

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 011**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2000 E 00990269 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 1239869**

54 Título: **Receptor TWEAK**

30 Prioridad:

20.12.1999 US 172878 P

10.05.2000 US 203347 P

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

05.12.2013

73 Titular/es:

**IMMUNEX CORPORATION (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

WILEY, STEVEN, R.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 433 011 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

Receptor TWEAK.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al descubrimiento del receptor funcional (TWEAKR) para la proteína TWEAK. Más particularmente, la invención se refiere al uso de agonistas y antagonistas de TWEAKR en métodos de tratamiento, y a métodos de cribado basados en TWEAKR y en la interacción TWEAK-TWEAKR.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

A. Angiogénesis

15 La angiogénesis es un proceso multi-etápico del desarrollo que da como resultado la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos existentes. Este proceso regulado espacial y temporalmente implica aflojamiento de contactos de la matriz e interacciones de las células de soporte en los vasos existentes por proteasas, seguido por movimiento coordinado, alteración morfológica, y proliferación de las células de la musculatura lisa y endoteliales del vaso existente. Las células nacientes se extienden luego en el tejido diana seguido por interacciones célula-célula en las cuales las células endoteliales forman tubos que rodean las células de la musculatura lisa. De una manera coordinada, las proteínas de la matriz extracelular del vaso se secretan y se reclutan células de soporte peri-endoteliales para soportar y mantener la integridad estructural (véase, v.g., Daniel et al., Ann. Rev. Physiol. 2000 (62) 649, 2000). La angiogénesis juega papeles importantes tanto en la fisiología normal como en la patológica.

20

25 En condiciones fisiológicas normales, la angiogénesis está implicada en el desarrollo fetal y embrionario, la curación de las heridas, la regeneración de órganos, y los procesos de remodelación reproductora femeninos que incluyen la formación del endometrio, el cuerpo lúteo, y la placenta. La angiogénesis está regulada estrictamente en condiciones normales, especialmente en los animales adultos, y la perturbación de los controles de regulación puede conducir a angiogénesis patológica.

30

La angiogénesis patológica se ha visto implicada en la manifestación y/o progresión de enfermedades inflamatorias, ciertos trastornos oftálmicos, y el cáncer. En particular, varias líneas de evidencia soportan el concepto de que la angiogénesis es esencial para el crecimiento y la persistencia de los tumores sólidos y sus metástasis (véase, v.g., Folkman, N. Engl. J. Med. 285:1182, 1971; Folkman et al., Nature 339:58, 1989; Kim et al., Nature 362:841, 1993; Hori et al., Cancer Res., 51:6180, 1991). Los inhibidores de angiogénesis son por tanto útiles para la prevención (v.g., el tratamiento de condiciones premalignas), intervención (v.g., el tratamiento de pequeños tumores), y regresión (v.g., el tratamiento de grandes tumores) de los cánceres (véase, v.g., Bergers et al., Science 284:808, 1999).

35

40 Existe necesidad de composiciones y métodos adicionales de modulación de la angiogénesis para la prevención, abrogación, y alivio de enfermedades.

40

B. TWEAK

45 La proteína TWEAK, que ha sido denominada también TREPA y Apo3L, es un miembro de la familia de factores de necrosis tumoral (TNF) y se expresa en una gran diversidad de tejidos humanos (Chicheportiche et al. J. Biol. Chem., 272 (51): 32401, 1997; véase también Wiley, Publicación PCT No. WI 98/35061, 13 de agosto 1998). Al igual que la mayoría de los miembros de la familia TNF, TWEAK es una proteína de membrana tipo II con un dominio extracelular C-terminal. Aunque TWEAK se describió originalmente como un inductor débil de apoptosis, se demostró posteriormente que esta inducción de la muerte celular es indirecta (Schneider et al., Eur. J. Immunol. 29:1785, 1999).

50

Lynch et al., demostraron que TWEAK induce directamente la proliferación y angiogénesis de las células endoteliales (J. Biol. Chem., 274 (13): 8455, 1999). Concentraciones picomolares de TWEAK soluble recombinante inducen proliferación en líneas de células endoteliales múltiples y en células musculares lisas de la aorta, y reducen el requerimiento de suero y factores de crecimiento en cultivo. Además, TWEAK induce una fuerte respuesta angiogénica en un ensayo de bolsa corneal de rata. Dado que los miembros de la familia TNF inician respuestas biológicas por señalización a través de miembros de la familia de receptores TNF, se ha registrado un gran interés en la identificación y caracterización del receptor TWEAK.

55

60 Marsters et al. informaron que TWEAK se fija a y emite señales a través de un receptor que contiene un dominio de muerte conocido diversamente como DR3, Apo3, WSL-1, TRAMP, o LARD (Marsters et al., Current Biology 8 (9): 525, 1998). En cambio, Schneider et al., demostraron que TWEAK se fija a y emite señales en células Kym-1, pero que las células Kym-1 no expresan el receptor DR3 (Schneider et al., Eur. J. Immunol. 29:1785, 1999). Estos resultados sugieren la existencia de un receptor TWEAK todavía sin identificar.

60

65

Dado que TWEAK induce angiogénesis in vivo, existe una necesidad particular de identificar el receptor funcional principal TWEAK. Una vez identificado, el receptor TWEAK puede utilizarse para cribado y desarrollo de agonistas y antagonistas del receptor TWEAK para la modulación de la angiogénesis y el tratamiento de enfermedades humanas.

WO 98/35061 da a conocer el uso de TWEAK como agente terapéutico a fin de promover la vascularización y curación de las heridas, y expone estrategias de utilización de RNA antisentido o anticuerpos bloqueadores contra TWEAK a fin de prevenir la vascularización de tumores sólidos. WO 00/42073 da a conocer reactivos que modifican la actividad de TWEAK para el tratamiento de trastornos inmunológicos.

Meighan-Mantha et al., J. Biol. Chem. 974 (46), 33166-33176 (1999) informaron de la expresión de Fn14 (TWEAKR) en diversos tejidos de ratón.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención está basada en la identificación y caracterización biológica del receptor principal funcional de TWEAK. Como se describe más adelante, cDNA que codificaba el receptor TWEAK se clonó molecularmente a partir de una biblioteca de expresión de células endoteliales humanas.

Aunque se ha informado de secuencias de DNA y secuencias deducidas de aminoácidos correspondientes al receptor TWEAK identificado en esta memoria (véase, v.g., Kato et al., Publicación PCT No. WO 98/55508; 10 de diciembre de 1998 e Incyte, Publicación PCT No. WO 99/61471, 2 de diciembre de 1999), no se había apreciado con anterioridad que estas secuencias codifiquen un receptor para TWEAK o que el polipéptido codificado esté implicado en la modulación de la angiogénesis. Análogamente, algunos investigadores han reivindicado recientemente métodos de producción y utilización de antagonistas del receptor TWEAK para tratar trastornos inmunológicos, pero sin identificar el receptor TWEAK principal o su papel en la angiogénesis (Rennert, Publicación PCT No. WO 00/42073, 20 de julio de 2000). Estas deficiencias han sido abordadas, como se describe en esta memoria, por identificación del receptor principal de TWEAK (TWEAKR) y caracterización de sus actividades biológicas. La identificación de TWEAKR ha conducido al desarrollo de composiciones para la modulación de la angiogénesis, y proporciona también instrumentos de cribado para la identificación de diagnósticos y agentes terapéuticos.

La presente invención proporciona el uso de un polipéptido aislado que comprende un fragmento soluble del dominio extracelular del receptor TWEAK que tiene la capacidad de fijar TWEAK en la fabricación de un medicamento para uso en la inhibición de la angiogénesis en un mamífero, en donde el dominio extracelular del receptor TWEAK está constituido por la secuencia que se expone en los residuos 28 a 79 de SEQ ID NO: 7.

La invención proporciona también el uso de un anticuerpo que se fija específicamente al dominio extracelular del receptor TWEAK en la fabricación de un medicamento para el uso en la modulación de la angiogénesis (tal como la promoción o inhibición de la angiogénesis) en un mamífero, en donde el dominio extracelular del receptor TWEAK está constituido por la secuencia que se expone en los residuos 28 a 79 de SEQ ID NO: 7.

El mamífero puede ser un humano, y el polipéptido puede comprender un polipéptido Fc o dominio de cremallera de leucina. El anticuerpo puede seleccionarse del grupo constituido por anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos transgénicos y anticuerpos humanos. El anticuerpo puede estar conjugado a un radioisótopo, a una toxina derivada de planta, hongo, o bacteria tal como ricina A o toxina de la differia, o a otro veneno químico.

El polipéptido o el anticuerpo puede causar la disrupción de la interacción entre el receptor TWEAK y una molécula TRAF.

El mamífero puede tratarse también con un agente quimioterapéutico, y el agente quimioterapéutico puede seleccionarse del grupo constituido por agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de la vinca y otros agentes quimioterapéuticos derivados de plantas, nitrosoureas, antibióticos antitumorales, enzimas antitumorales, inhibidores de topoisomerasas, análogos de platino, supresores adrenocorticales, hormonas, agonistas de hormonas, antagonistas de hormonas, anticuerpos, agentes inmunoterapéuticos, factores de las células de la sangre, agentes radioterapéuticos y modificadores de la respuesta biológica, o el agente quimioterapéutico puede seleccionarse del grupo constituido por cisplatino, ciclofosfamida, mecloretamina, melfalán, bleomicina, carboplatino, fluorouracilo, 5-fluorodesoxiuridina, metotrexato, taxol, asparaginasa, vincristina, y vinblastina, linfoquinas y citoquinas tales como interleuquinas, interferones (con inclusión de alfa, beta, o delta), y TNF, clorambucil, busulfán, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, dacarbacina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, vindesina, etoposido, teniposido, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, L-asparaginasa, hidroxixurea, metilhidracina, mitotano, tamoxifeno, y fluoximesterona, o el agente quimioterapéutico puede seleccionarse del grupo constituido por ligando Flt3, ligando CD40, interleuquina-2, interleuquina-12, ligando 4-1BB, anticuerpos anti-

4-1BB, antagonistas de TNF y antagonistas del receptor de TNF, TRAIL, agonistas CD148, antagonistas de VEGF, antagonistas del receptor de VEGF, y antagonistas de Tek.

5 El uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser para el tratamiento de una deficiencia de vascularización en tejido cardíaco o periférico, con inclusión de enfermedad de las arterias coronarias, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, déficits de circulación periférica, lesión isquemia/reperfusión de las extremidades; mejora de la curación de las heridas, trasplante de órganos, reimplantación de dedos o extremidades seccionados, o injerto vascular o de piel; o uso en asociación con cirugía de bypass o angioplastia.

10 La invención proporciona también un antagonista de TWEAKR que comprende un polipéptido aislado que comprende un fragmento soluble de un dominio extracelular del receptor TWEAK que tiene la capacidad de fijarse a TWEAK para uso en medicina, en donde el dominio extracelular del receptor TWEAK está constituido por la secuencia que se expone en los residuos 28 a 79 de SEQ ID NO: 7.

15 Se proporciona también por la invención un método de identificación de un compuesto que es capaz de modular la angiogénesis, comprendiendo el método identificar un compuesto de test que se fija a un dominio extracelular del receptor TWEAK, en donde el compuesto de test no es TWEAK, y en donde el dominio extracelular del receptor TWEAK está constituido por la secuencia que se expone en los residuos 28 a 79 de SEQ ID NO: 7, pudiendo comprender el método la identificación de un compuesto de test que afecta a la interacción entre TWEAK y un dominio extracelular del receptor TWEAK, en donde el dominio extracelular del receptor TWEAK consiste en la secuencia que se expone en los residuos 28 a 79 de SEQ ID NO: 7. La invención proporciona también un método de identificación de un compuesto que es capaz de modular la angiogénesis, comprendiendo el método identificar un compuesto de test que modula la angiogénesis por modulación de la interacción entre un receptor TWEAK y TRAF, en donde el receptor TWEAK comprende un dominio extracelular constituido por la secuencia que se expone en los residuos 28 a 79 de SEQ ID NO: 7. Los métodos de la invención pueden comprender también la determinación de la capacidad del compuesto de test para modular la proliferación de células endoteliales y/o la migración y/o angiogénesis de las células endoteliales; pudiendo ser la modulación estimuladora o inhibidora.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 La Figura 1 muestra una alineación de secuencias de las secuencias de polipéptidos del receptor TWEAK humanas y murinas. La secuencia superior es el polipéptido del receptor TWEAK murino (SEQ ID NO: 5), y la secuencia inferior es el polipéptido del receptor TWEAK humano (SEQ ID NO: 4).

35 La Figura 2 muestra el efecto de TWEAKR-Fc sobre el cierre de heridas HRMEC inducidas por PMA.

La Figura 3 muestra el efecto de TWEAKR-Fc sobre el cierre de heridas HRMEC inducidas por EGF.

40 La Figura 4 muestra el efecto de TWEAKR-Fc sobre la proliferación de HUVEC inducida por TWEAK (100 ng/ml).

La Figura 5 muestra el efecto de TWEAKR-Fc sobre la proliferación de HUVEC inducida por FGF-2 (10 ng/ml).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 La presente invención está dirigida al receptor TWEAK y métodos para identificación y utilización de agonistas y antagonistas del receptor TWEAK. La invención proporciona métodos de cribado para agonistas y antagonistas y para tratamiento de enfermedades o afecciones medidas por angiogénesis.

