al., J. Leukocyte Biol., 65:680 (1999); Schneider et al., J. Exp. Med., 189:1747-1756 (1999); Mukhopadhyay et al., J. Biol. Chem., 274:15978-15981 (1999)].

[0032] El término "epítipo etiquetado" cuando se usa en este documento, se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un ligando Apo-2, o una parte del mismo, fusionado con un "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene suficientes residuos como para proporcionar un epítipo frente al que puede obtenerse un anticuerpo, aunque también es suficientemente corto como para que no interfiera con la actividad del ligando Apo-2. El polipéptido etiqueta preferiblemente también es suficientemente exclusivo como para que el anticuerpo no presente una

reacción cruzada con otros epítomos. Los polipéptidos etiqueta adecuados generalmente tienen al menos seis residuos de aminoácido y, normalmente, entre aproximadamente 8 y aproximadamente 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 residuos).

5 **[0033]** El término "ión metálico divalente" se refiere a un ión metálico que tiene dos cargas positivas. Entre los ejemplos de iones metálicos divalentes para utilizar en la presente invención se incluyen, pero sin limitaciones, cinc, cobalto, níquel, cadmio, magnesio y manganeso. Entre las formas particulares de estos metales que pueden emplearse se incluyen formas de sales (por ejemplo, formas de sales farmacéuticamente aceptables), tales como cloruro, acetato, carbonato, citrato y sulfato de los iones metálicos divalentes mencionados anteriormente. Un ión metálico divalente preferido para su uso en la presente invención es el cinc y, más preferiblemente, la forma de sal, sulfato de cinc. Los iones metálicos divalentes, tal como se describen aquí, se utilizan preferiblemente en concentraciones o cantidades (por ejemplo, cantidades efectivas) que son suficientes para, por ejemplo, (1) aumentar la capacidad de almacenamiento de los trímeros de Apo-2L durante un periodo de tiempo deseado, (2) aumentar la producción o rendimiento de trímeros de Apo-2L en un cultivo de células recombinantes o método de purificación, (3) aumentar la solubilidad (o reducir la agregación) de trímeros de Apo-2L, o (4) aumentar la formación de trímeros de Apo-2L.

20 **[0034]** "Aislado" cuando se usa para describir las diversas proteínas descritos en este documento, significa una proteína que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que normalmente interferirían con los usos diagnóstico o terapéutico de la proteína, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En las realizaciones preferidas, la proteína se purificará (1) a un nivel suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal o internos usando un secuenciador de copa giratoria, (2) hasta homogeneidad mediante PAGE-SDS en condiciones reductoras y no reductoras usando tinción con azul de Coomassie o, preferiblemente, con plata. La proteína aislada incluye proteína *in situ* dentro de células recombinantes, ya que no se presentará al menos un componente del ambiente natural del ligando Apo-2. Sin embargo, generalmente, la proteína aislada se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

30 **[0035]** Una molécula de ácido nucleico de ligando Apo-2 "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en la fuente natural del ácido nucleico del ligando Apo-2. Una molécula de ácido nucleico de ligando Apo-2 aislada es diferente de la forma o disposición en que se encuentra en la naturaleza. Por tanto, las moléculas de ácido nucleico de ligando Apo-2 aisladas se diferencian de la molécula de ácido nucleico de ligando Apo-2 ya que existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico de ligando Apo-2 aislada incluye moléculas de ácido nucleico de ligando Apo-2 contenidas en células que normalmente expresan el ligando Apo-2 donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

40 **[0036]** El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias identificadas en este documento se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de ligando Apo-2, tras alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas formas que están dentro de las habilidades de la técnica, pueden determinarse parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo la asignación de algoritmos necesarios para lograr un alineamiento máximo a lo largo de las secuencias de longitud completa que se están comparando. A los fines expresados en este documento, los valores del porcentaje de identidad de aminoácidos pueden obtenerse usando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2, que fue creado por Genentech, Inc. y cuyo código fuente ha sido presentado con la documentación del usuario en la oficina de propiedad de derechos de autor de EE. UU., Washington, DC, 20559, registrado con el número de registro de derechos de autor de EE. UU. N ° TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, CA. Todos los parámetros de comparación de secuencias están establecidos en el programa ALIGN-2 y no varían.

55 **[0037]** El término "secuencias control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida de forma operativa en un organismo huésped particular. Entre las secuencias control que son adecuadas para procariontes se incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma. Es sabido que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

60 **[0038]** El ácido nucleico está unido "de forma operativa" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora se une de forma operativa al ADN de un polipéptido si este se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o un potenciador se une de forma operativa a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma se une de forma operativa a una secuencia codificante si se coloca de modo que facilita la traducción. Generalmente, "unido de forma operativa" significa que las

secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas y, en caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores estén contiguos. La unión se logra por ligamiento a sitios de restricción convenientes. Si estos sitios no existen, se usan adaptadores o enlazadores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

[0039] "Biológicamente activo" o "actividad biológica" para los objetivos de la presente invención significa (a) tener la capacidad de inducir o estimular la apoptosis en por lo menos un tipo de células cancerosas de mamífero o células infectadas viralmente in vivo o ex vivo; (b) capaz de desarrollar un anticuerpo, es decir, inmunogénico; (c) capaz de unirse y/o estimular un receptor para Apo-2L; o (d) retener la actividad de un polipéptido Apo-2L nativo o natural.

[0040] Los términos "apoptosis" y "actividad apoptótica" se usan en un sentido amplio y se refieren a la forma ordenada o controlada de muerte celular en mamíferos que, normalmente, va acompañada de uno o más cambios celulares característicos, incluyendo condensación del citoplasma, pérdida de microvellosidades de la membrana plasmática, segmentación del núcleo, degradación del ADN cromosómico o pérdida de función mitocondrial. Esta actividad puede determinarse y medirse, por ejemplo, mediante un ensayo de viabilidad celular análisis por FACS, o electroporesis de ADN.

[0041] Los términos "cáncer", "canceroso" o "maligno" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluye, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, leucemia, blastoma y sarcoma. Más ejemplos particulares de estos cánceres son carcinoma de célula escamosa, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer hepático, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello de útero, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello.

[0042] Los términos "tratar", "tratamiento" y "terapia" tal como se utiliza aquí se refieren a terapia curativa, terapia profiláctica y terapia preventiva.

[0043] El término "mamífero" tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier mamífero clasificado como mamífero, incluyendo humanos, vacas, caballos, perros y gatos. En una realización preferida de la invención, el mamífero es humano.

II. Composiciones y métodos de la invención

[0044] Se ha descrito una citoquina nueva relacionada con la familia de ligando de TNF, la citoquina identificada aquí como "ligando Apo-2". La secuencia de aminoácidos madura predicha de ligando Apo-2 humano contiene 281 aminoácidos y tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 32,5 kDa. La ausencia de una secuencia señal y la presencia de una región hidrofóbica interna sugiere que el ligando Apo-2 es una proteína transmembrana de tipo II. También se han descritos polipéptidos de ligando Apo-2 de dominio extracelular soluble. Véase, por ejemplo, WO97/25428 publicada el 17 de julio de 1997. También se han descrito variantes sustitucionales de Apo-2L. Se han utilizado técnicas de rastreo de alanina para identificar varias moléculas de variantes sustitucionales que tienen actividad biológica. Las variantes sustitucionales particulares del ligando Apo-2 incluyen aquellas en que por lo menos un aminoácido es sustituido por un residuo de alanina. Estas variantes sustitucionales se identifican, por ejemplo, como "D203A"; "D218A" y "D269A". Esta nomenclatura se utiliza para identificar las variantes de ligando Apo-2 en las que los residuos de ácido aspártico en las posiciones 203, 218, y/o 269 (utilizando la numeración mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO:1)) están sustituidos por residuos de alanina. Opcionalmente, las variantes de Apo-2L pueden comprender una o más de las sustituciones de alanina que se indican en la Tabla I siguiente.

[0045] Ahora se proporciona la estructura cristalina de rayos X del dominio extracelular del ligando Apo-2 y se ha realizado la mutagénesis de rastreo de alanina para proporcionar el mapeo de sus regiones de contacto de receptor. La estructura obtenida para ligando Apo-2 revela una proteína homotrimérica que contiene un nuevo sitio de unión a ion metálico divalente (cinc) que coordina la interacción de las tres subunidades de la molécula trímero de ligando Apo-2.

[0046] La estructura de rayos X de Apo-2L se determinó mediante sustitución molecular utilizando un modelo de TNF-alfa [Eck et al., J. Biol. Chem., 264:17595-17605 (1989)] y se refinó hasta 3,9 Angstrom (para la forma de los residuos 114-281) y 1,3 Angstrom (para la variante D218A; forma 92-281). Como otros miembros de la familia de TNF, el Apo-2L parece comprender un trímero compacto formado de tres monómeros arrollados que se entierran aproximadamente 5100 Angstrom² (1700 Angstrom² por monómero) para formar el trímero globular (véase la figura 2A). La posición de las cadenas beta centrales estaba bien conservada en comparación con otros miembros estructuralmente caracterizados de la familia de TNF, TNF-alfa [Eck et al., supra: Jones et al., Nature, 338: 225-228 (1989)], TNF-beta [Eck et al., J. Biol. Chem., 267:2119-2122 (1992)], y CD40L [Karpusas et al., Structure, 3:1031-1039 (1995)], con una r.m.s.d. de 0,8 Angstrom cuando se compara con las cadenas centrales de TNF-alfa o TNF-beta. Ninguno de los residuos en la interfase del trímero de Apo-2L parece estar absolutamente conservado a lo largo de las secuencias de todos los miembros de la familia de TNF humano actualmente conocidos; sin embargo,

se conserva la naturaleza química hidrofóbica de estos residuos. (Véase la figura 3). Los residuos conservados en el grupo de interfase de trímeros de Apo-2L próximo a la base (la parte más amplia del trímero) y a lo largo del eje de tres pliegues. Próximas a la parte superior de la interfase del trímero de Apo-2L en la vecindad de Cys230, las estructuras parecen divergir y la conformación de los bucles de 190 y 230 son variables en cada estructura.

[0047] A diferencia del núcleo de estructura beta, la estructura de los bucles y las superficies de unión a receptor varía considerablemente entre los miembros de la familia de TNF. Una diferencia entre la estructura del ligando Apo-2 y las estructuras de TNF-alfa, TNF-beta, y CD40L son las conexiones entre las cadenas A y A'. En TNF-alfa, TNF-beta y CD40L, la cadena A va seguida de un bucle compacto. En el ligando Apo-2, una inserción de 15 residuos alarga este bucle y altera su conformación. La primera parte del bucle (residuos 131 a 141) está desordenada, mientras que la segunda parte del bucle (residuos 142 a 154) cruza la superficie de la molécula de una interfase monómero-monómero a la siguiente (véase la figura 2A) con una conformación que se parece a CD40L en su parte C-terminal.

[0048] Los solicitantes hallaron sorprendentemente un nuevo sitio de unión a ion metálico divalente (cinc) enterrado cerca de la parte superior o la interfase de trimerización. Los miembros de la familia de TNF se pueden dividir mediante análisis de secuencia en tres grupos con respecto a Cys230: (1) proteínas, tales como TNF-alfa y ligando Fas en que un residuo de cisteína en la posición correspondiente a Cys230 está acompañado por otra cisteína en el bucle adyacente (el bucle 194-203 en Apo-2L) con la que puede formar un puente disulfuro que impide que interaccione con un ion metálico, (2) proteínas sin una cisteína correspondiente a Cys230 (tal como TNF-beta y OPGL), y (3) proteínas que presentan sólo un residuo de cisteína correspondiente a Cys230. El Apo-2L y sus ortólogos en otras especies cumplen con el último criterio (Es decir, proteínas que tienen sólo Cys230) y se espera que se unan a iones metálicos divalentes en la superficie del trímero. La conformación de la cadena principal inmediatamente antes de la Cys230 en Apo-2L difiere del disulfuro que contiene miembros de la familia de TNF, tales como TNF-alfa y CD40L. En Apo-2L, la cadena lateral de Cys230 está orientada hacia la interfase en lugar de alejarse de la misma.

[0049] El residuo Cys230 en cada monómero de Apo-2L apunta hacia el interior hacia el eje del trímero y se coordina con un ion metálico divalente conjuntamente con una molécula de disolvente interior. El sitio de unión del ion metálico divalente muestra una geometría tetraédrica ligeramente distorsionada con enlaces y ángulos apropiados para un sitio de unión a cinc y es completamente inaccesible al disolvente (véase la figura 2B). La identidad del metal unido se confirmó utilizando espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) (véase el Ejemplo 5). En un análisis cuantitativo para Cd, Co, Zn, Ni, y Cu utilizando ICP-AES, se detectaron 0,79 moles de Zn y 0,06 moles de Co por molécula de trímero de Apo-2L demostrando que el ion unido en la estructura era cinc en aproximadamente una proporción molar de uno a uno (véase el ejemplo 5). La importancia de este sitio se demostró mediante la observación de que la sustitución de alanina de Cys230 daba lugar a una actividad apoptótica disminuida en más de 8 veces (véase el ejemplo 7). Además, la eliminación del metal unido del Apo-2L mediante diálisis frente a agentes quelantes daba lugar a un descenso de 7 veces en la afinidad de DR5 y a un descenso de más de 90 veces en la actividad apoptótica (véase el ejemplo 6). Tras la eliminación del Zn, las cisteínas eran propensas a la oxidación y se formaron dímeros de Apo-2L unidos por disulfuro que presentaban una actividad apoptótica disminuida. Dado que el sitio de unión a metal parece estar enterrado en la estructura del trímero de Apo-2L y no se espera que contacte con el receptor, los datos sugieren que la unión del ion metálico divalente puede ser importante para mantener la estructura del trímero y la estabilidad de Apo-2L.

[0050] A efectos de mapear el sitio de unión a receptor de ligando Apo-2, se identificaron los residuos de aminoácido importantes para la unión a receptor y la actividad biológica mediante mutagénesis de rastreo de alanina. [Cunningham et al., Science, 244:1081-1085 (1989)]. Las sustituciones individuales de alanina en los residuos Arg149, Gln205, Val207, Tyr216, Glu236, o Tyr237 dieron lugar a un descenso superior a 5 veces en la actividad apoptótica en un bioensayo y mostraron una afinidad disminuida para los receptores (véanse los ejemplos 3 y 4). La unión de Apo-2L a DR4, DR5 y DcR2 estaba más afectada por las sustituciones de alanina en los residuos Gln205, Tyr216, Glu236, o Tyr237, que dieron lugar a una afinidad disminuida de por lo menos 5 veces contra los tres receptores. Todas estas variantes con actividad apoptótica reducida también mostraron una unión deficiente a DR4 o DR5 (o ambos), sugiriendo que la unión a receptor es necesaria para la actividad apoptótica.

[0051] Las sustituciones de alanina en los residuos Asp218 y Asp269 dieron lugar a variantes de Apo-2L que tenían una mayor actividad apoptótica. (Véase el ejemplo 4). El residuo Asp218 se localiza próximo Tyr216, que es uno de los residuos requeridos para la actividad apoptótica. La comparación con la estructura Apo-2L (forma 114-281) de baja resolución sugiere que la conformación del bucle 216-220 no parece alterarse significativamente por la presencia de la mutación D218A.

[0052] Cuando los resultados de los análisis de mutagénesis se mapearon en la estructura de trímero de Apo-2L, se halló que el epítipo funcional en Apo-2L para la unión a receptor y la actividad biológica estaba localizado en la superficie formada por la unión de dos monómeros (véase la figura 5), similar a TNF-beta. Un surco poco profundo en la interfase monómero-monómero forma el sitio de unión a receptor con ambos monómeros que contribuyen al sitio de unión. Los residuos Arg32, Tyr87, y Asp143 en TNF-alfa (correspondiente a los residuos de Apo-2L Arg158, Tyr216, y Asp267) también contribuyen a la unión al receptor de TNF. [Goh et al., Protein Engineering, 4:785-791

(1991)]. En cambio, los residuos de TNF-alfa (correspondientes a los residuos Gln205, Glu236, y Tyr237 de Apo-2L) juegan sólo un papel menor en la unión a TNFR. De este modo, aunque para TNF-alfa la base de la estructura trimérica realiza la contribución más importante a la unión a receptor, en Apo-2L, los residuos de unión a receptor importantes también se presentan en la parte superior de la estructura del trímero. El Apo-2L parece ser único entre los miembros de la familia TNF de estructura conocida por tener una superficie de contacto más grande y más extendida para la interacción con sus receptores diana. Se cree que las variantes de Apo-2L preferidas comprenderán residuos nativos (es decir, no estarán mutados) en las posiciones correspondientes a Arg149, Gln205, Val207, Tyr216, Glu236, y/o Tyr237.

[0053] La siguiente descripción se refiere a métodos de producción de ligando Apo-2 mediante el cultivo de células huésped transformadas o transfectadas con un vector que contiene el ácido nucleico que codifica el ligando Apo-2 y la recuperación del polipéptido del cultivo celular.

[0054] El ADN que codifica el ligando Apo-2 se puede obtener a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm del ligando Apo-2 y expresarlo a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN del ligando Apo-2 humano se puede obtener convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano, tal como la biblioteca de bacteriófagos de ADNc de placenta humana tal como se describe en WO97/25428. El gen que codifica el ligando Apo-2 también se puede obtener a partir de una biblioteca genómica o mediante síntesis de oligonucleótidos.

[0055] Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como anticuerpos para el ligando Apo-2 u oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado del ADNc o biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede realizar utilizando procedimientos estándar, tal como se describe en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el ligando Apo-2 es utilizar la metodología de PCR [Sambrook et al., *supra*; Dieffenbach et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

[0056] Los fragmentos de la secuencia de aminoácidos o variantes del ligando Apo-2 se pueden preparar mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en el ADN del ligando Apo-2 o mediante la síntesis del polipéptido de ligando Apo-2 deseado. Dichos fragmentos o variantes representan inserciones, sustituciones y/o deleciones de residuos en uno o ambos extremos de la región intracelular, la región transmembrana o la región extracelular, o de la secuencia de aminoácidos mostrada para el ligando Apo-2 de longitud completa en la figura 1 (SEQ ID NO:1). Cualquier combinación de inserción, sustitución y/o deleción se puede realizar para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea, por ejemplo, una actividad biológica deseada o actividad apoptótica tal como se define aquí. En una realización preferida, los fragmentos o variantes presentan por lo menos aproximadamente el 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente, por lo menos aproximadamente el 90% de identidad de la secuencia e incluso más preferiblemente, por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de la secuencia con las secuencias identificadas aquí para los dominios intracelulares, transmembrana o extracelular del ligando Apo-2, o la secuencia de longitud completa para el ligando Apo-2. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos post-traduccionales del ligando Apo-2, tal como el cambio en el número o la posición de los sitios de glicosilación o la alteración de las características de anclaje a la membrana.

