

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 693**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/02 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.1999 E 09001057 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 2058334**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales, anticuerpos que reaccionan de forma cruzada y procedimiento para la fabricación de los mismos**

30 Prioridad:

12.06.1998 US 96637

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.02.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ASHKENAZI, AVI J.;
CHUNTHARAPAI, ANAN y
KIM, K. JIN**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 395 693 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales, anticuerpos que reaccionan de forma cruzada y procedimiento para la fabricación de los mismos.

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCIONCampo de la invención

10 La presente invención se refiere en general a un procedimiento para fabricar anticuerpos monoclonales. La presente invención también se refiere a anticuerpos obtenibles mediante el procedimiento que específicamente reacciona de forma cruzada con dos o más receptores diferentes a los que se puede unir el ligando Apo-2 (Apo-2L).

15 Descripción de la técnica anterior

Los anticuerpos nativos son sintetizados principalmente por linfocitos especializados llamados "células plasmáticas". La producción de una fuerte respuesta de los anticuerpos en un animal huésped está controlada por la inducción y regulación de la diferenciación de células B en estas células plasmáticas. Esta diferenciación implica que células B vírgenes (que tienen un anticuerpo modificado como receptor de antígeno de la superficie celular y no secretan anticuerpos) se conviertan en células B activadas (ambas secretan anticuerpos y tiene anticuerpos en la superficie celular), y entonces en células plasmáticas (que son fábricas de anticuerpos altamente especializadas sin receptores de antígeno en la superficie). Este proceso de diferenciación está influenciado por la presencia de antígeno y por la comunicación celular entre células B y células T auxiliares.

20

Debido a su capacidad para unirse selectivamente a un antígeno de interés, se han utilizado ampliamente anticuerpos para investigación, aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Los usos potenciales para los anticuerpos se expandieron con el desarrollo de los anticuerpos monoclonales. A diferencia del antisero policlonal, que incluye una mezcla de anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopos, los anticuerpos monoclonales están dirigidos contra un único determinante o epítipo en el antígeno y son homogéneos. Además, los anticuerpos monoclonales se pueden producir en cantidades ilimitadas.

25

El trabajo seminal por Kohler y Milstein describió el primer procedimiento para obtener hibridomas que pueden producir anticuerpos monoclonales (Kohler y Milstein Nature 256:495 (1975)). En este procedimiento, se fusiona una célula inmune secretora de anticuerpos, aislada de un ratón inmunizado, con una célula de mieloma, un tipo de tumor de células B. Las células híbridas (es decir, hibridomas) resultantes se pueden mantener in vitro y pueden continuar secretando anticuerpos con una especificidad definida.

30

Dado que los anticuerpos monoclonales murinos derivan de ratones, su uso como agentes terapéuticos en humanos está limitado debido a la respuesta anti-ratón humana que tiene lugar tras la administración del anticuerpo murino a un paciente. Por consiguiente, los investigadores han diseñado anticuerpos no humanos para hacerlos parecer más humanos. Dichos anticuerpos diseñados se denominan anticuerpos "quiméricos"; en los que un dominio de unión a antígeno no humano se acopla a un dominio constante humano (Cabilly et al., Patente de Estados Unidos No. 4.816.567). El isotipo del dominio constante humano se puede seleccionar para ajustar a medida el anticuerpo quimérico para la participación en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y la citotoxicidad dependiente de complemento. En un esfuerzo adicional por resolver las funciones de unión a antígeno de los anticuerpos y minimizar el uso de secuencias heterólogas en anticuerpos humanos, Winter y colaboradores [(Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al. Science 239:1534-1536 (1988)] han sustituido residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) del roedor por los segmentos correspondientes de un anticuerpo humano para generar anticuerpos humanizados.

35

40

45

Tal como se utiliza en la presente invención, el término anticuerpo "humanizado" es una realización de anticuerpos quiméricos en la que sustancialmente menos de un dominio variables humano intacto ha sido sustituido por las correspondientes secuencias de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que los residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de la región armazón ("framework") son sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

50

Otros grupos han desarrollado procedimientos para fabricar anticuerpos monoclonales completamente "humanos". Dichos anticuerpos se pueden generar inmortalizando una célula humana que secreta un anticuerpo específico utilizando un virus Epstein-Barr (EBV) [Steinitz et al. Nature 269:420-422 (1977)]; o preparando un hibridoma humano-humano que secreta el anticuerpo monoclonal [Olsson et al. PNAS (USA) 77:5429-5431 (1980)]. Los anticuerpos humanos también pueden derivar de bibliotecas de expresión en fagos. [Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1992); Vaughan et al. Nature Biotech 14:309 (1996)].

55

60

65

Alternativamente, también se han fabricado anticuerpos humanos en animales de laboratorio transgénicos, en los que los se han introducido loci de inmunoglobulina humana en el animal y los genes de inmunoglobulina endógena se inactivan parcial o totalmente [Fishwild et al. Nature Biotech. 14:845-851 (1996); y Mendez et al. Nature Genetics 15:146-156 (1997)].

5

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un anticuerpo que específicamente reacciona de forma cruzada con dos o más receptores Apo-2L diferentes; por ejemplo, que se une específicamente al polipéptido Apo-2 y además específicamente reacciona de forma cruzada con otro receptor Apo-2L, tal como se define en las reivindicaciones.

10

La presente solicitud proporciona además un anticuerpo monoclonal que tiene las características biológicas de un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en 3H1.18.10, 3H3.14.5 y 3D5.1.10.

15

Además, la presente invención proporciona líneas celulares de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales descritos en la presente invención tal como se definen en las reivindicaciones.

La presente invención también se refiere a ácidos nucleicos aislados que comprenden ADN que codifica un anticuerpo de la presente invención; un vector que comprende el ácido nucleico; una célula huésped que comprende el vector; un procedimiento de producción de un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped en condiciones en las que el ADN se expresa y, opcionalmente, que comprende además recuperar el anticuerpo del cultivo de células huésped.

20

La presente invención proporciona además composiciones que comprenden un anticuerpo de la invención y un portador.

25

Además, se describe un procedimiento de inducción de apoptosis en células de cáncer de mamífero que comprende exponer las células de cáncer de mamífero a una cantidad eficaz de un anticuerpo agonístico anti-receptor Apo-2L que reacciona de forma cruzada, tal como se describe en la presente invención.

30

También se describe un artículo de fabricación que comprende un recipiente y una composición contenida en dicho recipiente, donde la composición incluye un anticuerpo tal como se describe aquí.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35

La figura 1 representa un esquema de ejemplo de inmunización de antígeno mixto para los inmunógenos: Apo-2-IgG, DR4-IgG, DcR1-IgG y DcR2-IgG.

La figura 2 ilustra esquemas de inmunización de antígeno único para los antígenos: Apo-2-IgG, DR4-IgG y DcR2-IgG.

40

La figura 3 muestra títulos de suero específicos de antígenos de ratones inmunizados con DR4-IgG, Apo-2-IgG o DcR2-IgG individualmente. Se recogió el suero de ratones Balb/c (5 ratos/grupo) que se inmunizaron 10 veces en la pata de la pata (F.P.) con 1 µg de cada molécula de inmunoadhesina en MPL-TDM. La actividad hacia la parte Fc de IgG humana se preadsorbió mediante la incubación de 100 ml de suero (dilución 1:500 en PBS) con 3 mg por 50 ml de CD4-IgG durante 1 h a temperatura ambiente (RT). A continuación, se prepararon diluciones en serie de este suero preadsorbido en PBS. Las actividades específicas de antígeno de este suero preadsorbido se determinaron en un ELISA de captura utilizando pocillos de microtitulación recubiertos por antígenos específicos.

45

La figura 4 muestra títulos de suero específico de antígeno de ratones inmunizados con DR4-IgG, Apo-2-IgG, DcR1-IgG y DcR2-IgG juntos. Los ratones se inmunizaron en la F.P. con una mezcla de DR4-IgG, Apo-2-IgG, DcR1-IgG y DcR2-IgG (los ratones se inmunizaron 14 veces; DcR2-IgG sólo se incluyó en la mezcla para las 6 inmunizaciones finales). Se utilizó 1 µg por inyección de cada inmunógeno. La actividad para Fc de IgG en el suero se adsorbió mediante la incubación con CD4-IgG, tal como se ha descrito anteriormente. La actividad de este suero preadsorbido específico para cada antígeno se determinó en un ELISA de captura utilizando los pocillos de microtitulación recubiertos con el antígeno específico.

50

La figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos de un ADNc de Apo-2 humano de secuencia nativa (SEC ID No. 1) y su secuencia de aminoácidos derivada (SEC ID No. 2)

55

Las figuras 6A, 6B y 6C representan la unión de anticuerpo a los receptores Apo2-L: DR4, Apo-2, DcR1 y DcR2 tal como se determina mediante. Los anticuerpos son: 3H3.14.5 (Fig. 6A), 3H1.18.10 (Fig. 6B), y 3DS.1.10 (Fig. 6C).

60

Las figuras 7A, 7B y 7C muestra un análisis FACS para los anticuerpos 3H1-18.10 (Fig. 7A), 3H3.14.5 (Fig. 7B), y 3D5.1.10

La figura 7C [ilustrada mediante líneas en negrita] en comparación con los controles de IgG [líneas de puntos]. Todos los anticuerpos reconocieron Apo-2 expresado en células 9D humanas.

La figura 8 representa la apoptosis inducida por los anticuerpos 3H1.18.10 (3H1), 3H3.14.5 (3H3) y 3D5.1.10 (3D5), un control de emparejamiento de isotipos (IgG), y Apo-2L.

65

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDASI. Definiciones

5 El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y de bloqueo o neutralización) y composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica.

10 El término "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en muy pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un sitio antigénico único. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen habitualmente diferentes anticuerpos dirigidos contra determinantes (epítomos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno.

15 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen anticuerpos híbridos y recombinantes producidos por el "splicing" (cortar y empalmar) de un dominio variable (incluyendo hipervariable) de un anticuerpo con un dominio constante, o una cadena ligera con una cadena pesada, o una cadena de una especie con una cadena de otra especie, o fusiones con proteínas heterólogas, independientemente de la especie de origen o la designación de la clase o subclase de inmunoglobulina, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv), siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.816.567 y Mage et al., en *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág.79-97 (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987).

20 De este modo, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo por obtenerse a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden fabricar mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de las bibliotecas de fagos generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990), por ejemplo.

25 Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "sFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptido. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios VH y VL que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase, por ejemplo, Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

30 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata o conejo, que presenta la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región armazón ("framework") (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en anticuerpo dador. Estas modificaciones se realizan para refinar más y optimizar la acción de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de, por lo menos, uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima por lo menos una parte de una región o dominio constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana.

35 El término "región hipervariable" cuando se utiliza en la presente invención se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (es decir, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (es decir, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol.

Biol. 196: 901-917 (1987)). Los residuos del "armazón" o "FR" son los residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se definen en la presente invención.

5 Los términos "ligando Apo-2" o "Apo-2L" se refieren a los polipéptidos Apo-2L descritos en WO97/25428, publicada el 17 de julio de 1997 e incorporada expresamente en la presente invención por referencia. Para los objetivos de la presente solicitud, estos términos también se refieren a los polipéptidos descritos en WO97/01633, publicada el 16 de enero de 1997 e incorporada expresamente en la presente invención por referencia.

10 Un "receptor de Apo-2L" es un polipéptido al que Apo-2L (tal como se define en la presente invención) se puede unir específicamente. El término "receptor de Apo-2L", cuando se utiliza en la presente invención, comprende receptores de Apo-2L de secuencia nativa y variantes de los mismos (que se definen posteriormente en la presente invención). Estos términos comprenden el receptor de Apo-2L de una serie de mamíferos, incluyendo humanos. El receptor de Apo-2L se puede aislar de varias fuentes, tales como tipos de tejidos humanos o de otra
15 fuente, se puede preparar mediante procedimientos recombinantes o sintéticos. Ejemplo de receptores Apo-2L de "secuencia nativa" incluyen polipéptido Apo-2 (tal como se describe en la presente invención a continuación), "DR4" de secuencia nativa, tal como se describe en Pan et al. Science 276:111-113 (1997); "receptor 1 señuelo" o "DcR1" de secuencia nativa como en Sheridan et al., Science 277:818-821 (1997); y "receptor 2 señuelo" o "DcR2" de secuencia nativa como en Marsters et al. Curr. Biol. 7:1003-1006 (1997) y osteoprotegerina de
20 secuencia nativa [véase Simonet et al. Cell 89:309-319 (1997) y Emery et al. J. Interferon and Cytokine Research 18(5): A47 Abstract 2.17 (1998)].

25 Los términos "polipéptido Apo-2" y "Apo-2" cuando se utiliza en la presente invención comprenden Apo-2 de secuencia nativa y variantes de Apo-2 (que se definen posteriormente en la presente invención). Estos términos comprenden Apo-2 de un conjunto de mamíferos, incluyendo humanos. El Apo-2 se puede aislar de de varias fuentes, tales como tipos de tejidos humanos o de otra fuente, se puede preparar mediante procedimientos recombinantes o sintéticos.

30 Un polipéptido de "secuencia nativa" (por ejemplo "Apo-2 de secuencia nativa") comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido derivado de la naturaleza. De este modo, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos de un polipéptido natural de cualquier mamífero. Dicho polipéptido de secuencia nativa se puede aislar de la naturaleza o se puede producir mediante medios recombinantes o sintéticos. El término "secuencia nativa" de un polipéptido comprende específicamente formas truncadas o secretadas de forma natural del polipéptido (por ejemplo, una secuencia del dominio
35 extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas de "corte y empalme" alternativo) y variantes alélicas naturales del polipéptido.

40 Una forma variante natural de Apo-2 incluye un Apo-2 que tiene una sustitución de aminoácido en el residuo 410 en la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 5 (SEC ID No. 2). En una realización de dicha forma variante natural, el residuo de leucina en la posición 410 está sustituido por un residuo de metionina. En la figura 5 (SEC ID No. 2), el residuo de aminoácido en la posición 410 se identifica como "Xaa" para indicar que el aminoácido puede ser, opcionalmente, leucina o metionina. En la figura 10 (Sec ID No. 2), el nucleótido en la posición 1367 se identifica como "W" para indicar que el nucleótido puede ser adenina (A) o timina (T) o uracilo (U). En una realización de la invención, el Apo-2 de secuencia nativa es un Apo-2 de secuencia nativa maduro o
45 de longitud completa que comprende los aminoácidos 1 a 411 de la figura 5 (SEC ID No. 2). Opcionalmente, el Apo-2 se obtiene o es obtenible mediante la expresión del polipéptido codificado por el inserto de ADNc del vector depositado como ATCC 209021.