A. Abreviaturas y Terminología Utilizadas en la Memoria Descriptiva

50 "4-1BB" y "ligando 4-1BB" (4-1BB-L) son polipéptidos descritos, entre otros lugares, en la Patente U.S. No. 5.674.704, con inclusión de formas solubles de los mismos.

55 "bGFG" es el factor básico de crecimiento de fibroblastos.

"BSA" es seroalbúmina bovina.

"Ligando CD40" (CD40L) es un polipéptido descrito, entre otros lugares, en la Patente U.S. No. 5.716.805, con inclusión de formas solubles del mismo.

60 "CHO" es una línea de células de ovario de hámster chino.

"DMEM" es medio de Eagle Modificado de Dulbecco, un medio de cultivo de células disponible comercialmente.

65 "ELISA" es el Ensayo de Inmunosorbente Unido a Enzima.

"Flt3L" es el ligando Flt3, un polipéptido descrito, entre otros lugares, en la Patente U.S. 5.554.512, con inclusión de formas solubles del mismo.

5 "HRMEC" son células endoteliales microvasculares renales humanas primarias.

"HUVEC" es una línea de células endoteliales de la vena umbilical humana.

10 "PBS" es solución salina tamponada con fosfato.

"PMA" es 12-miristato-13-acetato de forbol.

"RTKS" son tirosina-quinazas receptoras.

15 "Tek", que ha sido denominado también Tie2 y ORK, es una RTK que se expresa predominantemente en el endotelio vascular. La clonación molecular de Tek humano (ork) ha sido descrita por Ziegler, Patente U.S. No. 5.447.860. "Antagonistas de Tek" se describen, entre otros lugares, en Cerretti et al., Publicación PCT No. WO 00/75323, 14 de diciembre de 2000.

20 "TNFR" es un receptor del factor de necrosis tumoral, que incluye formas solubles del mismo. "TNFR/Fc" es un polipéptido de fusión receptor del factor de necrosis tumoral-Fc.

"TRAIL" es el ligando inductor de apoptosis afín a TNF, un polipéptido transmembranal de tipo II en la familia TNF descrito, entre otros lugares, en la Patente U.S. No. 5.763.223, con inclusión de formas solubles del mismo.

25 "VEGF" es el factor de crecimiento endotelial vascular, conocido también como VPF o factor de permeabilidad vascular.

30 B. Polipéptidos Solubles del Receptor TWEAK

Como se describe en los ejemplos que siguen, el cDNA del receptor TWEAK humano nativo tiene la secuencia SEQ ID NO: 3, que codifica un polipéptido de 129 residuos (SEQ ID NO: 4). El examen de la secuencia de DNA predice un polipéptido que tiene dominio extracelular de aproximadamente 78 aminoácidos (residuos 1-78 de SEQ ID NO: 4, que incluyen el péptido de señal), un dominio transmembranal de aproximadamente 23 aminoácidos (residuos 79-101 de SEQ ID NO: 4), y un dominio extracelular de aproximadamente 28 aminoácidos (residuos 102-129 de SEQ ID NO: 4). La secuencia del receptor TWEAK ha sido publicada también por Kato et al., Publicación PCT No. WO 98/55508, 10 de diciembre 1998 y por Incyte, Publicación PCT No. WO 99/61471, 2 de diciembre 1999. Como se utiliza en esta memoria, "TWEAKR" incluye polipéptidos que tienen estas secuencias, y en particular que comprenden los aminoácidos 28-79 de SEQ ID NO: 7, así como variantes de los mismos existentes naturalmente.

40 En un aspecto de la invención, se utiliza un fragmento soluble del receptor TWEAK como antagonista de TWEAKR para inhibir la angiogénesis y/o para inhibir la fijación del ligando TWEAK a TWEAKR.

45 Los polipéptidos solubles son susceptibles de ser secretados por las células en las que se expresan. El uso de formas solubles de polipéptidos es ventajoso para ciertas aplicaciones. La purificación de los polipéptidos a partir de células hospedadoras recombinantes se facilita dado que los polipéptidos se secretan, y las proteínas solubles son generalmente adecuadas para administración parenteral. Un polipéptido soluble secretado puede identificarse (y distinguirse de sus homólogos fijados a la membrana no solubles) por separación de células intactas que expresan el polipéptido deseado del medio de cultivo, v.g., por centrifugación, y ensayo del medio (sobrenadante) en cuanto a la presencia del polipéptido deseado. La presencia del polipéptido deseado en el medio indica que el polipéptido era secretado por las células y por tanto es una forma soluble del polipéptido. Los polipéptidos solubles pueden prepararse por cualquiera de numerosas técnicas convencionales. Una secuencia de DNA que codifica un polipéptido soluble deseado puede subclonarse en un vector de expresión para producción del polipéptido, o el fragmento de DNA codificante deseado puede sintetizarse químicamente.

55 Los polipéptidos TWEAKR solubles comprenden la totalidad o partes del dominio extracelular de TWEAKR, pero generalmente carecen del dominio transmembranal que podría causar la retención del polipéptido en la superficie de la célula. Los polipéptidos solubles pueden incluir parte del dominio transmembranal o la totalidad o parte del dominio citoplásmico con tal que el polipéptido sea secretado por la célula en la que se produce. Los polipéptidos TWEAKR solubles comprenden ventajosamente un péptido de señal nativo o heterólogo cuando se sintetizan inicialmente, a fin de promover la secreción por la célula, pero la secuencia de señal es escindida después de la secreción. El término "línea extracelular de TWEAKR" puede abarcar la totalidad o parte del dominio extracelular de TWEAKR nativo, así como formas afines que incluyen, pero sin carácter limitante: (a) fragmentos, (b) variantes, (c) derivados, y (d) polipéptidos de fusión. La capacidad de estas formas afines para inhibir la angiogénesis u otras respuestas mediadas por TWEAKR puede determinarse in vitro o in vivo, utilizando métodos tales como los

ilustrados a continuación o utilizando otros ensayos conocidos en la técnica. Ejemplos de polipéptidos TWEAK solubles se proporcionan a continuación.

5 Una forma multímera de un polipéptido TWEAKR soluble ("multímero TWEAKR soluble") puede utilizarse como antagonista para bloquear la fijación de TWEAK a TWEAKR, a fin de inhibir la angiogénesis y otras respuestas mediadas por TWEAKR.

10 Los multímeros TWEAKR solubles son multímeros enlazados covalentemente o no covalentemente, que incluyen dímeros, trímeros, o multímeros superiores. Los multímeros pueden estar unidos por enlaces disulfuro formados entre residuos cisteína en polipéptidos TWEAKR solubles diferentes. En esta memoria se describen multímeros que comprenden polipéptidos TWEAKR solubles múltiples unidos por interacciones covalentes o no covalentes entre los restos peptídicos fusionados a los polipéptidos TWEAKR solubles. Tales péptidos pueden ser enlazadores (espaciadores) peptídicos, o péptidos que tienen la propiedad de promover la multimerización. Las cremalleras de leucina y ciertos polipéptidos derivados de anticuerpos se encuentran entre los péptidos que pueden promover multimerización de polipéptidos TWEAKR solubles unidos a ellos, como se describe con mayor detalle más adelante.

Los multímeros pueden comprender de 2 a 4 polipéptidos TWEAKR solubles.

20 Un multímero TWEAKR soluble puede prepararse utilizando polipéptidos derivados de inmunoglobulinas. La preparación de proteínas de fusión que comprenden ciertos polipéptidos heterólogos fusionados a diversas porciones de polipéptidos derivados de anticuerpos (con inclusión del dominio Fc) ha sido descrita, v.g., por Ashkenazi et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535, 1991); Byrn et al. (Nature 344:677, 1990); y Hollenbaugh y Aruffo ("Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en Current Protocols in Immunology, Supl. 4, páginas 10.19.1-10.19.11, 1992).

30 Una realización de la presente invención está dirigida a un dímero TWEAKR-Fc que comprende dos proteínas de fusión creadas fusionando TWEAKR soluble a un polipéptido Fc. Una fusión de genes que codifica la proteína de fusión TWEAKR-Fc se injerta en un vector de expresión apropiado. Las proteínas de fusión TWEAKR-Fc se expresan en células hospedadoras transformadas con el vector de expresión recombinante, y se dejan ensamblar de modo muy similar a las moléculas de anticuerpos, después de lo cual se forman enlaces disulfuro intercatenarios entre los restos Fc para producir TWEAKR soluble divalente. El término "polipéptido Fc", como se utiliza en esta memoria, incluye formas nativas y formas muteína de polipéptidos derivados de la región Fc de un anticuerpo. Están incluidas también formas truncadas de tales polipéptidos que contienen la región bisagra que promueve la dimerización.

40 Un polipéptido Fc adecuado, descrito en la Solicitud PCT WO 93/10151 es un polipéptido monocatenario simple que se extiende desde la región bisagra N-terminal al término C nativo de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano. Otro polipéptido Fc útil es la muteína Fc descrita en la Patente U.S. 5.457.035 y por Baum et al., EMBO J. 13: 3992, 1994. La secuencia de aminoácidos de esta muteína es idéntica a la de la secuencia Fc nativa presentada en WO 93/10151, excepto que el aminoácido 19 ha cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 ha cambiado de Leu a Glu, y el aminoácido 22 ha cambiado de Gly a Ala. La muteína exhibe afinidad reducida para los receptores Fc. Los polipéptidos de fusión que comprenden restos Fc, y los multímeros formados a partir de ellos, ofrecen una ventaja de purificación fácil por cromatografía de afinidad en columnas de Proteína A o Proteína G, y los polipéptidos de fusión Fc pueden proporcionar una semivida más larga in vivo, que es útil en aplicaciones terapéuticas, que los polipéptidos no modificados.

50 Un polipéptido TWEAKR soluble puede sustituirse en lugar de la porción variable de una cadena pesada o ligera de anticuerpo. Si las proteínas de fusión se construyen tanto con cadenas pesadas como con cadenas ligeras de un anticuerpo, es posible formar un multímero TWEAKR soluble con tantos como cuatro polipéptidos TWEAKR solubles.

55 Alternativamente, el multímero TWEAKR soluble es una proteína de fusión que comprende polipéptidos TWEAKR solubles múltiples, con o sin enlazadores (espaciadores) peptídicos, o péptidos que tienen la propiedad de promover multimerización. Entre los enlazadores peptídicos adecuados se encuentran los descritos en las Patentes U.S. 4.751.180, 4.935.233, y 5.073.627. Una secuencia de DNA que codifica un enlazador peptídico deseado puede insertarse entre ellos, y en el mismo marco de lectura que las secuencias de DNA que codifican TWEAKR, utilizando métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, un oligonucleótido sintetizado químicamente que codifica el enlazador puede ligarse entre las secuencias que codifican TWEAKR soluble. En realizaciones particulares, una proteína de fusión comprende de 2 a 4 polipéptidos TWEAKR solubles, separados por enlazadores peptídicos.

60 Otro método para preparar multímeros TWEAKR solubles implica el uso de un dominio de cremallera de leucina. Los dominios de cremallera de leucina son péptidos que promueven multimerización de las proteínas en las que se encuentran. Las cremalleras de leucina fueron identificadas originalmente en varias proteínas de fijación de DNA

(Landschulz et al., Science 240: 1759, 1988), y se han encontrado desde entonces en una diversidad de proteínas diferentes. Entre las cremalleras de leucina conocidas se encuentran péptidos existentes naturalmente y derivados de los mismos que se dimerizan o trimerizan. Ejemplos de dominios de cremallera de leucina adecuados para producción de proteínas multímeras solubles se describen en la Solicitud PCT WO 94/10308, y la cremallera de leucina derivada del agente tensioactivo pulmonar proteína D (SPD) descrita en Hoppe et al., FEDS Lett. 344: 191, 1994. El uso de una cremallera de leucina modificada que permite la trimerización estable de una proteína heteróloga fusionada a ella se describe en Fanslow et al., Semin. Immunol. 6: 267, 1994. Proteínas de fusión recombinantes que comprenden un polipéptido TWEAKR soluble fusionado a un péptido de cremallera de leucina se expresan en células hospedadoras adecuadas, y el multímero TWEAKR soluble que se forma se recupera del sobrenadante de cultivo.

Para algunas aplicaciones, se cree que los multímeros TWEAKR solubles de la presente invención proporcionan ciertas ventajas sobre el uso de formas monómeras. Los polipéptidos de fusión Fc, por ejemplo, exhiben típicamente una semivida in vivo incrementada en comparación con un polipéptido no modificado.

La presente invención abarca el uso de diversas formas de multímeros TWEAKR solubles que retienen la capacidad para inhibir la angiogénesis u otras respuestas mediadas por TWEAKR. La expresión "multímero TWEAKR soluble" tiene por objeto abarcar multímeros que contienen la totalidad o parte del dominio extracelular de TWEAKR nativo, así como formas afines que incluyen, pero sin carácter limitante, multímeros de: (a) fragmentos, (b) variantes, (c) derivados, (d) polipéptidos de fusión de TWEAKR solubles. La capacidad de estas formas afines para inhibir la angiogénesis u otras respuestas mediadas por TWEAKR puede determinarse in vitro o in vivo, utilizando métodos tales como los ilustrados en los ejemplos o utilizando otros ensayos conocidos en la técnica.

Entre los polipéptidos TWEAKR solubles y multímeros TWEAKR solubles útiles en la práctica de la presente invención se encuentran variantes de TWEAKR que retienen la capacidad para fijar ligandos y/o inhibir la angiogénesis u otras respuestas mediadas por TWEAKR. Tales variantes de TWEAKR incluyen polipéptidos que son sustancialmente homólogos a TWEAKR nativos, pero que tienen una secuencia de aminoácidos diferentes de la de un TWEAKR nativo debido a una o más deleciones, inserciones o sustituciones.