[0057] Las variaciones en la secuencia de ligando Apo-2 descrita anteriormente se pueden realizar utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas establecidas en la patente de Estados Unidos No. 5,364,934. Estas incluyen mutagénesis mediada por oligonucleótido (dirigida de sitio), rastreo de alanina y mutagénesis por PCR.

[0058] El análisis del rastreo de aminoácidos se puede utilizar para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de rastreo preferidos están los aminoácidos neutros relativamente pequeños. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es habitualmente un aminoácido de rastreo preferido entre este grupo ya que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante. [Cunningham et al., *Science*, 244:1081.(1989)]. La alanina también es habitualmente preferida porque es el aminoácido más común. Además, se halla frecuentemente en posiciones enterradas y expuestas. [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., NY); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)].

[0059] Las variantes de Apo-2L particulares descritas aquí incluyen aquellos polipéptidos Apo-2L que incluyen una o más de las sustituciones de alanina indicadas proporcionadas en la Tabla I siguiente. Dichas variantes de Apo-2L comprenderán habitualmente una secuencia de aminoácidos no natural que difiere de una secuencia de aminoácidos de Apo-2L nativa (tal como la provista en la figura 1; SEQ ID NO:1, para una forma de longitud completa o madura de Apo-2L o una secuencia de dominio extracelular de la misma) en por lo menos uno o más aminoácidos. Opcionalmente, el uno o más aminoácidos que difieren en la variante de Apo-2L en comparación con Apo-2L nativo comprenderá una sustitución o sustituciones de aminoácidos, tales como los indicados en la Tabla I. Las variantes de Apo-2L incluyen variantes de Apo-2L solubles que comprenden los residuos 91-281, 92-281, 95-

281 o 114-281 de la figura 1 (SEQ ID NO:1) y que tienen una o más sustituciones de aminoácidos indicados en la Tabla I. Las variantes de Apo-2L preferidas incluirán las variantes que comprenden residuos 91-281, 92-281, 95-281 o 114-281 de la figura 1 (SEQ ID NO:1) y que tiene una o más sustituciones de aminoácidos indicadas en la Tabla I que aumentan la actividad biológica, tal como la unión a receptor.

[0060] Las variaciones en la secuencia de ligando Apo-2 también incluidas aquí se refieren a derivados amino terminales o formas modificadas. Dichas secuencias de ligando Apo-2 incluyen cualquiera de los polipéptidos de ligando Apo-2 aquí descritos que tienen una metionina o metionina modificada (tal como formil metionilo u otra especie de metionilo bloqueado) en el N-terminal de la secuencia polipeptídica.

[0061] El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica el ligando Apo-2 nativo o variante se puede insertar en un vector replicable para la clonación posterior (amplificación del ADN) o para la expresión. Existen varios vectores públicamente disponibles. Los componentes del vector incluyen en general, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia terminadora de transcripción, cada una de las cuales se describe a continuación. Las secuencias señal, orígenes de replicación, genes marcadores, elementos potenciadores y secuencias terminadoras de la transcripción opcionales que se pueden utilizar son conocidos en la técnica y se describen con más detalle en WO97/25428.

[0062] Los vectores de expresión y clonación contienen normalmente un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está unido operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos del ligando Apo-2. Los promotores son secuencias no traducidas localizadas en dirección 5' con respecto al codón de inicio de un gen estructural (generalmente en aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción y la traducción de una secuencia de ácido nucleico particular, tal como la secuencia de ácido nucleico del ligando Apo-2, a la que están unidos operativamente. Dichos promotores se encuentran habitualmente en dos clases, inducible y constitutivo. Los promotores inducibles son promotores que inician los niveles incrementados de la transcripción a partir de ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. Actualmente, se conocen un gran número de promotores reconocidos por una variedad de potenciales células huésped. Estos promotores están unidos operativamente a ADN que codifica el ligando Apo-2 mediante la eliminación del promotor del ADN de origen con la digestión con enzimas de restricción y la inserción de la secuencia del promotor aislado en el vector. La secuencia de promotor nativo del ligando Apo-2 y muchos promotores heterólogos se pueden utilizar para dirigir la amplificación y/o expresión del ADN del ligando de Apo-2.

[0063] Los promotores adecuados para utilizar con huéspedes procariotas y eucariotas son conocidos en la técnica y se describen con más detalle en WO97/25428.

[0064] Un método preferido para la producción de APO-2L soluble en *E. coli* utiliza un promotor inducible para la regulación de la expresión del producto. La utilización de un promotor inducible controlable permite el crecimiento del cultivo hasta la densidad celular deseable antes de la inducción de la expresión del producto y la acumulación de cantidades significativas de producto que pueden no ser bien toleradas por el huésped.

[0065] Se han evaluado tres sistemas de promotores inducibles (T7 polimerasa, trp y fosfatasa alcalina (AP)) por los solicitantes para la expresión de Apo-2L (forma 114-281). La utilización de cada uno de estos tres promotores dio lugar a la recuperación de cantidades significativas de trimero Apo-2L soluble biológicamente activo de la pasta celular recogida. El promotor AP es preferido entre estos tres sistemas de promotores inducibles analizados debido al control de promotor más ajustado y la densidad celular más elevada y los títulos alcanzados en la pasta celular recogida.

[0066] La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes indicados anteriormente utiliza técnicas de unión estándar. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se separan, se ajustan y se religan en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos.

[0067] Para el análisis para confirmar que las secuencias son correctas en los plásmidos construidos, se pueden utilizar mezclas de ligación para transformar la cepa 294 de *E. coli* K12 (ATCC 31.446) y los transformantes satisfactorios se seleccionan por su resistencia a la ampicilina o tetraciclina cuando sea adecuado. Los plásmidos de los transformantes se preparan, analizan mediante digestión con endonucleasas de restricción, y/o se secuencian utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica. [Véase, por ejemplo, Messing et al., *Nucleic Acids Res.*, 9:309 (1981); Maxam et al., *Methods in Enzymology* 65:499 (1980)].

[0068] Se pueden utilizar vectores de expresión que proporcionan la expresión transitoria en células de mamíferos del DNA que codifica el ligando Apo-2. Por lo general, la expresión transitoria implica la utilización de un vector de expresión que sea capaz de replicarse eficientemente en una célula huésped, de manera que dicha célula huésped acumula muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetice niveles elevados de un polipéptido deseado codificado por el vector de expresión. [Sambrook et al., supra]. Los sistemas de expresión transitoria, que comprenden un vector de expresión adecuado y una célula huésped, permiten la identificación positiva conveniente

de los polipéptidos codificados por los ADN clonados, así como el rastreo rápido de dichos polipéptidos por sus propiedades biológicas o fisiológicas. De este modo, los sistemas de expresión transitoria son de particular utilidad en la invención con propósitos de identificar análogos y variantes del ligando Apo-2 que son ligandos Apo-2 biológicamente activos.

5 [0069] Otros métodos, vectores y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis de ligando Apo-2 en cultivo celular de vertebrado recombinante se describen en Gething et al., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei et al., *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117,060; y EP 117,058.

10 [0070] Las células huésped adecuadas para la clonación o la expresión de ADN en los vectores del presente documento incluyen células procariotas, levaduras o eucariotas superiores. Las procariotas adecuadas para este propósito incluyen, sin limitación, las eubacterias, tales como los organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, las enterobacteriáceas como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como
15 *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en la patente DD 26-6.710, publicada el 12 de Abril de 1989). *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Preferiblemente, la célula huésped debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas.

20 [0071] *E. coli* es la célula huésped preferida para utilizar. *E. Coli* es particularmente adecuada para la expresión del ligando Apo-2 (forma 114-281), un polipéptido de menos de 20 kd de tamaño sin necesidad de glicosilación. Como huésped de producción, la *E. Coli* se puede cultivar hasta una densidad celular relativamente elevada y es capaz de producir niveles relativamente elevados de proteínas heterólogas.

25 [0072] Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos o la levadura, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican el ligando Apo-2. Las células huésped adecuadas para la expresión de ligando Apo-2 glicosilado derivan de organismo multicelulares. Ejemplos de dichas células huésped, incluyendo células CHO, se describen adicionalmente en WO97/25428.

30 [0073] Las células huésped se transfectan y preferiblemente se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de ligando Apo-2L y se cultivan en medio nutriente modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

35 [0074] La transfección se refiere a la captación de un vector de expresión por una célula huésped aunque se expresen o no alguna secuencia codificante. Son conocidos numerosos métodos de transfección por los expertos en la materia, por ejemplo, CaPO₄ y electroporación. La transfección satisfactoria es reconocida en general cuando cualquier indicación de la operación de este vector tiene lugar en la célula huésped.

40 [0075] La transformación significa introducir ADN en un organismo, de manera que el ADN sea replicable, ya sea como elemento extracromosómico o mediante integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que utiliza cloruro de calcio, tal como se describe en Sambrook et al., *supra*, o la electroporación, se utilizan en general para procariotas u otras células que contienen barreras de paredes celulares sustanciales. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células vegetales, tal como se describe por
45 Shaw et al., *Gene*, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Además, las plantas se pueden transfectar utilizando tratamiento con ultrasonidos tal como se describe en WO 91/00358 publicada el 10 de enero de 1991.

50 [0076] Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se puede utilizar el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978). En la Patente de Estados Unidos No. 4.399.216 se han descrito aspectos generales de transformaciones de sistemas de células huésped de mamíferos. Las transformaciones en la levadura se llevan a cabo habitualmente según el procedimiento de Van Solingen et al., *J. Bact.*, 130: 946 (1977) y Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). Sin embargo, también se pueden utilizar otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policonaciones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para varias técnicas para transformar células de mamífero, ver
55 Keown et al., *Methods in enzymology*, 185:527-537 (1990) y Manssur et al., *Nature*, 336. 348-352 (1988).

60 [0077] Las células procariotas utilizadas para producir el ligando Apo-2 se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado tal como se describe en general en Sambrook et al., *supra*. Las formas particulares de medios de cultivo que se pueden utilizar para cultivar *E. Coli* se describen adicionalmente en los siguientes ejemplos. Las células huésped de mamífero utilizadas para producir ligando Apo-2 se pueden cultivar en una serie de medios de cultivo.

65 [0078] Entre los ejemplos de medios de cultivo disponibles comercialmente se incluyen F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ("MEM", Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle modificado por Dulbecco ("DMEM", Sigma). Cualquiera de dichos medios se puede complementar, según sea necesario, con hormonas y/u otros

factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES). Nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco Contamycin™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes en concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro complemento necesario en las concentraciones apropiadas que serían conocidas para los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y serán evidentes para los expertos en la materia.

5
10 **[0079]** En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos de células de mamífero se pueden hallar en *Mammalian Cell Biotechnology, A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991).

15 **[0080]** Según con la presente invención tal como se define en las reivindicaciones, se añadirán o incluirán normalmente uno o más iones metálicos divalentes en los medios de cultivo para cultivar o fermentar las células huésped. Los iones metálicos divalentes están presentes o se añaden preferiblemente a los medios de cultivo a un nivel de concentración suficiente para aumentar la estabilidad de almacenamiento, aumentar la solubilidad o ayudar en la formación de trímeros de Apo-2L estables coordinados por uno o más iones de cinc. La cantidad de iones metálicos divalentes que se pueden añadir dependerá, en parte, de la densidad de la célula huésped en el cultivo o la potencial sensibilidad de la célula huésped a dichos iones metálicos divalentes. A densidades de célula huésped más elevadas en el cultivo, puede ser beneficioso incrementar la concentración de iones metálicos divalentes. Si los iones metálicos divalentes se añaden durante o después de la expresión de un producto por las célula huésped, puede ser deseable ajustar o incrementar la concentración de iones metálicos divalentes a medida que aumenta la expresión del producto por las células huésped. Se cree, en general, que los niveles traza de iones metálicos divalentes que pueden estar presentes en medios de cultivo celular disponibles habitualmente pueden no ser suficientes para la formación de trímeros estables. De este modo, se prefiere la adición de cantidades adicionales de iones metálicos divalentes tal como se describen aquí.

25
30 **[0081]** Los iones metálicos divalentes se añaden preferiblemente a los medios de cultivo en una concentración que no afecta de manera adversa o negativa al crecimiento de células huésped, si los iones metálicos divalentes se añaden durante la fase de crecimiento de las células huésped en el cultivo. En cultivos en matraces de agitación, se observó que el ZnSO₄ añadido a concentraciones superiores a 1 mM puede dar lugar a una menor densidad de células huésped. Los expertos en la materia entienden que las células bacterianas pueden secuestrar iones metálicos de manera eficaz mediante la formación de complejos de iones metálicos con matrices celulares. De este modo, en los cultivos celulares, es preferible añadir los iones metálicos divalentes seleccionados a los medios de cultivo después de la fase de crecimiento (después de conseguir la densidad de célula huésped deseada) o justo antes de la expresión del producto por las célula huésped. Para asegurar que están presentes cantidades suficientes de iones metálicos divalentes, se pueden añadir o alimentar iones metálicos divalentes adicionales a los medios de cultivo celular durante la fase de expresión del producto.

35
40 **[0082]** La concentración de iones metálicos divalentes en los medios de cultivo no debe exceder la concentración que puede ser perjudicial o tóxica para las células huésped. En los métodos que utilizan la célula huésped, *E. coli*, se prefiere que la concentración de ion metálico divalente en los medios de cultivo no supere aproximadamente 1 mM (preferiblemente, \leq 1 mM). Según la presente invención, la concentración de iones metálicos divalente en los medios de cultivo es de aproximadamente 50 micromolar a aproximadamente 250 micromolar. Lo más preferiblemente, el ion metálico divalente utilizado en dichos métodos es sulfato de cinc. Es deseable añadir los iones metálicos divalentes al cultivo celular en una cantidad en la que los iones metálicos y el trímero de ligando Apo-2 pueden estar presentes en una proporción molar de uno a uno.

45
50 **[0083]** Los iones metálicos divalentes se pueden añadir al cultivo celular en cualquier forma aceptable. Por ejemplo, una solución del ion metálico se puede fabricar utilizando agua, y a continuación se puede añadir o alimentar el medio de cultivo con la solución del ion metálico divalente.

55 **[0084]** En un aspecto de la presente invención, el Apo-2L seleccionado (forma 114-281) se expresa en *E. coli*, y durante el cultivo o la fermentación del cultivo celular, se fijan los parámetros del proceso, de manera que las actividades celulares se realizan a velocidades de captación de oxígeno de aproximadamente 1,0 a 3,0 mmoles/L-min para cultivos a aproximadamente 40-50 g/L de peso celular en seco. Se prefiere que los polipéptidos Apo-2L recién sintetizados tengan suficiente tiempo para el plegamiento correcto de las proteínas y la trimerización de monómeros de Apo-2L. La fase de crecimiento del proceso de fermentación se realiza preferiblemente a 30°C. Justo antes del inicio de la expresión del producto, el punto fijado de control de la temperatura del proceso puede permanecer a 30°C o disminuir hasta 25°C para el resto de la fermentación. Opcionalmente, se puede desear incrementar la densidad celular en el cultivo celular y, por consiguiente, los parámetros mencionados anteriormente se pueden ajustar (o incrementar). Por ejemplo, puede ser ventajoso incrementar la densidad celular en el cultivo celular para incrementar el rendimiento volumétrico. Un experto en la materia, mediante técnicas rutinarias conocidas en el sector, puede incrementar de manera gradual la densidad celular e incrementar de manera gradual los parámetros mencionados anteriormente, si se desea.

5 [0085] La expresión del Apo-2L se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern, transferencia Northern para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 77:5201-5205 (1980)], transferencia de puntos (análisis de ADN) o hibridación in situ convencionales, utilizando una sonda marcada apropiadamente, en base a las secuencias proporcionadas aquí. Se pueden utilizar varios marcadores, más normalmente radioisótopos, y particularmente ³²P. Sin embargo, también se pueden utilizar otras técnicas, tales como la utilización de nucleótidos modificados con biotina para la introducción en un polinucleótido. A continuación, la biotina sirve como sitio para la unión a avidina o anticuerpos, que pueden estar marcados con una amplia variedad de marcadores, tales como radionucleótidos, agentes fluorescentes o enzimas. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer cadenas dobles específicas, incluyendo cadenas dobles de ADN, cadenas dobles de ARN y cadenas dobles híbridas de ADN y ARN o cadenas dobles de ADN-proteína. Los anticuerpos, a su vez, se pueden marcar y el ensayo se puede llevar a cabo cuando la cadena doble se une a una superficie, de manera que tras la formación de la doble cadena en la superficie, se puede detectar la presencia de anticuerpo unido a la doble cadena.

15 [0086] Alternativamente, la expresión génica se puede medir mediante métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido, y ensayo del cultivo celular o fluidos biológicos, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Con las técnicas de tinción inmunohistoquímica, se prepara una muestra de células, habitualmente mediante deshidratación y fijación, seguido de una reacción con anticuerpos marcados específicos para el producto génico acoplado, donde los marcadores son normalmente visualmente detectables, tales como marcadores enzimáticos, marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes y similares.

20 [0087] Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales y se pueden preparar en cualquier mamífero. De manera conveniente, los anticuerpos se pueden preparar contra un polipéptido ligando Apo-2 nativo o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas aquí o contra una secuencia exógena fusionada a ADN de ligando Apo-2 y que codifica un epítipo de anticuerpo específico.

25 [0088] El ligando Apo-2 se recupera preferiblemente del medio de cultivo como un polipéptido secretado, aunque también se puede recuperar de los lisados de las células huésped cuando se produce directamente sin una señal secretora. Si el ligando Apo-2 está unido a membrana, se puede liberar de la membrana utilizando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Triton-X 100) o se puede liberar su región extracelular mediante separación enzimática.