50 Un "dominio extracelular" o "ECD" (por ejemplo, "dominio extracelular de Apo-2" o "ECD de Apo-2") se refiere a una forma de un polipéptido receptor que está esencialmente libre de los dominios transmembrana y citoplasmático del receptor. Normalmente, el ECD tendrá menos de un 1% de dichos dominios transmembrana y/o citoplasmático y, preferiblemente, tendrá menos de un 0,5% de dichos dominios. Opcionalmente, el ECD de Apo-2 comprenderá los residuos de aminoácidos 54 a 182 de la figura 5 (SEC ID No. 2) o los residuos de aminoácidos 1 a 182 de la figura 5 (SEC ID No. 2). Opcionalmente, el ECD de Apo-2 comprenderá uno o más
55 dominios ricos en cisteína y, preferiblemente, uno o ambos dominios ricos en cisteína identificados para la secuencia mostrada en Sheridan et al., Science 277:818-821 (1997). Un experto en la materia entenderá que el dominio transmembrana identificado para el polipéptido Apo-2 de la presente invención se identifica según el criterio de rutina utilizado en la técnica para identificar este tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar, pero lo más probable es que no sea en más de aproximadamente 5
60 aminoácidos en cualquier extremo del dominio mencionados específicamente anteriormente.

65 Una "variante" del polipéptido (por ejemplo, "variante de Apo-2") significa un polipéptido biológicamente activo que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa, por ejemplo, con Apo-2 que tiene la secuencia de aminoácidos deducida en la figura 5 (SEC ID No. 2) para un Apo-2 humano de secuencia nativa de longitud completa o las secuencias identificadas en la presente invención para ECD o dominio de muerte de Apo-2. Dichas variantes incluyen, por

ejemplo, polipéptidos en los que se añaden o se eliminan uno o más residuos de aminoácidos en el extremo N o C terminal del polipéptido [por ejemplo, en el caso de Apo-2 en la secuencia de la figura 5 (SEC ID No. 2) o las secuencias identificadas en la presente invención para el ECD o dominio de muerte de Apo-2].

5 Ejemplos de "variantes de anticuerpos" incluyen variantes humanizadas de anticuerpos no humanos, anticuerpos "madurados por afinidad" (véase, por ejemplo Hawkins et al. J. Mol. Biol. 254: 889-896 [1992] y Lowman et al. Biochemistry 30 (45): 10832-10837 [1991]) y mutantes de anticuerpos con la función o funciones efectoras alteradas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.648.260 concedida el 15 de julio de 1997, incorporadas expresamente por referencia en la presente invención).

10 Normalmente, una variante tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos, e incluso más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia nativa [por ejemplo, para Apo-2, con la secuencia de aminoácidos de la figura 5 (SEC ID No. 2) o las secuencias identificadas en la presente invención para el ECD o dominio de muerte de Apo-2].

15 El "porcentaje (%)" de identidad en la secuencia de aminoácidos" se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia nativa, después de alinear las secuencias e introducir los espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad en la secuencia. El alineamiento, para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos, puede conseguirse de varias formas que se hallan dentro de los conocimientos de la técnica, por ejemplo, utilizando un software informático disponible públicamente, tal como el software ALIGN™ o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan.

20 El término "epítipo etiquetado" cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un polipéptido, o una secuencia del dominio del mismo, fusionado a una "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene suficientes residuos para proporcionar un epítipo contra el que se puede producir un anticuerpo, aunque es suficientemente corto, de manera que no interfiere con la actividad del polipéptido. El polipéptido etiqueta preferiblemente es también bastante único, de manera que el anticuerpo no reacciona sustancialmente de forma cruzada con otros epítopos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente por lo menos seis residuos de aminoácidos y normalmente entre aproximadamente 8 y aproximadamente 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 residuos).

25 "Biológicamente activo" y "actividad biológica deseada" con respecto a un receptor de Apo-2L para los objetivos de la presente invención significa (1) que tiene la capacidad de modular la apoptosis (de una forma agonística o estimulante o de una forma antagonística o de bloqueo) en por lo menos un tipo de célula de mamífero in vivo o ex vivo; (2) que tiene la capacidad de unirse al ligando Apo-2; o (3) que tiene la capacidad de modular la señalización del ligando Apo-2 y la actividad del ligando Apo-2.

30 Los términos "apoptosis" y "actividad apoptótica" se utilizan en un sentido amplio y se refieren a la forma ordenada o controlada de muerte celular en mamíferos que va acompañada normalmente por una o más cambios celulares característicos, incluyendo la condensación del citoplasma, pérdida de las microvellosidades de la membrana plasmática, segmentación del núcleo, degradación del ADN cromosómico o pérdida de la función mitocondrial. Esta actividad se puede determinar y medir, por ejemplo, mediante ensayos de viabilidad celular, análisis FACS o electroforesis de ADN, todas ellas conocidas en la técnica.

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

40 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que está normalmente caracterizada por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos más concretos de dichos cánceres incluyen cáncer de célula escamosa, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, blastoma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer pancreático, glioblastoma, neuroblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

45 El término "mamífero", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, vacas, caballos, perros y gatos.

Los términos "antígeno" e "inmunógeno" se utilizan indistintamente en la presente invención para referirse a una molécula o sustancia que induce una respuesta inmune (preferiblemente una respuesta del anticuerpo) en un animal inmunizado con el mismo (es decir, el antígeno es "inmunogénico" en el animal). El antígeno puede ser una proteína, péptido, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto natural o sintético. Preferiblemente, el antígeno es una "proteína" que tiene un peso molecular superior a aproximadamente 4 kD. La proteína puede ser, por ejemplo, una proteína celular, bacteriana o viral.

Por "antígenos diferentes" se entiende antígenos que son estructuralmente distintos; por ejemplo, en el caso de péptidos o proteínas, que tienen secuencias de aminoácidos diferentes.

La expresión "antígenos estructuralmente o funcionalmente relacionados" se refiere a antígenos con estructuras similares y/o funciones similares. Por ejemplo, los antígenos pueden comprender receptores (o fragmentos de los mismos), opcionalmente fusionados a secuencias de aminoácidos heterólogas, que están unidas por y/o activadas por el mismo ligando, por ejemplo, receptores Apo-2L tal como se describen en la presente invención. Otros ejemplos de receptores estructuralmente y funcionalmente relacionados incluyen miembros de la familia de receptores ErbB2, tal como el receptor EGF, el receptor HER2, HER3 y HER4; y miembros de la familia de receptores Rse, Axl y Mer. Entre los ejemplos de ligandos estructuralmente o funcionalmente relacionados se incluyen las neuregulinas, factores de crecimiento del tipo insulina (IGFs), etc.

La proteína antígeno de interés puede ser un "receptor" [es decir, una molécula proteica que existe en la naturaleza en la superficie celular o en el citoplasma de una célula y que es capaz de unirse a uno o más ligandos]. Otro antígeno de ejemplo es una proteína "ligando" (es decir, una molécula capaz de unirse y, opcionalmente, activar uno o más receptores; por ejemplo, un factor de crecimiento). El antígeno de la presente invención puede comprender, por ejemplo, un fragmento de un receptor o ligando, opcionalmente fusionado a una o más secuencias de aminoácidos heterólogas (por ejemplo, el antígeno puede ser una inmunoadhesina).

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "inmunoadhesina" designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan el "dominio de unión" de una proteína "adhesina" heteróloga (por ejemplo, un receptor, ligando o enzima) con un dominio constante de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de la secuencia de aminoácidos de adhesina con la especificidad de unión deseada que es diferente del sitio de reconocimiento y unión a antígeno (sitio de combinación a antígeno) de un anticuerpo (es decir, es "heterólogo") y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.565.335 y la Patente de Estados Unidos No. 5.116.964, incorporadas expresamente en la presente por referencia.

El término "dominio de unión a ligando" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a cualquier receptor nativo de la superficie celular o cualquier región o derivada de la misma que mantiene por lo menos la capacidad cualitativa de unión a ligando del correspondiente receptor nativo. En una realización específica, el receptor es de un polipéptido de la superficie celular que tiene un dominio extracelular que es homólogo a un miembro de la familia de supergenes de inmunoglobulinas. Otros receptores, que no son miembros de la familia de supergenes de inmunoglobulinas, pero que sin embargo están cubiertos específicamente por esta definición, son receptores para citoquinas y, en particular, receptores con actividad tirosina quinasa (receptores tirosina quinasa), miembros de las superfamilias de receptores de hematopoyetina y del factor de crecimiento nervioso, y moléculas de adhesión celular, por ejemplo, por ejemplo, las selectinas E, L y P.

El término "dominio de unión a receptor" se utiliza para designar cualquier ligando nativo para un receptor, incluyendo moléculas de adhesión celular, o cualquier región o derivado de dicho ligando nativo que mantiene por lo menos la capacidad cualitativa de unión al receptor de un correspondiente ligando nativo. Esta definición incluye específicamente, entre otras, secuencias de unión de ligandos para los receptores mencionados anteriormente.

Una "quimera anticuerpo-inmunoadhesina" comprende una molécula que combina por lo menos un dominio de unión de un anticuerpo (tal como se define aquí) con por lo menos una inmunoadhesina (tal como se define en esta solicitud). Las quimeras anticuerpo-inmunoadhesina de ejemplo son las quimeras biespecíficas CD4-IgG descritas en Berg et al., PNAS (USA) 88:4723-4727 (1991) y Chamow et al., J. Immunol. 153:4268 (1994).

Un polipéptido "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que interferirían con las utilidades de diagnóstico o terapéuticas para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) hasta más de un 95% en peso del polipéptido según se determina por el procedimiento de Lowry, y más preferiblemente más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata.

Un antígeno "purificado" es aquel que se ha sometido a uno o más procesos de purificación. El antígeno purificado puede ser "homogéneo", que se utiliza aquí para referirse a una composición que comprende por lo menos aproximadamente de un 70% a aproximadamente un 100% en peso del antígeno de interés, en base al peso total de la composición, preferiblemente por lo menos aproximadamente de un 80% a aproximadamente un 100% en peso del antígeno de interés.

El término "inmunización" se refiere a la etapa o etapas de administración de uno o más antígenos a un animal, de manera que se pueden desarrollar anticuerpos en el animal. En general, la inmunización comprende inyectar el antígeno o antígenos en el animal. La inmunización puede implicar una o más administraciones del antígeno o antígenos.

El animal a inmunizar aquí es preferiblemente un roedor. Otros animales que se pueden inmunizar aquí incluyen primates no humanos, tales como monos del viejo Mundo (por ejemplo, babuino o macaco, incluyendo el mono rhesus y mono cynomolgus; véase la Patente de Estados Unidos 5.658.570); aves (por ejemplo, pollos); conejos; cabras; ovejas; vacas; caballos; cerdos; burros; perros, etc. Un "roedor" es un animal que pertenece al orden rodentia de los mamíferos placentales. Entre los roedores de ejemplo se incluyen ratones, ratas, cobayas, ardillas, hámsters, hurones, etc, siendo los ratones el roedor preferido para la inmunizado según el procedimiento de la presente invención.

"Anticuerpos policlonales" o "antisuero policlonal" se refieren a suero inmune que contiene una mezcla de anticuerpos específicos para uno (antisuero monovalente o específico) o más (antisuero polivalente) antígenos que se pueden preparar a partir de sangre de animales inmunizados con el antígeno o antígenos.

El término "células inmunes" se refiere a células que son capaces de producir anticuerpos. Las células inmunes de interés particular aquí son células linfoides derivadas, por ejemplo, del bazo, linfocitos de sangre periférica (PBLs), nódulo linfático, nódulo inguinal, parche de Peyers, amígdalas, médula ósea, sangre del cordón umbilical, efusiones pleurales y linfocitos que se infiltran al tumor (TIL).

Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir específicamente o no específicamente una molécula de interés (por ejemplo, una placa de ensayo).

Un "adyuvante" es un estimulante no específico de la respuesta inmune. El adyuvante puede estar en forma de una composición que comprende alguno o ambos de los siguientes componentes: (a) una sustancia diseñada para formar un depósito que protege el antígeno o antígenos del catabolismo rápido (por ejemplo, aceite mineral, alumbre, hidróxido de aluminio, liposoma o tensoactivo (por ejemplo, poliál plurónico)) y (b) una sustancia que estimula no específicamente la respuesta inmune del animal huésped inmunizado (por ejemplo, incrementando los niveles de linfoquina en el mismo). Entre las moléculas de ejemplo para aumentar los niveles de linfoquina se incluyen lipopolisacárido (LPS) o una parte con Lípido A del mismo; Bordetella pertussis; toxina de pertussis; Mycobacterium tuberculosis; y muramil dipéptido (MDP). Entre los ejemplos de adyuvantes se incluyen el adyuvante de Freund (que comprende opcionalmente M. tuberculosis muerto; adyuvante de Freund completo); adyuvante de hidróxido de aluminio, y monofosforil Lípido A-dicorinomicolato de tehalosa sintético (MPL-TDM).

Por "cribado" se entiende someter uno o más anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpo purificado y/o sobrenadante del cultivo de hibridoma que comprende el anticuerpo) a uno o más ensayos que determinan cualitativa y/o cuantitativamente la capacidad de un anticuerpo para unirse a un antígeno de interés.

Por "ensayo inmune" se entiende un ensayo que determina la unión de un anticuerpo a un antígeno, en el que el anticuerpo o el antígeno, o ambos, son opcionalmente adsorbidos en una fase sólida (es decir, un ensayo "inmunoadsorente") en alguna fase del ensayo. Ejemplos de dichos ensayos incluyen ELISAs, radioinmunoensayos (RIAs), y ensayos FACS.

Un anticuerpo que "reacciona de forma cruzada" con dos o más antígenos diferentes es capaz de unirse a cada uno de los diferentes antígenos, por ejemplo, tal como se determina mediante ELISA o FACS en los ejemplos siguientes.