Los polipéptidos TWEAKR pueden comprender de 1 a 10 deleciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos, cuando se comparan con una secuencia de TWEAKR nativa. Se incluyen como variantes de polipéptidos TWEAKR aquellas variantes que existen naturalmente, tales como formas alélicas y formas remodeladas alternativamente, así como variantes que se han construido modificando la secuencia de aminoácidos de un polipéptido TWEAKR o la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico que codifica un polipéptido TWEAKR.

Generalmente, las sustituciones de uno o más aminoácidos presentes en el polipéptido nativo debería hacerse de manera conservadora. Ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de aminoácidos fuera del o de los dominios activos, y la sustitución de aminoácidos que no alteran la estructura secundaria y/o terciaria de TWEAKR. Ejemplos adicionales incluyen la sustitución de un residuo alifático por otro, tal como Ile, Val, Leu, o Ala uno por otro, o sustituciones de un residuo polar por otro, tal como entre Lys y Ala; Glu y Asp; o Gln y Asn; o sustituciones de un residuo aromático por otro, tal como The, Trp, o Tyr uno por otro. Otras sustituciones conservadoras de este tipo, por ejemplo, sustituciones de regiones enteras que tienen características similares de hidrofobicidad, se conocen en la técnica.

La variante TWEAKR puede ser idéntica en al menos aproximadamente 70% en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de TWEAKR nativa; la variante de TWEAKR puede ser idéntica al menos aproximadamente en un 80% en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de TWEAKR nativo. La variante TWEAKR puede ser idéntica al menos en un 90% en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de TWEAKR nativo; la variante de TWEAKR puede ser idéntica al menos aproximadamente en un 95% en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de TWEAKR nativo. La variante TWEAKR puede ser idéntica al menos en un 98% en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de TWEAKR nativo; la variante de TWEAKR puede ser idéntica al menos en un 99% en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de TWEAKR nativo. El porcentaje de identidad, en el caso tanto de polipéptidos como de ácidos nucleicos, puede determinarse por inspección visual. El porcentaje de identidad puede determinarse también utilizando el método de alineación de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443, 1970) como ha sido revisado por Smith y Waterman (Adv. Appl. Math 2: 482, 1981). Preferiblemente, el porcentaje de identidad se determina utilizando un programa de computadora, por ejemplo la versión 10.x del programa de computadora GAP, disponible del Genetics Computer Group (GCG; Madison, WI, véase también Devereux et al., Nucl. Acids Res. 12: 387, 1984). Los parámetros preferidos por defecto para el programa GAP incluyen: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para desidentidades) para nucleótidos, y la matriz de comparación ponderada de Gribskov y Burgess, Nucl. Acids Res. 14: 6745, 1986, como ha sido descrita por Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, págs. 353-358, 1979 para aminoácidos; (2) una penalidad de 30 (aminoácidos) o 50 (nucleótidos) por cada laguna y una penalidad adicional de 1 (aminoácidos) o 3 (nucleótidos) por cada símbolo en cada laguna; (3) ausencia de penalidad por lagunas terminales; y (4) ausencia de penalidad máxima por lagunas largas. Pueden utilizarse también otros programas

utilizados por un experto en la técnica de comparación de secuencias. Para fragmentos de TWEAKR, el porcentaje de identidad se calcula basándose en la porción de TWEAKR que está presente en el fragmento.

5 La presente invención abarca además el uso de polipéptidos TWEAKR solubles con o sin glicosilación asociada del patrón nativo. El TWEAKR expresado en sistemas de expresión de levadura o de mamífero (v.g., células COS-1 o COS-7) puede ser similar a o significativamente diferente de un polipéptido TWEAKR nativo en peso molecular y patrón de glicosilación, dependiendo de la elección del sistema de expresión. La expresión de polipéptidos TWEAKR en sistemas de expresión bacteriana, tales como *E. coli*, proporciona moléculas no glicosiladas. Células hospedadoras diferentes pueden proporcionar también diferencialmente polipéptidos, dando como resultado 10 mezclas heterogéneas de polipéptidos con términos N o C variables.

15 La estructura primaria de aminoácidos de los polipéptidos TWEAKR solubles puede modificarse para crear derivados por formación de conjugados covalentes o agregados con otros restos químicos, tales como grupos glicosilo, lípidos, fosfato, grupos acetilo y análogos. Los derivados covalentes de TWEAKR pueden prepararse por enlace de grupos funcionales particulares a cadenas laterales de aminoácidos de TWEAKR o al término N o el término C de un polipéptido TWEAKR.

20 Polipéptidos de fusión de TWEAKR soluble que son útiles en la práctica de la invención incluyen también conjugados covalentes o agregados de un polipéptido TWEAKR con otros polipéptidos añadidos para proporcionar entidades polifuncionales nuevas.

C. Anticuerpos Receptores de TWEAK

25 Se describen en esta memoria epítopes antigénicos del dominio extracelular TWEAKR. Tales epítopes son útiles para generar anticuerpos, y en particular los anticuerpos monoclonales bloqueantes descritos con mayor detalle más adelante. Tales epítopes o variantes de los mismos pueden producirse utilizando métodos bien conocidos en la técnica tales como síntesis en fase sólida, escisión química o enzimática de un polipéptido, o utilización de morfología de DNA recombinante.

30 La invención reivindicada abarca composiciones y usos de anticuerpos que son inmunorreactivos con polipéptidos TWEAKR. Tales anticuerpos "se fijan específicamente" a polipéptidos TWEAKR, lo que significa que los mismos se fijan por sitios de fijación de antígeno del anticuerpo en comparación con las interacciones de fijación inespecíficas. Los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se utilizan en esta memoria en su sentido más amplio, e incluyen, sin limitación, anticuerpos monoclonales y policlonales intactos así como fragmentos tales como fragmentos Fv, Fab, y F(ab')₂, anticuerpos monocatenarios tales como scFv, y diversas combinaciones de cadenas. Los anticuerpos de la presente invención son preferiblemente humanizados, y más preferiblemente humanos. Los anticuerpos se pueden 35 preparar utilizando una diversidad de métodos bien conocidos que incluyen, sin limitación, inmunización de animales que tienen repertorios inmunes nativos o transgénicos, presentación de fago, hibridoma y cultivo de células recombinantes, así como biorreactores transgénicos vegetales y animales.

40 Pueden prepararse anticuerpos tanto policlonales como monoclonales por técnicas convencionales. Véase, por ejemplo, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet et al. (eds.), Plenum Press, Nueva York (1980); y *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Land (eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988).

45 Se contemplan también en esta memoria líneas de células de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales específicos para los polipéptidos de la invención. Tales hibridomas se pueden producir e identificar por técnicas convencionales. Un método para producción de una línea de células de hibridoma de este tipo comprende inmunizar un animal con un polipéptido, recoger células del bazo del animal inmunizado, fusionar dichas células de bazo a una línea de células de mieloma, generando con ello células de hibridoma, e identificar una línea de células de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se fija al polipéptido. Los anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas pueden recuperarse por técnicas convencionales.

55 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, v.g. versiones "humanizadas" de anticuerpos producidos originalmente en ratones u otras especies no humanas. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo elaborado por ingeniería genética que comprende típicamente la región variable de un anticuerpo no humano (v.g., murino), o al menos regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) del mismo, y las porciones de inmunoglobulina residuales derivadas de un anticuerpo humano. Procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales quiméricos y elaborados adicionalmente por ingeniería genética incluyen los descritos en Riechmann et al. (*Nature* 332:323, 1988), Liu et al. (*PNAS* 84:3439, 1987), Larrick et al. (*Bio/Technology* 7:934, 1989), y Winter y Harris (*TIPS* 14:139, mayo 1993). Tales anticuerpos humanizados se 60 pueden preparar por técnicas conocidas y ofrecen la ventaja de una inmunogenicidad reducida cuando los anticuerpos se administran a humanos.

Procedimientos que se han desarrollado para generación de anticuerpos humanos en animales no humanos pueden emplearse en la producción de anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser parcialmente humanos o preferiblemente completamente humanos. Por ejemplo, se pueden emplear ratones transgénicos en los cuales se ha introducido material genético que codifica una o más cadenas de inmunoglobulina humana. Tales ratones pueden estar alterados genéticamente de diversas maneras. La manipulación genética puede dar como resultado cadenas de polipéptidos de inmunoglobulina humanas que reemplacen a cadenas de inmunoglobulina endógenas en al menos algunos, y de modo preferible virtualmente en todos los anticuerpos producidos por el animal después de la inmunización.

Se han preparado ratones en los cuales uno o más genes de inmunoglobulina endógenos han sido desactivados por diversos medios. Se han introducido genes de inmunoglobulina humana en los ratones a fin de reemplazar los genes de ratón desactivados. Los anticuerpos producidos en los animales incorporan cadenas de polipéptidos de inmunoglobulina humanas codificadas por el material genético humano introducido en el animal. Ejemplos de técnicas para producción y uso de tales animales transgénicos a fin de producir anticuerpos (que se denominan a veces "anticuerpos transgénicos") se describen en las Patentes U.S. Núms. 5.814.318, 5.569.825, y 5.545.806.

D. Enfoques Inhibidores Antisentido, de Ribozima, y de Triple Hélice

La modulación de la angiogénesis en un tejido o grupo de células puede mejorarse también por disminución del nivel de expresión del gen TWEAKR y/o de la interacción receptor-ligando TWEAK por utilización de secuencias del gen receptor o ligando de TWEAK en asociación con métodos bien conocidos antisentido, de "desactivación de genes", de ribozima y/o de triple hélice a fin de disminuir el nivel de expresión del receptor o ligando de TWEAK. Entre los compuestos que pueden exhibir la capacidad para modular la actividad, expresión o síntesis del receptor o ligando de TWEAK, con inclusión de la capacidad para modular la angiogénesis, se encuentran moléculas antisentido, de ribozima, y de triple hélice. Tales moléculas pueden diseñarse para reducir o inhibir la actividad de genes intactos, o en caso apropiado, de genes diana mutantes. Métodos para la producción y uso de tales moléculas son bien conocidos por los expertos en la técnica.

E. Producción Recombinante de Polipéptidos del Receptor TWEAK

Polipéptidos TWEAK, con inclusión de polipéptidos TWEAKR solubles, fragmentos, y polipéptidos de fusión, utilizados en la presente invención se pueden preparar utilizando un sistema de expresión recombinante. Células hospedadoras transformadas con un vector de expresión recombinante ("células hospedadoras recombinantes") que codifican el polipéptido TWEAKR se cultivan en condiciones que promueven la expresión de TWEAKR y se recupera el TWEAKR. También pueden producirse polipéptidos TWEAKR en plantas o animales transgénicos, o por síntesis química.

Se describen en esta memoria moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos TWEAKR utilizados en la invención, que incluyen: (a) ácidos nucleicos que codifican los residuos 28-79 de SEQ ID NO: 7 y fragmentos de los mismos que fijan TWEAK; (b) ácidos nucleicos que son idénticos al menos en un 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, ó 99% a un ácido nucleico de (a), y que codifican un polipéptido capaz de fijar TWEAK; y (c) ácidos nucleicos que se hibridan a severidad moderada a un ácido nucleico de (a), y que codifican un polipéptido capaz de fijar TWEAK.

Debido a la degeneración del código genético, puede existir una variación considerable en las secuencias de nucleótidos que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Se describen secuencias de ácido nucleico capaces de hibridarse en condiciones de severidad moderada (v.g., solución de prelavado de 5 x SSC, 0,5% SDS, EDTA 1,0 mM (pH 8,0) y condiciones de hibridación de 50°C, 5 x SSC, durante una noche) a las secuencias de DNA que codifican TWEAKR. El especialista experto puede determinar combinaciones adicionales de sal y temperatura que constituyen severidad de hibridación moderada (véase también, Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982; y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons, 1989 y versiones posteriores). Condiciones de mayor severidad incluyen temperaturas más altas para la hibridación y lavados post-hibridación, y/o concentración menor de sales. El porcentaje de identidad de los ácidos nucleicos se puede determinar utilizando los métodos arriba descritos para los polipéptidos, es decir, por métodos que incluyen inspección visual y el uso de programas de computadora tales como GAP.

Cualquier sistema de fusión adecuado puede emplearse para la producción de TWEAKR recombinante. Vectores de expresión recombinante incluyen DNA que codifica un polipéptido TWEAKR enlazado operativamente a secuencias de nucleótidos adecuadas reguladoras de la transcripción y la traducción, tales como las derivadas de un gen de mamífero, microbio, virus o insecto. Las secuencias de nucleótidos se enlazan operativamente cuando la secuencia reguladora está relacionada funcionalmente con la secuencia de DNA de TWEAKR. Así, una secuencia de nucleótido promotor se enlaza operativamente a una secuencia de DNA de TWEAKR si la secuencia de nucleótidos del promotor controla la transcripción de la secuencia del DNA de TWEAKR. Ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores de transcripción, operadores, o intensificadores, un sitio de fijación de ribosoma de mRNA y secuencias apropiadas que controlan la iniciación y terminación de la transcripción y la traducción. Una secuencia

que codifica un péptido de señal apropiado (nativo o heterólogo) puede incorporarse en vectores de expresión. Una secuencia de DNA para un péptido de señal (a la que se hace referencia por una diversidad de nombres que incluyen conductor de la secreción, péptido conductor, o simplemente conductor) puede fusionarse en marco a la secuencia de TWEAKR de tal manera que el polipéptido TWEAKR se traduce inicialmente como una proteína de fusión que comprende el péptido de señal. Un péptido de señal que es funcional en las células hospedadoras deseada promueve la secreción extracelular del polipéptido TWEAKR. El péptido de señal se escinde del polipéptido TWEAKR después de la secreción de TWEAKR por la célula.