30 [0089] Cuando el ligando Apo-2 se produce en una célula recombinante distinta a la de origen humano, el ligando Apo-2 está libre de proteínas o polipéptidos de origen humano. Sin embargo, normalmente es necesario recuperar o purificar el ligando Apo-2 de proteínas o polipéptidos de células recombinantes para obtener preparaciones que sean sustancialmente homogéneas con el ligando Apo-2. En una primera etapa, el medio de cultivo o lisado se puede centrifugar para eliminar los restos celulares particulados. El ligando Apo-2 se purifica a continuación de proteínas y polipéptidos solubles contaminantes, siguiendo los procedimientos que se exponen a continuación a modo de ejemplo de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en columnas de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía en sílice o resina de intercambio catiónico como DEAE o CM; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; diafiltración y columnas de Sefarosa-Proteína A para eliminar contaminantes, tales como IgG. En una realización preferida, el ligando Apo-2 se puede aislar mediante cromatografía de afinidad. Los fragmentos de ligando Apo-2 o variantes en que los residuos se han eliminado, insertado o sustituido se recuperan de la misma manera que el ligando Apo-2 nativo, teniendo en cuenta cualquier cambio sustancial en propiedades ocasionadas por la variación. Por ejemplo, la preparación de una fusión de ligando Apo-2 con otra proteína o polipéptido, por ejemplo, un antígeno bacteriano o viral, facilita la purificación; se puede utilizar una columna de inmovilización que contiene anticuerpo para el antígeno para adsorber el polipéptido de fusión.

35 [0090] Un inhibidor de proteasa, tal como fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), también se puede utilizar para inhibir la degradación proteolítica durante la purificación y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales. Un experto en la materia entenderá que los métodos de purificación adecuados para el ligando Apo-2 nativo pueden requerir la modificación para justificar los cambios en el carácter del ligando Apo-2 o sus variantes tras la expresión en cultivo celular recombinante.

40 [0091] Durante cualquiera de dichas etapas de purificación, puede ser deseable exponer el Apo-2L recuperado a una solución que contiene iones metálicos divalente o a material purificado (tal como un medio de cromatografía o soporte) que contiene uno o más iones metálicos divalentes. En una realización preferida, los iones metálicos divalentes y/o el agente reductor se utilizan durante la recuperación o la purificación del Apo-2L. Opcionalmente, tanto los iones metálicos divalentes como el agente reductor, tal como DTT o BME, se pueden utilizar durante la recuperación o purificación del Apo-2L. Se cree que la utilización de iones metálicos divalentes durante la recuperación o purificación proporcionará la estabilidad del trímero de Apo-2L o conservará el trímero de Apo-2L formado durante la etapa de cultivo celular.

[0092] Un método preferido de recuperación y purificación del APO-2L expresado a partir de células huésped procariotas (lo más preferible de células huésped bacterianas) comprende las siguientes etapas: (a) extraer Apo-2L (intracelular) de células de *E. coli*; (b) estabilizar el Apo-2L plegado correctamente en una solución tampón que comprende iones metálicos divalentes y/o un agente reductor; (c) purificar el Apo-2L mediante cromatografía utilizando, secuencialmente, un cromatógrafo intercambiador catiónico, de hidroxipatita y de interacción hidrofóbica, y (d) eluir selectivamente Apo-2L en una solución tampón que comprende iones metálicos divalentes y/o agente reductor de cada uno de dichos soportes cromatográficos. Los iones metálicos divalentes y el agente reductor utilizado en dichos métodos pueden incluir un sulfato de Zn, cloruro de ZN, sulfato de Co, DTT y BME, y más preferiblemente, un sulfato de Zn o DTT. Una descripción más detallada de este proceso de recuperación y purificación es proporcionada en el ejemplo 8 siguiente.

[0093] Tal como se ha descrito anteriormente, dichos métodos son aplicables y útiles para otras proteínas, además de Apo-2L, que presentan actividad mejorada cuando están en una forma trimerizada o que requieren trimerización de la proteína para la actividad.

[0094] Las formulaciones que comprenden ligando Apo-2 y uno o más iones metálicos divalentes también se proporcionan en la presente invención tal como se define en las reivindicaciones. Se cree que dichas formulaciones serán particularmente adecuadas para el almacenamiento (y mantener la trimerización de Apo-2L), así como para la administración terapéutica. Las formulaciones preferidas comprenderán Apo-2L y cinc. Más preferiblemente, la formulación comprenderá una solución de Apo-2L y cinc en que el metal está en una proporción molar con respecto a la proteína inferior a 2X. Si se desea una suspensión acuosa, el ion metálico divalente en la formulación puede ser una proporción molar con respecto a la proteína superior a 2x. Utilizando sulfato de cinc, los solicitantes han hallado que Apo-2L (forma 114-281) precipita y forma una suspensión acuosa a aproximadamente una concentración de 100 mM de sulfato de cinc en la formulación. Los expertos en la materia entenderán que a una proporción molar superior a 2X, puede haber un intervalo superior de concentración del ion metálico divalente en la formulación en la que el metal se vuelve perjudicial para la formulación sería indeseable como formulación terapéutica.

[0095] Las formulaciones se pueden preparar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, la formulación de Apo-2L se puede preparar mediante intercambio de tampones en una columna de filtración de gel.

[0096] Normalmente, se utiliza una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para hacer que la formulación sea isotónica. Entre los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables se incluyen solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la formulación es preferiblemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, y más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. Preferiblemente, el pH se selecciona de manera que se asegure que el cinc permanezca unido al Apo-2L. Si el pH es demasiado elevado o demasiado bajo, el cinc no permanece unido al Apo-2L y como resultado, tenderán a formarse dímeros de Apo-2L. Será evidente para los expertos en la materia que ciertos portadores pueden ser más preferibles dependiendo de, por ejemplo, la ruta de administración y las concentraciones de ligando Apo-2 y los iones metálicos divalentes.

[0097] Los compuestos terapéuticos del Apo-2L se pueden preparar mediante la mezcla de la molécula de Apo-2L deseada que tienen el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^a Edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas, soluciones acuosas o suspensiones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son preferiblemente no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como Tris, HEPES, PIPES, fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como, cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabens, tales como metil o propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

[0098] Entre ejemplos adicionales de dichos portadores se incluyen intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón, tales como glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrógenofosfato de disodio, hidrógenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinil pirrolidona y sustancias basadas en celulosa. Los portadores para formas tópicas o basadas en gel incluyen polisacáridos, tales como carboximetilcelulosa sódica o metilcelulosa, polivinilpirrolidona, poliacrilatos, polímeros en bloque de polioxietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y alcoholes de cera de madera. Para todas las administraciones, se utilizan de manera adecuada formas de depósitos convencionales. Dichas formas incluyen, por ejemplo, microcápsulas, nanocápsulas, liposomas, esparadrado, formas de inhalación, pulverizadores nasales, comprimidos sublinguales y preparaciones de liberación controlada.

[0099] Las dosis eficaces de ligando Apo-2 en las formulaciones se pueden determinar empíricamente y la realización de dichas determinaciones se encuentran en la capacidad de la técnica. Actualmente se cree que una dosis o cantidad eficaz de ligando Apo-2 puede variar desde aproximadamente 1 microgramo/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal o más por día. El escalado entre especies de las dosis se puede realizar de una manera conocida en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en Mordenti et al., *Pharmaceut. Res.*, 8:135 (1991). Los expertos en la materia entenderán que la dosis de ligando Apo-2 que se debe administrar variará dependiendo de, por ejemplo, el mamífero que recibirá el ligando Apo-2, la ruta de administración, y otros fármacos o terapias que se administran al mamífero.

[0100] El Apo-2L a utilizar en la administración in vivo debe ser estéril. Esto se realiza fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización o reconstitución. El Apo-2L normalmente se almacenará en forma liofilizada o en solución si se administra de manera sistemática. Si está en forma liofilizada, el Apo-2L se formula normalmente en combinación con otros ingredientes para la reconstitución con un diluyente apropiado en el momento para su uso. Un ejemplo de una formulación líquida de Apo-2L es una solución no conservada incolora, clara y estéril para una vial de dosis única para inyección subcutánea.

[0101] Las formulaciones terapéuticas de Apo-2L se colocan en general en un recipiente que tiene un Puerto de acceso estéril, por ejemplo una bolsa de solución o vial intravenoso con un tapón agujereable por una aguja de inyección hipodérmica. Las formulaciones se administran preferiblemente como inyecciones o infusiones intravenosas (i.v.), subcutáneas (s.c.), intramuscular (i.m.) repetidas, como formulaciones en aerosol adecuadas para la liberación intranasal o intrapulmonar (para la liberación intrapulmonar, véase, por ejemplo, EP 257,956).

[0102] El Apo-2L se puede administrar también en forma de preparaciones liberación controlada. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen la proteína, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) tal como se describe por Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 (1981) y Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos No. 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato (Sidman et al., *Biopolymers*, 22: 547-556 (1983)), copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables (Langer et al., *supra*), copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOT (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133,988).

[0103] El Apo-2L y sus formulaciones aquí descritas se pueden utilizar en una serie de aplicaciones terapéuticas y no terapéuticas. Entre estas aplicaciones están los métodos de tratamiento de varios cánceres (proporcionados anteriormente) y afecciones virales. Dichas aplicaciones terapéuticas y no terapéuticas se describen, por ejemplo, en WO97/125428 y WO97/01633.

[0104] Un artículo de fabricación, tal como un kit, que contiene Apo-2L útil para el diagnóstico o tratamiento de los trastornos aquí descritos comprende por lo menos un recipiente y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados de diversos materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una formulación de APO-2L que es efectiva para el diagnóstico o tratamiento de una patología y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta sobre el recipiente, o asociado con el mismo, indica que la formulación se utiliza para el diagnóstico o el tratamiento de la patología de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede además incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con las instrucciones para su utilización. El artículo de fabricación también puede comprender un segundo o tercer recipiente con otro agente activo tal como se ha descrito anteriormente.

[0105] Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

[0106] Se utilizaron los reactivos comercialmente disponibles referidos en los ejemplos según las instrucciones del fabricante a menos que se indique lo contrario. El origen 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.

EJEMPLO 1

Expresión y purificación de variantes de Apo-2L

- 5 **[0107]** Las variantes por sustitución de alanina de Apo-2L se construyeron mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótido (Kunkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 82:488-492 (1985); Kunkel, Methods in Enzymology, 154:367-382 (1987)) de un plásmido (pAPOK5) (véase la figura 13), diseñado para la expresión en *E. Coli* intracelular de la forma de aminoácidos 91-281 de Apo-2L bajo el control del promotor *trp*. Se construyó pAPOK5 mediante la utilización de PCR para clonar el ADNc de Apo-2L (que codifica los residuos 91-281) en el plásmido pS1162 que transporta el promotor *trp* y los cultivos se desarrollaron durante la noche a 30°C. Las células se recogieron por centrifugación y se congelaron.
- 10 **[0108]** El residuo celular se homogenizó en 6 volúmenes de Tris-HCl 0,1 M pH 7-8, NaCl 0,2 M, DTT 5 mM, EDTA 1 mM y se aisló Apo-2L a partir de la fracción soluble mediante IMAC en una columna hiTRAP quelante (Pharmacia) cargada con níquel. El Apo-2L presentaba una afinidad débil por el metal inmovilizado y se podía eluir con concentraciones bajas de imidazol. Se obtuvo una purificación final mediante cromatografía de intercambio catiónico en una columna SP hiTRAP (Pharmacia). SE determinaron las concentraciones de variantes de Apo-2L purificadas mediante mediciones de absorbancia utilizando una e_{280} de 1,4 mg⁻¹ ml cm⁻¹.
- 15

[0109] Las variantes de Apo-2L identificadas por la mutagénesis dirigida de sitio se indican en la Tabla I.

TABLA I

Unión a receptor y actividad apoptótica de variantes de Apo-2L^a
Proporción (variante/tipo salvaje)

Variante	DR4-IgG K _D	DR5-IgG K _D	DcR2-IgG K _D	Apoptosis ED ₅₀
Δcinc	6,3	6,6	11,2	90,0
R130A	3	2,7	1,3	1,9
N134A	1,0	0,8	1,0	1,5
L136A	3,3	1,5	1,4	0,8
S138A	2,1	1,3	2,2	1,2
N140A	1,4	1,9	0,9	1,1
S141A	2,3	1,3	2,4	1,3
K142A	2,6	1,9	2,7	2,0
N143A	2,1	2,0	1,3	1,5
R149A	1,8	2,2	1,6	3,5
S153A	2,3	1,2	2,1	0,9
E155A	1,6	2	1,4	2,5
R158A	2,4	1,3	6,5	1,4
S159A	4,7	2,2	3,4	0,9
R170A	1,1	2,2	0,6	0,9
K179A	0,9	0,9	1,1	2,0
R191A	7,8	3,9	3,2	2,2
Q193A	1,7	1,1	1,2	2,2
E195A	4,6	1,4	2,6	0,8
K197D	2	2,1	2,9	1,1
K201A	4,3	2,7	10	2,5
N202A	2,5	2,5	1,9	3,2
D203A	1,5	1,1	0,6	0,5
Q205A	13,1	6,3	10,8	690
V207A	2,2	2,8	2,1	5,6
Y213A	1,3	1	1,5	1,2
Y216A	14,5	8,9	9,0	320
D218A	1,3	1,9	1,1	0,3
C230S	4,1	7,1	6,7	8,0
E236A	6,0	9,8	8,4	10,8
Y237A	7,3	5,0	48	8,3
Y240A	1,8	0,8	1,8	1,1
K251A	1,9	2	2,4	0,8
S259A	4,3	2,0	1,4	3,3
H264A	1,9	2,0	1,4	3,1
D267A	5,7	1,9	5,5	1,11
D269A	1,7	0,5	0,9	0,2

^aValores mostrados representan la proporción de variante con respecto a tipo salvaje. Para Apo-2L de tipo salvaje (residuos 91-281), los valores de K_D para DR4-IgG, DR5-IgG y DcR2-IgG son 0,8 ± 0,3 nM, 0,9 ± 0,4 nM y 0,3 ± 0,2 nM. El Apo-2L de tipo salvaje (residuos 91-281) produjo una ED₅₀ de 24 ± 3,1 ng/mL en el ensayo de apoptosis, mientras que la forma 114-281 de Apo-2L era ligeramente más activa y produjo una ED₅₀ de 16,0 ± 3,6 ng/ml. Sólo los cambios de 2 veces a partir de los valores de tipo salvaje se consideran como significativos.

EJEMPLO 25 Análisis cristalográfico de Apo-2L

10 [0110] Los cristales de Apo-2L (residuos de aminoácidos 114-281) se desarrollaron en 70 μ L de gotas posadas que contenían 40 μ L de proteína (a 2,6 mg/mL en Tris 20 mM, pH 8,0), 20 μ L de Tris 50 mM pH 8,0 y 10 μ L de peg 2K MME al 8% sobre una solución en pocillo de peg 2K MME al 50% a 20°C y eran miembros del grupo espacial P63 con dos monómeros en la unidad asimétrica y las constantes de la celda unidad $a=72,5$, $c=140$ Angstrom y difractan a 3,9 Angstrom a temperatura ambiente. Los cristales de la variante D218A (véase el ejemplo 1) crecieron en 14 μ L de gotas posadas que contenían 4 μ L de MPD al 4% y 10 μ L de proteína (1,7 mg/ml en Tris 20 mM pH 7,5) sobre una solución en pocillo de MPD al 32% a 4°C y eran miembros del grupo espacial R32 con un monómero en la unidad asimétrica por unidad asimétrica y los parámetros de celda unitaria 66,4, $c=197,7$ Angstrom y difractados a 1,3 Angstrom a -180°C con radiación de sincrotrón. Los grupos de datos que difractan a 3,9 Angstrom para los cristales de Apo-2L (residuos 114-281) y 1,9 Angstrom para la variante D218A se midieron en un generador de rayos X de ánodo rotativo Rigaku equipado con un detector MAR y se procesaron con DENZO/SCALEPACK [Otwinowski et al., Proceedings of the CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing (eds. Sawyer et al.) pp.56-62 Daresbury Laboratory, Daresbury, England, 1993]. Se midió un grupo de datos de 1,3 Angstrom para la variante D218A en el Advanced Photon Source en Argonne National Labs y se procesaron con HKL2000/SCALEPACK y tenían una R_{sim} de 6,4% (34% en la capa 1,35-1,30), con un 100% de completación y una redundancia de 12 veces, y $I/\langle I \rangle = 12,4$.

25 [0111] La estructura de Apo-2L nativa se resolvió mediante el desplazamiento molecular utilizando un modelo basado en TNF-alfa (código pdb 1TNF) con el programa Amore [Acta Cryst., D50:760-763 (1994)] y se refinó [Brunger, X-PLOR: versión 3.1, Yale Press, New Haven 1987] con limitaciones no cristalográficas estrictas de 2 veces hasta un R_{libre} de 35%. Esta estructura se refinó frente al grupo de datos de 1,9 Angstrom hasta una R_{libre} del 25% y finalmente se refinó frente a los datos de 1,3 Angstrom con Refmac y SHELXL [Sheldrick et al., Methods in Enzymology, pp. 319-343, Academic Press, San Diego 1997] de $R_{\text{libre}} = 22\%$ y R_{factor} del 20% con buena geometría (rmsd enlaces 0,011 Angstrom, rmsd ángulo 1,7°). Todos los residuos se encuentran dentro de las regiones permitidas de una representación de Ramachandran. Durante el refinamiento, se observó un máximo 28 sigma de la densidad electrónica entre la simetría relacionada con Cys230 en el eje del trímero. Esta densidad se modeló como un ion cinc y se refinó con un factor B de 10. Se cree que está presente una molécula de cloro en el eje del trímero como el cuarto ligando al cinc. El modelo final consiste en los residuos 120-130, 142-194, 203-281 con 170 moléculas de disolvente y un ion cinc y un ion cloruro. Los residuos 91-119, 131-141 y 195-202 están desordenados. La secuenciación N-terminal de varios cristales confirmó que el extremo N-terminal está intacto, mientras que la espectrometría de masas del material de partida muestra que es de longitud completa.

40 [0112] En la figura 2C se proporciona un resumen de los datos cristalográficos.