Un anticuerpo que "específicamente reacciona de forma cruzada" con dos o más antígenos diferentes es aquel que se une a un primer antígeno y se une además a un segundo antígeno diferente, en el que la capacidad de unión (por ejemplo, DO 450/620; Figs. 6A-C) del anticuerpo al segundo antígeno en una concentración del anticuerpo de aproximadamente 10 µg/ml es aproximadamente del 50% a aproximadamente el 100% (preferiblemente desde aproximadamente el 75% a aproximadamente el 100%) de la capacidad de unión del primer antígeno determinada en un ELISA de captura como en los siguientes ejemplos. Por ejemplo, el anticuerpo se puede unir específicamente a Apo-2 (el "primer antígeno") y reacciona específicamente de forma cruzada con otro receptor Apo-2L, tal como DR4 (el "segundo antígeno"), donde el grado de unión de aproximadamente 10 µg/mL del anticuerpo a DR4 es aproximadamente del 50% a aproximadamente 100% de la capacidad de unión del anticuerpo a Apo-2 en el ELISA de captura de la presente invención. La palabra "marcador", cuando se utiliza en la presente invención, se refiere a un compuesto o composición detectable que

se puede conjugar directamente o indirectamente a una molécula de interés y puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

5 Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en el medio natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una molécula de ácido nucleico aislada está en una forma o composición diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal y como existe en células naturales. Sin embargo, una
10 molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el polipéptido, cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

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

20 Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia
25 codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante la unión en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan según la práctica convencional.

30 Tal y como se utiliza en la presente invención, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan indistintamente y todas las denominaciones incluyen progenie. De este modo, las palabras "transformantes" y "células transformantes" incluyen las células primarias del sujeto y los cultivos derivados de las mismas sin considerar el número de transferencias. También debe entenderse que toda la progenie puede no ser
35 precisamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica tal y como se criba en la célula originalmente transformada. Cuando se pretenden designaciones diferentes, serán obvias a partir del contexto.

40 El término "agente citotóxico" tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, I^{131} , I^{125} , Y^{90} y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como las toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, micótico, vegetal o animal, o variantes y/o fragmentos de las mismas.

45 Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfan, cisoxina, taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), y doxetaxel (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Rnace), toxotere, metotrexato, cisplatino, melfalan, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina,
50 vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas [véase la Patente de Estados Unidos No. 4.675.187], melfalan y otras mostazas de nitrógeno relacionadas. También se incluyen en esta definición agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores, tales como tamoxifeno y onapristona.

55 El término "profármaco", tal como se utiliza en esta solicitud, se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco parental y es capaz de ser activado enzimáticamente o convertirse en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Willman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", Biochemical Society Transactions, 14:375-382, 615th Meeting, Belfast (1986), y Stella et al., "Prodrugs: A Chemical approach to targeted drug delivery",
60 Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.) pág. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiosfosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados por D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen β -lactamas, profármacos que contienen fenoxiacetamidas opcionalmente sustituidas o profármacos que contienen fenilacetamidas
65 opcionalmente sustituidas, profármacos de 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en un fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivarse en

un profármaco para su utilización en la presente invención incluyen, pero sin limitación, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

5 Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco (tal como las composiciones de glicoproteínas descritas en la presente invención y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de las membranas biológicas.

10 MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

A. Protocolo de inmunización de antígenos mixtos

15 En la presente invención se describe un procedimiento para fabricar anticuerpos monoclonales en el que se inmuniza un animal con dos o más antígenos diferentes para generar anticuerpos policlonales y, preferiblemente, anticuerpos monoclonales, contra los dos o más antígenos con los que se inmunizó el animal. Este procedimiento se describirá con más detalle en las siguientes secciones.

(i) Selección y preparación de antígenos

20 El procedimiento de la presente invención implica la preparación de anticuerpos dirigidos contra uno o más antígenos diferentes. Preferiblemente, por lo menos uno de los antígenos es (y preferiblemente todos los antígenos son) una molécula biológicamente importante y la administración del anticuerpo contra el mismo a un mamífero que padece de una enfermedad o trastorno puede dar lugar a un beneficio terapéutico en ese mamífero. Preferiblemente, el antígeno es una proteína. Sin embargo, se pueden utilizar otros antígenos no polipeptídicos (por ejemplo, glicolípidos asociados a tumor; véase, la Patente de Estados Unidos 5.091.178).

Entre los antígenos proteicos de ejemplo se incluyen moléculas, tales como renina; una hormona de crecimiento, incluyendo hormona de crecimiento humano y hormona de crecimiento bovino; factor de liberación de la hormona del crecimiento; hormona paratiroide; hormona estimuladora de la tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimuladora de folículos; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como el factor VIIIc, factor IX, factor tisular (TF) y factor von Willebrands; factores anticoagulantes, tales como Proteína C; factor natriurético atrial; tensoactivo de pulmón; un activador del plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tejido (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopoético; factor alfa y beta de necrosis tumoral; encefalinasa; RANTES (regulada por activación de células T normalmente expresadas y secretadas); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una albúmina de suero, tal como albúmina de suero humano; sustancia inhibidora Muellieriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocito T citotóxico (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico, tal como factor neurotrófico derivado óseo (BDNF), neurotrofina-3, neurotrofina-4, neurotrofina-5 o neurotrofina-6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento de nervioso, tal como NGF-β, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4, o TGF-β5; un factor de necrosis tumoral (TNF), tal como TNF-α o TNF-β; factor I y II de crecimiento de tipo insulina (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I de cerebro), proteínas de unión al factor de crecimiento de tipo insulina; proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón-alfa, interferón-beta e interferón-gamma; factores estimuladores de colonias (CSFs), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleuquinas (ILs), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de membrana de superficie; factor acelerante de la descomposición, antígeno viral, tal como, por ejemplo, una parte de la envoltura de SIDA; proteínas de transporte; receptores "homing"; adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor, tal como receptor HER2, HER3 ó HER4; y variantes y/o fragmentos de cualquiera de los polipéptidos indicados anteriormente.

Las dianas moleculares preferidas para anticuerpos incluyen proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y CD34; miembros de la familia de receptores ErbB, tales como el receptor EGF, receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular, tales como LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, y la integrina αvβ3 incluyendo las subunidades α o β de las mismas (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento, tales como VEGF, IgE; factor tisular (TF); un factor de necrosis tumoral (TNF), tal como TNF-α o TNF-β, interferón alfa (α-IFN); una interleuquina, tal como IL-8; IgE; antígenos de grupos sanguíneos; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor mpl; CTLA-4; proteína C; un receptor de Apo-2L, tal como Apo-2, DR4, DcR1 y dcR2; y variantes y/o fragmentos de las moléculas identificadas anteriormente, etc.

Cada antígeno a utilizar en el procedimiento se purifica preferiblemente para formar una preparación esencialmente homogénea del antígeno utilizando técnicas de purificación disponibles en el sector. Entre los ejemplos de procedimientos de purificación que se pueden utilizar se incluyen fraccionamiento en una cromatografía por interacción hidrofóbica (por ejemplo, en fenil sefarosa), precipitación con etanol, enfoque isoelectrico, HPLC de Fase Inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en HEPARIN SEPHAROSE™, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, "cromatoenfoque", SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía de afinidad (por ejemplo, utilizando proteína A, proteína G, un anticuerpo, un sustrato específico, ligando o antígeno como reactivo de captura) o combinaciones de dos o más de estos procedimientos.

En el caso de una proteína antígeno, se puede prepara una inmunoadhesina mediante la fusión de las proteínas (o un fragmento de las mismas) a una región Fc de inmunoglobulina y la purificación de la inmunoadhesina resultante mediante cromatografía de proteína a o proteína G.

Los antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados a una o más de otras moléculas, se pueden utilizar como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembrana, tales como receptores, se pueden utilizar como inmunógeno fragmentos de éstos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor). Opcionalmente, la proteína de interés o un fragmento de la misma se fusiona a una molécula heteróloga, por ejemplo, para formar una inmunoadhesina como en los siguientes ejemplos.

Para antígenos de peso molecular bajo (tales como haptenos y péptidos sintéticos) y otros antígenos puede ser deseable acoplar el antígeno con una "molécula portadora", tal como albúmina de suero [por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA)], ovoalbúmina, hemocianina de la lapa californiana (KLH), tiroglobulina bovina, inhibidor de tripsina de soja o el derivado proteico de tuberculina purificado (PPD). Dichas moléculas portadoras pueden ser inmunogénicas en el animal a inmunizar (es decir, pueden proporcionar sitios de unión a receptores de células T de la clase II). El acoplamiento se puede conseguir utilizando un agente de acoplamiento bifuncional, tal como el éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de los residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de los residuos de lisina), carbodiimida, glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCI2 o R1N=N=NR, donde R y R1 son grupos alquilo diferentes. Alternativamente, o adicionalmente, el antígeno y la molécula portadora se pueden generar como una proteína de fusión. En general, aproximadamente 1 mol de hapteno por 50 aminoácidos de molécula portadora es una proporción de acoplamiento razonable.

El antígeno se puede hacer más antigénico mediante el acoplamiento a matrices grandes, tales como esferas de agarosa; acoplamiento químico a células (por ejemplo, glóbulos rojos); conversión del antígeno en compuestos más grandes mediante auto-polimerización (por ejemplo, utilizando reticuladores químicos, tales como dinitrofenol o arsinilo, o mediante desnaturalización parcial); preparación de un complejo inmune; unión del antígeno a nitrocelulosa; y/o la unión del antígeno a una proteína "portadora" (ver anteriormente).

El antígeno puede estar presente en o sobre una célula, bacteria o virus y el animal huésped está inmunizado con la célula, bacteria o virus. Dicho antígeno puede ser nativo a la célula, bacteria o virus o puede haber sido introducido sintéticamente (por ejemplo, mediante técnicas recombinantes, acoplamiento químico, etc.). Preferiblemente, sin embargo, cada uno de los antígenos con los que se inmuniza el animal han sido purificados mediante por lo menos una etapa de purificación.

(ii) Inmunización

Se selecciona el animal o huésped a inmunizar con los antígenos. Preferiblemente, el animal es un roedor, por ejemplo, un ratón.

El ratón a inmunizar puede ser, por ejemplo, un ratón "libre de antígenos" tal como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.721.122, incorporada expresamente por referencia en la presente invención.

El huésped puede ser un animal transgénico en el que se han introducido loci de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, el animal transgénico puede ser un ratón que comprende genes de inmunoglobulina humanos y uno en el que los genes de inmunoglobulina endógenos han sido inactivados parcial o completamente. Tras la estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos en dichos huéspedes transgénicos, que se parece mucho la observada en humanos en todos los aspectos, incluyendo la redistribución de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Esta estrategia se describe, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995).

La cantidad de cada antígeno administrado al animal huésped puede variar, por ejemplo, desde aproximadamente 0,01 µg hasta aproximadamente 250 µg, preferiblemente desde aproximadamente 0,1 µg hasta aproximadamente 100 µg. El procedimiento implica la inmunización del animal huésped con dos o más

antígenos diferentes, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente diez antígenos diferentes. Preferiblemente, el animal huésped se inmuniza con una composición que comprende una mezcla de dichos dos o más antígenos diferentes y, opcionalmente, un diluyente fisiológicamente aceptable, tal como PBS u otro tampón. Alternativamente, el animal se puede inmunizar con los antígenos por separado. Los antígenos utilizados para preparar la composición han sido purificados preferiblemente mediante una etapa de purificación.

El animal huésped se puede inmunizar con los antígenos de diferentes maneras. Por ejemplo, mediante inyecciones subcutáneas, intramusculares, intradérmicas, intravenosas y/o intraperitoneales. Además, son posibles las inyecciones en órganos linfoides, nódulos linfáticos popliteales y/o las bases de las patas. Puede ser deseable inmunizar el animal utilizando una combinación de dos o más rutas de administración diferentes, de manera separada y/o simultánea.

Cuando la respuesta primaria es débil, puede ser deseable reforzar el animal en intervalos separados hasta que el título de los anticuerpos se incrementa o se mantiene. Después de la inmunización, se pueden tomar muestras de suero (sangrados de muestra) para comprobar la producción de anticuerpos específicos. Preferiblemente, se proporciona al animal huésped un refuerzo final aproximadamente 3-5 días antes del aislamiento de las células inmunes del animal huésped.

(iii) Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se pueden fabricar utilizando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975). En el procedimiento del hibridoma, las "células inmunes" que producen o son capaces de producir anticuerpos policlonales se obtienen del animal inmunizado tal como se ha descrito anteriormente. Anteriormente se describen varias células inmunes, siendo los nódulos linfáticos o bazo la fuente preferida de células inmunes para generar anticuerpos monoclonales. A continuación, dichas células se pueden fusionar con células de mieloma utilizando un "agente de fusión" adecuado, tal como polietilenglicol o virus Sendai, para formar una célula de hibridoma [Goding, Monoclonal Antibodies : Principles and Practice, pág.59-103 (Academic Press, 1986)].

Las células de hibridoma preparadas de esta manera se cultivan y desarrollan en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las líneas de mieloma preferidas son aquéllas que se fusionan de manera eficaz, inducen una producción estable de anticuerpos a nivel elevado por las células seleccionadas productoras de anticuerpos, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre éstas, las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y las células P3X63AgU.1, SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Manassas, VA, Estados Unidos. La línea celular de mieloma de rata 210-RCY3.Ag1.2.3 también está disponible. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano se han descrito también para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, páginas, 51-63 Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987)).

Alternativamente, las líneas de células hibridoma se pueden preparar a partir de las células inmunes del animal inmunizado de otras maneras, por ejemplo, inmortalizando las células inmunes con un virus (por ejemplo, con el virus de Epstein Barr), o con un oncogén Copn el fin de producir una línea celular inmortalizada que produce el anticuerpo monoclonal de interés. Véase, también, Babcook et al. PNAS (USA), 93:7843-7848 (1996), que se refiere a la producción de anticuerpos monoclonales mediante la clonación de ADNc de inmunoglobulina de células individuales que producen anticuerpos específicos para otra estrategia de preparación de anticuerpos monoclonales utilizando células inmunes del animal inmunizado.

(iv) Cribado ("Screening")

El cribado se realiza para identificar uno o más anticuerpos monoclonales capaces de unirse a cada antígeno. En general, se criban anticuerpos que se unen a cada antígeno con el que se ha inmunizado el animal. Dicho cribado se puede realizar en un sobrenadante de cultivo y/o anticuerpos purificados, a partir del sobrenadante de cada cultivo de hibridomas resultante de la fusión. Alternativamente, o adicionalmente, el cribado se puede llevar a cabo utilizando un sobrenadante de cultivo y/o anticuerpos purificados de células de hibridomas clonadas (ver a continuación). Además, cuando interesan anticuerpos que reaccionan de forma cruzada, se puede determinar la capacidad de los anticuerpos monoclonales para reaccionar de forma cruzada con dos o más antígenos diferentes. Además, puede ser deseable cribar los anticuerpos con ciertas características funcionales (por ejemplo, actividad agonística, actividad de bloqueo, etc.).