Células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptidos TWEAKR incluyen procariotas, células de levadura y células eucariotas superiores, con inclusión de células de insecto y de mamífero. Vectores apropiados de clonación y expresión para uso con hospedadores bacterianos, fúngicos, de levadura, de insecto, y de mamífero se describen, por ejemplo, en Pouwels et al. Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, Nueva York, 1985.

Los procariotas incluyen organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, *E. coli* o *Bacilli*. Células hospedadoras procariotas adecuadas para transformación incluyen, por ejemplo, *E. coli*, *Baillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y diversas otras especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*. En una célula hospedadora procariota, tal como *E. coli*, los polipéptidos TWEAKR pueden incluir un residuo metionina N-terminal para facilitar la expresión del polipéptido recombinante en la célula hospedadora procariota. El Met del terminal N puede escindirse del polipéptido recombinante expresado.

Vectores de expresión para uso en células hospedadoras procariotas comprenden generalmente uno o más genes marcadores fenotípicos seleccionables. Un gen marcador fenotípico seleccionable es, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a los antibióticos o que suministra un requerimiento autotrófico. Ejemplos de vectores de expresión útiles para células hospedadoras procariotas incluyen los derivados de plásmidos disponibles comercialmente tales como el vector de clonación pBR322 (ATCC 37017). pBR322 contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina y proporciona así medios simples para identificación de células transformadas. Un promotor apropiado y una secuencia de DNA de TWEAKR se insertan en el vector pBR322. Otros vectores disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo, pKK223-3, (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, EE.UU.).

Secuencias promotoras utilizadas comúnmente para vectores de expresión recombinantes de células hospedadoras procariotas incluyen β -lactamasa (penicilinas), el sistema promotor de lactosa (Chang et al., Nature 275:615, 1978; Goeddel et al., Nature 281:544, 1979), el sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8:4057, 1980; EP-A-36776) y el promotor *tac* (Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, p. 412, 1982). Un sistema de expresión en células hospedadoras procariotas particularmente útil emplea un promotor P_L del fago λ y una secuencia represora termolábil cl857ts. Vectores de plásmido disponibles de la American Type Culture Collection que incorporan derivados del promotor P_L de λ incluyen el plásmido pHUB2 (residente en la cepa de *E. coli* JMB9, ATCC 37092) y pPLc28 (residente en *E. coli* RR1, ATCC 53082).

Los polipéptidos TWEAKR pueden expresarse también en células hospedadoras de levadura, preferiblemente del género *Saccharomyces* (v.g., *S. cerevisiae*). Pueden emplearse también otros géneros de levadura, tales como *Pichia* o *Kluyveromyces*. Los vectores de levadura contendrán a menudo una secuencia origen de replicación de un plásmido de levadura 2 μ , una secuencia de replicación autónoma (ARS), una región promotora, secuencias para poliadenilación, secuencias para terminación de la transcripción, y un gen marcador seleccionable. Secuencias promotoras adecuadas para vectores de levadura incluyen, entre otros, promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato-quinasa (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255:2073, 1980) u otras enzimas glicolíticas (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7:149, 1968; Holland et al., Biochem. 17: 4900, 1978), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato-descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato-isomerasa, 3-fosfoglicerato-mutasa, piruvato-quinasa, triosafosfato-isomerasa, fosfo-glucosa-isomerasa, y glucoquinasa. Otros vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levadura se describen adicionalmente en Hitzeman, EP-73657. Otra alternativa es el promotor ADH2 reprimible por glucosa descrito por Russell et al. (J. Biol. Chem. 258:2674, 1982) y Beier et al. (Nature 300:724, 1982). Vectores lanzadera replicables tanto en levadura como en *E. coli* pueden construirse por inserción de secuencias de DNA de pBR322 para selección y replicación en *E. coli* (gen Amp^r y origen de replicación) en los vectores de levadura descritos anteriormente.

La secuencia conductora del factor α de levadura puede emplearse para dirigir la secreción de polipéptidos recombinantes. La secuencia conductora del factor α se inserta a menudo entre la secuencia promotora y la secuencia del gen estructural. Véase, v.g., Kurjan et al., Cell 30:933, 1982; Bitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5330, 1984. Otras secuencias conductoras adecuadas para facilitar la secreción de polipéptidos recombinantes por células de levadura son conocidas por los expertos en la técnica. Una secuencia conductora puede modificarse cerca de su extremo 3' para contener uno o más sitios de restricción. Esto facilitará la fusión de la secuencia conductora al gen estructural.

Protocolos de transformación de levadura son conocidos por los expertos en la técnica. Otro protocolo de este tipo ha sido descrito por Hinnel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929, 1978. El protocolo de Hinnel et al. selecciona

transformantes Trp⁺ en un medio selectivo, en donde el medio selectivo está constituido por 0,67% de base nitrogenada de levadura, 0,5% de casaminoácidos, 2% de glucosa, 10 µg/ml de adenina y 20 µg/ml de uracilo.

Las células hospedadoras de levadura transformadas por vectores que contienen una secuencia promotora ADH2 pueden cultivarse para inducir la expresión en un medio "rico". Un ejemplo de un medio rico es uno que consiste en 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, y 1% de glucosa complementada con 80 µg/ml de adenina y 80 µg/ml de uracilo. La desrepresión del promotor ADH2 ocurre cuando se agota la glucosa del medio.

Pueden emplearse también sistemas de cultivo de células hospedadoras de insecto para expresar polipéptidos TWEAKR recombinantes, con inclusión de polipéptidos TWEAKR solubles. Sistemas de baculovirus para producción de polipéptidos heterólogos en células de insecto han sido revisados por Luckow y Summers, *Bio/Technology* 6:47, 1988.

Las células de mamífero son particularmente preferidas para uso como células hospedadoras. Ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., *Cell* 23: 175, 1981), células L, células C127, células 3T3, (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa y líneas de células BHK (ATCC CR L10), y la línea de células CV1/EBNA derivada de la línea de células de riñón de mono verde africano CV1 (ATCC CCL 70) como ha sido descrito por McMahan et al. (*EMBO J.* 10:2821, 1991). Para la producción de polipéptidos terapéuticos es particularmente ventajoso utilizar una línea de células hospedadoras de mamífero que se ha adaptado para crecer en un medio que no contiene proteínas animales.

Se han descrito métodos establecidos para introducir DNA en células de mamífero (Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, págs. 15-69). Protocolos adicionales que utilizan reactivos disponibles comercialmente, tales como Lipofectamine (Gibco/BRL) o Lipofectamine-Plus, pueden utilizarse para transfectar células (Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413, 1987). Adicionalmente, puede utilizarse electroporación para transfectar células de mamífero utilizando procedimientos convencionales, tales como los indicados en Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición, vol. 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). La selección de transformantes estables puede realizarse utilizando métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, resistencia a fármacos citotóxicos. Kaufman et al., *Meth. Enzymology* 185: 487, 1990, describe varios esquemas de selección, tales como la resistencia a dihidrofolato-reductasa (DHFR). Una cepa hospedadora adecuada para selección de DHFR puede ser la cepa de CHO DX-BOC, que es deficiente en DHFR (Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216, 1980). Un plásmido que expresa cDNA de DHFR puede introducirse en la cepa DX-B11, y únicamente las células que contienen el plásmido podrán crecer en el medio selectivo apropiado. Otros ejemplos de marcadores seleccionables que pueden incorporarse en un vector de expresión incluyen cDNAs que confieren resistencia a antibióticos, tales como G218 e higromicina B. Las células que albergan el vector pueden seleccionarse sobre la base de la resistencia a estos compuestos.

Secuencias de control de la transcripción y la traducción para vectores de expresión en células hospedadoras de mamífero pueden escindirse de genomas virales. Secuencias de promotores y secuencias intensificadoras utilizadas comúnmente se derivan de virus de polioma, adenovirus 2, virus 40 de los simios (SV40), y citomegalovirus humano.

Pueden utilizarse secuencias de DNA derivadas del genoma viral de SV40, por ejemplo, el origen, el promotor temprano y tardío, el intensificador, el modulador, y los sitios de poliadenilación de SV40 para proporcionar otros elementos genéticos para expresión de una secuencia de gen estructural en una célula hospedadora de mamífero. Los promotores virales precoz y tardío son particularmente útiles debido a que ambos se obtienen fácilmente de un genoma viral como un fragmento, que puede contener también un origen de replicación viral (Fiers et al., *Nature* 273:113, 1978; Kaufman, *Meth. in Enzymology*, 1990). Pueden utilizarse también fragmentos de SV40 menores o mayores, con tal que esté incluida la secuencia de aproximadamente 250 pares de bases que se extiende desde el sitio *Hind* III hacia el sitio *Bgl* I localizado en el sitio del origen de replicación viral de SV40.

Secuencias de control adicionales que se ha demostrado mejoran la expresión de genes heterólogos de vectores de expresión de mamífero incluyen elementos tales como el elemento de la secuencia aumentadora de la expresión (EASE) derivado de células CHO (Morris et al., *Animal Cell Technology*, 1997, págs. 529-534) y el conductor tripartito (TPL) y RNAs del gen VA del Adenovirus 2 (Gingeras et al., *J. Biol. Chem.* 257:13475, 1982). Las secuencias del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) de origen viral permiten que se traduzcan eficientemente mRNAs dicistrónicas (Oh y Samow, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:295, 1993; Ramesh et al., *Nucleic Acids Research* 24:2697, 1996). Se ha demostrado que la expresión de un cDNA heterólogo como parte de un mRNA dicistrónico seguida por el gen para un marcador seleccionable (v.g. DHFR) mejora la transfectabilidad del hospedador y la expresión del cDNA heterólogo (Kaufman, *Meth. in Enzymology*, 1990). Vectores de expresión ilustrativos que emplean mRNAs dicistrónicas son pTR-DC/GFP descrito por Mosser et al., *Biotechniques* 22:150, 1997, y p2A51 descrito por Morris et al., *Animal Cell Technology*, 1997, págs. 529-534.

Un vector útil de alta expresión, pCAVNOT, ha sido descrito por Mosley et al., *Cell* 59: 335, 1989. Otros vectores de expresión para uso en células hospedadoras de mamífero pueden construirse como ha sido descrito por Okayama y

Berg (Mol. Cell. Biol. 3: 280, 1983). Un sistema útil para expresión estable de alto nivel de cDNAs de mamífero en células epiteliales mamarias de murino C127 puede construirse sustancialmente como ha sido descrito por Cosman et al. (Mol. Immunol. 23: 935, 1986). Un vector útil de alta expresión, PMLSV N1/N4, descrito por Cosman et al., Nature 312: 768, 1984, ha sido depositado como ATCC 39890. Vectores útiles adicionales de expresión de mamífero se conocen en la técnica.

Con relación a péptidos de señal que pueden emplearse en la producción de polipéptidos TWEAKR, se puede utilizar el péptido de señal TWEAKR nativo o bien puede reemplazarse el mismo por un péptido de señal o secuencia de señal heterólogo(a), en caso deseado. La elección del péptido de señal o conductor puede depender de factores tales como el tipo de células hospedadoras en las cuales vaya a producirse el TWEAKR recombinante. Ejemplos de péptidos de señal heterólogos que son funcionales en células hospedadoras de mamífero incluyen la secuencia de señal para interleuquina-7 (IL-7) descrita en la Patente de Estados Unidos 4.965.195, la secuencia de señal para el receptor de interleuquina-2 descrita en Cosman et al., Nature 312: 768 (1984); el péptido de señal del receptor de interleuquina-4 descrito en EP 367566; el péptido de señal del receptor de interleuquina-1 tipo I descrito en la patente U.S. 4.968.607; y el péptido de señal del receptor de interleuquina-1 tipo II descrito en EP 460.846.

Utilizando las técnicas de DNA recombinante que incluyen mutagénesis y la reacción en cadena de polimerasa (PCR), el profesional experto puede producir secuencias de DNA que codifican polipéptidos TWEAKR que comprenden diversas adiciones o sustituciones de residuos o secuencias de aminoácidos, o deleciones de residuos o secuencias terminales o internos, que incluyen fragmentos, variantes, derivados, y polipéptidos de fusión de TWEAKR.

Animales transgénicos, con inclusión de ratones, cabras, ovejas, y cerdos transgénicos, así como plantas transgénicas, que incluyen tabaco, tomate, legumbres, céspedes, y semillas, pueden utilizarse también como biorreactores para la producción de polipéptidos TWEAKR, con inclusión de polipéptidos TWEAKR solubles. En el caso de los animales transgénicos, es particularmente ventajoso construir un DNA quimérico que incluye una secuencia codificante de TWEAKR enlazada operativamente a secuencias reguladoras de acción cis que promueven la expresión del TWEAKR soluble en leche y/u otros fluidos corporales (véase, v.g., la Patente U.S. No. 5.843.605; y la Patente U.S. No. 5.880.327). En el caso de las plantas transgénicas, es particularmente ventajoso producir TWEAKR en un tipo de célula, tejido, u órgano particular (véase, v.g., la Patente U.S. No. 5.639.947; y la Patente U.S. No. 5.889.189).