EJEMPLO 3Determinación de la afinidad de unión a receptor de las variantes de Apo-2L

45 [0113] Se determinaron las constantes de disociación (K_d) para la unión de las variantes de Apo-2L (véase la Tabla I) a inmunoadhesinas de receptores inmovilizadas a partir de las mediciones de la resonancia de plasmón superficial (SPR) en una Pharmacia BIAcore 1000.

50 [0114] Se prepararon las inmunoadhesinas de receptores DR5-IgG (también referida como Apo-2-IgG) y DcR2-IgG tal como se describe en WO98/51793 publicada el 19 de noviembre de 1998 y WO99/10484 publicada el 9 de marzo de 1999, respectivamente. Se preparó DR4-IgG tal como se indica a continuación. Se clonó una secuencia de ECD de DR4 maduro (aminoácidos 1-218; Pan et al., supra) en un vector pCMV-1 Flag (Kodak) cascada abajo de la secuencia señal Flag y se fusionó a la región Ch1, bisagra y Fc de la cadena pesada de la inmunoglobulina G1 humana tal como se ha descrito previamente [Aruffo et al., Cell, 61:1303-1313 (1990)]. La inmunoadhesina se expresó mediante transfección transitoria en células 293 humanas y se purificó a partir de los sobrenadantes celulares mediante cromatografía de afinidad de proteína A, tal como se describe por Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 88:10535-10539 (1991)].

60 [0115] Las proteínas de inmunoadhesina de receptor se acoplaron a la superficie del chip sensor a nivel de 1000-2000 unidades de resonancia utilizando la química de acoplamiento de aminas (Pharmacia Biosensor). Se registraron sensogramas para la unión de Apo-2L a concentraciones que variaban de 15,6 nM a 500 nM en incrementos de 2 veces. Las constantes cinéticas se determinaron mediante análisis de regresión no lineal y se utilizaron para calcular las constantes de unión.

65 [0116] Los resultados se muestran en la Tabla I.

EJEMPLO 4Actividad apoptótica de variantes de Apo-2L in vitro

5 **[0117]** Se utilizó un bioensayo que mide la viabilidad celular a partir de la conversión metabólica de un colorante fluorescente para determinar la actividad apoptótica de las variantes de Apo-2L. Se realizaron diluciones en serie de 2 veces de Apo-2L (forma 114-281) o variantes de Apo-2L (véase la tabla) en medio RPMI-1640 (Gibco) que contenía BSA al 0,1%, y se transfirieron 50 μ L de cada dilución a pocillos individuales de microplacas de cultivo de tejido Falcon de 96 pocillos. Se añadieron 50 μ L de células de carcinoma de pulmón humano SK-MES-1 (ATCC HTB58) (en RPMI-1640, BSA al 0,1 %) a una densidad de 2×10^4 células/pocillo. Estas mezclas se incubaron a 37°C durante 24 horas. A las 20 horas, se añadieron 25 μ L de azul de alamar (AccuMed, Inc., Westlake, Ohio). Se determinó el número de células midiendo la fluorescencia relativa a 590 nm después de la excitación a 530 nm. Estos datos se analizaron utilizando un ajuste de 4 parámetros para calcular ED50, la concentración de Apo-2L que produce una reducción del 50% en la viabilidad celular.

15 **[0118]** Las sustituciones individuales de alanina en los residuos Arg149, Gln205, Val207, Tyr216, Glu236 o Tyr237 dieron lugar a un descenso superior a 5 veces en actividad apoptótica en el bioensayo y mostraron una afinidad disminuida para DR4, DR5 y DcR2 (Tabla I). La unión de Apo-2L a estos receptores estaba mayoritariamente afectada por la sustitución de alanina de Gln205, Tyr216, Glu236 y Tyr237, todos ellos dieron lugar a como mínimo una afinidad disminuida de 5 veces para los tres receptores. Todas las variantes de Apo-2L con una actividad apoptótica reducida también mostraban una unión impedida a DR4 o DR5 (o ambos), sugiriendo que la unión al receptor es necesaria para el efecto biológico. La sustitución de alanina de Asp218 o Asp269 dio lugar a un incremento de más de 2 veces en la actividad apoptótica. Cabe mencionar que la mayoría de sustituciones de alanina presenta efectos similares en la unión a DR4 y DR5, siendo las únicas excepciones la mutación de Gln193, Glu195, Ser259, His264, y Asp267, todas ellas con un efecto superior a 5 veces en la unión a DR4 (afinidad de disminución), pero sólo un efecto pequeño o despreciable en la unión a DR5. Los cambios en la unión a DcR2 tendían a presentar efectos paralelos a los observados para la unión a DR4. La actividad apoptótica disminuida parece estar más estrechamente unida con la unión a DR5 disminuida, sugiriendo que es necesario el DR5 para la señalización de la muerte en SK-MES en respuesta a la administración de Apo-2L.

EJEMPLO 5Análisis elemental y cuantitativo para determinar el contenido de metal de Apo-2L

35 **[0119]** Se realizó un análisis elemental de Apo-2L mediante la utilización de espectrometría de emisión atómica de plasma acoplada inductivamente (ICP-AES). Para esta determinación, se utilizó una solución 2 mg/mL de Apo-2L (residuos 114-281 producidos en E. coli utilizando métodos descritos en WO97/25428; no se añadieron cantidades adicionales de iones de metales divalentes durante la fermentación o purificación según los métodos aquí descritos) formulada en Tris 20 mM pH 7,5. Se determinaron los niveles de Cd, Co, Zn, Ni, y Cu en esta muestra y en una parte del tampón de formulación.

TABLA II

Muestra	Cd	Co	Zn	Ni	Cu
Tampón	-0,058	-0,090	-0,098	-0,098	-0,082
Apo-2L	-0,058	0,199	1,712	-0,108	-0,975

45 **[0120]** Los metales unidos al Apo-2L fueron Zn y Co (Tabla II). Las proporciones molares calculadas fueron de 0,79 moles de Zn por mol de trímero de Apo-2L y 0,06 moles de Co por mol de trímero de Apo-2L. Estos datos indican que Apo-2L tiene un sitio de unión a cinc por trímero. El sitio está ocupado en un 85% con el metal en esta preparación de Apo-2L.

EJEMPLO 6Efectos de la eliminación del cinc unido de Apo-2L utilizando agentes quelantes

50 **[0121]** Se trató una muestra de Apo-2L (forma 114-281) con agentes quelantes para eliminar el cinc unido. La muestra en primer lugar se dializó frente a 2 cambios de 1000 volúmenes cada uno de EDTA 50 mM, a continuación frente a 2 cambios de 1000 volúmenes de 1,10-fenantrolina 2 mM, y finalmente frente a 1000 volúmenes Tris 20 mM pH 7,5 libre de metal. La muestra, antes y después del tratamiento quelante, se analizó por la unión a receptor, el contenido de metal y la actividad apoptótica. La unión a receptor se midió tal como se describe en el ejemplo 3, el contenido de metal se determinó mediante ICP-AES y la actividad apoptótica se analizó tal como se describe en el ejemplo 4. ICP-AES mostró que el proceso de diálisis eliminó el cinc unido. Después de este tratamiento, la afinidad del receptor se redujo significativamente (Tabla I) y la actividad apoptótica disminuyó en 90 veces (Figura 4).

[0122] Se registraron los espectros dicroicos circulares en un instrumento espectropolarímetro AVIV (Lakewood, NJ) modelo 202. El espectro rastreó de 250 a 200 nm utilizando un tamaño de etapa de 0,5 nm, un tiempo promedio de 5 segundos y cubetas rectangulares de cuarzo que tenían una longitud de paso de 1 cm. La concentración de proteína fue de 2 μ M en soluciones que contienen PBS. Tal como se muestra en la figura 6, el Apo-2L (forma 114-281) produce un espectro CD típico de una proteína que tiene un contenido elevado de lámina beta. La eliminación del cinc unido da lugar a una menor intensidad de los picos dicroicos, sugiriendo que el contenido de lámina beta ha disminuido.

[0123] Se utilizó dicroísmo circular para controlar el efecto de la eliminación de cinc en la estabilidad térmica de Apo-2L (forma 114-281). Estos experimentos también utilizaron cubetas rectangulares de cuarzo de 1 cm y una concentración de proteína de 2 μ M. El dicroísmo circular a 225 nm se controló a medida que la muestra se calentaba de 30 a 100°C. Las mediciones se tomaron a incrementos de 2°C después de permitir que la muestra se equilibrara a esa temperatura durante 1 minuto. Se registraron tanto la elipticidad (CD) como el voltaje de dínodo y la dependencia con la temperatura del voltaje de dínodo se representó en la figura 7. El voltaje de dínodo es proporcional a la absorbancia de la muestra. Un incremento en el voltaje de dínodo tras el calentamiento de la muestra refleja la agregación de proteínas. El incremento en el voltaje de dínodo concomitante con una pérdida de estructura secundaria tal como se indica por una disminución en la elipticidad a 225 nm. Estos datos sugieren que el Apo-2L (forma 114-281) se agrega tras la desnaturalización térmica teniendo lugar el punto medio de esta transición (T_m) a aproximadamente 75°C. La eliminación del cinc unido da lugar a un amplio descenso en la T_m para la desnaturalización térmica hasta aproximadamente 54°C. Estos datos muestran que el cinc unido es necesario para mantener la estructura y la estabilidad de Apo-2L homotrimérico.

EJEMPLO 7

Efectos de la eliminación del sitio de unión a cinc de Apo-2L mediante mutación

[0124] La Cys230 de Apo-2L (forma 91-281) se sustituyó por Ala o Ser mediante la utilización de mutagénesis dirigida por oligonucleótidos tal como se describe en el ejemplo 1. A continuación, las proteínas variantes se expresaron y purificaron tal como se describe en el ejemplo 1. Tal como se muestra en la tabla I, los mutantes C230A y C230S de Apo-2L (forma 91-281) habían reducido la afinidad de unión a receptor y disminuido ampliamente la actividad apoptótica. Dado que la estructura de rayos X de Apo-2L muestra que la Cys230 es un residuo enterrado, y de este modo es improbable que contacte de forma directa con el receptor tras la formación de complejo, estos datos sugieren que la mutación de Cys230 afecta de manera indirecta a la actividad por cambios en la estructura o estabilidad de Apo-2L homotrimérico.

EJEMPLO 8

Adiciones de Zn mejora la acumulación y recuperación del producto ligando Apo-2 soluble

A. Expresión de Apo-2L (residuos de aminoácidos 114-281) regulada por el promotor de fosfatasa alcalina

[0125] El pAPApo2-P2RU (véase la figura 12) codifica la coexpresión de Apo-2L (residuos de aminoácidos 114-281) y el ARNt es codificado por *pro2* y *argU*. El plásmido basado en pBR322 [Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 43:77-90 (1978)] pAPApo2-P2RU se utilizó para producir el Apo-2L en *E. coli*. Las secuencias transcripcionales y traduccionales requeridas para la expresión de Apo-2L son proporcionadas por el promotor de fosfatasa alcalina y el *trp* Shine-Dalgarno, tal como se describe para el plásmido pHGH1 [Chang et al., Gene, 55:189-196 (1987)]. La secuencia codificante para Apo-2L (forma 114-281) se localiza en dirección 3' del promotor y las secuencias de Shine-Dalgarno y está precedida por una metionina de iniciación. La secuencia codificante incluye nucleótidos (mostrados en la figura 1) que codifican los residuos 114-281 de Apo-2L (Figura 1) a excepción de que el codón que codifica el residuo Pro119 se cambia a "CCG" en lugar de "CCT" a efectos de eliminar la potencial estructura secundaria. La secuencia que codifica la lambda al terminador transcripcional [Scholtissek et al., Nucleic Acids Res., 15:3185 (1987)] va después de la secuencia codificante de Apo-2L. Adicionalmente, este plásmido también incluye secuencias para la expresión del *pro2* de ARNt [Komine et al., J. Mol. Biol., 212:579-598 (1990)] y *argU/dnaY* [Garcia et al., Cell, 45: 453-459 (1986)]. Estos genes se clonaron mediante PCR a partir de w3110 de *E. coli* y se colocaron en dirección 3' de la lambda a la secuencia terminadora transcripcional. Este plásmido confiere resistencia a tetraciclina y ampicilina después de la producción del huésped.

[0126] Se utilizó la cepa 43E7 (*E. coli* W3110 *fhuA(tonA) phoA Δ(argF-lac) ptr3 degP kanS ompT ilvG+*) como el huésped de producción para la coexpresión del ligando Apo-2 y del ARNt. Se prepararon las células competentes de 43E7 y se transformaron con pAPApo2-P2RU utilizando procedimientos estándar. Los transformantes se recogieron de placas de LB que contenían 20 μ g/ml tetraciclina (LB+Tet20), se purificaron por líneas y se desarrollaron en caldo LB con 20 μ g/ml de tetraciclina en un agitador/incubador a 30°C antes de almacenarse en DMSO a -80°C.

[0127] Se preparó un inóculo en matriz de agitación mediante la inoculación del medio estéril utilizando un vial de cultivo de solución madre descongelada recientemente. Se incluyeron antibióticos apropiados en el medio para proporcionar una presión selectiva para asegurar la retención del plásmido. La composición del medio del matraz de

agitación se proporciona en la tabla III. Los cultivos del matraz se incubaron con agitación a aproximadamente 30°C (28°C-32°C) durante 14-18 horas. A continuación, este cultivo se utilizó para inocular el recipiente de la fermentación de producción. El volumen de inoculación estaba entre un 0,1% y 10% del volumen inicial de medio.

TABLA III

5

Composición del medio del matraz de agitación	
Ingrediente	Cantidad/litro
Tetraciclina	4-20 mg
Triptona	8-12 g
Extracto de levadura	4-6 g
Cloruro de sodio	8-12 g
Fosfato de sodio, añadido como una solución de pH 7	4-6 mmol

[0128] La producción del Apo-2L se llevó a cabo en el medio de producción proporcionado en la Tabla IV. El proceso de fermentación se realizó a aproximadamente 30°C (28-32°C) y un pH controlado a aproximadamente 7,0 (6,5-7,5). La velocidad de aeración y la velocidad de agitación se fijaron para proporcionar la transferencia adecuada de oxígeno al cultivo. Al inicio de la expresión del producto, inducida por el agotamiento de fosfato, la temperatura del proceso se desplazó de 30°C a 25°C. A través del proceso de fermentación, el cultivo celular se alimentó de glucosa en base a un algoritmo informático para cumplir con sus requisitos de carbono asegurando a la vez la condición aeróbica.

[0129] Se realizaron dos adiciones por lotes de ZnSO₄ durante el proceso de fermentación. Una adición se realizó justo antes de la inducción de la expresión del producto. La segunda adición se realizó aproximadamente en el punto medio del periodo de producción. En este ejemplo, las adiciones tuvieron lugar a una densidad óptica de cultivo de aproximadamente DO550 80-120 y a aproximadamente 28 horas después de la inoculación. Se añadieron las cantidades suficientes de ZnSO₄ 100 mM para conseguir aproximadamente 50-100 micromolar (concentración final) con cada adición por lotes de los iones metálicos.

[0130] Se dejó proceder la fermentación durante aproximadamente 34-45 horas, después de lo cual se recogió la pasta celular del caldo para la posterior evacuación de la recuperación de producto.

25

TABLA IV

Composición del medio de producción para el sistema de expresión de promotor AP	
Ingrediente	Cantidad/litro
Tetraciclina	4-20 mg
Glucosa ^a	10-250 mg
Sulfato de amonio ^a	2-8 g
Fosfato de sodio, monobásico, dihidratado ^a	1-5 g
Fosfato de potasio, dibásico ^a	1-5 g
Fosfato de potasio, monobásico ^a	0-5 g
Citrato de sodio, dihidratado ^a	0,5-5 g
Cloruro de potasio	0-5 g
Sulfato de magnesio, heptahidratado ^a	1,0-10 g
Antiespumante	0-5 ml
Cloruro férrico, hexahidratado ^a	20-200 mg
Sulfato de zinc, heptahidratado ^a	0,2-20 mg
Cloruro de cobalto, hexahidratado ^a	0,2-20 mg
Molibdato de sodio, dihidratado ^a	0,2-20 mg
Sulfato cúprico, pentahidratado ^a	0,2-20 mg
Ácido bórico ^a	0,2-20 mg
Sulfato de manganeso, monohidratado ^a	0,2-20 mg
Hidrolisato de caseína ^a	5-25 g
Extracto de levadura ^a	5-25 g

^aUna parte de estos ingredientes se puede suministrar al cultivo durante la fermentación. Se añadió hidróxido de amonio según sea necesario para controlar el pH.

[0131] Se tomaron muestras de caldo con la evolución del tiempo del proceso de fermentación. Se recogieron células de 1 ml de muestras de caldo diluidas hasta una densidad celular de DO550 20 mediante centrifugación y se almacenaron los residuos celulares resultantes a -20°C hasta el análisis. Los residuos celulares se descongelaron y se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de extracción (HEPES 50 mM, pH 8,0, EDTA 50 mM y 0,2 mg/ml de lisozima de clara de huevo de gallina) y rompieron mecánicamente para liberar el producto del citoplasma. Se extrajeron los sólidos de los lisados celulares mediante centrifugación antes de cargar los lisados aclarados en una columna HPLC IEX Dionex ProPac para la cuantificación del trómero. El método de ensayo de HPLC separa el

30

producto de las proteínas de *E. coli* contaminantes mediante la utilización de un gradiente 5%-22% de NaCl 1M en un tampón fosfato 25 mM (pH 7,5) durante 25 minutos a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min.

5 [0132] La pasta celular congelada se descongeló y se resuspendió en tampón de extracción (tampón Hepes 100 mM, pH 8,0, EDTA 50 mM, DTT 5 mM). Después de múltiples pases de la suspensión celular a través de un homogenizador mecánico para liberar el producto Apo-2L del compartimento citoplásmico, se añadió PEI al 0,2% (concentración final) y los sólidos se extrajeron mediante centrifugación. El lisado aclarado se diluyó 1:1 (v/v) con H₂O y se ajustó el pH hasta 7,2 antes de cargarse en la columna MPHS (BioRad) preequilibrada con 3-4 volúmenes de columna de Hepes 50 mM/Triton al 0,05%/DTT 1 mM pH 7,2. Después de una etapa de lavado con 2-3
10 volúmenes de columna de tampón de equilibrio seguido de una segunda etapa de lavado con NaCl 0,1 M en el tampón de equilibrio, las proteínas Apo-2L se eluyeron de la columna MPHS con 6 volúmenes de columna de un gradiente de NaCl 0,1 M a 0,8 M en el tampón de equilibrio. Se recogieron las fracciones de eluente de la columna, se analizaron y las fracciones relevantes se agruparon y almacenaron a 4-8°C.