La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridomas se pueden determinar, por ejemplo, en un inmunoensayo, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación u otro ensayo de unión in vitro, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).

5 Existen tres clases generales de procedimientos de cribado que se pueden utilizar (a) ensayo de captura de anticuerpos; (b) ensayos de captura de antígenos y (c) ensayos funcionales.

10 En ensayos de captura de anticuerpos, el antígeno se puede unir a una fase sólida, los anticuerpos monoclonales a analizar se dejan unir al antígeno, se eliminan los anticuerpos no unidos mediante lavado, y a continuación se detectan los anticuerpos unidos, por ejemplo, mediante un reactivo secundario, tal como un anticuerpo marcado que reconoce específicamente el anticuerpo.

15 Para un ensayo de captura de antígenos, el antígeno se puede marcar directamente (en la presente invención se describen varios marcadores). En una realización, los anticuerpos monoclonales a analizar se pueden unir a una fase sólida y, a continuación, reaccionar con el antígeno opcionalmente marcado. Alternativamente, se puede dejar que se forme el complejo anticuerpo-antígeno mediante inmunoprecipitación antes de la unión del anticuerpo monoclonal a analizar a una fase sólida. Una vez que los complejos de anticuerpo-antígeno están unidos a la fase sólida, se puede eliminar el antígeno no unido mediante lavado y se pueden identificar los positivos mediante la detección del antígeno.

20 Existen diversos cribados funcionales para identificar anticuerpos monoclonales con actividades deseadas. Entre los ejemplos se incluyen el ensayo de actividad agonística y el ensayo de bloqueo de los siguientes ejemplos; ensayo de adhesión a monocapas de queratinocitos y el ensayo de respuesta mixta de linfocitos (MLR) [Werther et al. J. Immunol. 157:4986-4995 (1996)]; ensayos de inhibición del crecimiento de células tumorales (tal como se describe en WO 89/06692, por ejemplo); ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad mediada por complemento (CDC) (Patente de Estados Unidos 5.500.362); y ensayos de hematopoyesis (véase WO 95/27062). La clase/subclase de los anticuerpos se puede determinar, por ejemplo, mediante ensayos de doble difusión; captura de anticuerpos en placas recubiertas de antígenos; y/o captura de anticuerpos en anticuerpos anti-IgG.

30 Para cribar los anticuerpos que se unen a un epítipo concreto en el antígeno de interés (por ejemplo, los que bloquean la unión de cualquier anticuerpos descrito aquí a un receptor de Apo-2L), se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Alternativamente, se puede realizar un mapeo de epítopos, por ejemplo tal como se describe en Champe et al., J. Biol. Chem. 270:1388-1394 (1995), para determinar si el anticuerpo se une a un epítipo de interés.

40 Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones de células individuales se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante [Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]; clonación de células individuales por recogida; o clonación mediante crecimiento en agar blando [Harlow and Lane; Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988); pps 224-227].

45 Los clones de hibridoma se pueden desarrollar mediante procedimientos estándar. Los medios de cultivo adecuados para este objetivo incluyen, por ejemplo, medio DMEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden desarrollar in vivo como tumores ascíticos en un animal. [Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Chapter 7].

50 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación convencionales de inmunoglobulinas, tales como, por ejemplo, proteína G-sefarosa o proteína A-sefarosa, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

55 *(v) Clonación y modificaciones posteriores del Mab*

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridomas sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen en otro caso proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos se describirá con más detalle a continuación.

65 El ADN también se puede modificar, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia codificante de los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera humanos en lugar de secuencias murinas homólogas

(Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)), o mediante unión covalente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es inmunoglobulina.

5 Habitualmente, dichos polipéptidos que no son inmunoglobulinas se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo divalente quimérico que comprende un sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

10 El anticuerpo monoclonal puede estar humanizado. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de los mismos [tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno] que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Un anticuerpo humanizado tiene uno o más
15 residuos de aminoácidos introducidos en el mismo de un origen que no es humano. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos importados, que habitualmente se extraen de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de CDRs de roedores o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a utilizar en la fabricación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el denominado procedimiento de "ajuste óptimo", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a la biblioteca
30 completa de secuencias de dominios variables humanas. La secuencia humana que es la más próxima a la del roedor es entonces aceptada como el armazón (FR) humano para el anticuerpo humanizado [Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)]. Otro procedimiento utiliza una estructura particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma estructura se puede utilizar para diversos anticuerpos humanizados diferentes [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151: 2623 (1993)].

Es también importante que los anticuerpos se humanicen manteniendo una afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios
40 productos conceptuales humanizados utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles normalmente y son familiares para los expertos en la materia. Existen programas informáticos que muestran y visualizan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La observación de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir del receptor y se pueden importar secuencias, de manera que se consigue la característica del anticuerpo deseado, tal como una mayor afinidad por el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno.

Los anticuerpos también se pueden preparar como anticuerpos monovalentes. Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinantes de cadena ligera y cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca en general en cualquier punto en la región Fc para evitar la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína pertinentes se sustituyen por otro residuo de aminoácido o se eliminan para evitar la reticulación.

Los procedimientos in vitro también son adecuados para la preparación de anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab, se puede llevar a cabo utilizando técnicas de rutina conocidas en el sector. Por ejemplo, la digestión se puede realizar utilizando papaína. Ejemplos de digestión con papaína se describen en WO 94/29348 publicado el 22 de diciembre de 1994 y Patente de Estados Unidos No. 4.342.566. La digestión con papaína de anticuerpos produce habitualmente dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos Fab, cada uno con un sitio de unión antígeno único y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y es capaz de reticular con el antígeno.

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

Puede ser deseable generar un anticuerpo multiespecífico que comprende el anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos multiespecíficos presentan especificidades de unión por lo menos dos antígenos diferentes. Mientras que dichas moléculas normalmente sólo se unirán a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAbs), los anticuerpos con especificidades adicionales, tales como los anticuerpos triespecíficos, están comprendidos por esta expresión cuando se utilizan en la presente invención. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos [por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂].

Los procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción habitual de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein et al., Nature, 305: 537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda, y los rendimientos del producto son bajos. En WO 93/08829, y en Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991) se describen procedimientos similares.

Según una estrategia diferente, los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a las secuencias de los dominios constantes de la inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere que la primera región constante de la cadena pesada (CH1) contenga el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones donde las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos utilizadas en la construcción proporcionan rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptidos en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no son de una importancia particular.

Preferiblemente, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se observa que esta estructura simétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera sencilla de separación. Esta estrategia se describe en WO 94/04690. Para más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

Según otra estrategia descrita en WO 96/27011, se puede diseñar la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte del dominio de CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño similar o idéntico a la cadena o cadenas laterales grandes se crean en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales grandes de aminoácidos por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede estar acoplado a avidina, y el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos No. 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/300373, y EP 03089).

Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar utilizando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

5 Se contemplan anticuerpos con dos o más valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

También se contemplan inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo descrito en la presente invención conjugado a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina
10 enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmento de las mismas), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Se han descrito anteriormente agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen cadena
15 A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de la toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y Prop-5), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Existen un grupo de radionucleidos disponibles para la producción de
20 anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se pueden fabricar utilizando una serie de agentes acopladores de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP),
25 iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta et al. Science, 238:1098 (1997). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético (MX-DTPA)
30 marcado en el carbono 14 es un agente quelante de ejemplo para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase WO94/11026.

El anticuerpo se puede conjugar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el premarcaje del tumor, donde el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación de conjugado
35 no unido de la circulación utilizando un agente depurador y, a continuación la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga al agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

También se pueden preparar los inmunoliposomas que comprenden el anticuerpo. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein
40 et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:4030 (1990); y las Patentes de Estados Unidos No. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con un mayor tiempo de circulación se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.013.556.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir
45 liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar a los liposomas tal como se describen en Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente en el liposoma está contenido un agente quimioterapéutico. Véase Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81(29):1484 (1989).

El anticuerpo también se puede utilizar en ADEPT mediante la conjugación del anticuerpo a una enzima activadora del profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptídico,
55 véase WO81/01145) en un fármaco activo anticancerígeno. Véase, por ejemplo, WO 88/07378 y la Patente de Estados Unidos No. 4.975.278.

El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco, de manera que lo convierte en su forma citotóxica más activa.

60 Entre las enzimas que son útiles en el procedimiento se incluyen, pero sin limitación, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticancerígeno, 5-fluoroacilo; proteasas, tales como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que
65 contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas que que dividen los carbohidratos, tales como β -

galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; β -lactamasa útil para convertir profármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilin amidasa, tales como penicilin V amidasa o penicilin G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas" se puede utilizar para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey Nature 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima se pueden preparar tal y como se ha descrito en la presente invención para la liberación del abzima a una población de células tumorales.

Las enzimas de la presente invención se pueden unir covalentemente al anticuerpo mediante técnicas bien conocidas en el sector, tal como la utilización de los reactivos de reticulación heterobifuncionales descritos anteriormente. Alternativamente, se pueden construir proteínas de fusión que comprenden por lo menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo unida a por lo menos una parte funcionalmente activa de una enzima utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Neuberger et al., Nature 312: 604-608 (1984)).

Puede ser deseable utilizar un fragmento de anticuerpo, en lugar de un anticuerpo intacto, para, por ejemplo, incrementar la penetración en el tumor. En este caso, puede ser deseable modificar los fragmentos de anticuerpos con el fin de incrementar su vida media en suero. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión a receptor salvaje en el fragmento del anticuerpo (por ejemplo, mediante la mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o mediante la incorporación del epítipo en un péptido etiqueta que a continuación se fusiona al fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en el centro, por ejemplo, mediante síntesis de ADN o péptidos).

El epítipo de unión a receptor salvaje constituye preferiblemente una región en la que alguno o más residuos de aminoácidos de uno o dos bucles de un dominio Fc se transfieren a una posición análoga del fragmento del anticuerpo. Incluso más preferiblemente, se transfieren dos o más residuos de uno o dos bucles del dominio Fc. Aún más preferiblemente, el epítipo se obtiene del dominio CH2 de la región Fc (por ejemplo, de una IgG) y se transfiere a la región CH1, CH3 o VH, o a más de una de dichas regiones, de la anticuerpo. Alternativamente, el epítipo se obtiene del dominio CH2 de la región Fc y se transfiere a la región CL o la región VL, o ambas, del fragmento de anticuerpo. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.747.035.

Se contemplan las modificaciones covalentes del anticuerpo. Se pueden realizar mediante síntesis química o mediante división enzimática o química del anticuerpo, si es aplicable. Se introducen otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo en la molécula mediante la reacción de residuos de aminoácidos marcados del anticuerpo con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales o residuos N o c-terminales seleccionados.

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

Los anticuerpos también se pueden fusionar o unir a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heteróloga, tal como un epítipo etiqueta.

B. Anticuerpos Anti-receptores de Apo-L

La presente invención proporciona anticuerpos que son capaces de reaccionar de forma cruzada con dos o más receptores de Apo-2L diferentes. Estos anticuerpos que reaccionan de forma cruzada se pueden preparar según el procedimiento de inmunización de antígenos mixtos descrito anteriormente (o mediante inmunización de un animal con un único antígeno, por ejemplo, Apo-2 u otro receptor de Apo-2L), o se pueden producir mediante otras técnicas tales como las elaboradas a continuación.

Tal como se describe en los siguientes ejemplos, se han preparado anticuerpos monoclonales anti-Apo-2. Tres de estos anticuerpos (3H1.18.10, 3H3.14.5 y 3D5.1.10) se han depositado con la ATCC. En una realización, los anticuerpos monoclonales de la invención tendrán las mismas características biológicas que uno o más de los anticuerpos monoclonales secretados por las tres líneas celulares de hibridomas depositadas con la ATCC que producen los anticuerpos 3H1.18.10, 3H3.14.5 o 3D5.1.10. El término "características biológicas" se utiliza para referirse a las actividades o propiedades in vitro y/o in vivo del anticuerpo monoclonal, tal como la capacidad de unirse específicamente a Apo-2 y/u otro receptor de Apo-2L, o de bloquear, inducir o potenciar sustancialmente

la activación del receptor de Apo-2L. Opcionalmente, el anticuerpo monoclonal se unirá al mismo epítipo que uno o más de los anticuerpos 3H1.18.10, 3H3.14.5 o 3D5.1.10 descritos en la presente invención. El anticuerpo monoclonal tiene preferiblemente los residuos de la región hipervariable de uno o más de los anticuerpos mencionados anteriormente, por ejemplo, puede comprender una variante humanizada.

A parte de los procedimientos descritos anteriormente para obtener anticuerpos (mediante inmunización de un huésped con uno o más antígenos), existen otras técnicas para generar anticuerpos anti-receptor de Apo-2L. Por ejemplo, los anticuerpos humanos se pueden producir en bibliotecas de expresión de fagos [Hoogenboom and Winter. *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1992); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. Las técnicas de Cole et al. and Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 141(1):86-95 (1991)]. Se han revisado procedimientos para la preparación de bibliotecas de fagosy se describen en Winter et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 12:433-55 (1994); Soderlind et al., *Immunological Reviews*, 130:109-123 (1992); Hoogenboom, *Tibtech February 1997*, Vol. 15; Neri et al., *Cell Biophysics*, 27:47-61 (1995). Las bibliotecas de anticuerpos de cadena única también se pueden preparar mediante los procedimientos descritos en WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 y WO 95/15388. Las bibliotecas de anticuerpos también están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Cambridge Antibody Technologies (C.A.T.). Cambridge, UK.

C. Anticuerpos recombinantes

La presente invención también proporciona ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo tal como se describe en la presente invención (por ejemplo, obtenido mediante la inmunización de antígeno mixto y7o un anticuerpo anti-receptor Apo-2L), vectores y células huésped que comprenden el ácido nucleico, y técnicas recombinantes para la producción de dichos anticuerpos. Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para la posterior clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Existen muchos vectores disponibles. Los componentes del vector incluyen generalmente, 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 la transcripción. Algunos ejemplos de dichos componentes del sistema de expresión se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.739.277 concedida el 14 de abril de 1998.

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención son las células procariotas, levadura o eucariotas superiores (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5.739.277).

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las células huésped utilizadas para producir el anticuerpo de la presente invención se pueden cultivar en un conjunto de medio. También se pueden incluir cualquier suplemento necesario en las concentraciones apropiadas que sería conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son los utilizados previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y serán evidentes para el experto en la materia.

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o se secretan directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, se elimina el debris particulado, ya sean células huésped o fragmentos lisados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión en general se concentran en primer lugar utilizando un filtrador de la concentración de proteínas disponibles comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa, tal como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes extraños.