El profesional experto reconocerá que el procedimiento para purificación de polipéptidos TWEAKR solubles expresados variará de acuerdo con el sistema hospedador empleado, y de si se secreta o no el polipéptido recombinante. Polipéptidos TWEAKR solubles pueden purificarse utilizando métodos conocidos en la técnica, que incluyen uno o más pasos de concentración, salificación, intercambio iónico, interacción hidrófoba, purificación por afinidad, HPLC, o de cromatografía de exclusión por tamaños. Los polipéptidos de fusión que comprenden restos Fc (y multímeros formados a partir de ellos) ofrecen la ventaja de una purificación fácil por cromatografía de afinidad en columnas de proteína A o proteína G.

F. Métodos de Tratamiento/Usos Médicos

Se describen a continuación métodos y composiciones que emplean el receptor o ligando TWEAK, o los genes que codifican el receptor o ligando TWEAK, a fin de promover o suprimir la angiogénesis en un tejido o grupo de células diana. Debe entenderse que los términos "tratar", "tratando", "tratamiento", "terapia", "terapéutico", y análogos incluyen terapia preventiva, terapia profiláctica, terapia de mejora y terapia curativa.

Los polipéptidos, composiciones, y métodos expuestos se utilizan para inhibir la angiogénesis u otras respuestas mediadas por TWEAKR en un mamífero que precisa dicho tratamiento. El término "respuesta mediada por TWEAKR" incluye cualquier respuesta celular, fisiológica, o biológica de otro tipo que está causada al menos en parte por la fijación del ligando TWEAK a TWEAKR o que puede inhibirse o suprimirse, total o parcialmente, por bloqueo de la fijación de TWEAK a TWEAKR. El tratamiento se administra ventajosamente a fin de prevenir el comienzo o la recurrencia de una enfermedad o afección mediada por angiogénesis, o para tratar un mamífero que padece una enfermedad o afección mediada por angiogénesis. Enfermedades o afecciones mediadas por angiogénesis incluyen, pero sin carácter limitante, trastornos oculares, afecciones malignas y metastásicas, y enfermedades inflamatorias.

Entre los trastornos oculares que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención se encuentran enfermedades oftálmicas caracterizadas por neovascularización ocular que incluyen, pero sin carácter limitante, retinopatía diabética, (una complicación importante de la diabetes), retinopatía de la premadurez (esta condición oftálmica devastadora, que conduce frecuentemente a problemas crónicos de visión e implica un riesgo elevado de ceguera, es una complicación grave durante la atención de los niños prematuros), glaucoma neovascular, retinoblastoma, fibroplasia retrolental, rubeosis, uveítis, degeneración macular, y neovascularización de injerto corneal. Otras enfermedades oftálmicas inflamatorias, tumores oculares, y enfermedades asociadas con neovascularización de la coroides o el iris pueden tratarse también de acuerdo con la presente invención.

La presente invención puede ser útil también para tratamiento de afecciones malignas y metastásicas tales como tumores sólidos. Los tumores sólidos incluyen sarcomas y carcinomas tanto primarios como metastásicos.

5 La presente invención puede ser útil también para el tratamiento de enfermedades inflamatorias que incluyen, pero sin carácter limitante, artritis, reumatismo, y psoriasis.

10 Otras enfermedades o afecciones que pueden tratarse de acuerdo con el uso de la presente invención incluyen tumores benignos y condiciones preneoplásticas, angiogénesis miocárdica, articulaciones hemofílicas, escleroderma, adhesiones vasculares, neovascularización de la placa aterosclerótica, telangiectasia, y granulación de las heridas.

15 Estados de enfermedad que son dependientes de angiogénesis incluyen aterosclerosis coronaria o periférica e isquemia de cualquier tejido u órgano, con inclusión del corazón, hígado, cerebro y análogos. Estos tipos de enfermedades pueden ser tratados por composiciones que promueven la angiogénesis.

20 Además de polipéptidos que comprenden un fragmento de dominio extracelular de TWEAKR, multímeros TWEAKR solubles y anticuerpos que se fijan al dominio extracelular de TWEAKR, pueden administrarse también otras formas de antagonistas de TWEAKR para conseguir un efecto terapéutico. Ejemplos de otras formas de antagonistas de TWEAKR incluyen otros anticuerpos tales como anticuerpos contra TWEAK, ácidos nucleicos antisentido, ribocimas, muteínas, aptámeros, y moléculas pequeñas dirigidas contra TWEAKR o contra TWEAK.

25 Los usos de acuerdo con la presente invención pueden testarse en modelos animales in vivo para confirmar la actividad profiláctica o terapéutica deseada, así como para determinar la dosificación terapéutica óptima, antes de la administración a humanos.

30 La cantidad de un antagonista de TWEAKR particular que puede ser eficaz en un uso médico particular depende de la edad, el tipo y la gravedad de la afección a tratar, el peso corporal, la duración deseada del tratamiento, el método de administración, y otros parámetros. Las dosis eficaces son determinadas por un doctor u otro profesional médico cualificado. Las dosis típicas eficaces son aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones preferidas, la dosificación es aproximadamente 0,1-50 mg/kg; en algunas realizaciones preferidas, la dosificación es aproximadamente 0,5-10 mg/kg. La dosificación para administración local es típicamente menor que para administración sistémica. En algunas realizaciones, es suficiente una sola administración; en algunas realizaciones el antagonista de TWEAKR se administra como dosis múltiples a lo largo de uno o más días.

40 Los antagonistas de TWEAKR se administran típicamente en la forma de una composición farmacéutica que comprende uno o más portadores farmacológicamente aceptables. Portadores farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, cargas, adyuvantes, excipientes, y vehículos que son aceptables farmacéuticamente para la ruta de administración, y pueden ser suspensiones acuosas u oleaginosas formuladas utilizando agentes dispersantes, humectantes, y de suspensión adecuados.

45 Los portadores farmacéuticamente aceptables son generalmente estériles y están exentos de agentes pirogénicos, pudiendo incluir agua, aceites, disolventes, sales, azúcares y otros carbohidratos, agentes emulsionantes, agentes tampón, agentes antimicrobianos, y agentes quelantes. El portador particular farmacéuticamente y la ratio de compuesto activo a portador están determinados por la solubilidad y las propiedades químicas de la composición, el modo de administración, y la práctica farmacéutica estándar.

50 Las composiciones que se describen en esta memoria pueden estar contenidas en un vial, botella, tubo, jeringuilla, inhalador u otro recipiente para administraciones simples o múltiples. Tales recipientes pueden estar hechos de vidrio o un material polímero tal como polipropileno, polietileno, o poli(cloruro de vinilo), por ejemplo. Recipientes preferidos pueden incluir un sello, u otro sistema de cierre, tal como un tapón de caucho que puede ser atravesado por una aguja a fin de extraer una dosis simple y cerrarse luego de nuevo herméticamente después de la retirada de la aguja. La totalidad de tales recipientes para líquidos inyectables, formulaciones liofilizadas, formulaciones liofilizadas reconstituidas o polvos reconstituibles para inyección conocidos en la técnica o para la administración de composiciones aerosolizadas se contemplan para uso en las composiciones y métodos expuestos en esta memoria.

60 Los antagonistas de TWEAKR se administran al paciente de una manera apropiada para la afección. Así, por ejemplo, un antagonista de TWEAKR, o una composición farmacéutica del mismo, se puede administrar por vía intravenosa, transdérmica, intradérmica, intraperitoneal, intramuscular, intranasal, epidural, oral, tópica, subcutánea, intracavitaria, liberación sostenida de implantes, rutas peristálticas, o cualquier otra técnica adecuada. Se prefiere la administración parenteral.

65 En ciertas realizaciones de la invención reivindicada, el uso comprende adicionalmente la utilización de uno o más agentes quimioterapéuticos adicionales. Los agentes quimioterapéuticos adicionales se pueden administrar antes

de, simultáneamente a , o después de la administración del antagonista de TWEAKR. El uso de más de un agente quimioterapéutico es particularmente ventajoso cuando el mamífero que se está tratando padece tumor sólido. En algunas realizaciones de la invención reivindicada, el tratamiento comprende adicionalmente el uso de radiación. La radiación, con inclusión de braquiterapia y teleterapia, puede administrarse antes de, simultáneamente a, o después de la administración del segundo o segundos agentes quimioterapéuticos y/o el antagonista de TWEAKR.

Cuando el mamífero que se está tratando padece un tumor sólido, el uso incluye preferiblemente además de un antagonista de TWEAKR, uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados del grupo constituido por agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de vinca y otros agentes quimioterapéuticos derivados de plantas, nitrosoureas, antibióticos antitumorales, enzimas antitumorales, inhibidores de topoisomerasas, análogos de platino, supresores adrenocorticales, hormonas, agonistas y antagonistas de hormonas, anticuerpos, agentes inmunoterapéuticos, factores de las células de la sangre, agentes radioterapéuticos, y modificadores de la respuesta biológica.

En algunas realizaciones preferidas, el uso incluye, además de un antagonista de TWEAKR, uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados del grupo constituido por cisplatino, ciclofosfamida, mecloretamina, melfalán, bleomicina, carboplatino, fluorouracilo, 5-fluorodesoxiuridina, metotrexato, taxol, asparaginasa, vincristina, y vinblastina, linfoquinas y citoquinas tales como interleuquinas, interferones (con inclusión de alfa, beta, o delta), y TNF, clorambucil, busulfán, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, dacarbacina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, vindesina, etoposido, teniposido, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, L-asparaginasa, hidroxiaurea, metilhidracina, mitotano, tamoxifeno, y fluoximesterona.

En algunas realizaciones preferidas el uso incluye, además de un antagonista de TWEAKR, uno o más agentes quimioterapéuticos, con inclusión de formas solubles diversas de los mismos, seleccionados del grupo constituido por ligando Flt3, ligando CD40, interleuquina-2, interleuquina-12, ligando 4-1BB, anticuerpos anti-4-1BB, antagonistas de TNF y antagonistas del receptor de TNF, TRAIL, antagonistas de VEGF, antagonistas del receptor de VEGF (con inclusión de VEGF-R1 y VEGF-R2, conocidos también como Flt1 y Flk1 o KDR), antagonistas de Tek, y agonistas de CD148 (a los que se hace referencia también como DEP-1, ECRTF, y PTPRJ, véase Takahashi et al., J. Am. Soc. Nephrol. 10: 2135-45, 1999). En algunas realizaciones preferidas, los antagonistas de TWEAKR de la invención se utilizan como un componente de, o en combinación con, "terapia metronómica", tal como la descrita por Browder et al. y Klement et al., (Cancer Research 60: 1878, 2000; J. Clin. Invest. 150(8): R15, 2000; véase también Barinaga, Science 288:245, 2000).

Los polipéptidos, composiciones, y métodos pueden utilizarse como un tratamiento de primera línea, para el tratamiento de una enfermedad residual después de la terapia primaria, o como adjunto a otras terapias que incluyen quimioterapia, cirugía, radiación, y otros métodos terapéuticos conocidos en la técnica.

Cuando las secuencias de ácido nucleico se proporcionan de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria, es ventajoso utilizar un mecanismo de suministro de tal modo que las secuencias se incorporen: en una célula para expresión. Sistemas de suministro que pueden emplearse ventajosamente en los métodos contemplados incluyen el uso de, por ejemplo, sistemas de suministro virales tales como vectores de retrovirus y adenovirus, así como sistemas de suministro no virales. Tales sistemas de suministro son bien conocidos por los expertos en la técnica.

G. Métodos de Cribado

El receptor TWEAK como se describe en esta memoria puede utilizarse en una diversidad de métodos de cribado para aislar, por ejemplo, agonistas y antagonistas de TWEAKR. Los agonistas de TWEAKR son compuestos que promueven la actividad biológica de TWEAKR y los antagonistas de TWEAKR son compuestos que inhiben la actividad biológica de TWEAKR. Los compuestos identificados por los ensayos de cribado siguientes pueden utilizarse en composiciones y métodos para modulación de la angiogénesis a fin de tratar una diversidad de estados de enfermedad. La presente exposición proporciona métodos de cribado para compuestos que (a) modulan la expresión del receptor del gen o ligando de TWEAK en un tejido o célula diana, (2) modulan la interacción receptor-ligando TWEAK para regular la angiogénesis; (3) se fijan al receptor o ligando de TWEAK para influir en la angiogénesis; o (4) interfieren con o regulan la influencia del complejo receptor-ligando TWEAK fijado en eventos aguas abajo tales como la angiogénesis.

La presente invención contempla el uso de ensayos que están diseñados para identificar compuestos que modulan la actividad de un gen receptor o ligando de TWEAK (es decir, modulan el nivel de expresión del gen TWEAK y/o modulan el nivel de actividad del producto del gen TWEAK). Adicionalmente, pueden utilizarse ensayos que identifican compuestos que se fijan a las secuencias reguladoras del gen TWEAK (v.g., secuencias promotoras; véase v.g., Platt, 1994, J. Biol. Chem. 269, 28558-28562), y que pueden modular el nivel de expresión del gen TWEAK.