15 [0133] El análisis de la acumulación de Apo-2L durante la fermentación mostró que las adiciones de ZnSO₄ no afectaron significativamente al crecimiento celular. La producción del ligando Apo-2 empezó cuando se agotó el fosfato en el medio, habitualmente aproximadamente 15-25 horas después de la inoculación. La figura 8 muestra la evolución con el tiempo en la acumulación de trímeros de Apo-2L soluble detectados mediante el método de HPLC IEX. Los cultivos con adiciones de ZnSO₄ presentaban una concentración de producto superior en las muestras de
20 lisado celular que los controles de menos ZnSO₄.

[0134] El análisis de la recuperación del producto en la etapa de captura inicial (que implica Cromatografía IEX) (figura 9) muestra los perfiles de elución de la cromatografía MPHS de lisados celulares de fermentaciones realizadas en ausencia y presencia de adiciones de ZnSO₄. Después del flujo inicial y las etapas de lavado, se separaron dos picos principales, Pico (máximo) A y pico (máximo) B. Mediante análisis SDS-PAGE, ambos máximos consistían de principalmente Apo-2L.
25

[0135] El material purificado de ambos máximos (picos) se preparó y analizó para la actividad biológica y la estabilidad. Los resultados obtenidos de estos estudios sugirieron que el Máximo A era un grupo más estable de producto Apo-2L, mientras que el Máximo B presentaba una mayor tendencia a la agregación con el tiempo. Para minimizar la inestabilidad, se excluyó el máximo B para una recuperación adicional. La proporción de Máximo A con respecto al Máximo B se estimó comparando los trazos de corte que representan el área integrada bajo cada uno de los máximos. Los resultados tabulados en la Tabla V muestran un desplazamiento del porcentaje de Apo-2L como Máximo A de aproximadamente el 45% en promedio para el caso de menos ZnSO₄ hasta aproximadamente el 80%
30 para el caso de más ZnSO₄, un incremento significativo en la cantidad de producto Apo-2L en el grupo recuperable.
35

TABLA V

ID proceso	Adiciones de ZnSO ₄	Escala de cromatografía	Máximo A %	Máximo B %
SAP02-113	No	0,66 x 15,5 cm	41,6	58,4
LAPO2-4	No	4,4 x 41,5 cm	50,4	49,6
SAPO2-138	Sí	0,66 x 17,0 cm	78,8	21,2

40 B. Expresión de Apo-2L (residuos de aminoácidos 114-281) regulada por el promotor *trp*:

[0136] Construcción del plásmido PS1346.Apo2L.0: Se insertó el ADN que codifica los residuos 114-281 de Apo-2L (precedido por el codón de metionina de iniciación) en un vector plasmídico pS1346. El plásmido pS1346 es un derivado de pGH207-1 [DeBoer et al., Promoters: Structure and Function, Praeger, New York, pp. 462-481 (1982)] y
45 contiene el terminador transcripcional lambda-to [Scholtissek et al., Nucleic Acids Res., 15:3185 (1987)] en dirección 3' de la secuencia codificante de Apo-2L.

[0137] Se utilizó la cepa 54C2 (*E. coli* W3110 *fhuA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP lacIq*) como el huésped de producción para la expresión de ligando Apo-2 (residuos de aminoácidos 114-281), donde la expresión del ligando se reguló por el promotor *trp*. Se prepararon células competentes de 54C2 y se transformaron con pS1346.Apo2L.0 utilizando procedimientos estándar. Los transformantes se recogieron de las placas de LB que contenían 20 µg/ml de tetraciclina (LB+Tet20), se purificaron por líneas y se desarrollaron en caldo LB con 20 µg/ml de tetraciclina en un agitador/incubador a 30°C antes de almacenarse en DMSO a -80°C.
50

[0138] Los experimentos realizados con el organismo de producción, 54C2/pS1346.Apo2L.0, se llevaron a cabo bajo parámetros de fermentación similares tal como se ha descrito anteriormente para el sistema de expresión de promotor AP a excepción de ajustes menores en la composición del medio (Tabla VI), la adición de un inductor, ácido indol-3-acrílico (IAA), y la longitud del proceso. Se añadió triptófano al medio inicial para reprimir la actividad del promotor durante la fase de crecimiento inicial. El desplazamiento de temperatura de 30°C a 25°C se realizó cuando la densidad celular del caldo alcanzó una DO550 de aproximadamente 30. EL inductor se añadió cuando la densidad celular del caldo alcanzó una DO550 de aproximadamente 55. En los experimentos en los que se
60

realizaron adiciones de ZnSO₄, se añadieron cantidades suficientes de una solución de ZnSO₄ 100 mM a una densidad celular de DO550 de 25 y a las 24 horas después de la inoculación para conseguir una concentración final de aproximadamente 50-100 μM. Las pastas celulares se recogieron a las 6 horas después de la adición de inductor y se almacenó de -20°C a -80°C.

5

TABLA VI

Adiciones al medio de producción para el sistema de expresión de promotor AP necesarias para el sistema de expresión de promotor trp	
Ingrediente	Cantidad/litro
L-isoleucina	0,5-1 g
Triptófano	0,1-5 g

10 **[0139]** El crecimiento para el sistema de promotor trp se ralentizó después de alcanzar una DO550 de 40-60. Hubo una expresión discontinua del ligando Apo-2 antes de la inducción con la adición de IAA y fue probablemente responsable para el problema de crecimiento. Los perfiles de crecimiento celular eran comparables en ausencia y presencia de adiciones de ZnSO₄. La figura 10 muestra la evolución con el tiempo en la acumulación de trimeros de Apo-2L solubles detectados por el método de HPLC IEX. La acumulación de Apo-2L soluble continuó incrementándose en el desarrollo de la adición de ZnSO₄ y alcanzó una concentración de producto más elevada en
15 las muestras de lisado celular.

C. Recuperación y purificación de Apo-2L (residuos de aminoácidos 114-281) de E. coli utilizando iones de metal divalente/DTT:

20 **[0140]** Se puede utilizar el siguiente protocolo en la recuperación y purificación de Apo-2L de E. coli. En primer lugar las células se homogenizan y se realiza la extracción de la siguiente manera. Las células de Escherichia coli recogidas congeladas se suspenden en 6 volúmenes de tampón de extracción (100 mM HBPEs/5 mM DTT (o 5 mM de sulfato de Zn en lugar de DTT), pH 8,0), o todo el caldo celular se condiciona con DTT 5 mM (o 5 mM de sulfato de Zn en lugar de DTT) a pH 8,0. La suspensión se mezcla intensamente durante 1 hora a 2-8°C, a continuación se
25 homogeniza en un homogenizador (Gaulin Corporation, Everett, MA). La suspensión de células rotas se flocula en PEI al 0,2% durante 1-2 horas y se centrifuga mediante un centrifugador de alimentación continua BTPX205 (Alfa Laval Separation AB, Suecia) y se aclara mediante filtración en profundidad.

30 **[0141]** Después de la extracción, el Apo-2L se purifica de la siguiente manera. Se realiza una cromatografía cerámica High S Macro-Prep (MP-HS) mediante el acondicionamiento de la suspensión celular aclarada (extracto) con un volumen igual de H₂O/Triton-100 al 0,1% y se ajusta el pH hasta 7,2. El extracto condicionado se carga en una columna de intercambio catiónico MP-HS (Bio-Rad, Hercules, CA) que está equilibrada en 50 mM HEPES/Triton-100 al 0,05%/1 mM DTT (o 100 μM de sulfato de Zn), pH 7,2. (En las dos etapas anteriores, se puede utilizar alternativamente SP-Sefarosa de Flujo Rápido (Amersham Pharmacia, Suecia)). Las proteínas que no se
35 unen fluyen y son extraídas mediante lavado con tampón de equilibrio hasta la línea base a A280. La columna se lava 3 volúmenes de columna de NaCl 0,1 M/tampón de equilibrio. El Apo-2L se eluye utilizando un gradiente lineal de 8 volúmenes de columna desde 0,1 a 0,8 M de cloruro de sodio en tampón de equilibrio. Las fracciones se recogen y se agrupan aquellas que contienen Apo-2L plegado de forma correcta según la determinación por SDS-PAGE o SEC-HPLC.
40

[0142] El grupo de Apo-2L de la columna MP-HS se carga en una columna de Macro-Prep Hidroxiapatita (Bio-Rad, Hercules, CA) equilibrada en HEPES 50 mM/DTT 1 mM (o sulfato de Zn 100 μM), pH 7,2. (Como alternativa a la Macro-Prep Hidroxiapatita, se puede utilizar SP-Sefarosa de Flujo rápido). Después de cargar la muestra, la columna se lava con tampón de equilibrio hasta la línea base a A280. El Apo-2L se eluye fuera de la columna
45 mediante la utilización de una etapa isocrática de fosfato de sodio 0,15 M en tampón de equilibrio.

[0143] El grupo de MP-HA se acondiciona con un volumen igual de sulfato de amonio 1,0 M/Tris 50 mM/DTT 1 mM (o sulfato de Zn 100 μM), pH 7,5, y a continuación se carga en una columna de Fenil-Sefarosa FF (Amersham Pharmacia, Suecia) que está equilibrada en sulfato de amonio 0,5 M/Tris 50 mM/DTT 1 mM (o sulfato de Zn 100
50 μM), pH 7,5. (Como alternativa al sulfato de amonio 0,5 M, se puede utilizar sulfato de sodio 0,6 M). La columna se lava con tampón de equilibrio, y se recoge el Apo-2L en el efluente de la columna.

[0144] A continuación, se formula el Apo-2L mediante ultrafiltración y cromatografía de filtración en gel G-25 (Amersham Pharmacia, Suecia). El grupo de fenil-Sefarosa se concentra con Ultrafiltración de TFF (Millipore, Bedford, MA) y se formula en una columna de filtración en gel G-25 con Tris 20 mM/trehalosa al 8%, pH 7,5. (Como alternativa, el material puede formularse mediante diafiltración). La pureza final de Apo-2L se puede determinar mediante SDS-PAGE, SEC-HPLC y análisis de secuencias de aminoácidos.
55

EJEMPLO 9

Adiciones de cloruro de cobalto mejoran la acumulación y recuperación del producto ligando Apo-2 soluble

5 Expresión de Apo-2L (residuos de aminoácidos 114-281) regulada por el promotor de fosfatasa alcalina

[0145] Se utilizaron el mismo organismo de producción, composición del medio, condiciones de fermentación y análisis de muestra descritos en el ejemplo 8A en el estudio del efecto de las adiciones del ion metálico diferente de Zn, concretamente cloruro de cobalto, sobre la acumulación de producto Apo-2L (residuos de aminoácidos 114-281).
10 Se utilizó una solución de CoCl_2 en H_2O 100 mM en lugar del ZnSO_4 100 mM y se añadieron cantidades suficientes para llegar a una concentración final de 50-100 μM en cada una de las dos adiciones.

[0146] La figura 11 muestra las ventajas de las adiciones de CoCl_2 en la acumulación de Apo-2L durante el proceso de fermentación. Como en los experimentos de adición de ZnSO_4 , aunque no significativo, se detectó una tasa de acumulación más elevada de producto Apo-2L soluble mediante el método de ensayo HPLC IEX. Los datos demuestran que las adiciones de ciertos iones metálicos mejoran en general la acumulación de Apo-2L soluble, probablemente como resultado de su capacidad de estabilizar los trímeros ensamblados de Apo-2L.

20 **EJEMPLO 10**

Efectos de varios iones metálicos en formulaciones de Apo-2L

[0147] Se realizaron ensayos in vitro mediante la incubación de 50 μl de Apo-2L (forma 114-281) a 5 °C durante 24 horas con 5 mM de sal metálica (cada una de las cuales citadas en la Tabla VII siguiente; proporción molar 100:1 de metal con respecto a proteína) en un formulación de Tris 20 mM, trehalosa al 8%, Tween 20 al 0,01%, pH 7,5. A continuación, se evaluaron las muestras para la actividad apoptótica utilizando un ensayo SKMES tal como se describe en el ejemplo 4.

[0148] La EC50 (o concentración de Apo-2L que da lugar a la eliminación del 50% de las células) se muestra en la Tabla VII (unidades de ng/ml). Tal como se muestra en la Tabla VII, la adición de acetato de Zn y sulfato de Zn al cultivo aumentó la actividad de Apo-2L.

TABLA VII

Metal añadido	Bioensayo EC50
Control	19,0 ± 1,9 (n=3)
Acetato de Mn	19,8
Cloruro de Mn	19,9
Acetato de Fe	32,5
Acetato de Co	25,9
Cloruro de Co	17,9
Sulfato de Co	16,7
Acetato de Ni	18,7
Acetato de Cu	844
Cloruro de Cu	984
Sulfato de Cu	774
Acetato de Ag	20
Acetato de Zn	12,3
Cloruro de Zn	17,2
Sulfato de Zn (100:1)	9,3 ± 1,2 (n=3)
(10:1)	10,0 ± 0 (n=2)
(1:1)	11,5 ± 0,7 (n=2)

35 **EJEMPLO 11**

Efectos de iones metálicos de cinc sobre la estabilidad de la formulación del ligando Apo-2

[0149] Tal como se indica en el Ejemplo 8B, la primera etapa en el proceso de purificación utilizando el intercambiador de cationes MPHS produce dos máximos, A y B. Para investigar la estabilidad de almacenamiento de los dos máximos, se extrajo Apo-2L (forma 114-281) del producto expresado por E. coli (utilizando el plásmido pS1346.ApoL.0 con el promotor trp), y se purificó mediante un intercambio catiónico MPHS. El máximo A del MPHS se purificó adicionalmente mediante MP-Hidroxiapatita y Fenil-Sefarosa FF, y a continuación se formuló utilizando la filtración en gel G-25. El máximo B de MPHS se purificó mediante MP-Hidroxiapatita, Fenil-Sefarosa FF, y Superflujo Ni-NTA y a continuación se formuló en filtración en gel G-25 en Tris 20 mM, trehalosa al 8%, Tween al 0,01% Tween 20, pH 7,5. Las muestras se llenaron de forma estéril en viales de vidrio de 3 cc y se sellaron con tapones de gris

butilo recubiertos de teflón. La capacidad de almacenamiento de los máximos A y B purificados y formulados se evaluó en los tiempos (semanas (“se”) o meses (“me”)) y temperaturas (°C) indicadas en la Tabla VIII.

TABLA VIII

5

Máximo A	SDS-SEC %M	SDS-SEC %D	SEC % recuperación	SEC % trímero	RP % principal	EC50
1 semana, -70C	ND	ND		98,60	78,10	
1 semana, 37C	ND	ND	96,7	98,2	73,60	
2 meses, -70C	88,85	7,50		93,93	74,52	
2 meses, 30C	84,90	10,58	65,07	94,03	53,98	
6 meses, -70C	93,00	5,80			ND	11,1
6 meses, 5C	87,00	9,44	100		ND	14,8
6 meses, 30C	80,00	8,68	76		ND	67,8
Máximo B	SDS-SEC %M	SDS-SEC %D	SEC % recuperación	SEC % trímero	RP % principal	
1 semana, -70C	ND	ND		98,70	75,3	
1 semana, 37C	ND	ND	101,1	98,3	61,4	
2 meses, -70C	94,03	3,79		90,00	65,77	
2 meses, 30C	94,12	4,54	46,07	94,12	32,185	
6 meses, -70C	82,00	11,25			ND	10,3
6 meses, 5C	73,50	17,00	92		ND	12,6
6 meses, 30C	47,00	23,20	38		ND	Muerto

[0150] La tabla VIII muestra, entre otras cosas, el porcentaje de monómero (% M) y el porcentaje de dímero (% D); “ND” se refiere a aquellos valores no determinados. El máximo A incluía una cantidad de dímero ligeramente inferior y otras impurezas que el máximo B en el día 0. Tal como se muestra en la Tabla VIII, se halló que el máximo B era más térmicamente lábil, tal como se valoró mediante la precipitación más extensa a 30°C (aproximadamente un 40% más en el punto de 2 meses). Incluso a 5°C, el máximo B fue aproximadamente 2 veces más propenso a la formación de dímero que el pico A. El análisis bioquímico de los picos A y B indicó que el material de cada uno era bioquímicamente equivalente a excepción de sus respectivas propiedades de estabilidad. Se cree que la menor estabilidad del pico B puede estar relacionada con el ensamblaje incorrecto (trímero) o un contenido de cinc inferior (proporción molar de 0,83 de cinc con respecto a proteína para el máximo A y una proporción molar de 0,7 de cinc con respecto a proteína para el máximo B).