La composición de anticuerpos preparada a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La adecuidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier región Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss et al., *EMBO J.* 5: 1565-1575 (1986)). La matriz a la que se une el

ligando de afinidad es frecuentemente agarosa, pero hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten velocidades de flujo más elevadas y tiempos de procesamiento más cortos que los conseguidos con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABXTm (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónica o catiónica (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo a recuperar.

D. Usos terapéuticos para los anticuerpos

Los anticuerpos descritos en la presente invención tienen utilidad terapéutica. Los anticuerpos de receptores Apo-2L agonísticos se pueden utilizar, por ejemplo, para activar o simular la apoptosis en células cancerígenas. Por consiguiente, en la presente invención se describen procedimientos para tratar el cáncer utilizando anticuerpos, tales como los anticuerpos de receptor Apo-2L que reaccionan de forma cruzada. Se contempla naturalmente que los procedimientos se pueden utilizar en combinación con otras técnicas terapéuticas, tales como cirugía.

El anticuerpo se administra preferiblemente al mamífero en un portador. Los portadores adecuados y sus formulaciones se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., 1980, Mack Publishing Co., editado por Oslo et al. Normalmente, se utiliza una cantidad apropiada de un sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para hacer que la formulación sea isotónica. Entre los ejemplos de un portador farmacéuticamente aceptable se incluyen solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, y más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7.5. Además, los portadores incluyen preparaciones de liberación sostenida, tales como matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Será evidente para los expertos en la materia que ciertos portadores pueden ser preferibles dependiendo de, por ejemplo, la ruta de administración y la concentración de anticuerpo que se administra.

El anticuerpo se puede administrar al mamífero mediante inyección (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular), o mediante otros procedimientos, tales como una infusión que asegura su liberación al torrente sanguíneo de una forma eficaz. El anticuerpo también se puede administrar mediante rutas intratumorales, peritumorales, intralesionales o perilesionales, para ejercer efectos locales, así como efectos terapéuticos sistémicos. Se prefiere la inyección local o intravenosa.

Las dosis y pautas eficaces para la administración del anticuerpo se pueden determinar empíricamente y la realización de dichas determinaciones se encuentra en la técnica. Los expertos en la materia entenderán que la dosis de anticuerpo que debe administrarse variará dependiendo de, por ejemplo, el mamífero que recibirá el anticuerpo, la ruta de administración, el tipo particular de anticuerpo utilizado y otros fármacos que se administran al mamífero. En la literatura se encuentra una guía en la selección de las dosis apropiadas para el anticuerpo sobre usos terapéuticos de anticuerpos, por ejemplo, Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone et al., eds., Noyes Publications, Park Ridge, N.J., (1985) ch. 22 y pp. 303-357; Smith et al., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al., eds., Raven Press, New York (1977) pp. 365-389. Una dosis diaria típica de anticuerpo utilizada sola podría variar de aproximadamente 1 µg/kg hasta 100 mg/kg del peso corporal o más por día, dependiendo de los factores mencionados anteriormente.

El anticuerpo también se puede administrar al mamífero en combinación con cantidades eficaces de uno o más agentes terapéuticos o conjuntamente con un tratamiento de radiación. Los agentes terapéuticos contemplados incluyen agentes quimioterapéuticos, así como inmunoadyuvantes y citoquinas. El anticuerpo se puede administrar secuencialmente o simultáneamente con dicho uno o más agentes terapéuticos. Las cantidades de anticuerpo y agente terapéutico dependen, por ejemplo, del tipo de fármacos que se utilizan, el cáncer a tratar y la programación y rutas de administración, que generalmente serían inferiores que si cada uno se hubiera utilizado individualmente.

Tras la administración del anticuerpo al mamífero, se puede monitorizar el cáncer del mamífero y la condición fisiológica de varias maneras conocidas por el técnico en la materia. Por ejemplo, se puede observar la masa del tumor físicamente o mediante técnicas estándar de imagen por rayos x.

Los anticuerpos del receptor Apo-2L de la presente invención también pueden ser útiles para aumentar la muerte celular mediada por el sistema inmune en células que expresan un receptor o receptores de Apo-2L, por ejemplo, a través de la fijación de complemento o DAC. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos antagonísticos anti-receptor Apo-2L a través de la formación a complemento o DAC. Alternativamente, se pueden utilizar los anticuerpos antagonísticos anti-receptor Apo-2L para bloquear la apoptosis en exceso (por ejemplo, en una enfermedad neurodegenerativa) o para bloquear los efectos autoinmunes/inflamatorios potenciales de Apo-2

resultantes de la activación de NF-kB. Dichos anticuerpos antagonísticos se pueden utilizar según los procedimientos terapéuticos y técnicas descritas anteriormente.

E. Usos no terapéuticos para los anticuerpos

- 5 Los anticuerpos se pueden utilizar en ensayos de diagnóstico para su antígeno, por ejemplo, detectando su expresión en células, tejidos específicos o suero. Se pueden utilizar varias técnicas de ensayo de diagnóstico conocidas en la técnica, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directo o indirecto y ensayos de inmunoprecipitación realizados en fases heterogéneas u homogéneas [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC PRes, Inc. (1987) páginas 147-158]. Los anticuerpos utilizados en los ensayos de diagnóstico se pueden marcar con un grupo detectable. El grupo detectable debería ser capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el grupo detectable puede ser un radioisótopo, tal como ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S o ¹²⁵I, un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina, o una enzima, tal como alcalina fosfatasa, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. Se puede utilizar cualquier procedimiento conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo al grupo detectable, incluyendo aquellos procedimientos descritos por Hunter et al., Nature, 144: 945 (1962); David et al., Biochemistry, 13: 1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth., 40: 219 (1981); y Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30: 407 (1982).
- 20 Los anticuerpos también son útiles para la purificación por afinidad de antígeno de un cultivo de células recombinantes o de origen natural. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan sobre un soporte adecuado, tal como una resina Sephadex o papel de filtro, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. A continuación, el anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el antígeno a purificar, y posteriormente se lava el soporte con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra a excepción del antígeno, que está unido al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado que liberará el antígeno del anticuerpo.
- 25

F. Kits que contienen anticuerpos

- 30 También se describen aquí artículos de fabricación y kits que contienen anticuerpos que se pueden utilizar, por ejemplo, para las aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas descritas anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente con una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados por una variedad de materiales, tales como el vidrio o el plástico. El recipiente contiene una composición que incluye un agente activo que es eficaz para las aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas, tales como las descritas anteriormente. El agente activo en la composición es el anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo del receptor Apo-2L. La etiqueta del recipiente indica que la composición se utiliza para una aplicación terapéutica o no terapéutica específica, y también puede indicar instrucciones para el uso *in vivo* o *in vitro*, tales como los descritos anteriormente.
- 35
- 40 El kit comprenderá normalmente el recipiente descrito anteriormente y uno o más recipientes que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas, y prospectos con instrucciones de uso.

- 45 Los siguientes ejemplos se muestran con fines únicamente ilustrativos y no pretenden en ningún caso limitar el alcance de la presente invención

EJEMPLO 1

Preparación de inmunógenos

- 50 Los antígenos receptores en los ejemplos 2 y 3 siguientes eran todos receptores para el ligando Apo-2 [Pitti et al., J. Biol. Chem., 271:12687-12690 (1996); y WO97/25428]. Los receptores Apo-2L fueron: DR4 [Pan et al., Science, 276:111-113 (1997)]; Apo-2 [denominada "DR5" en Sheridan et al., Science 277:810-821 (1997)]; DcR1 [Sheridan et al., Science 277:818-821 (1997)]; y DcR2 [Marsters et al., Curr. Biol., 7:1003-1006 (1997)].
- 55 Las inmunoadhesinas receptoras (denominadas "DR4-IgG", "Apo-2-IgG" "DcR1-IgG" y "DcR2-IgG") se prepararon mediante la fusión de la secuencia del dominio extracelular de cada receptor a la región bisagra y Fc de la cadena pesada γ 1 de inmunoglobulina humana en pRK5 tal como se ha descrito previamente [Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 88:10535-10539 (1991)]. Las proteínas inmunoadhesinas se expresaron mediante transfección transitoria en células 293 humanas y se purificaron a partir de los sobrenadantes celulares mediante cromatografía de afinidad con proteína A, tal como se ha descrito por Ashkenazi et al., supra. La inmunoadhesina purificada se suspendió en solución salina tamponada con fosfato (PBS).
- 60

EJEMPLO 2Inmunización de antígenos mixtos

5 Los animales en este ejemplo se inmunizaron con las cuatro inmunoadhesinas receptoras del ejemplo precedente. El esquema de inmunización de antígenos mixtos utilizado se muestra en la figura 1.

10 Los ratones Balb/c (obtenidos de Charles River Laboratories) se inmunizaron en cada planta de la pata trasera 14 veces en intervalos de 3-4 días, con una mezcla de DR4-IgG, Apo-2-IgG, DcR1-IgG y DcR2-IgG (1 µg cada uno) suspendida en monofosforil lípido A más adyuvante dicorinomicolato de trehalosa (MPL-TDM; Ribi Immunochem. Research Inc., Hamilton, MT) en una proporción 1:1 de inmunoadhesina:adyuvante (DcR2-IgG sólo se incluyó en la mezcla utilizada par a las seis inmunizaciones finales).

15 Tres días después del refuerzo final, se extrajeron de los ratones nódulos de células de nódulos linfáticos popliteales y se preparó una suspensión de células individuales en medio DMEM (obtenido de Biowhitakker Corp.) suplementada con 1% de penicilin-estreptomicina. Las células de los nódulos linfáticos se fusionaron con células de mieloma murino P3X63AgU.1 (ATCC CRL 1597) utilizando polietilenglicol al 35% y se cultivaron en placas de cultivo de 96 pocillos.

20 Se seleccionaron los hibridomas en super DMEM [DMEM más 10% de suero de ternera fetal (FCS), 10% de NCTC-109 (BioWittaker, Wakersville, MD), 100 mM de piruvato, 100 U/ml de insulina, 100 mM de ácido oxaloacético, 2 mM de glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales (GIBCO), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina] que contenía 100 µM de hipoxantina, 0,4 µM de aminopterin, y 16 µM de timidina (1x HAT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

25 Diez días después de la fusión, se cribaron 180 µl de sobrenadante de cada cultivo de hibridoma por la presencia de anticuerpos para tres antígenos diferentes (es decir, DR4-IgG, Apo-2-IgG y CD4-IgG control) en un ELISA de captura. Las células de hibridomas se realimentaron con 200 µl de súper DMEM que contenía FCs al 10% y antibióticos. Dos días después, se recogieron 180 µl de sobrenadante de cultivo y se cribaron por la presencia de anticuerpos a otros dos antígenos diferentes (es decir, DcR1-IgG y DcR2-IgG) en un ELISA de captura. Después de un examen meticuloso de los resultados del ELISA, se clonaron dos veces hibridomas positivos potenciales que secretaban anticuerpos monoclonales contra cada antígeno utilizando un procedimiento de dilución limitante. Los sobrenadantes de cultivos de estos clones se volvieron a analizar por su capacidad para unirse a un antígeno concreto, pero no a otros, incluyendo CD4-IgG, en un ELISA de captura. También se determinaron los isotipos de los anticuerpos.

30 También se analizaron los clones seleccionados por (a) su capacidad de reconocer receptores de Apo-2L expresados en membranas celulares mediante citometría de flujo (FACS); (b) su capacidad de bloquear la interacción ligando-receptor, y (c) por su actividad agonística.

EJEMPLO 3Inmunización de antígenos únicos

45 El esquema de inmunización de antígenos únicos se muestra en la figura 2. El procedimiento general era casi el mismo que el protocolo de inmunización de antígenos mixtos en el Ejemplo 2 anterior, a excepción de que se utilizó solamente un único antígeno como inmunógeno y durante el cribado de sobrenadante de hibridomas (180 µl) se recogió sólo una vez para cribar la presencia de anticuerpos monoclonales positivos al antígeno concreto y Cd4-IgG de control.

50 Se inmunizaron ratones Balb/c (obtenidos de Charles River Laboratories) mediante la inyección de 0,5 µg/50 µl de proteína inmunoadhesina (diluida en adyuvante MPL-TDM adquirida de Ribi Immunochemical Research Inc., Hamilton, MT) 10 veces en cada planta de la pata trasera en intervalo de 3-4 días. Tres días después del refuerzo final, se extrajeron los nódulos linfáticos popliteales de los ratones y se preparó una suspensión de células individuales en medio DMEM (obtenido de Biowhitakker Corp.) suplementado con penicilina-estreptomina al 1%. A continuación, las células de los nódulos linfáticos se fusionaron con células de mieloma murinas P3X63AgU.1 (ATCC CRL 1597) utilizando polietilenglicol al 35% y se cultivaron en placas de cultivo de 96 pocillos. Los hibridomas resultantes de la fusión se seleccionaron en medio HAT como en el ejemplo 2. Diez días después de la fusión, se cribaron los sobrenadantes del cultivo de hibridomas (180 µl) en un ELISA para analizar la presencia de anticuerpos monoclonales que se unen a la proteína de inmunoadhesina.

EJEMPLO 4

ELISA de captura

5 Para el ELISA de captura, se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorb; Nunc, Kamstrup, Dinamarca) mediante la adición de 50 μ l de Fc de IgG de cabra anti-humana 2 μ g/ml (adquirido de Cappel Laboratories) en PBS a cada pocillo y se incubó a 4°C durante toda la noche. A continuación, se lavaron las
10 placas tres veces con tampón de lavado (PBS que contenía TWEEN 20™ al 0,05%). A continuación, se bloquearon los pocillos en las placas de microtitulación con 50 μ l de albúmina de suero bovino (BSA) al 2,0% en PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, las placas se lavaron de nuevo tres veces con tampón de lavado.

Después de la etapa de lavado, se añadieron a cada pocillo 50 μ l de proteína de inmuno adhesina 1 μ g/ml (tal como se ha descrito anteriormente) en tampón de ensayo (PBS más BSA al 0,5%). Las placas se incubaron
15 durante 1 hora a temperatura ambiente en un aparato agitados, seguido de un lavado tres veces con tampón de lavado.

Tras las etapas de lavado, se añadieron 100 μ l de los sobrenadantes de hibridoma o anticuerpo purificado (utilizando columnas de proteína G-sefarosa) (1 μ g/ml) a pocillos designados. Se añadieron 100 μ l de medio
20 acondicionado con célula de mieloma P3X63AgU.1 a otros pocillos designados como controles. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 horas en un aparato agitador y, a continuación, se lavaron tres veces con tampón de lavado.