Un ensayo de este tipo puede implicar, por ejemplo, el uso de un sistema de control, en el cual ocurre la transcripción y traducción del gen receptor o ligando de TWEAK, en comparación con un sistema de que incluye un compuesto de test sospechoso de influir en la transcripción o traducción normal de un gen TWEAK. Por ejemplo, podría determinarse la tasa de RNA del Receptor TWEAK producido por células cardíacas, y utilizar esto para determinar si un compuesto de test influye en dicha tasa. Para evaluar la influencia de un compuesto de test sospechoso de influir en esta tasa de transcripción normal, podría determinarse primeramente la tasa de producción de RNA del Receptor TWEAK en un cultivo de células cardíacas mediante, por ejemplo, Transferencia Northern. Podría administrarse luego el compuesto de test a un cultivo de células cardíacas en condiciones idénticas por lo demás como el cultivo de control. Posteriormente, podría determinarse la tasa de RNA del Receptor TWEAK en el cultivo tratado con el compuesto de test mediante, por ejemplo, Transferencia Northern, y compararse con la tasa de RNA del Receptor TWEAK producido por las células del cultivo de control. Un aumento en el RNA del Receptor TWEAK en las células puestas en contacto con el compuesto de test con relación a las células de control es indicativo de un estimulador de la transcripción y/o traducción del gen del Receptor TWEAK en células cardíacas, mientras que una disminución es indicativa de un inhibidor de la transcripción y/o traducción del gen del Receptor TWEAK en las células cardíacas.

Existen una diversidad de otros métodos que pueden utilizarse para determinar el nivel de expresión de un gen receptor o ligando de TWEAK asimismo, y pueden utilizarse adicionalmente en ensayos para determinar la influencia de un compuesto de test sobre el nivel de expresión del gen receptor o ligando de TWEAK. Por ejemplo, RNA de un tipo de células o tejido que se sabe o se sospecha expresa el Receptor TWEAK o el ligando, gen, tal como cardíaco, puede aislarse y testarse utilizando hibridación o técnicas PCR. Las células aisladas pueden derivarse de cultivo de células o de un paciente. El análisis de las células tomadas de un cultivo puede ser un paso necesario en la evaluación de las células a utilizar como parte de una técnica de terapia génica basada en células o, alternativamente, para testar el efecto de compuestos sobre la expresión del gen receptor o ligando de TWEAK. Tales análisis pueden revelar aspectos tanto cuantitativos como cualitativos del patrón de expresión del gen receptor o ligando de TWEAK, que incluyen la activación o desactivación de la expresión del gen receptor o ligando de TWEAK.

Se describe en esta memoria un sistema de detección de este tipo, en el que una molécula de cDNA se sintetiza a partir de una molécula de RNA de interés (v.g., por transcripción inversa de la molécula de RNA en cDNA). Se utiliza luego una secuencia dentro de cDNA como el molde para una reacción de amplificación de ácido nucleico, tal como una reacción de amplificación PCR, o análoga. Los reactivos de ácido nucleico utilizados como reactivos de iniciación de la síntesis (v.g., cebadores) en los pasos de transcripción inversa y amplificación del ácido nucleico de este método se seleccionan de entre los segmentos de ácido nucleico del gen receptor o ligando de TWEAK descritos anteriormente. Las longitudes preferidas de tales reactivos de ácido nucleico son al menos 9-30 nucleótidos. Para la detección del producto amplificado, la amplificación del ácido nucleico puede realizarse utilizando nucleótidos marcados radiactivamente o no radiactivamente. Alternativamente, puede fabricarse un producto suficientemente amplificado de tal modo que el producto pueda visualizarse por tinción estándar con bromuro de etidio o por utilización de cualquier otro método adecuado de tinción de ácido nucleico.

Adicionalmente, es posible realizar dichos ensayos de expresión del gen receptor o ligando de TWEAK "in situ", es decir directamente sobre secciones tisulares (fijas y/o congeladas) de tejido del paciente obtenidas de biopsias o resecciones, de tal modo que no sea necesaria purificación alguna del ácido nucleico. Los segmentos de ácido nucleico del gen receptor o ligando de TWEAK arriba descritos pueden utilizarse como sondas y/o cebadores para tales procedimientos in situ (véase, por ejemplo, Nuovo, G.J., 1992. "PCR in Situ Hybridization Protocols and Applications", Raven Press, NY).

Los compuestos identificados por ensayos tales como los descritos en esta memoria pueden ser útiles, por ejemplo, en la modulación de la angiogénesis influenciada por la interacción receptor-ligando TWEAK. Tales métodos de estimulación o inhibición de la angiogénesis influenciada por TWEAK se exponen en esta memoria.

Alternativamente, pueden diseñarse sistemas de ensayo para identificar compuestos capaces de fijar el Receptor TWEAK o el polipéptido ligando de la invención e influir con ello en la angiogénesis resultante de esta interacción. Los compuestos identificados pueden ser útiles, por ejemplo, en la modulación de la vascularización de tejidos o células diana, pueden utilizarse en cribados para identificación de compuestos que interrumpen las interacciones normales receptor-ligando TWEAK, o pueden interrumpir por sí mismos dichas interacciones.

El principio de los ensayos utilizados para identificar compuestos que se fijan al receptor o ligando de TWEAK implica preparar una mezcla de reacción del receptor o ligando de TWEAK y el compuesto de test en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que los dos componentes interactúen y se unan, formando así un complejo que puede eliminarse y/o detectarse en la mezcla de la reacción. Estos ensayos pueden conducirse de diversas maneras. Por ejemplo, un método para conducir un ensayo de este tipo de cribado para compuestos que se fijan al Receptor TWEAK, podría implicar el anclaje del Receptor TWEAK o la sustancia de test en una fase sólida y detectar los complejos Receptor TWEAK/compuesto de test anclados en la fase sólida al final de la reacción. En un método de este tipo, el Receptor TWEAK puede anclarse a una superficie sólida, y el compuesto de test, que no

está anclado, puede marcarse, directa o indirectamente. Alternativamente, estos mismos métodos podrían utilizarse para cribado de compuestos de test que se fijan al ligando de TWEAK más bien que al receptor.

En la práctica, pueden utilizarse convenientemente placas de microtitulación como la fase sólida. El componente anclado puede inmovilizarse por uniones no covalentes o covalentes. La unión no covalente puede realizarse por recubrimiento simple de la superficie sólida con una solución de la proteína y secado. Alternativamente, un anticuerpo inmovilizado, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, específico para la proteína a inmovilizar puede utilizarse para anclar la proteína a la superficie sólida. Las superficies pueden prepararse con anterioridad y guardarse.

A fin de realizar el ensayo, el componente no inmovilizado se añade a la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Una vez completada la reacción, se retiran los componentes que no han reaccionado (v.g., por lavado) en condiciones tales que cualesquiera complejos formados queden inmovilizados en la superficie sólida. La detección de complejos anclados en la superficie sólida puede realizarse de varias maneras. En el caso de que el componente no inmovilizado previamente esté premarcado, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que se formaron complejos. En el caso de que el componente no inmovilizado previamente no esté premarcado, puede utilizarse un marcador indirecto para detectar los complejos anclados en la superficie; v.g. utilizando un anticuerpo marcado específico para el componente no inmovilizado previamente (el anticuerpo, a su vez, puede estar marcado directa o indirectamente con un anticuerpo anti-Ig marcado).

Alternativamente, puede conducirse una reacción en una fase líquida, separarse los productos de reacción de los componentes que no han reaccionado, y detectarse los complejos; v.g., utilizando un anticuerpo inmovilizado específico para el receptor o ligando de TWEAK o el compuesto de test para anclar cualesquiera complejos formados en solución, y un anticuerpo marcado específico para el otro componente del posible complejo a fin de detectar los complejos anclados.

Aquellos compuestos identificados como agentes de fijación para el Receptor TWEAK o el ligando de TWEAK pueden evaluarse adicionalmente en cuanto a su aptitud para interferir con la interacción receptor-ligando TWEAK. Tales compuestos pueden utilizarse luego terapéuticamente a fin de estimular o inhibir la angiogénesis.

Los polipéptidos receptores y ligandos de TWEAK pueden utilizarse también en un ensayo de cribado a fin de identificar compuestos y pequeñas moléculas que interaccionan específicamente con el receptor o ligando de TWEAK descrito a fin de inhibir (antagonizar) o aumentar (agonizar) la interacción entre estas moléculas. Así, por ejemplo, los polipéptidos de la invención pueden utilizarse para identificar antagonistas y agonistas de células, preparaciones exentas de células, bibliotecas químicas, y mezclas de productos naturales. Los antagonistas y agonistas pueden ser sustratos naturales o modificados, ligandos, enzimas, receptores, etc. de los polipéptidos de la presente invención, o pueden ser miméticos estructurales o funcionales de los polipéptidos. Antagonistas potenciales de la interacción receptor-ligando TWEAK de la presente invención puede incluir moléculas pequeñas, péptidos, y anticuerpos que se fijan a y ocupan un sitio de fijación de los polipéptidos, haciendo que los mismos están indisponibles para interaccionar y prevenir con ello su capacidad normal para modular la angiogénesis. Otros antagonistas potenciales son moléculas antisentido que pueden hibridarse al mRNA *in vivo* y bloquear la traducción del mRNA en los polipéptidos de la presente invención. Agonistas potenciales incluyen moléculas pequeñas, péptidos y anticuerpos que se fijan a los presentes polipéptidos de TWEAK e influyen en la angiogénesis tal como es causada por las interacciones descritas de los polipéptidos TWEAK de la presente invención.

Los agonistas y antagonistas de moléculas pequeñas tienen usualmente un peso molecular menor que 10 K y pueden poseer cierto número de propiedades fisicoquímicas y farmacológicas que mejoran la penetración celular, resisten la degradación y prolongan sus semividas fisiológicas. (Gibbs, "Pharmaceutical Research in Molecular Oncology", Cell, vol. 79, (1994).) Anticuerpos, que incluyen moléculas intactas así como fragmentos, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, se pueden utilizar para fijarse a e inhibir los polipéptidos de la presente invención por bloqueo del comienzo de una cascada de señalización. Es preferible que los anticuerpos sean humanizados, y más preferible que los anticuerpos sean humanos. Los anticuerpos se pueden preparar por cualquiera de una diversidad de métodos bien conocidos.

Se conocen en la técnica métodos específicos de cribado y muchos de ellos están incorporados extensamente en sistemas de test de alta capacidad de tal modo que puedan cribarse grandes números de compuestos de test en un periodo de tiempo breve. Los ensayos pueden realizarse en una diversidad de formatos, con inclusión de ensayos de fijación proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímicos, inmunoensayos, ensayos basados en células, etc. Estos formatos de ensayo son bien conocidos en la técnica. Los ensayos de cribado de la presente invención pueden utilizarse para cribado de bibliotecas de productos químicos y son adecuados para la identificación de fármacos candidato de molécula pequeña, anticuerpos, péptidos y otros antagonistas y agonistas.

Una realización de un método para identificación de moléculas que antagonizan o inhiben la interacción receptor-ligando TWEAK implica añadir una molécula candidato a un medio que contiene células que expresan los polipéptidos de la presente invención: cambiar las condiciones de dicho medio de tal manera que, excepto en lo que

5 respecta a la presencia de la molécula candidato, los polipéptidos pudieran interactuar; y observar la fijación e inhibición de la angiogénesis. La fijación del receptor y ligando de TWEAK puede determinarse de acuerdo con ensayos de fijación competitivos reseñados anteriormente, y bien conocidos en la técnica. El efecto angiogénico de esta fijación puede determinarse por ensayos de proliferación celular, tales como, por ejemplo, ensayos de densidad de células, u otros ensayos de proliferación celular que son también bien conocidos en la técnica. La actividad de las células puestas en contacto con la molécula candidato se puede comparar luego con las células idénticas que no han estado en contacto y pueden identificarse agonistas y antagonistas de las interacciones con el polipéptido TWEAK de la presente invención. La medida de la actividad biológica puede realizarse por cierto número de métodos bien conocidos tales como la medida de la cantidad de proteína presente (v.g., un ELISA) o de la actividad de la proteína. Una disminución en la estimulación o activación biológica indicaría un antagonista. Un aumento indicaría un agonista.

15 Pueden diseñarse adicionalmente ensayos de cribado para encontrar moléculas que mimeticen: la actividad biológica resultante de las interacciones del polipéptido TWEAK de la presente invención. Moléculas que mimetizan la actividad biológica de un polipéptido pueden ser útiles para aumentar la actividad biológica del polipéptido. A fin de identificar compuestos para agentes terapéuticamente activos que mimeticen la actividad biológica de un polipéptido, debe determinarse primeramente si una molécula candidato se fija al polipéptido. Se añade luego una molécula candidato de fijación a un ensayo biológico para determinar sus efectos biológicos. Los efectos biológicos de la molécula candidato se comparan luego con los del polipéptido.

20 Adicionalmente, la formación de complejos dentro de mezclas de reacción que contienen el compuesto de test y la proteína del gen receptor o ligando de TWEAK normal puede compararse también con la formación de complejos dentro de mezclas de reacción que contienen el compuesto de test y una proteína del gen receptor o ligando de TWEAK mutante. Esta comparación puede ser importante en aquellos casos en que es deseable identificar compuestos que interrumpen las interacciones del mutante pero no de las proteínas del gen receptor o ligando de TWEAK normal.