Listado de secuencias

[0151]
 <110> Genentech, Inc.
 <120> Métodos para la producción de ligando APO-2 utilizando iones metálicos divalentes
 <130> P1761R1PCT
 <141> 2000-06-26
 <150> US 60/141,342
 <151> 1999-06-28
 <160> 7
 <210> 1
 <211> 281
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

ES 2 392 392 T3

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

<210> 2
<211> 1042
<212> ADN
5 <213> Homo sapiens
<220>
<221> Variación
<222> 447
<223> N puede ser T O G
10 <400> 2

ES 2 392 392 T3

tttcctcact gactataaaa gaatagagaa ggaagggctt cagtgaccgg 50
 ctgcctggct gacttacagc agtcagactc tgacaggatc atggctatga 100
 tggaggtcca ggggggaccc agcctgggac agacctgctg gctgatcgtg 150
 atcttcacag tgctcctgca gtctctctgt gtggctgtaa cttacgtgta 200
 ctttaccaac gagctgaagc agatgcagga caagtactcc aaaagtggca 250
 ttgcttgttt cttaaagaa gatgacagtt attgggaccc caatgacgaa 300
 gagagtatga acagccoctg ctggcaagtc aagtggcaac tccgtcagct 350
 cgttagaaag atgattttga gaacctctga ggaaaccatt tctacagttc 400
 aagaaaagca acaaaatatt tctcccctag tgagagaaag aggtccncag 450
 agagtagcag ctcacataac tgggaccaga ggaagaagca acacattgtc 500
 ttctccaaac tccaagaatg aaaaggctct gggccgcaaa ataaactcct 550
 gggaatcatc aaggagtggg cattcattcc tgagcaactt gcacttgagg 600
 aatgggtgaac tggatcatcca tgaaaaaggg ttttactaca tctattccca 650
 aacatacttt cgatttcagg aggaaataaa agaaaacaca aagaacgaca 700
 aacaaatggc ccaatatatt tacaataaca caagttatcc tgaccctata 750
 ttgttgatga aaagtgctag aaatagttgt tggctctaaag atgcagaata 800
 tggactctat tccatctatc aagggggaat atttgagctt aaggaaaatg 850
 acagaatfff tgtttctgta acaaatgagc acttgataga catggaccat 900
 gaagccagtt ttttcggggc ctttttagtt ggctaactga cctggaaaga 950
 aaaagcaata acctcaaagt gactattcag ttttcaggat gatacactat 1000
 gaagatgfff caaaaaatct gaccaaaaca acaaacaga aa 1042

ES 2 392 392 T3

5 <210> 3
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

```

Lys Pro Ala Ala His Leu Ile Gly Asp Pro Ser Lys Gln Asn Ser
 1                               5                               10                               15
Leu Leu Trp Arg Ala Asn Thr Asp Arg Ala Phe Leu Gln Asp Gly
                               20                               25                               30
Phe Ser Leu Ser Asn Asn Ser Leu Leu Val Pro Thr Ser Gly Ile
                               35                               40                               45
Tyr Phe Val Tyr Ser Gln Val Val Phe Ser Gly Lys Ala Tyr Ser
                               50                               55                               60
Pro Lys Ala Thr Ser Ser Pro Leu Tyr Leu Ala His Glu Val Gln
                               65                               70                               75
Leu Phe Ser Ser Gln Tyr Pro Phe His Val Pro Leu Leu Ser Ser
                               80                               85                               90
Gln Lys Met Val Tyr Pro Gly Leu Gln Glu Pro Trp Leu His Ser
                               95                               100                              105
Met Tyr His Gly Ala Ala Phe Gln Leu Thr Gln Gly Asp Gln Leu
                               110                              115                              120
Ser Thr His Thr Asp Gly Ile Pro His Leu Val Leu Ser Pro Ser
                               125                              130                              135
Thr Val Phe Phe Gly Ala Phe Ala Leu
                               140
  
```

10 <210> 4
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

ES 2 392 392 T3

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

<210> 5
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

5

ES 2 392 392 T3

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

<210> 6
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

5

ES 2 392 392 T3

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

Tyr Lys

<210> 7

<211> 152

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 392 392 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Método de producción de ligando Apo-2, que comprende las etapas de: (a) proporcionar una célula huésped que comprende un vector replicable que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de ligando Apo-2; (b) proporcionar medios de cultivo que contienen un ion metálico divalente, en el que el ion metálico divalente es cinc y está presente en los medios de cultivo a una concentración de aproximadamente 50 micromolar a aproximadamente 250 micromolar; (c) cultivar la célula huésped en los medios de cultivo bajo condiciones suficientes para expresar el ligando Apo-2; y (d) recuperar el ligando Apo-2 de la célula huésped o medios de cultivo, en el que dicha célula huésped es E. coli.
2. Método, según la reivindicación 1, en el que dicho cinc es sulfato de cinc.
3. Método, según la reivindicación 2, en el que dicho cinc está presente en los medios de cultivo a una concentración de aproximadamente 50 micromolar a aproximadamente 100 micromolar.
4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende además la etapa de (e) purificar el ligando Apo-2.
5. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ligando Apo-2 se recupera o purifica en presencia de un ion metálico divalente, en el ion metálico divalente es cinc.
6. Método, según la reivindicación 5, en el que en la etapa (e) dicho ligando Apo-2 se purifica en presencia de un agente reductor.
7. Método, según la reivindicación 6, en el que dicho agente reductor se selecciona del grupo que consiste en DTT y BME.
8. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que dicho ligando Apo-2 se purifica mediante el contacto secuencial de dicho ligando Apo-2 a un soporte de cromatografía catiónica, soporte de hidroxapatita y soporte cromatográfico hidrofóbico.
9. Método, según la reivindicación 8, en el que dicho soporte de cromatografía catiónica se selecciona del grupo que consiste en SP-Sefarosa, CM-Sefarosa, y resina cerámica HS Macro-Prep.
10. Método, según la reivindicación 8, en el que dicho soporte cromatográfico hidrofóbico se selecciona del grupo que consiste en fenil agarosa, butil agarosa, resina TSK y resina Toyopearl.
11. Método, según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho vector replicable comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más moléculas de ARNt.
12. Método, según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho vector replicable tiene un promotor de fosfatasa alcalina.
13. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho ligando Apo-2 comprende los aminoácidos 114 a 281 de la figura 1 (SEQ ID NO:1).
14. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho ligando Apo-2 comprende los aminoácidos 1 a 281 de la figura 1 (SEQ ID NO:1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo.
15. Método de aumentar la formación de trímeros de ligando Apo-2, que comprende exponer los polipéptidos de ligando Apo-2 a un ion metálico divalente, en el que el ion metálico divalente es cinc y está presente en una concentración de aproximadamente 50 micromolar a aproximadamente 250 micromolar.
16. Método, según la reivindicación 15, en el que se reduce la formación de dímeros de ligando Apo-2 unidos por disulfuro.
17. Formulación que comprende ligando Apo-2 y un ion metálico divalente, en la que el ion metálico divalente es cinc y está presente en la formulación a (i) una proporción molar 100:1 de cinc con respecto al ligando Apo-2, en la que dicho cinc es acetato de cinc o sulfato de cinc; o (ii) una proporción 10:1 ó 1:1 de cinc con respecto al ligando Apo-2, en la que dicho cinc es sulfato de cinc, y en la que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 7,5.
18. Formulación, según la reivindicación 17, en la que dicha formulación es una formulación farmacéuticamente aceptable.
19. Formulación, según la reivindicación 17, en la que dicho ligando Apo-2 comprende los aminoácidos 114 a 281 de la figura 1 (SEQ ID NO:1).

20. Formulación, según la reivindicación 17, en la que dicho ligando Apo-2 comprende los aminoácidos 1 a 281 de la figura 1 (SEQ ID NO:1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo.

5 21. Método de producción de una formulación farmacéuticamente aceptable de ligando Apo-2, según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, que comprende mezclar ligando Apo-2 e ion cinc divalente, y un portador farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

1 TTTCCCTCAGCTATAAAAAGAAATAGAGAGAGGAGGGCTTCAGTGCACCCTGGCTGCTGACTTACAGCAGCTCAGACTCGACAGGATC
 1 ATGGCTATGATGGAGGTCAGGGGGGACCCAGCCCTGGGACAGACCTGGGTGCTGATCGTGATCTTACAGTGGTCTCGAGTCTCTCTGT
 1 MetAlaMetMetGluValGlnGlyProSerLeuGlyGlnThrCysValLeuIleValIlePheThrValLeuLeuGlnSerLeuCys
 181 GTGGCTGTAACTTACGTGACTTTACCAACGGAGCTGAAGCAGATGCAGGACAACTCCAAAAGTGGCATTCCTGTTCTTAAAAGAA
 31 ValAlaValThrTyrValTyrPheThrAsnGluLeuLeuGlnMetGlnAspLysTyrSerLysSerGlyIleAlaCysPheLeuLysGlu
 271 GATGACAGTTATTGGGACCCCAATGACGAAGAGATGAACAGCCCTGCTGGCAAGTCAAGTGGCAACTCCGTCAGCTCGTTAGAAG
 61 AspAspSerTyrTrpAspProAsnAspGluGluSerMetAsnSerProCysTrpGlnValLysTrpGlnLeuArgGlnLeuValArgLys
 361 ATGATTTGAGAACCTCTGAGGAAACCAATTTCTACAGTTCAGAAAAGCAACAAATAATTTCTCCCTAGTGAGAGAAAAGGGTCCNCAG
 91 MetIleLeuArgThrSerGluGlnThrIleSerThrValGlnGluLysGlnGlnAsnIleSerProLeuValArgGluArgGlyProGln
 451 AGAGTAGCAGCTCACATAACTGGGACCAGAGGAAGCAACACATTCCTCCAAAACCTCCAAAGATGAAAAGGCTCTGGGCCGCAAA
 121 ArgValAlaAlaIleThrGlyThrArgGlyArgSerAsnThrLeuSerSerProAsnSerLysAsnGluLysAlaLeuGlyArgLys
 541 ATAACTCCTGGGAATCATCAAGGAGTGGGCATTCATCCTGAGCAACTGCGACTTGAGGAATGGTGAACCTGCATCCATGAAAAAGGG
 151 IleAsnSerTrpGluSerSerArgSerGlyHisSerPheLeuSerAsnLeuHisLeuArgAsnGlyGluLeuValIleHisGluLysGly
 631 TTTTACTACATCTATTCCCAACATACTTTCGATTTCAAGGAGGAAATAAAAGAAAACACAAAAGAACGACAAAATAATGGTCCAAATATATT
 181 PheTyrTyrIleTyrSerGlnThrTyrPheArgPheGlnGluIleLysGluAsnThrLysAsnAspLysGlnMetValGlnTyrIle
 721 TACAAATACACAAGTTATCTGACCCTATATTTGTTGATGAAAAGTGTAGAAATAGTTGTTGGTCTAAAGATGCAGAAATATGGACTCTAT
 211 TyrLysTyrThrSerTyrProAspProIleLeuLeuMetLysSerAlaArgAsnSerCysTrpSerLysAspAlaGluTyrGlyLeuTyr
 811 TCCATCTATCAAGGGGAAATATTTGAGCTTAAAGGAAAATGACAGAAATTTTGTCTGTAAACAATGAGCACCTGTGATAGACATGGACCAT
 241 SerIleTyrGlnGlyGlyIlePheGluLeuLysGluAsnAspArgIlePheValSerValThrAsnGluHisLeuIleAspMetAspHis
 901 GAAGCCAGTTTTTTCGGGGCCTTTTGTAGTTGGCTAACCTGGAAACAAAACCAATTAACCTCAAAGTGACTATTTCAGTTTTCAGGAT
 271 GluAlaSerPheGlyAlaPheLeuValGlyStp
 991 GATACACTATGAAGATGTTTCAAAAATCTGACCAAAAACAAACAAACAGAAA

Figura 2A

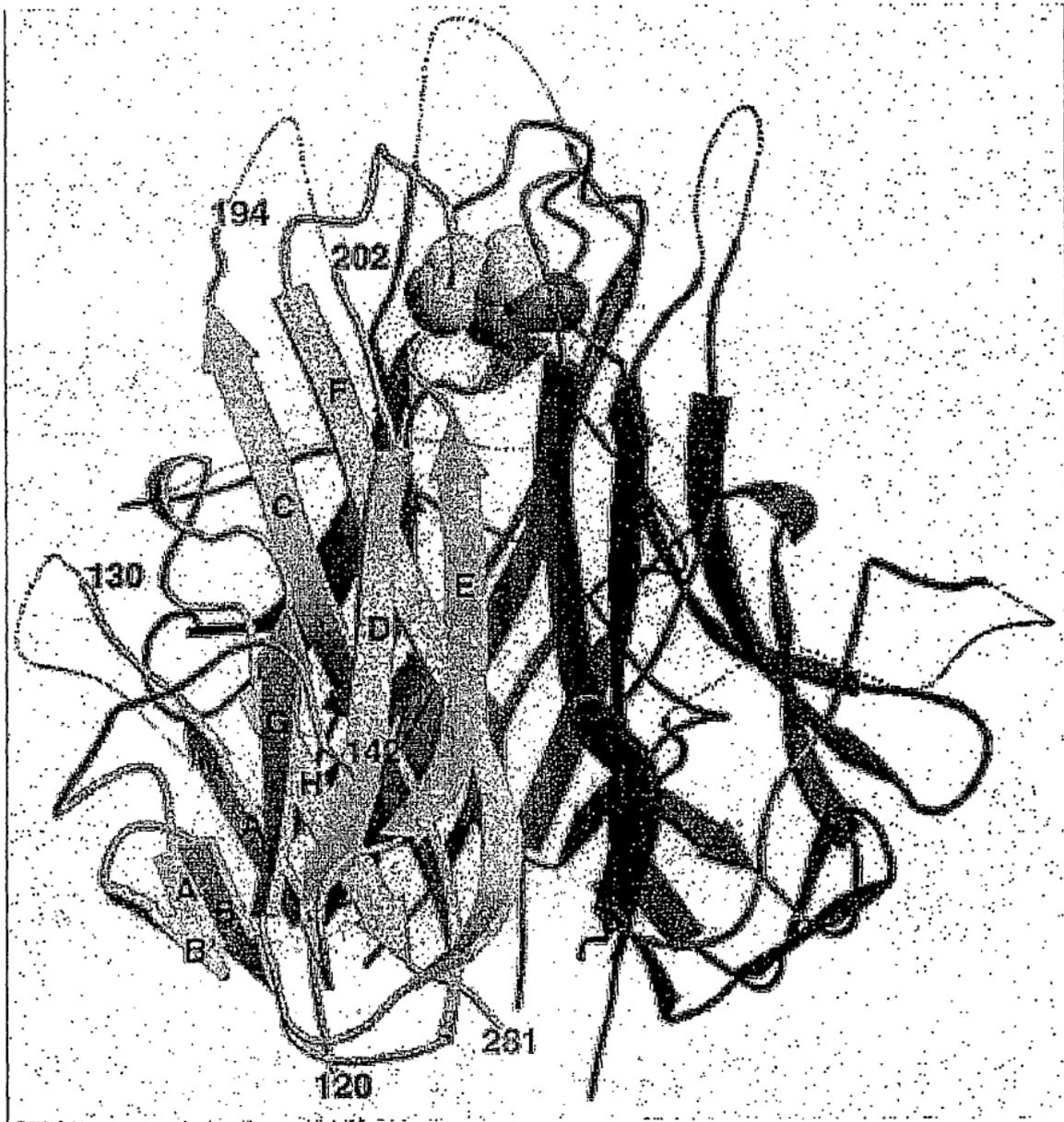
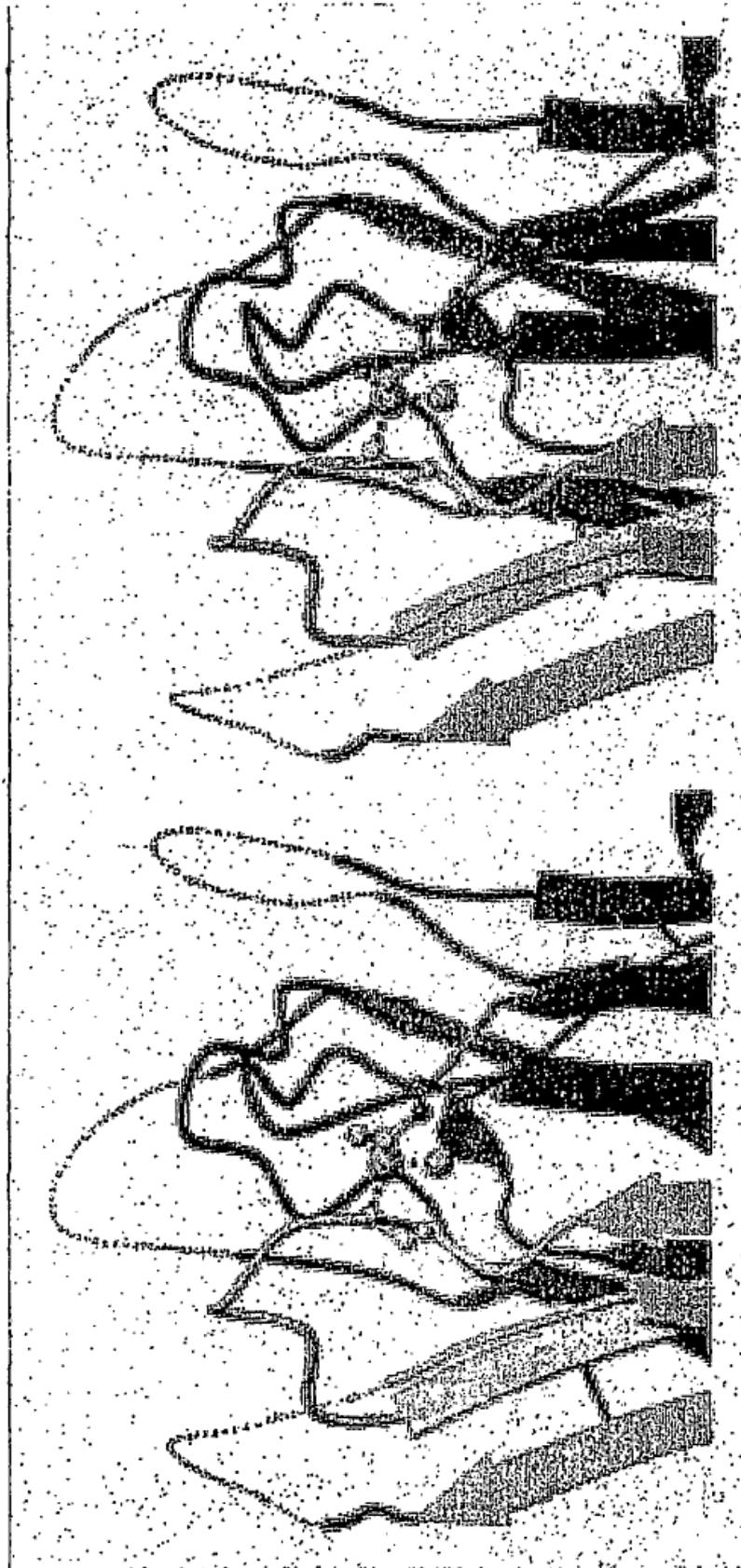