A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 100 μ l de Fc de IgG de cabra anti-ratón conjugado a HRP (adquirido de Cappel Laboratories), diluido 1:1000 en tampón de ensayo (albúmina de suero bovino al 0,5%, TWEEN 20™ al 0,05%, Timersol al 0,01 % en PBS), y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura
25 ambiente en un aparato agitador. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado, seguido de la adición de 50 μ l de sustrato (sustrato de peroxidasa en micropocillo TMB, Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD) a cada pocillo y la incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de
30 50 μ l de una solución de detención de 1 componente con TMB (dietil glicol, Kirkegaard & Perry) a cada pocillo, y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placa de microfítulos automatizado.

EJEMPLO 5

35 Determinación de isotipos de anticuerpo

Los isotipos de los anticuerpos se determinaron mediante el recubrimiento de placas de microtitulación con Ig de cabra anti-ratón específica de isotipo (Fisher Biotech, Pittsburgh, PA) durante toda la noche a 4°C. A
40 continuación, las placas se lavaron con tampón de lavado. Los pocillos en las placas de microtitulación se bloquearon a continuación con 200 μ l de albúmina de suero bovino al 25 y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Las placas se lavaron de nuevo tres veces con tampón de lavado. A continuación, se añadieron 100 μ l de sobrenadante de cultivo de hibridoma o 5 μ l/ml de anticuerpo purificado a los pocillos designados. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y, a continuación se añadieron
45 a cada pocillo 50 μ l de IgG de cabra anti-ratón conjugada a HRP (tal como se ha descrito anteriormente). Las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. El nivel de HRP unida a la placa se detectó utilizando sustrato HRP tal como se ha descrito anteriormente.

EJEMPLO 6

50 Citometría de flujo

Se realizó un análisis FACS utilizando células 9D (una línea celular de linfoides B humana que expresa Po-2 y DR4; Genentech, Inc.) o células endoteliales microvasculares humanas (HUMEC) (Cell Systems, Inc.), que expresan DcR1 y DcR2. Se añadieron veinticinco microlitros de una suspensión celular (4 X 10⁶ células/ml) en
55 un tampón de clasificación celular (PBS que contiene FCs al 1% y NaN3 al 0,02%) a pocillos de microtitulación con una base en forma de U, se mezclaron con 100 μ l de sobrenadante de cultivo o anticuerpo monoclonal purificado (purificado en una columna de proteína G-sefarosa) (10 μ g/ml) en tampón de clasificación celular (CSB) y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Después del lavado, las células se incubaron con 100 μ l de IgG de cabra anti-ratón conjugado con FITC durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron dos veces en CSB
60 y se resuspendieron en 150 μ l de CSB y se analizaron mediante FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

EJEMPLO 7Ensayo de la capacidad del anticuerpo para bloquear la apoptosis inducida por Apo-2L

5 Se analizaron los sobrenadantes de hibridoma y anticuerpos purificados por su capacidad de bloquear la apoptosis de células 9D inducida por el ligando Apo-2. Se suspendieron células 9D humanas (5x 10⁵ células) en 50 µl de medio RPMI completo (RPMI más FCS al 10%, glutamina, aminoácidos no esenciales, penicilina y estreptomycin y piruvato sódico) en tubos Falcon 2052. Se añadieron a las células 10 µg de anticuerpo más 10 µg de anticuerpo Dr4 en 200 µl de medio y las células se incubaron en hielo durante 15 minutos. Se añadieron a las células 0,5 µg de Apo-2L (Apo-2L soluble etiquetado con His preparado tal como se describe en WO 97/25428; véase también Pitti et al., supra) en 250 µl de RPMI completo. Las células 9D se incubaron durante toda la noche a 37°C en presencia de CO₂ al 7%. Las células se recogieron y se lavaron una vez en PBS. La viabilidad de las células se determinó a continuación mediante la tinción de la unión de FITC-Annexina V a fosfatidilserina según las recomendaciones del fabricante (Clontech). Brevemente, las células lavadas en PBS se resuspendieron en 200 µl de tampón de unión. Se añadieron a las células diez µl de Annexina V-FITC (1 µg/ml) y 10 µl de yoduro de propidio. Después de la incubación durante 15 minutos en la oscuridad, se analizaron las células mediante FACScan.

EJEMPLO 8

20

Apoptosis por anticuerpos monoclonales después de la reticulación con Ig anti-ratón

Se añadieron células 9D humanas (2,5x10⁵ células) en 50 µl de medio RPMI completo (RPMI más FCS al 10%, glutamina, aminoácidos no esenciales, penicilina y estreptomycin y piruvato sódico) a tubos Falcon 2052. A continuación, se incubaron las células con 1 µg de anticuerpo monoclonal en 100 µl de medio RPMI completo sobre hielo durante 15 minutos. A continuación, las células se incubaron con 10 µg de Fc de IgG de cabra anti-ratón en 350 µl de medio RPMI completo durante toda la noche a 37°C. Después de lavar una vez con PBS, las células se resuspendieron en 200 µl de PBS que contenía BSA al 0,5% y se incubaron con 10 µl de FITC-Annexina y 10 µl de yoduro de propidio durante 15 minutos en la oscuridad. A continuación, se detectaron las células muertas mediante FACScan tal como se ha descrito anteriormente.

30

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las figuras 3 y 4 proporcionan una comparación del título de suero específico de antígeno de ratones inmunizados con un único antígeno (figura 3) frente a ratones inmunizados con antígenos mixtos (figura 4).

35

Los títulos de suero (EC₅₀) de ratones inmunizados con cada antígeno fueron aproximadamente 10.000 para cada antígeno específico. Los títulos de suero específicos de antígeno (EC₅₀) de ratones inmunizados con antígenos mixtos fueron ~10.000 para DR4-IgG, Apo-2-IgG, DcR1-IgG y ~5.000 para DcR2-IgG. Por consiguiente, los títulos de anticuerpo específicos de antígeno eran bastante comparables si los ratones se inmunizaban con un antígeno individual o con una mezcla de cuatro antígenos diferentes. El título específico de DcR2-IgG (~1:4.000) de ratones inmunizados con cuatro antígenos diferentes fue ligeramente inferior (~1:10.000) que la de los ratones inmunizados con DcR2-IgG solo. Sin embargo, esto puede haber sido debido al hecho de que los ratones inmunizados con antígenos mixtos recibieron DcR2-IgG sólo 6 veces, mientras que los ratones inmunizados con DcR2-IgG solo recibieron 10 inyecciones.

45

TABLA 1

COMPARACIÓN ENTRE INMUNIZACIONES DE ANTÍGENOS INDIVIDUALES Y ANTÍGENOS MIXTOS						
	DR4		Apo-2		DcR2	
	Antígeno individual	Antígeno mixto	Antígeno individual	Antígeno mixto	Antígeno individual	Antígeno mixto
ELISA positivo	13,30%	6,50%	4,50%	2,10%	1,20%	2,30%
FACS positivo	48%	17%	36%	46%	20%	0
Anticuerpo monoclonal final 1 seleccionado	5	3	4	5	1	0
Especificidad	3/5	1/3	1/4	1/5		
Reacción de forma cruzada*	0/5	1/4	0/4	1/5		

* Reacciona específicamente de forma cruzada con DR4 y Apo-2

La tabla 1 compara la eficacia de la generación de anticuerpo monoclonales con DR4, Apo-2 y DcR2 utilizando ratones inmunizados con un único antígeno, frente a ratones inmunizados con antígenos mixtos. Se pueden generar anticuerpos monoclonales utilizando ambos procedimientos. Sin embargo, el esquema de inmunización de antígenos mixtos dio lugar a la producción y aislamiento de más anticuerpos que reaccionaban de forma cruzada con diferentes receptores (es decir, epítomos compartidos reconocidos ente dos proteínas; véase la Tabla 1). En particular, utilizando el protocolo de inmunización de antígenos mixtos, se identificaron los anticuerpos que reaccionaban de forma cruzada con diferentes receptores de Apo-2L. Las reactividades cruzadas determinadas mediante ELISA de captura se muestran en la Tabla 2.

10 TABLA 2

REACTIVIDADES CRUZADAS DE ANTICUERPO CON RECEPTORES DE APO-2L					
	Isotipo	Reactividad cruzada			
		DR4	Apo-2	DcR1	DcR2
3H1.18.10	G1	+/-	+++	+/-	+/-
3H3.14.5	G1	+/-	+++	+/-	+/-
3D5.1.10	G1	++	+++	-	+/-
++ ≥ 75% de unión (en comparación con la unión a Apo-2) + ≈ 50-74% de unión +/- ≈ 25-49% de unión - ≤ 24% de unión					

Tal como se muestra en la figura 6C y la Tabla 2, el anticuerpo 3D5.1:10 se unió específicamente a Apo-2 y reacción específicamente de forma cruzada con DR4. Los anticuerpos 3H1.18.10 y 3H3.14.5 se unieron específicamente a Apo-2 y mostraron cierta reactividad cruzada con otros receptores de Apo-2L analizados. (Tabla 2 y figuras 6A y 6B). Se evaluaron otras actividades biológicas de los anticuerpos de la Tabla 2 según los procedimientos descritos en el Ejemplo 6 (unión del anticuerpo al receptor de la superficie celular); Ejemplo 7 (capacidad de bloqueo o neutralización); y el Ejemplo 8 (actividad apoptótica). Los resultados se muestran en la Tabla 3 siguiente.

15 TABLA 3

OTRAS ACTIVIDADES DE LOS ANTICUERPOS ANTI-RECEPTORES DE APO-2L			
	FACS DE CÉLULAS 9D	Capacidad de bloqueo	Actividad apoptótica
3H1.18.10	+	-	-
3H3.14.5	+	+	+
3D5.1.10	+	-	-

Los tres anticuerpos fueron capaces de unirse a Apo-2 expresado en la superficie de células 9D. El anticuerpo 3H3.14.5 también fue capaz de inhibir la apoptosis inducida a través de la interacción entre Apo-2L y Apo-2. Este anticuerpo fue capaz además de inducir la apoptosis de células 9D en presencia de un anticuerpo anti-Fc para reticular anticuerpos.

25 Depósito de material

Los siguientes materiales se ha depositado con la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Manassas, VA, USA (ATCC):

Material	ATCC Dep. No.	Fecha de depósito
pRK5-Apo-2	209021	8 de mayo de 1997
3F11.39.7	HB-12456	13 de enero de 1998
3H1.18.10	HB-12535	2 de junio de 1998
3H3.14.5	HB-12534	2 de junio de 1998
3D5.1.10	HB-12536	2 de junio de 1998

Este depósito se realizó según las consideraciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con el Propósito de Procedimiento de Patentes y sus Regulaciones (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años desde la fecha del depósito. El depósito estará disponible por la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y sometido a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y no limitada de la progenie del cultivo del depósito al público tras la publicación de la respectiva patente estadounidense o tras ponerse abierta a la inspección pública de cualquier solicitud de patente estadounidense o extranjera, la que sea primera, y asegura la disponibilidad de la progenie para alguien determinado por la U.S. Commissioner of Patents and Trademarks para tener el derecho a la misma de acuerdo con 35 USC § 122 y las normas de la Commissioner según las mismas (incluyendo 37 CFR § 1.14 con referencia concreta a 886 OG 638).

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

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

ES 2 395 693 T3

Listado de secuencias

<110> GENENTECH, INC.

5 <120> ANTICUERPOS MONOCLONALES, ANTICUERPOS QUE REACCIONAN DE FORMA CRUZADA Y PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE LOS MISMOS

<130> LCW/FP6607386

10 <140> Desconocido, presentado con la presente
<141> 1999-06-10

<150> 99928574.5
<151> 1999-06-10

15 <150> PCT/US99/13197
<151> 1999-06-10

20 <150> US09/096,637
<151> 1998-06-12

<160> 2

25 <210> 1
<211> 1799
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 1

```

30   cccacgcgtc cgcataaatc agcacgcggc cggagaacct cgcaatctct 50
      gcgcccacaa aatacaccga cgatgcccga tctactttaa gggctgaaac 100
35   ccacgggcct gagagactat aagagcggtc cctaccgcca tggaacaacg 150
      gggacagAAC gccccggccg cttcgggggc ccggaaaagg cacggcccag 200
40   gaccagggga ggcgcgggga gccaggcctg ggctccgggt cccaagacc 250
      cttgtgctcg ttgtcgccgc ggtcctgctg ttggtctcag ctgagtctgc 300
45   tctgatcacc caacaagacc tagctcccca gcagagagcg gcccacaaac 350
      aaaagaggtc cagcccctca gagggattgt gtccacctgg acaccatata 400
50   tcagaagacg gtagagattg catctcctgc aaatatggac aggactatag 450
      cactcactgg aatgacctcc tttctgctt gcgctgcacc aggtgtgatt 500
55   caggtgaagt ggagctaagt ccctgcacca cgaccagaaa cacagtgtgt 550
      cagtgcgaag aaggcacctt ccgggaagaa gattctcctg agatgtgccg 600
60   gaagtgccgc acaggggtgc ccagagggat ggtcaaggtc ggtgattgta 650
      caccctggag tgacatcgaa tgtgtccaca aagaatcagg catcatcata 700
65   ggagtcacag ttgcagccgt agtcttgatt gtggctgtgt ttgtttgcaa 750
      gtctttactg tggaagaaag tccttcctta cctgaaagge atctgctcag 800
  
```

ES 2 395 693 T3

gtggtggtgg ggaccctgag cgtgtggaca gaagctcaca acgacctggg 850
 gctgaggaca atgtcctcaa tgagatcgtg agtatcttgc agcccaccca 900
 5 ggtccctgag caggaaatgg aagtccagga gccagcagag ccaacaggtg 950
 tcaacatggt gtcccccggg gagtcagagc atctgctgga accggcagaa 1000
 10 gctgaaaggt ctcagaggag gaggetgctg gttccagcaa atgaaggtga 1050
 tcccactgag actctgagac agtgcttcga tgactttgca gacttggtgc 1100
 15 cctttgactc ctgggagccg ctcatgagga agttgggcct catggacaat 1150
 gagataaagg tggctaaagc tgaggcagcg ggccacaggg acaccttgta 1200
 20 cacgatgctg ataaagtggg tcaacaaaac cgggcgagat gcctctgtcc 1250
 acaccctgct ggatgccttg gagacgctgg gagagagact tgccaagcag 1300
 25 aagattgagg accacttggt gagctctgga aagttcatgt atctagaagg 1350
 taatgcagac tctgccwtgt cctaagtgtg attctcttca ggaagtgaga 1400
 30 ccttcctggg tttacctttt ttctggaaaa agcccaactg gactccagtc 1450
 agtaggaaag tgccacaatt gtcacatgac cggtactgga agaaactctc 1500
 35 ccatccaaca tcaccagtg gatggaacat cctgtaactt ttcactgcac 1550
 ttggcattat ttttataagc tgaatgtgat aataaggaca ctatggaaat 1600
 40 gtctggatca ttccgtttgt gcgtactttg agatttggtt tgggatgtca 1650
 ttgttttcac agcacttttt tctcctaagc taaatgcttt atttatttat 1700
 45 ttgggctaca ttgtaagatc catctacaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaag 1750
 ggcgccgagc actctagagt cgacctgcag aagcttggcc gccatggcc 1799