30 El ensayo para compuestos que interfieren con la interacción de los productos génicos del receptor o ligando de TWEAK y parejas de fijación puede realizarse en un formato heterogéneo u homogéneo. Los ensayos heterogéneos implican anclar el producto del gen del receptor o ligando de TWEAK o la pareja de fijación sobre una fase sólida y detectar los complejos anclados en la fase sólida al final de la reacción. En los ensayos homogéneos, la reacción total se lleva a cabo en una fase líquida. En cualquier enfoque, el orden de adición de las sustancias reaccionantes puede modificarse para obtener información diferente acerca de los compuestos que se testan. Por ejemplo, los compuestos de test que interfieren con la interacción entre los productos génicos del receptor o ligando de TWEAK y las parejas de fijación, v.g., por competición, pueden identificarse por realización de la reacción en presencia de la sustancia de test; es decir, por adición de la sustancia de test a la mezcla de reacción antes de o simultáneamente con los productos génicos del receptor y ligando de TWEAK. Alternativamente, los compuestos de test que interrumpen los complejos preformados, v.g., compuestos con constantes de fijación mayores que desplazan uno de los componentes del complejo, pueden testarse por adición del compuesto de test a la mezcla de reacción después que se han formado los complejos. Los diversos formatos se describen brevemente a continuación.

45 En un sistema de ensayo heterogéneo, el producto del gen receptor o ligando de TWEAK se ancla sobre una superficie sólida, y la especie no anclada se marca, directa o indirectamente. En la práctica, se utilizan convenientemente placas de microtitulación. La especie anclada puede inmovilizarse por uniones no covalentes o covalentes. La unión no covalente puede realizarse simplemente por recubrimiento de la superficie sólida con una solución del producto del gen receptor o ligando de TWEAK y secado. Alternativamente, un anticuerpo inmovilizado específico para la especie a anclar puede utilizarse para anclar la especie a la superficie sólida. Las superficies pueden prepararse con anterioridad y guardarse.

50 Con objeto de realizar el ensayo, la pareja de la especie inmovilizada se expone a la superficie recubierta con o sin el compuesto de test. Después que se completa la reacción, se eliminan los componentes que no han reaccionado (v.g., por lavado) y cualesquiera complejos formados quedarán inmovilizados sobre la superficie sólida. La detección de los complejos anclados en la superficie sólida puede realizarse de diversas maneras. Donde la especie no inmovilizada está pre-marcada, la detección del marcador inmovilizado sobre la superficie indica que se han formado complejos. En los casos en que la especie no inmovilizada no está pre-marcada, puede utilizarse un marcador indirecto para detectar los complejos anclados en la superficie; v.g., utilizando un anticuerpo marcado específico para la especie inicialmente no inmovilizada (el anticuerpo, a su vez, puede estar marcado directa o indirectamente con un anticuerpo anti-Ig marcado). Dependiendo del orden de adición de los componentes de la reacción, pueden detectarse los compuestos de test que inhiben la formación de complejos o que rompen los complejos preformados.

65 Alternativamente, la reacción puede conducirse en una fase líquida en presencia o ausencia del compuesto de test, separarse los productos de la reacción de los componentes que no han reaccionado, y detectarse los complejos; v.g., utilizando un anticuerpo inmovilizado específico para uno de los componentes de fijación a fin de anclar cualesquiera complejos formados en solución, y un anticuerpo marcado específico para el otro componente de la

pareja a fin de detectar los complejos anclados. Una vez más, dependiendo del orden de adición de las sustancias reaccionantes a la fase líquida, pueden identificarse los compuestos de test que inhiben el complejo o que rompen los complejos preformados.

5 En una realización alternativa de la invención, puede utilizarse un ensayo homogéneo. En este enfoque, se prepara un complejo preformado del producto del gen receptor o ligando de TWEAK en el cual o bien el producto del gen receptor o ligando de TWEAK o sus parejas de fijación están marcados, pero la señal generada por el marcador se extingue debido a formación de complejos (véase, v.g., la Patente U.S. No. 4.109.496 por Rubenstein, que utiliza este enfoque para inmunoensayos). La adición de una sustancia de test que compite con y desplaza una de las especies del complejo preformado dará como resultado la generación de una señal superior al ruido de fondo. De este modo pueden identificarse las sustancias de test que rompen la interacción del producto génico del receptor o ligando de TWEAK.

15 En una realización particular, el producto del gen receptor o ligando de TWEAK puede prepararse para inmovilización utilizando técnicas de DNA recombinante. Por ejemplo, la región codificante del receptor o ligando de TWEAK puede fusionarse a un gen de glutatión-S-transferasa (GST) utilizando un vector de fusión, tal como pGEX-5X-1, con lo cual su actividad de fijación se mantiene en la proteína de fusión resultante. La pareja de fijación interactiva puede purificarse y utilizarse para generar un anticuerpo monoclonal, utilizando métodos practicados rutinariamente en la técnica. Este anticuerpo puede marcarse con el isótopo radiactivo $<125>I$, por ejemplo, por métodos practicados rutinariamente en la técnica. En un ensayo heterogéneo, v.g., la proteína de fusión del receptor o ligando GST-TWEAK puede anclarse a cuentas de glutatión-agarosa. El producto del gen del receptor o ligando de TWEAK puede añadirse luego en presencia o ausencia del compuesto de test de una manera que permite que tenga lugar la interacción y fijación. Al final del periodo de reacción, puede eliminarse por lavado el material no combinado, y el anticuerpo monoclonal marcado puede añadirse al sistema y permitir que se fije a los componentes complejados. La interacción entre el Receptor TWEAK y los productos del gen ligando puede detectarse por medida de la cantidad de radiactividad que queda asociada con las cuentas de glutatión-agarosa. Una inhibición satisfactoria de la interacción por el compuesto de test dará como resultado una disminución de la radiactividad medida.

30 Alternativamente, una proteína de fusión génica del receptor de GST-TWEAK y el producto del gen ligando de TWEAK (o *viceversa*) pueden mezclarse uno con otro en un líquido en ausencia de las cuentas sólidas de glutatión-agarosa. El compuesto de test puede añadirse sea durante o después que las especies se dejan interaccionar. Esta mixtura puede añadirse luego a las cuentas de glutatión-agarosa y el material no fijado se elimina por lavado. Una vez más, la extensión de la inhibición de la interacción del producto del gen receptor-ligando TWEAK puede detectarse por adición del anticuerpo marcado y medición de la radiactividad asociada con las cuentas.

35 Estas mismas técnicas se pueden emplear utilizando fragmentos peptídicos que corresponden a los dominios de fijación de la proteína receptora y/o ligando de TWEAK, en lugar de una o ambas de las proteínas de longitud total. Cualquier número de métodos practicados rutinariamente en la técnica puede utilizarse para identificar y aislar los sitios de fijación. Estos métodos incluyen, pero sin carácter limitante, mutagénesis del gen que codifica una de las proteínas y cribado para disrupción de la fijación en un ensayo de co-inmunoprecipitación. Pueden seleccionarse luego mutaciones compensadoras en el gen que codifica la segunda especie en el complejo. El análisis de la secuencia de los genes que codifican las proteínas respectivas revelará las mutaciones que corresponden a la región de la proteína implicada en la fijación interactiva. Alternativamente, una proteína puede anclarse a una superficie sólida utilizando métodos descritos anteriormente en esta sección, y dejarse interaccionar con y fijarse a su pareja de fijación marcada, que se ha tratado con una enzima proteolítica, tal como tripsina. Después del lavado, un péptido corto marcado que comprende el dominio de fijación puede quedar asociado con el material sólido, que puede estar aislado e identificarse por secuenciación de aminoácidos. Asimismo, el gen que codifica los segmentos puede modificarse por ingeniería genética una sola vez para expresar fragmentos peptídicos de la proteína, los cuales pueden luego ser testados respecto a actividad de fijación y purificarse o sintetizarse.

50 Por ejemplo, y sin carácter de limitación, un producto del gen receptor o ligando de TWEAK puede anclarse a un material sólido como se ha descrito anteriormente en esta sección, produciendo una proteína de fusión del receptor o ligando GST-TWEAK y dejando que la misma se fije a cuentas glutatión-agarosa. La pareja de fijación interactiva obtenida puede marcarse con un isótopo radiactivo, tal como $<35>S$, y escindirise con una enzima proteolítica tal como tripsina. Los productos de escisión se pueden añadir luego a la proteína de fusión del receptor GST-TWEAK anclada o la proteína de fusión del ligando de TWEAK y dejarse fijar. Después de eliminar por lavado los péptidos no fijados, el material fijado marcado, que representa el dominio de fijación de la pareja de fijación, puede eluirse, purificarse, y analizarse respecto a secuencia de aminoácidos por métodos bien conocidos. Los péptidos así identificados pueden producirse sintéticamente o fusionarse a proteínas facilitadoras apropiadas utilizando tecnología de DNA recombinante.

Las interacciones receptor-ligando TWEAK de la invención, *in vivo*, inician una cascada de eventos que o bien estimulan o suprimen la angiogénesis en un grupo diana de célula o tejido. Las moléculas, tales como moléculas de ácido nucleico, proteínas, o moléculas pequeñas pueden, a su vez, influir en esta cascada. Los compuestos que

rompen los efectos de la interacción receptor-ligando TWEAK de esta manera pueden ser útiles en la regulación de la angiogénesis.

El principio básico de los sistemas de ensayo utilizados para identificar los compuestos que interfieren con el efecto angiogénico o antiangiogénico de la interacción receptor-ligando TWEAK implica preparar una mezcla de reacción que contiene el Receptor TWEAK y el ligando en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que ambos interactúen y se fijen, formando así un complejo. Con objeto de testar un compuesto para actividad inhibidora del efecto de esta interacción, la mezcla de reacción se prepara en presencia y ausencia del compuesto de test. El compuesto de test puede incluirse inicialmente en la mezcla de reacción, o se puede añadir en un momento subsiguiente a la adición del complejo receptor-ligando TWEAK. Las mezclas de reacción de control se incuban sin el compuesto de test o con un placebo. Se detecta luego la inhibición o potenciación de cualquier efecto del complejo TWEAK sobre la vascularización. La respuesta angiogénica normal en la reacción de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de test, indica que el compuesto interfiere con la cascada de eventos iniciada por la interacción receptor-ligando TWEAK. La angiogénesis mejorada en el cultivo que contiene los compuestos de test indica un estimulador del efecto del complejo receptor-ligando TWEAK.

EJEMPLOS

Los ejemplos siguientes tienen por objeto ilustrar realizaciones particulares y no limitan el alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Identificación del Receptor TWEAK

A. Clonación de la expresión de cDNA del Receptor TWEAK

Para clonar cDNA del Receptor TWEAK, se construyó un vector de expresión que codificaba un conductor de hormona del crecimiento, un dominio de multimerización de cremallera de leucina, y el dominio extracelular C-terminal de TWEAK humano (véase Chicheportiche et al., J. Biol. Chem. 272 (51): 32401, 1997). Este vector de expresión, que se designó pDC409-LZ-TWEAK, comprendía la secuencia de DNA SEQ ID NO: 1 y codificaba el polipéptido SEQ ID NO: 2. Se produjeron sobrenadantes pDC409-LZ-TWEAK acondicionados por transfección transitoria en células CVI-EBNA. Estos sobrenadantes se incubaron con cuentas magnéticas recubiertas con anticuerpo policlonal anti-ratón de cabra que se había incubado previamente con un anticuerpo monoclonal de ratón contra la cremallera de leucina. Se produjeron cuentas de control por mezclas de las cuentas recubiertas con sobrenadantes de células transfectadas con vector vacío.

Una monocapa de células COS que habían crecido en un matraz T175 se transfectó con 15 µg de agrupaciones de DNA de complejidad 100.000 de una biblioteca de expresión de cDNA de HUVEC. Después de 2 días, estas células se desprendieron del matraz y se incubaron en 1,5 ml de medio de fijación más 5% de leche desnatada seca durante 3 horas a 4°C en una rueda de rotor. Las células se pre-aclararon por adición de cuentas de control y se mantuvieron en rotación a 4°C durante 45 minutos adicionales, después de lo cual las células fijadas a las cuentas se desprendieron con un imán. El pre-aclareamiento se repitió 2-3 veces, después de lo cual se añadieron a las células cuentas recubiertas de TWEAK y se mantuvieron en rotación 30 minutos a 4°C. Las células que fijaban las cuentas TWEAK se separaron por el uso de un imán y se lavaron 4 veces en PBS. Se extrajo DNA plasmídico de estas células por lisis en SDS al 0,1%, y electroporación de los sobrenadantes en células DH101B. Se dejaron crecer colonias durante una noche en medio selectivo de ampicilina. Los transformantes se agruparon y se utilizaron como una fuente de DNA plasmídico para una tanda ulterior de lavado en batea. Después de dos tandas de lavado en batea, se seleccionaron clones positivos de la agrupación resultante basándose en su capacidad para fijar TWEAK utilizando un protocolo de fijación de portaobjetos como el descrito más adelante en la Parte B.

Se determinó que el cDNA del Receptor TWEAK humano (denominado también TWEAKR) tenía la secuencia SEQ ID NO: 3, que codifica un polipéptido de 129 residuos (SEQ ID NO: 4). El examen de la secuencia predice un polipéptido que tiene un dominio extracelular de aproximadamente 78 aminoácidos (residuos 1-78 de SEQ ID NO: 4, con inclusión del péptido de señal), un dominio transmembranal de aproximadamente 23 aminoácidos (residuos 79-101 de SEQ ID NO: 4), y un dominio intracelular de aproximadamente 28 aminoácidos (residuos 102-139 de SEQ ID NO: 4). TWEAKR es el miembro de la familia de receptores TNF más pequeño conocido. El mismo tiene una sola región de repetición rica en cisteína en el dominio extracelular, en comparación con las 3-4 repeticiones de otros miembros de la familia de receptores TNF. El polipéptido TWEAKR se había descrito previamente como una proteína transmembranal codificada por un codón de cDNA de hígado humano (WO 98/55508, véase también WO 99/61471), pero no había sido identificado como el Receptor TWEAK. Un homólogo murino, el Fn14 inducible por FGF (Meighan-Mantha et al., J. Biol. Chem. 274 (46): 33166, 1999), tiene una identidad aproximada de 82% con la proteína humana, como se muestra por la alineación en la Figura 1.