Figura 2B



Datos cristalográficos

	<u>Apo-2L (114-281)</u>	<u>Apo-2L (91-281) D218A</u>	<u>Apo-2L (91-281) D218</u>
Cristal			
Grupo espacial	P6 ₃	R32	R32
Celda unidad (Å)	a = 72,5 c =140	a = 66,4 c= 197,6	a = 66,4 c =197,7
Resolución (Å)	3,9	1,9	1,3
Cobertura (%)	94 (96)	93 (99)	100 (100)
<I/σ(I)>	5,9	10,1	12,4
# Único (hkl)	3589	12680	41840
Redundancia	4,9	4,3	12,1
R _{sim} (%)	15,4 (34)	6,2 (27)	6,4 (34)
# Promotores en ASU	2	1	1
Refinamiento			
R _{crist} (%)	33,8	20	
R _{libre} (%)	27,6	22	
msd Enlaces (Å)	0,009	0,015	0,007
msd ángulos (°)	1,79	2,0	1,41
Valores B promedio	--	14	14
# Moléculas de agua	0	70	

- 5 $R_{\text{symm}} = \frac{\sum_h \sum_i (I_{hr} - \langle I_r \rangle)}{\sum_h I}$, donde I_h es la intensidad del factor de estructura promedio de i observaciones de reflexiones relacionadas con la simetría con índice de Bragg h . $R_{\text{crist}} = \frac{\sum_h \sum_i |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|}{\sum |F_{\text{obs}}|}$, donde F_{obs} y F_{calc} son las amplitudes de los factores de estructura calculados. $R_{\text{libre}} = \frac{\sum_{(hkl) \in \tau} |F_{\text{obs}}(hkl) - k| F_{\text{calc}}(hkl)|}{\sum_{(hkl) \in \tau} |F_{\text{obs}}(hkl)|}$, donde el grupo τ de reflexiones está omito el proceso de refinamiento. El 10% de los datos se incluyeron en el grupo τ para el cálculo de R_{libre} y no se incluyeron en el refinamiento. Los valores en paréntesis son para la capa de resolución más elevada
- 10

Figura 2C

Figura 3

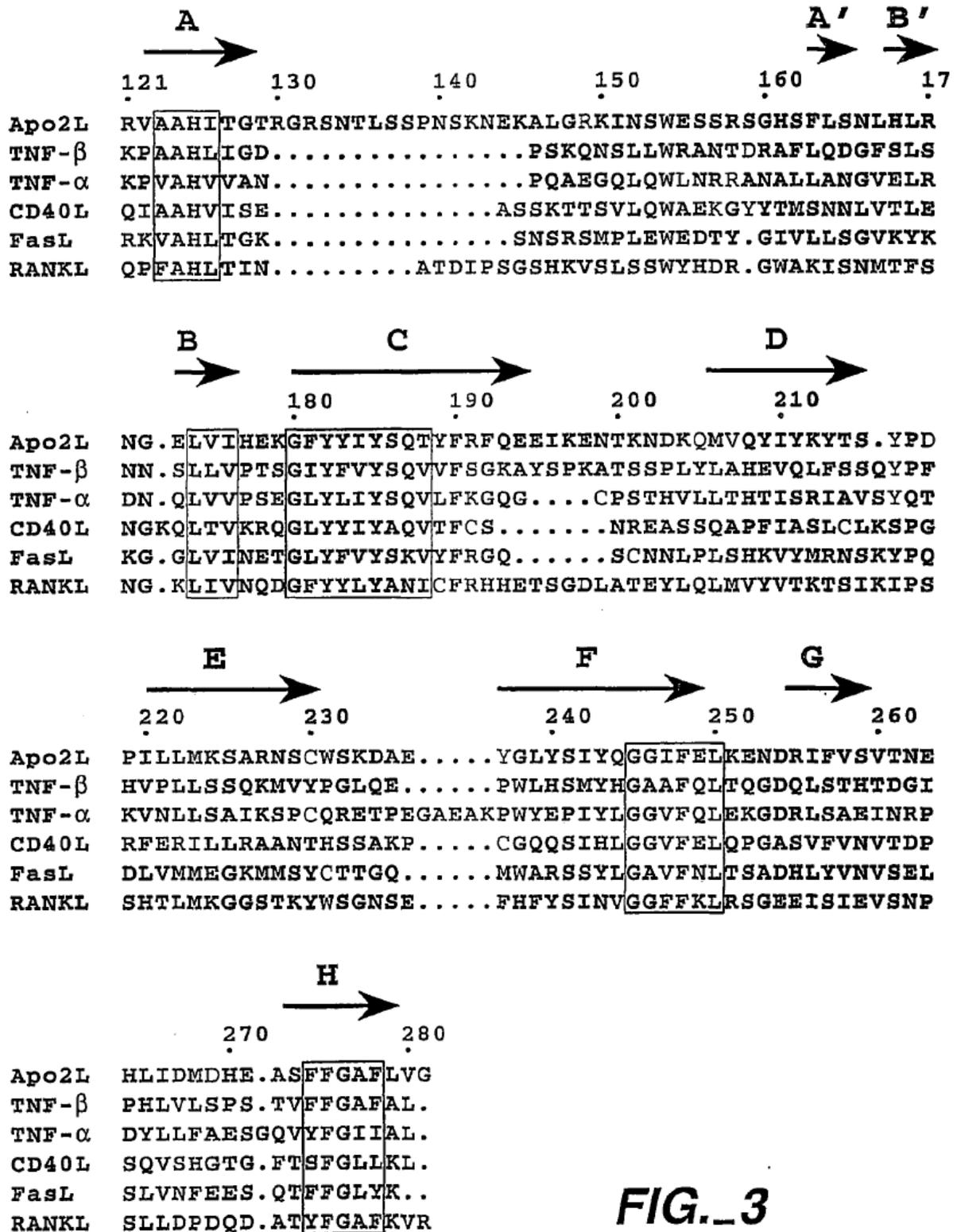


FIG. 3

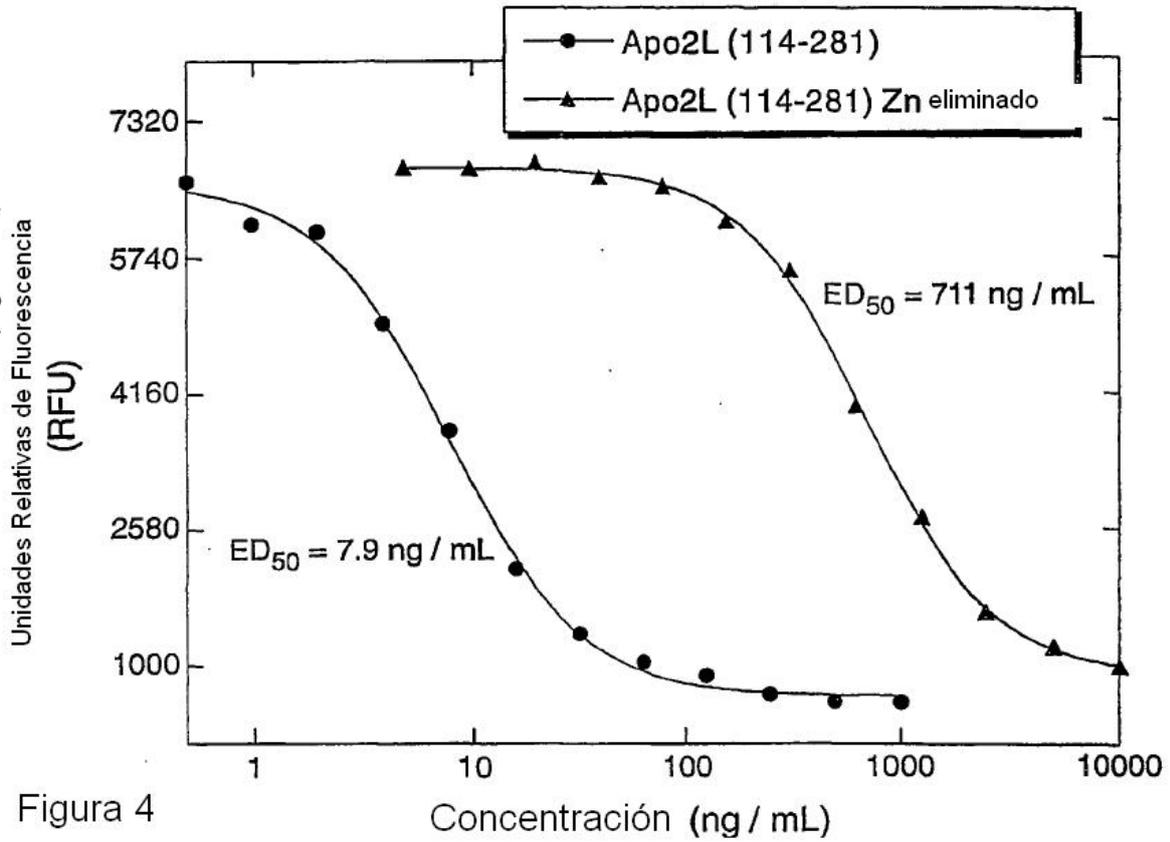


Figura 4

Espectro Dicroico circular

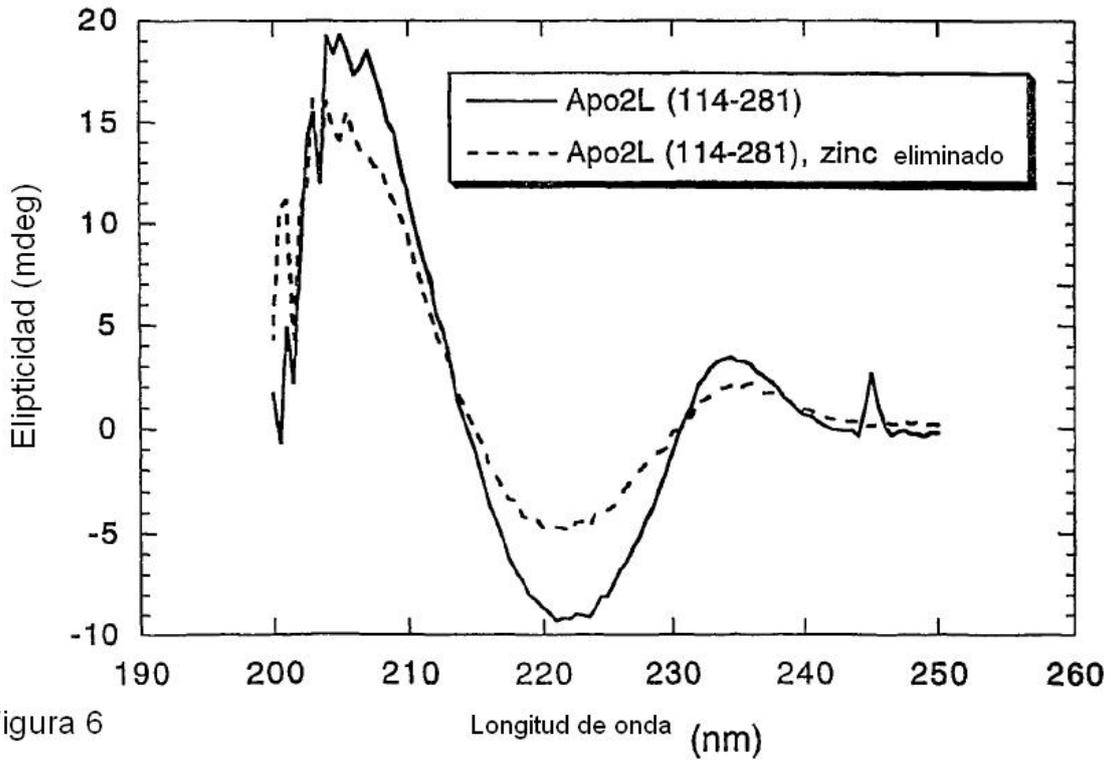
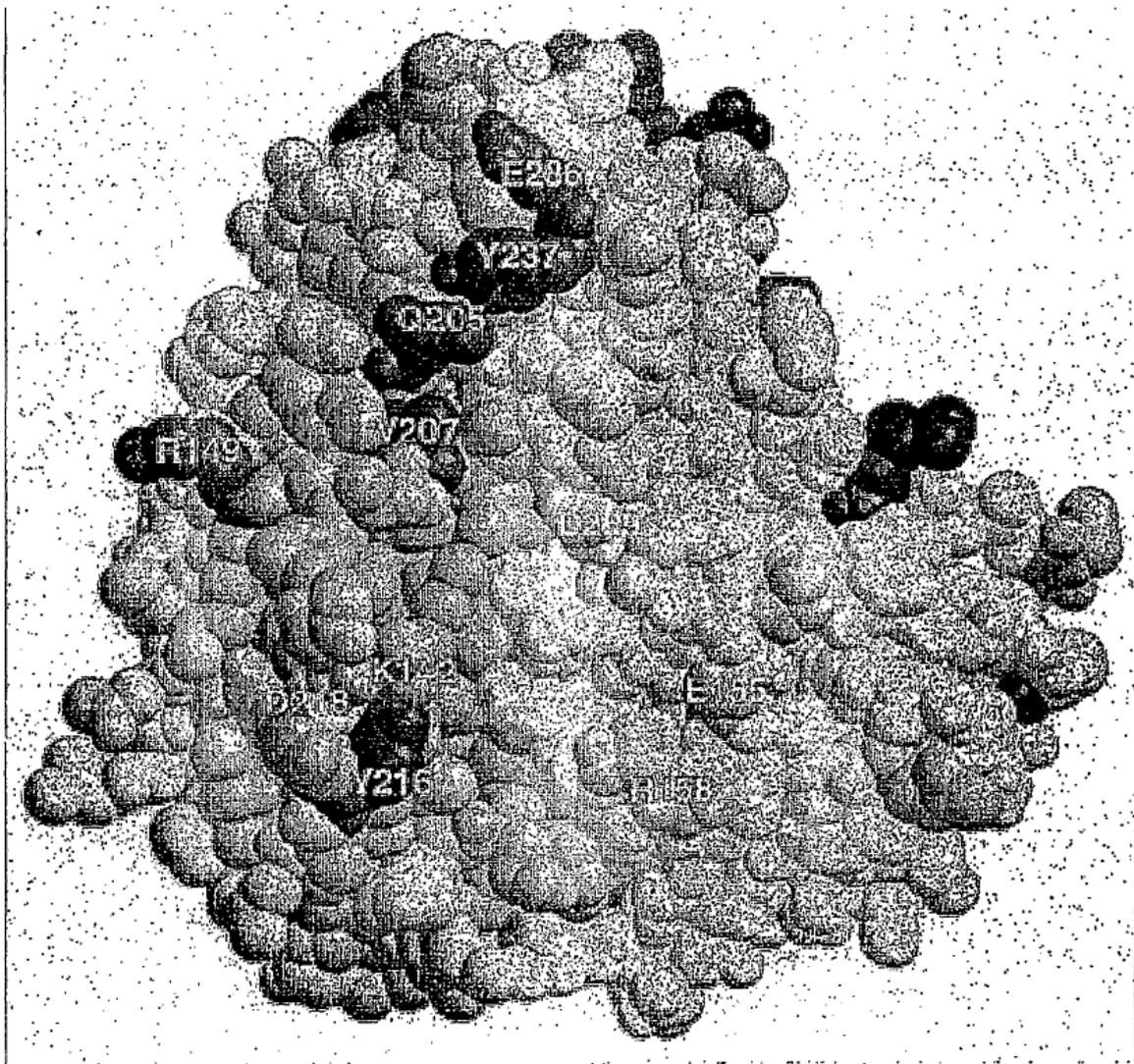


Figura 6

Figura 5



Efecto de eliminación de Zn en la estabilidad:
Desnaturalización térmica mediante CD

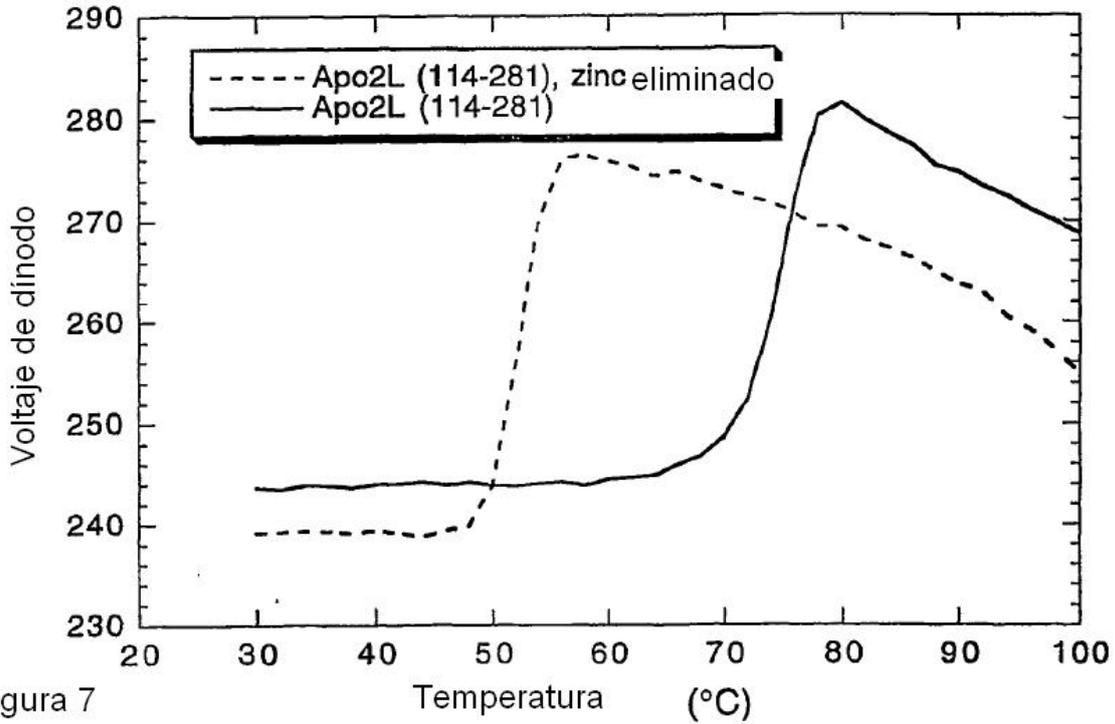


Figura 7

Efecto de las adiciones de ZnSO4 en la acumulación del producto Apo2L

Producción huésped: 43E7

(*E. coli* W3110 *fhuA* (*tonA*) *phoA* Δ (*argF-lac*) *degP* *kanS* *ptr3* *ompT* *llvG*)