ES 2 395 693 T3

```

<210> 2
<211> 411
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<220>
<221> alelo
<222> 410
10 <223> residuo 410 puede ser Leu o Met

<400> 2

15 Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg
    1          5          10          15

20 Lys Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro
    20          25          30

30 Gly Leu Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val
    35          40          45

25 Leu Leu Leu Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp

```

ES 2 395 693 T3

					50					55					60
	Leu	Ala	Pro	Gln	Gln	Arg	Ala	Ala	Pro	Gln	Gln	Lys	Arg	Ser	Ser
					65					70					75
5	Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	Cys	Pro	Pro	Gly	His	His	Ile	Ser	Glu	Asp
					80					85					90
	Gly	Arg	Asp	Cys	Ile	Ser	Cys	Lys	Tyr	Gly	Gln	Asp	Tyr	Ser	Thr
10					95					100					105
	His	Trp	Asn	Asp	Leu	Leu	Phe	Cys	Leu	Arg	Cys	Thr	Arg	Cys	Asp
					110					115					120
15	Ser	Gly	Glu	Val	Glu	Leu	Ser	Pro	Cys	Thr	Thr	Thr	Arg	Asn	Thr
					125					130					135
	Val	Cys	Gln	Cys	Glu	Glu	Gly	Thr	Phe	Arg	Glu	Glu	Asp	Ser	Pro
					140					145					150
20	Glu	Met	Cys	Arg	Lys	Cys	Arg	Thr	Gly	Cys	Pro	Arg	Gly	Met	Val
					155					160					165
	Lys	Val	Gly	Asp	Cys	Thr	Pro	Trp	Ser	Asp	Ile	Glu	Cys	Val	His
					170					175					180
25	Lys	Glu	Ser	Gly	Ile	Ile	Ile	Gly	Val	Thr	Val	Ala	Ala	Val	Val
					185					190					195
	Leu	Ile	Val	Ala	Val	Phe	Val	Cys	Lys	Ser	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys
					200					205					210
30	Val	Leu	Pro	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ile	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp
					215					220					225
	Pro	Glu	Arg	Val	Asp	Arg	Ser	Ser	Gln	Arg	Pro	Gly	Ala	Glu	Asp
35					230					235					240
	Asn	Val	Leu	Asn	Glu	Ile	Val	Ser	Ile	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Val
					245					250					255
40	Pro	Glu	Gln	Glu	Met	Glu	Val	Gln	Glu	Pro	Ala	Glu	Pro	Thr	Gly
					260					265					270
	Val	Asn	Met	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Ser	Glu	His	Leu	Leu	Glu	Pro
					275					280					285
45	Ala	Glu	Ala	Glu	Arg	Ser	Gln	Arg	Arg	Arg	Leu	Leu	Val	Pro	Ala
					290					295					300
	Asn	Glu	Gly	Asp	Pro	Thr	Glu	Thr	Leu	Arg	Gln	Cys	Phe	Asp	Asp
					305					310					315
50	Phe	Ala	Asp	Leu	Val	Pro	Phe	Asp	Ser	Trp	Glu	Pro	Leu	Met	Arg
					320					325					330
	Lys	Leu	Gly	Leu	Met	Asp	Asn	Glu	Ile	Lys	Val	Ala	Lys	Ala	Glu
					335					340					345
55	Ala	Ala	Gly	His	Arg	Asp	Thr	Leu	Tyr	Thr	Met	Leu	Ile	Lys	Trp
					350					355					360
60															

ES 2 395 693 T3

5	Val	Asn	Lys	Thr	Gly	Arg	Asp	Ala	Ser	Val	His	Thr	Leu	Leu	Asp
					365					370					375
	Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Gly	Glu	Arg	Leu	Ala	Lys	Gln	Lys	Ile	Glu
					380					385					390
10	Asp	His	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Lys	Phe	Met	Tyr	Leu	Glu	Gly	Asn
					395					400					405
15	Ala	Asp	Ser	Ala	Xaa	Ser									
					410										

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo que reacciona de forma cruzada con dos o más receptores Apo-2L diferentes.
- 5 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende un anticuerpo monoclonal.
3. Anticuerpo según la reivindicación 1, que se une específicamente al polipéptido Apo-2 y además reacciona de forma cruzada con otro receptor Apo-2L.
- 10 4. Anticuerpo según la reivindicación 1 que:
 - (i) es un fragmento de anticuerpo;
 - (ii) comprende residuos de una región hipervariable no humana y residuos de una región armazón humana; o
 - 15 (iii) es un anticuerpo humano.
5. Anticuerpo que tiene las características biológicas de un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en 3H1.18.10 (ATCC número HB-12535) y 3H3.14.5 (ATCC número HB-12534).
- 20 6. Anticuerpo según la reivindicación 5, que (i) se une al mismo epítipo que el epítipo al que se une un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en 3H1.18.10 (ATCC número HB-12535) y 3H3.14.5 (ATCC número HB-12534), o (ii) tiene los residuos de la región hipervariable de un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en 3H1.18.10 (ATCC número HB-12535) y 3H3.14.5 (ATCC número HB-12534).
- 25 7. Línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en 3H1.18.10 (ATCC número HB-12535) y 3H3.14.5 (ATCC número HB-12534).
- 30 8. Ácido nucleico aislado que comprende ADN que codifica el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
9. Vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 8.
10. Célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 9.
- 35 11. Procedimiento de producción de un anticuerpo, que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 10 en condiciones en las que se expresa el ADN y, opcionalmente, que comprende además recuperar el anticuerpo del cultivo de células huésped.
- 40 12. Composición que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un portador farmacéuticamente aceptable.

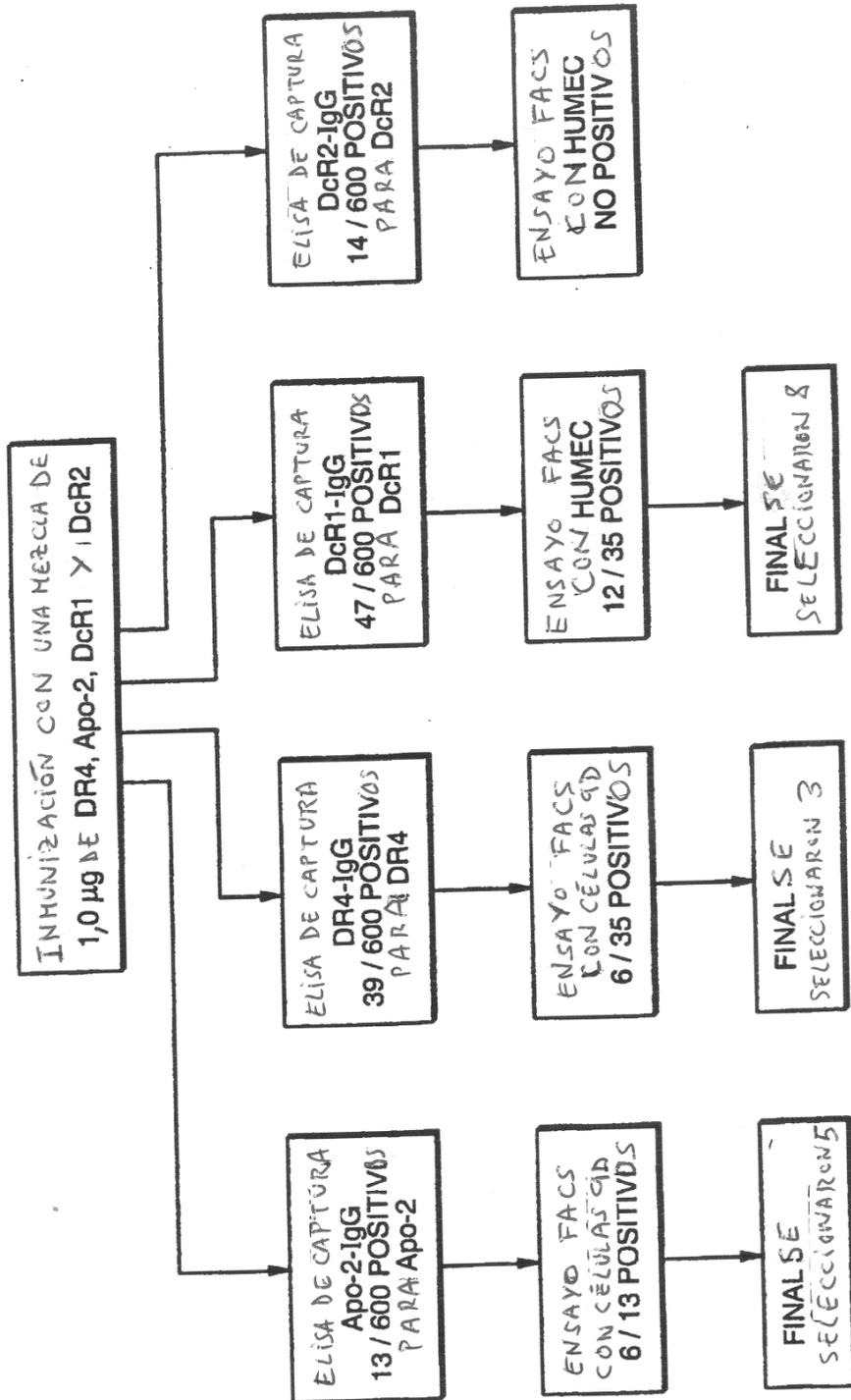


FIG.-1

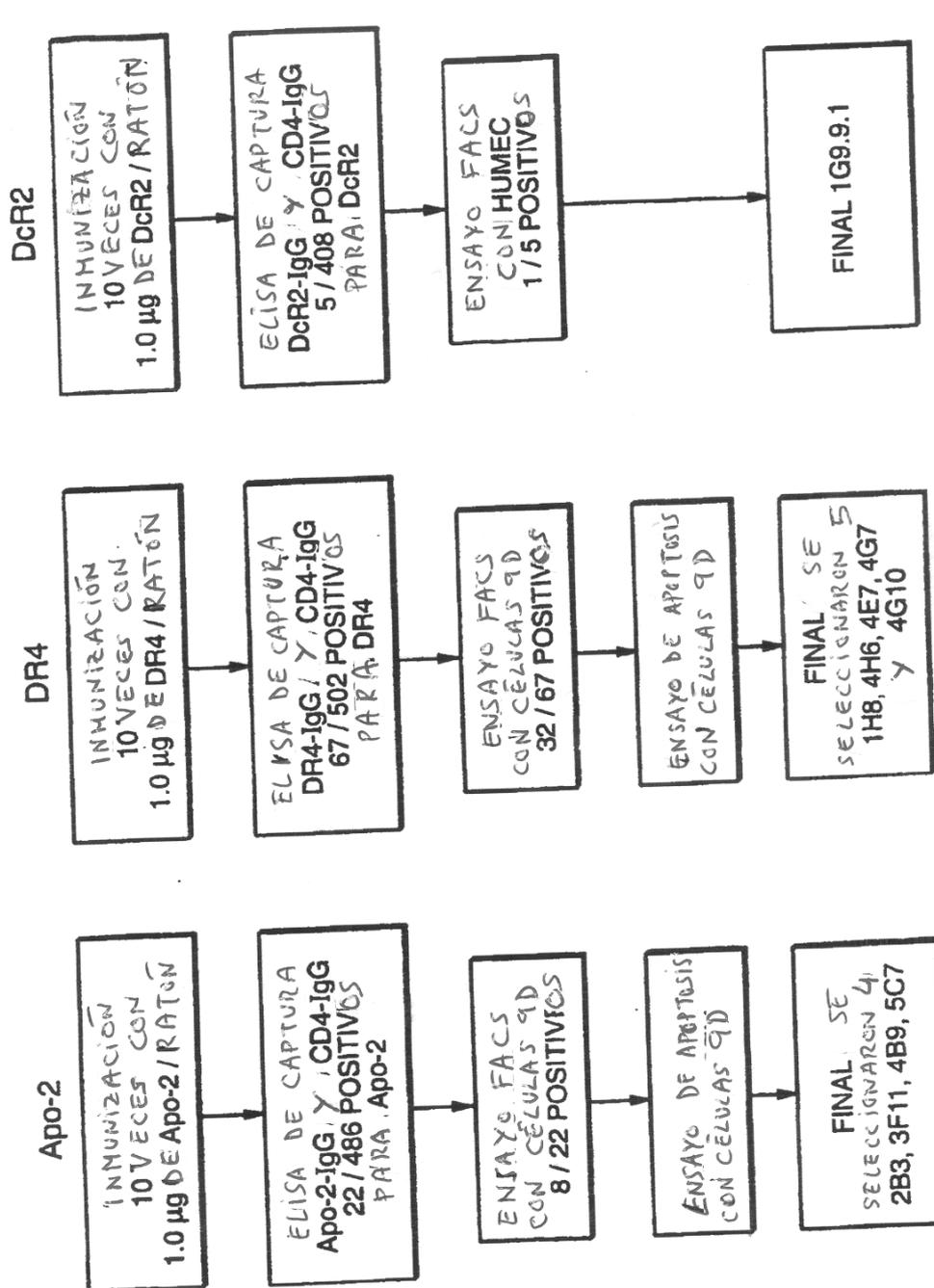
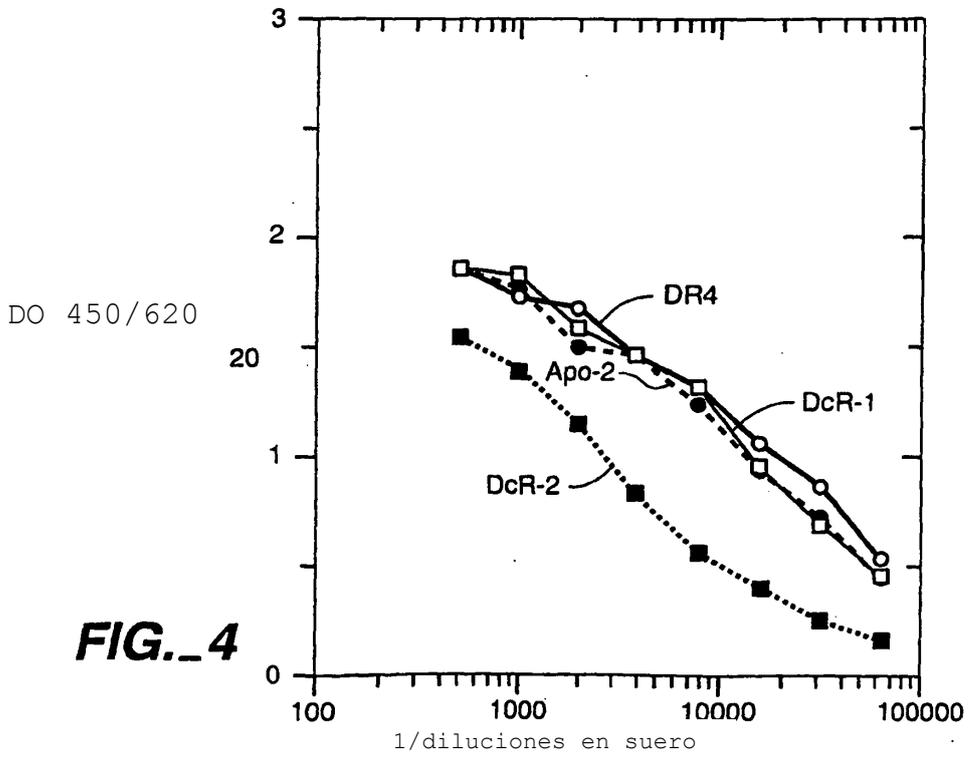
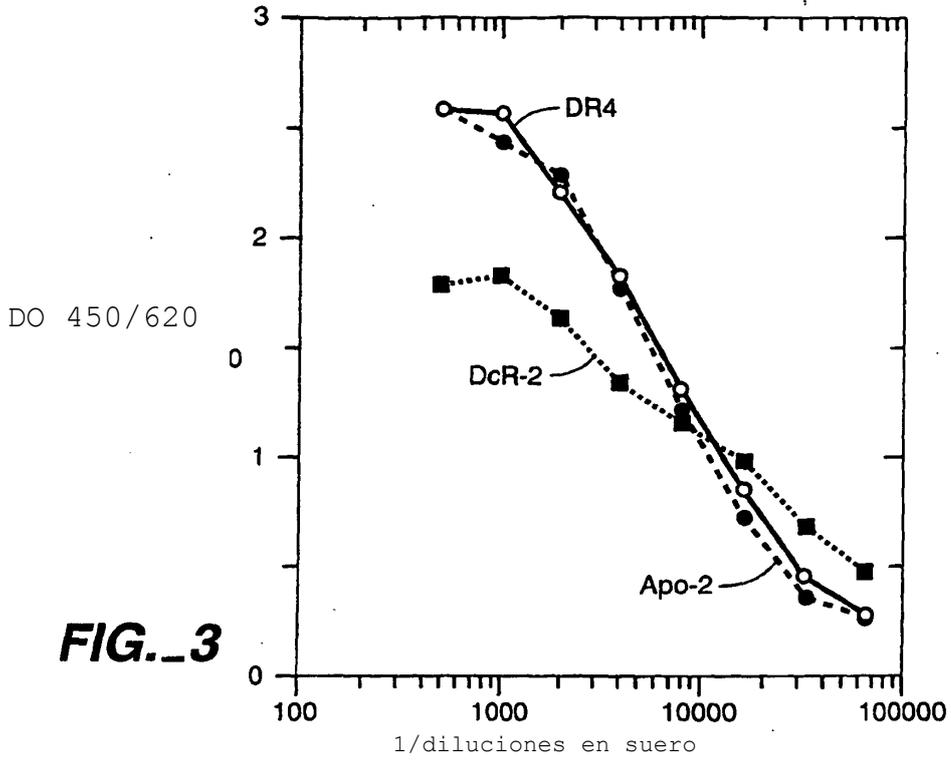


FIG.-2



1 CCCACGGCT CGCATAAATC AGCACGGGC CGGAGAACCC CGCAATCTCT GCGCCACAA AATACACCGA CGATGCCCGA TCTACTTTAA GGGCTGAJAAAC
 GGGTCCGAG GCGTATTTAG TCGTCCGCC GCTCTTTGGG GCGTTAGAGA CCGGGTGT TTATGTGGCT GCTACGGGCT AGATGAAATF CCCGACTTTC
 101 CCACGGGCT GAGACTAT AAGAGCTTC CCTACCGCA TGGAAACAG GGGACAGAAC GCCCGGGCCG CTTCCGGGGC CCGGAAAAGG CACGCCCCAC
 GGTCCCCGA CTCTCTGATA TTCTCGCAAG GGATGGCCGT ACCTGTTCG CCCTGTTCG CCGGCCCG GAAGCCCCG GGCCTTTTCC GTGCCGGGTC
 M etGluGlnAr gGlyGlnAsn AlaProAlaIa laSerGlyAl aArgLysArg HisGlyProGly
 201 GACCAGGGA GCGCGGGGA GCCAGCCCTG GGTCCCGGT CCCCAGACC CTTGTGCTCG TTGTCCCGC GGTCTCTGTC TTGCTCTCAG CTGAGTCTGC
 CTGGTCCCT CCGCCCCCT CCGTCCGGAC CCGAGCCCA GGGTTCCTGG GAACAGGAC AACACGGCG CAGGACCGAC AACACAGATC GACTCAGAGC
 22 ProArgG1 uAlaArgGly AlaArgProG lyLeuArgVa lProLysThr LeuValLeuV alValAlaAl aValLeuLeu LeuValSerA laGluSerAla
 301 TCTGATACC CAACAAGACC TAGCTCCCA GCAGAGAGG GCCCCACAAC AAAAGAGTC CAGCCCTCA GAGGATTTGT FTCCACCTGG ACACCATATC
 AGACTAGTGG GTTGTCTG AATGAGGCT CCGTCTCTCG CCGGTGTTCG TTTTCTCCAG FTCCGAGAT FTCCCTAACA CAGGTGGACC TGTGGTATAG
 55 LeuIleThr GlnGlnAspL euAlaProG1 euAlaProGln glnArgAla AlaProGlnG lnLysArgSe rSerProSer GluGlyLeuC ysProProG1 yHisHisIle
 401 TCAGAAGAC GTAGAGATTG CATCTCTGC AAATATGGAC AGGACTATAG CACTCACTGG AATGACCTCC TTTTCTGCTT GCGCTCCACC AGGTGTGATT
 AGTCTTCTGC CATCTTAAC GTAGAGACG TTTATACCTG TCTGTATTC GTGAGTGACC TTACTGGAG AAAAGACGAA CCGCAGCTGG TCCACACTAA
 88 SerGluAspG lyArgAspCy sIleSerCys LysTyrGlyG lnAspTyrSe rThrHisTyr AsnAspLeuL euPheCysLe uArgCysThr ArgCysAspSer
 501 CAGGTGAAGT GGAGCTAAGT CCTGCACCA CGACCAGAA CACAGTGTGT CAGTGGGAG AAGGCACCTT CCGGGAAGAA GATTCCTCTG AGATGTGCCG
 FTCCACTTCA CCTCGATTCA GGGACCTGGT GCTGGTCTTT GTGTACACA GTACACCTTC TTCCGTGGAA GGCCTTCTTT CTAAGAGGAC TCTACACGGC
 122 GlyGluVa lGluLeuSer ProCysThrT hrThrArgAs nThrValCys GlnCysGluG luclyThrPh eaArgGluGlu AspSerProG luMetCysArg
 601 GAAGTCCCG ACAGGTGTC CCAGAGGAT GGTCAAGGTC GGTGATGTA CACCTGGAG TGCATCGAA TGTGTCCACA AAGAAATCAGG CATCATCATA
 CTTACAGCGG TGTCCACAG GGTCTCCCTA CCAGTCCAG CCACTAACAT GTGGGACCTC ACTGTAGCTT ACACAGTGT TTCTTAGTCC GTAGTAGTAT
 155 LysCysArg ThrGlyCysP roArgGlyMe tValLysVal GlyAspCysT hrProTrpSe rAspIleGlu CysValHisL ysGluSerG1 yIleIleIle
 701 GGAGTACAG TTGCAGCCGT AGTCTTGATT GTGCTGTGT TTGTTTCAA GTCTTTACTG TGGAGRAAG TCCTTCTCTTA CCTGAAAAGG ATCTGCTCAG
 188 GlyValThrV alAlaAlaVa lValLeuIle ValAlaValP heValCysLy sSerLeuLeu TrpLysLysV alLeuProTy rLeuLysGly IleCysSerGly
 801 GTGGTGTGG GGACCCCTGAG CGTGTGGACA GAAGCTACA ACGACCTGG GCTGAGGACA ATGTCTCAA TGAATCGTG AGTATCTGC AGCCACCCA
 CACCACCACC CCTGGACTC GCACACCTGT CTTCCAGTGT TGTGGACCC CACTCTGT TACAGGAGTT ACTTAGGAC TCATAGRACG TCGGGTGGT
 222 GlyGlyG1 yAspProGlu ArgValAspA rgSerSerG1 naArgProGly AlaGluAspA snValLeuAs nGluIleVal SerIleLeuG lnProThrGln

FIG. 5A

901 GGTCCCTGAG CAGGAATGG AAGTCCAGGA GCCAGCAGAG CCAACAGGTG TCAACATGTT GTCCCCGGG GAGTCAGAGC ATCTGCTGGA ACCGGCAGAA
 CCAGGGACTC GTCCTTTACC TTCAGGTCCT CGGTCTCTC GGTGTCCAC AGTTTACAA CAGGGGCC CCACAGTTCG TAGACACCT TGGCCCGTCTT
 255 ValProGlu GlnGluMetG luValGlnGlu uProAlaGlu ProThrGlyV alAsnMetLe userProGly GluSerGluH isLeuLeuG1 uProAlaGlu
 1001 GCTGAAAGGT CTCAGAGGAG GAGGCTGCTG GTTCCAGCAA ATGAAGGTGA TCCCACCTGAG ACTCTGAGAC AGTCTTCCGA TGACTTTGCA GACTTGTGTC
 CGACTTTCCA GAGTCTCCTC CTCCGACGAC CAAGTCTGTT TACTTCCACT AGGGTACTC TGAGACTCTG TCACGAAAGCT ACTGAAACCT CTGAACCCAGC
 288 AlaGluArgS erGlnArgAr gArgLeuLeu ValProAlaA snGluGlyAs pProThrGlu ThrLeuArgG lnCysPheAs pAspPheAla AspLeuValPro
 1101 CCTTTGACTC CTGGAGCCG CTCATGAGGA AGTTGGGCT CATGACAAAT GAGATAAAGG TGGCTAAAGC TGAGGCAGCG GCGCCACAGG ACACCTTGT
 GGAACCTGAG GACCTTCGGC GAGTACTCTT TCAACCCCGA GTACTGTFTA CTCTATTTC ACCGATTTCC ACTCCGTCC CCGGTGTCCC TGTGAAACAT
 322 PheaspSe rTrpGluPro LeuMetArgL ysLeuGlyLe uMetAspAsn GluIleIysV alAlaLysAl aGluAlaAla GlyHisArgA spThrLeuTyI
 1201 CACGATGCTG ATAAAGTGGG TCAACAAAAC CCGCGGAGAT GCCTGTGTCC ACACCTGTCT GATGTCCTGG GAGAGACTGG GAGAGAGACT TGCCAAAGCAG
 GTGCTACGAC TATTTACCCC AGTTGTTTTG GCCCGCTCTA CCGACACAGG TGTGGGACGA CCTACCGAAC CTCTCCGACC CTCTCTCTGA ACGTTCGTC
 355 ThrMetLeu IleLysTrpV alAsnLysTh rGlyArgAsp AlaSerValH isThrLeuLe uAspAlaLeu GluThrLeuG lyGluArgLe uAlaLysGln
 1301 AAGATTGAGG ACCACTTGTG GAGCTCTGGA AAGTTCATGT ATCTAGAAGG TAAATGAGAC TCTGCCWGTG CCTAAGTGTG ATCTCTTCA GGAAGTGAGA
 TTCTAACTCC TGGTGAACAA CTCGAGACCT TTCAAGTACA TAGACTTCC ATTACGCTG AGACGARA CA GATTTCACAC TAAGAGAAGT CCTTCACACT
 388 LysIleGluA spHisLeuLe uSerSerGly LysPheMetI yrLeuGluG1 yAsnAlaAsp SerAlaXaas erOC*
 1401 CCTTCCCTGG TTTACTTTTT TTCTGGAAAA AGCCCAACTG GACTCCAGTC AGTAGGAAG TCCACAAATT GTCACATGAC CCGTACTGGA AGAAACTCTC
 GGAAGGACC AAATGGAAA AAGACCTTTT TCGGTTGAC CTGAGTCCAG TCATCCCTTC ACGGTGTTAA CAGTGTACTG GCCATGACCT TCTTTGAGAG
 1501 CCATCCAAAC TCACCAGTG GATGGAACAT CCTGTAACCT TTCACCTGCAC TTGGCATTAT TTTTATAAGC TGAATGTGAT AATAAGGACA CTATGGAAAT
 GGTAGGTGT AGTGGGTAC CTACCTTGTG GACATTTGTA AAGTGACGTG ACCGTAATA AAAATATTG ACTTACACTA TTATTCCTGT GATACCTTA
 1601 GTCTGGATCA TTCCGTTTGT GCGTACTTTG AGATTGGTT TGGGATGCA TTGTTTTTAC AGCACTTTTT TATCTTAATG TAAATGCTTT ATTTATTTAT
 CAGACCTAGT AAGGCAACAC CGCATGAAC TCTAAACCAA ACCCTACAGT AACAAAAGTG TCGTGA AAAA ATAGGATTAC ATTTACGAAA TAAATAAATA
 1701 TTGGGCTACA TTGTAAGATC CATCTACAAA AAAAAAAA GCGGCGCCG ACTCTAGAGT CGACCTGCAG AAGCTTGGCC GCCATGGCC
 AACCCGATGT AACATCTTAG GTAGATGTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT CCGCCGGCC TGAGATCTCA GCTGGACGTC TTCGAAACCG CCGTACCCG

FIG.-5B