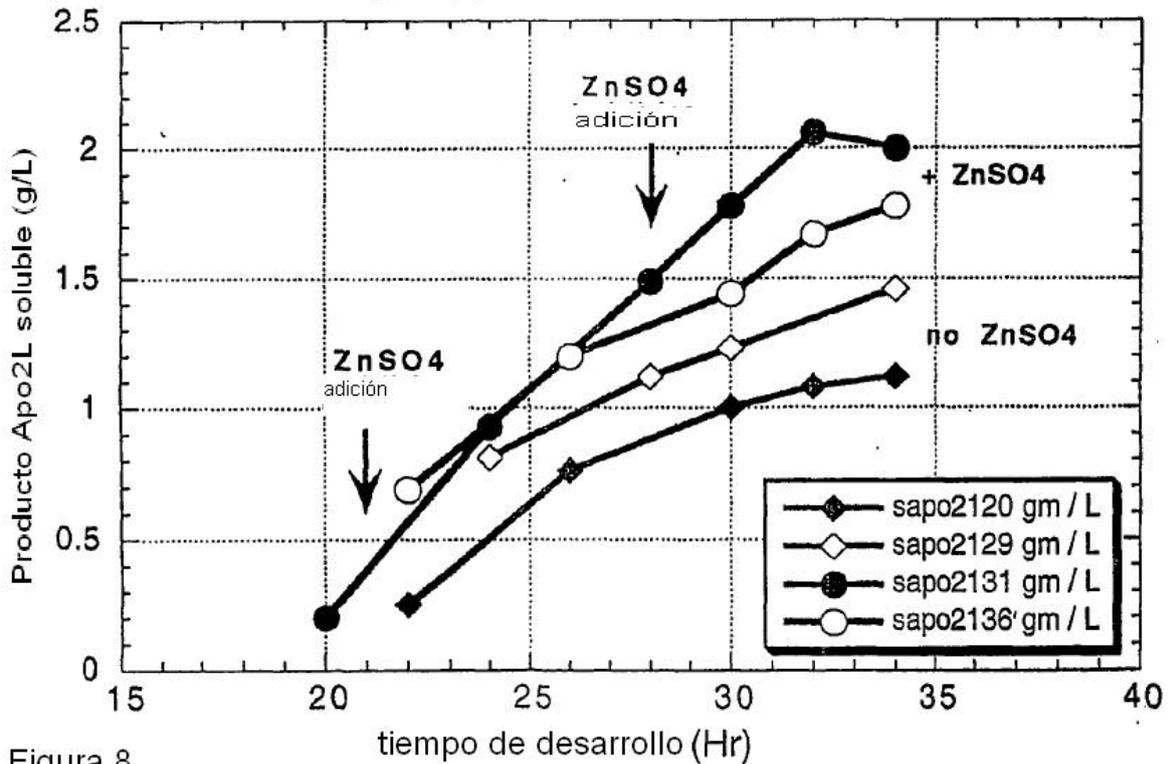


Figura 8

AP-Apo2L +/- ZnSO4 gm / l

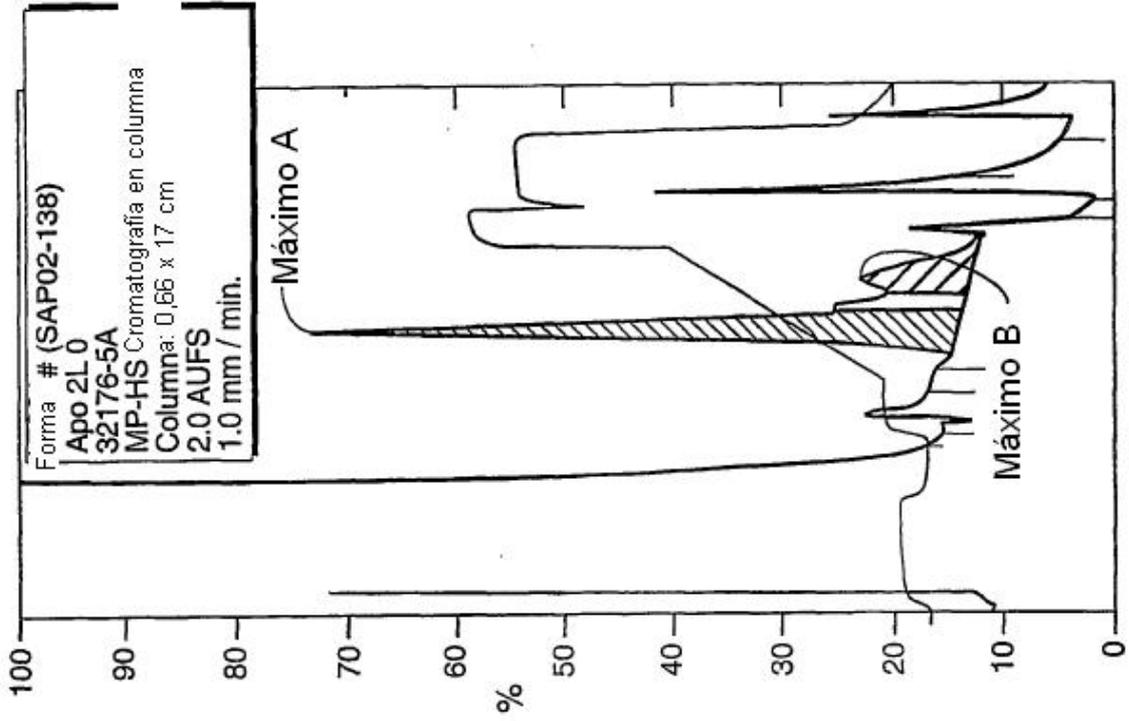


Figura 9B

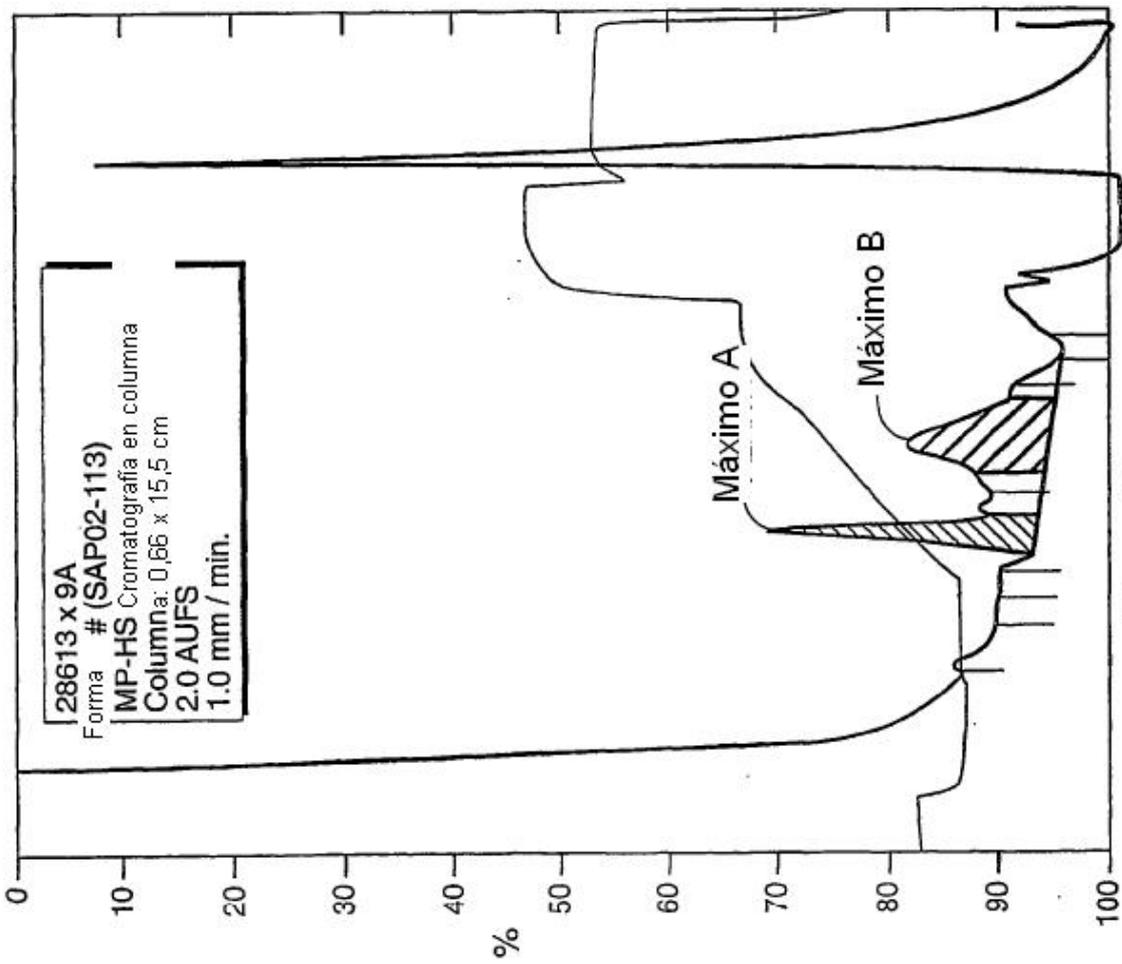


Figura 9A

Efecto de las adiciones de ZnSO₄ en la acumulación del producto Apo2L utilizando el promotor trp para la expresión por E. coli

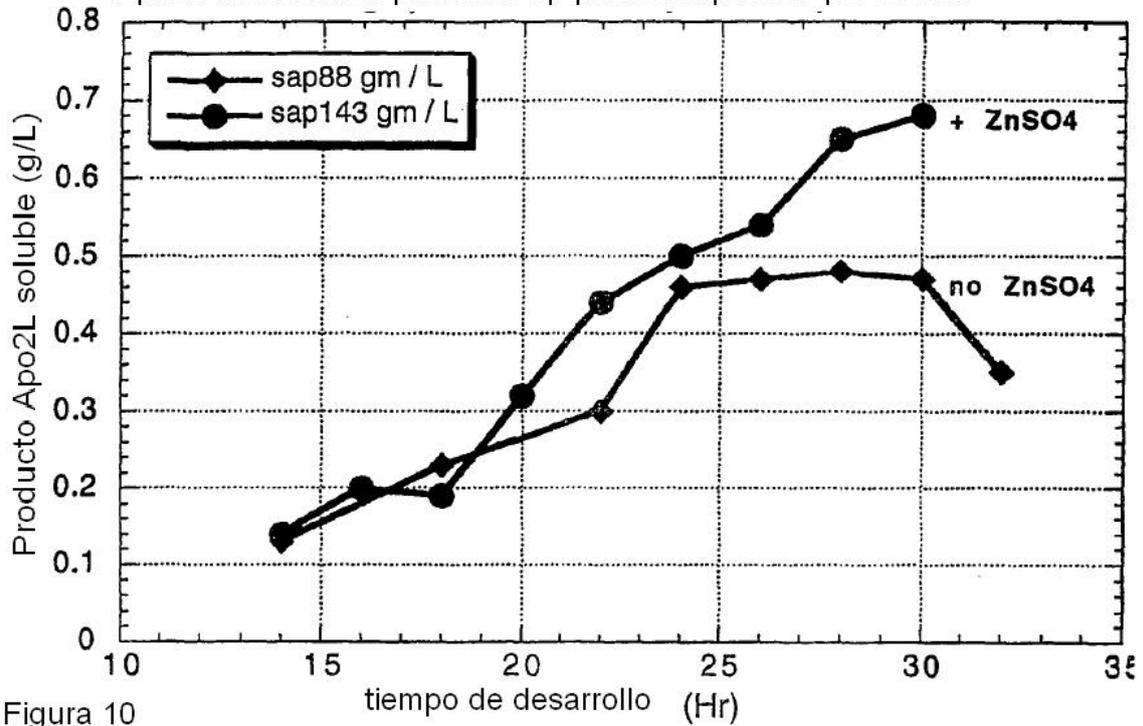


Figura 10

trp-Apo2L +/- ZnSO₄ gm / L

Efecto de las adiciones de CoCl₂ en la acumulación de producto Apo2L

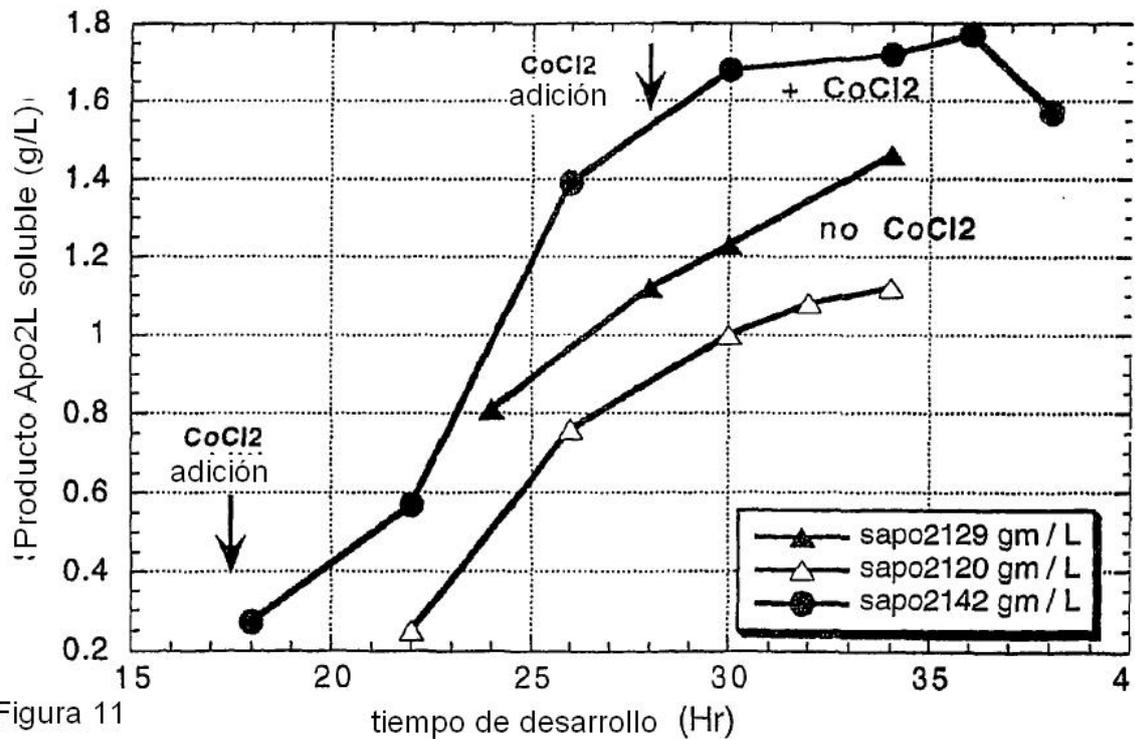


Figura 11

AP-Apo2L + CoCl₂ gm / L

Figura 12

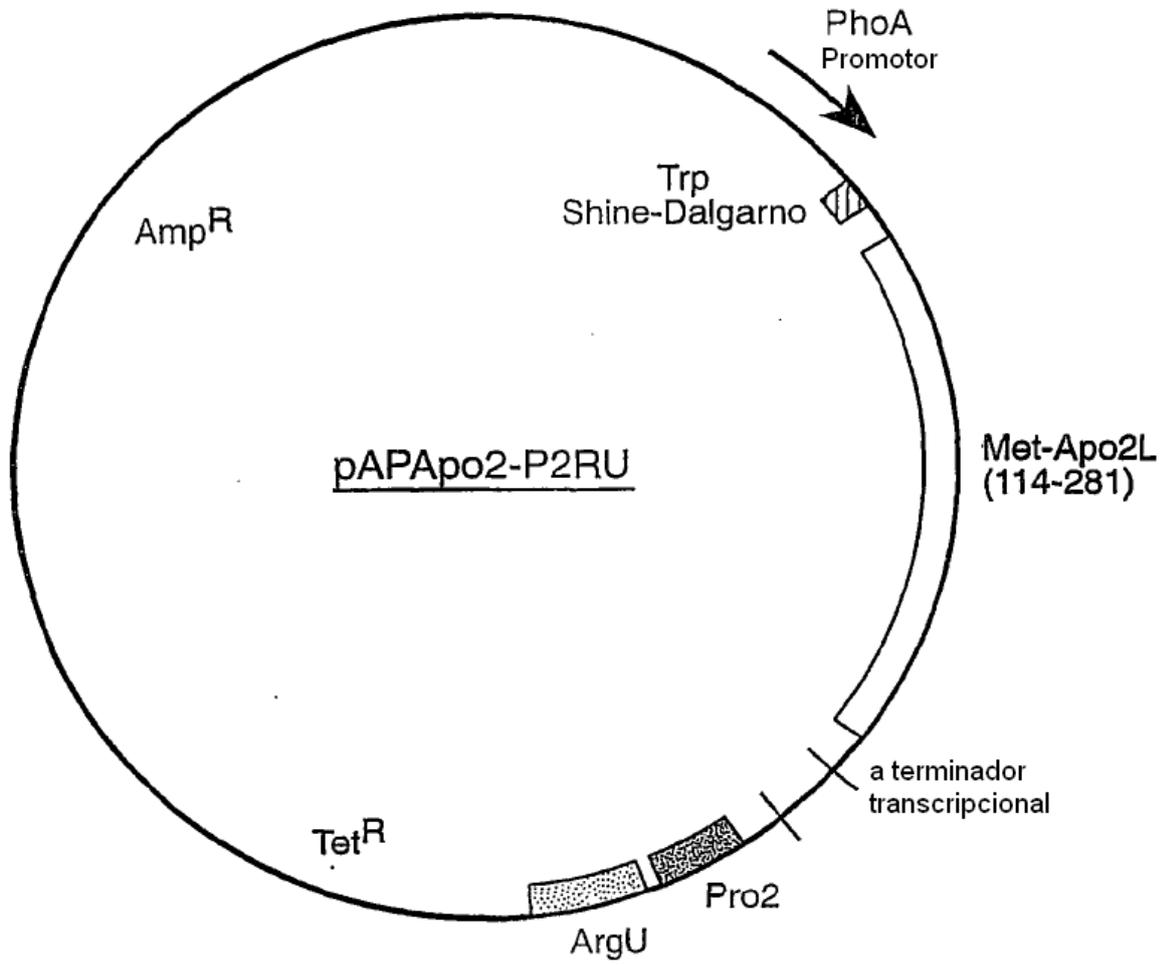


Figura 13