El Receptor TWEAK recientemente identificado se testó en paralelo con DR3 (que había sido identificado como el Receptor TWEAK por Marsters et al., Current Biology 8:525, 1998) respecto a la capacidad para fijarse a TWEAK.

B. El Receptor TWEAK se Fija a TWEAK

Se transfectaron portaobjetos de células COS con vectores de expresión que contenían TWEAKR, DR3, o vector sin inserción (control). Después de 2 días, las células se incubaron con sobrenadantes concentrados de células CV-1 transfectadas con un vector que codificaba la proteína de fusión del dominio extracelular de cremallera de leucina de TWEAK. Una hora más tarde, las células se lavaron y se sondaron con un anticuerpo marcado con I-125 contra el dominio de cremallera de leucina. Los portaobjetos se lavaron, se fijaron, y se sometieron a autorradiografía utilizando un film de rayos X. Las células transfectadas con TWEAKR fijaban cantidades significativas de TWEAK. TWEAK no se fijaba a las células transfectadas con DR3 o las células de control. Este experimento confirmó que el polipéptido TWEAKR identificado en la parte A anterior, en lugar de DR3, es el receptor principal para TWEAK. Después del descubrimiento del receptor funcional de TWEAK, otros investigadores comunicaron también que DR3 no es el receptor principal para TWEAK (Kaptein et al., FEBS Lett., 485 (2-3): 135000.2000. La interacción de la fijación TWEAK- TWEAKR se caracterizó ulteriormente por análisis Scatchard.

Las células CV-1 se transfectaron con TWEAK humano de longitud total y se mezclaron en una ratio 1:30 con células Raji, que no expresan TWEAK. Las células se incubaron con diluciones seriadas del receptor TWEAK-Fc humano marcado con 125-I durante 2 horas a 4°C. La sonda libre y la fijada se separaron por microcentrifugación de las muestras a través de una mixtura de aceite ftalato en tubos de plástico. Los sobrenadantes y los pelets se sometieron a conteo gamma. Los análisis Scatchard de la fijación de ligando de TWEAK al Receptor TWEAK exhibían una constante de afinidad de fijación (Ka) de aproximadamente $4,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.

C. El Receptor TWEAK se Expresa Fuertemente en el Tejido Cardíaco

Para determinar el patrón de expresión del Receptor TWEAK, se realizaron análisis por transferencia Northern. Transferencias Northern de tejidos humanos múltiples se adquirieron de Clontech (Palo Alto, CA) y se sondaron con DNA cebado aleatoriamente y marcado con P-32 de la región codificante del receptor TWEAK. Las transferencias se lavaron y se sometieron a autorradiografía utilizando film de rayos X. Los resultados demostraron que en el adulto TWEAKR se expresa fuertemente en corazón, placenta, y algunas muestras de músculo esquelético. La expresión fuerte en el tejido cardíaco respalda adicionalmente la utilidad de TWEAKR en la diagnosis y el tratamiento de la enfermedad cardíaca. En contraste con el adulto, los tejidos fetales expresaban TWEAKR de modo más ubicuo; se observaron transcritos de TWEAKR en pulmón e hígado.

EJEMPLO 2

Preparación de Antagonistas y Agonistas de TWEAKR

Dado que TWEAK induce la angiogénesis, pueden utilizarse los agonistas de TWEAKR (tales como anticuerpos agonistas) para promover angiogénesis y pueden utilizarse los antagonistas de TWEAKR (tales como receptores solubles y anticuerpos antagonistas) para inhibir la angiogénesis.

A. Producción Recombinante de Polipéptidos Solubles de Fusión Receptor TWEAK-Fc (TWEAKR-Fc)

Para construir un ácido nucleico codificante del dominio extracelular de TWEAKR fusionado a Fc, un ácido nucleico codificante de los 79 aminoácidos N-terminales de TWEAKR, que incluía el conductor (péptido de señal), se unió a un ácido nucleico codificante de una porción Fc de IgG1 humana. Las secuencias para este constructo se muestran como SEQ ID NO: 6 (ácido nucleico) y SEQ ID NO: 7 (aminoácidos). En SEQ ID NO: 7, los residuos 1-27 son el péptido de señal predicho (prediciéndose que se escindirán después de secreción de la célula: el sitio de escisión real se identificó por análisis de la secuencia N-terminal, véase más adelante), los residuos 28-79 proceden del dominio extracelular de TWEAKR rico en cisteína, los residuos 80-81 son de un sitio de clonación BgIII, y el resto es la porción Fc. Después de inserción en un vector de expresión de mamífero, y expresión en y secreción de una célula hospedadora de mamífero, este constructo produjo un polipéptido designado TWEAKR-Fc. El análisis de la secuencia N-terminal determinó que el polipéptido secretado designado TWEAKR-Fc tenía un término N correspondiente al residuo 28 (Glu) de SEQ ID NO: 7. La actividad anti-angiogénica de TWEAKR-Fc se demostró utilizando ensayos tales como los descritos en los ejemplos que siguen. Un constructo de fusión Fc análogo se preparó utilizando el dominio extracelular TWEAKR de murino.

B. Producción de Anticuerpos que Fijan el Dominio Extracelular de TWEAKR

Se inmunizan ratones BALB/c con dominio extracelular de TWEAKR y se recogen y utilizan células del bazo para preparar hibridomas utilizando procedimientos estándar. Los sobrenadantes de hibridoma se criban, utilizando ELISA, en cuanto a la capacidad para fijar TWEAKR. Los positivos se clonan dos veces, para asegurar el carácter monoclonal, después de lo cual se determina su isotipo y se reensayan respecto a reactividad con TWEAKR. Se preparan también anticuerpos y derivados de anticuerpos utilizando ratones transgénicos que expresan inmunoglobulinas humanas y por el uso de presentación de fago. Los anticuerpos resultantes se testan en ensayos

tales como los descritos en los ejemplos que siguen, para caracterizar su capacidad para modular la interacción TWEAK-TWEAKR, la señalización de TWEAKR, la angiogénesis, y otras actividades biológicas aguas abajo.

Los anticuerpos agonistas se utilizan para promover actividades biológicas inducidas por TWEAK tales como la angiogénesis, y los anticuerpos antagonistas se utilizan para inhibir las actividades biológicas inducidas por TWEAK tales como la angiogénesis. Para algunas aplicaciones, la actividad de los anticuerpos antagonistas se aumenta por conjugación a un radioisótopo, a una citotoxina derivada de planta, hongo, o bacteria tal como ricina A o toxina de la difteria, o a otro veneno químico. Y debido a la distribución tisular restringida de TWEAKR, los anticuerpos que se fijan a TWEAKR son particularmente útiles como agentes de direccionamiento para formación de imágenes o suministro de agentes terapéuticos a la vasculatura. Los anticuerpos que se fijan a TWEAKR pueden utilizarse, por ejemplo, para direccionar un marcador o agente quimioterapéutico detectable a las células murales (pericitos y células musculares lisas vasculares). Marcadores detectables pueden incluir radioisótopos, compuestos quimioluminiscentes y fluorescentes, y enzimas. Estas técnicas son útiles, por ejemplo, en la diagnosis, estadificación, y tratamiento de neoplasmas.

EJEMPLO 3

Actividad de TWEAKR-Fc en un Ensayo de Cierre de Heridas

Se utilizó un ensayo de migración de células endoteliales planares (cierre de heridas) para cuantificar la inhibición de la angiogénesis por TWEAKR-Fc in vitro. En este ensayo, la migración de las células endoteliales se mide como la tasa de cierre de una herida circular en una monocapa de células cultivadas. La tasa de cierre de las heridas es lineal, y está regulada dinámicamente por agentes que estimulan e inhiben la angiogénesis in vivo.

Células endoteliales microvasculares primarias de riñón humano (HRMEC), se aislaron, cultivaron y utilizaron en la tercera pasada después de descongelación, como se describe en Martin et al., *In Vitro Cell Dev Biol* 33:261, 1997. Se generaron lesiones circulares replicadas, "heridas" (diámetro 600-800 micrómetros) en monocapas HRMEC confluentes utilizando una prensa taladradora con punta de silicio. En el momento de la herida, el medio (DMEM + 1% BSA) se complementó con 20 ng/ml de PMA (12-miristato-13-acetato de forbol), EGF (4 ng/ml), y 0,150 a 5 µg/ml de TWEAKR-Fc, o una combinación de 40 ng/ml de EGF y 0,150 a 5 µg/ml de TWEAKR-Fc. El área de herida residual se midió en función del tiempo (0-12 horas) utilizando un microscopio y software de análisis de imágenes (Bioquant, Nashville, TN). Se calculó la tasa de migración relativa para cada agente y combinación de agentes por regresión lineal del área de herida residual representada gráficamente en función del tiempo. Los resultados se muestran en las Figuras 2-3.

Comparado con hulgG o medio+BSA, TWEAKR-Fc inhibía la migración endotelial inducida por PMA de una manera sensible a la dosis, reduciendo la tasa de migración para niveles no estimulados a 5 µg/ml (Figura 2). Ni hulgG ni TWEAKR-Fc inhibían la migración basal (no inducida). Cuando se indujo la migración de HRMEC por EGF, TWEAKR-Fc inhibía la migración endotelial de una manera dependiente de la dosis, reduciendo la tasa de migración para niveles no estimulados a 5 µg/ml (Figura 3).

EJEMPLO 4

Actividad de TWEAKR-Fc en un Ensayo de Bolsa Corneal

Se utilizó un ensayo de bolsa corneal en el ratón para cuantificar la inhibición de la angiogénesis por TWEAKR-Fc in vivo. En este ensayo, los agentes a testar respecto a actividad angiogénica o anti-angiogénica se inmovilizan en una forma de liberación lenta en un pelet Hydron, que se implanta en microbolsas creadas en el epitelio corneal de ratones anestesiados. La vascularización se mide como el aspecto, la densidad, y la extensión de crecimiento interno de vasos a partir de limbo corneal vascularizado en la córnea normalmente avascular.

Los pelets Hydron, como se describen en Kenyon et al., *Invest Ophthalmol. & Visual Science* 37: 1625, 1996, incorporaban sucralfato con bFGF (90 ng/pelet), bFGF e IgG (14 µg/pelet de control), o bFGF y TWEAKR-Fc (1,4 µg). Los pelets se implantaron quirúrgicamente en microbolsas estromales de la córnea creadas por micro-dissección de 1 mm medial al limbo corneal lateral de ratones macho C57BL de 6-8 semanas de edad. Después de 5 días, en el pico de la respuesta neovascular a bFGF, se fotografiaron las córneas, utilizando una lámpara de rendija Zeiss con un ángulo incipiente de 35-50° respecto al eje polar en el meridiano que contenía el pelet. Las imágenes se digitalizaron y se procesaron mediante filtros de color sustractivos (Adobe Photoshop 4.0) para delinear los microvasos establecidos por contenido de hemoglobina. Se utilizó el software de análisis de imágenes (Bioquant, Nashville, TN) para calcular la fracción de la imagen corneal que estaba vascularizada, la densidad de vasos dentro del área vascularizada, y la densidad de vasos dentro de la córnea total.

Como se muestra en la Tabla 1, TWEAKR-Fc (100 pmoles) inhibía la angiogénesis corneal inducida por bFGF (3 picomoles), reduciendo la densidad vascular al 50% de la inducida por FGF solo o FGF + IgG.

TABLA 1

Efecto de TWEAKR-Fc sobre la Angiogénesis inducida por FGF in el Ensayo de la Bolsa Corneal del Ratón	
Tratamiento	Reducción Mayor que 50% en Número y Longitud de Vasos n/n totales (%)
FGF solo	0/2 (0%)
FGF+IgG	0/2 (0%)
FGF+TWEAKR-Fc	6/9 (67%)

EJEMPLO 5

5

Fijación Cualitativa de TRAF al Dominio Citoplásmico del Receptor TWEAK (TWEAKR)

Los miembros de la familia TRAF son moléculas de señalización intracelulares. Se sabe que varios miembros de la familia TRAF se asocian con miembros de la familia de receptores de TNF a fin de iniciar una cascada de señalización que activa el camino NF-kappa-B, dando como resultado la activación y proliferación de las células. Se realizó un ensayo de fijación cualitativo in vitro para testar si los miembros de la familia TRAF o moléculas de señalización intracelulares se fijan al dominio citoplásmico de TWEAKR y saber, por tanto, si el pequeño dominio citoplásmico de TWEAKR es capaz de mediar una señal a la célula por el camino TRAF.

Se creó un vector de fusión GST constituido por los 29 aminoácidos del terminal C de TWEAKR fusionado a glutatión-S-transferasa por subclonación de la inserción apropiada en el vector pGEX-4T (Amersham Pharmacia Biotech) en los sitios BamHI y NotI. El producto de este vector se expresó en E. coli y se fijó a cuentas de sefarosa como ha sido descrito por Galibert et al., J. Biol. Chem. 273 (51): 34120, 1998. Cuentas construidas análogamente recubiertas con proteínas de fusión del dominio citoplásmico RANK-GST se utilizaron como control positivo, utilizándose como control negativo cuentas recubiertas con GST solo. Se produjeron proteínas TRAF marcadas con [35S] metionina/cisteína en lisados de reticulocitos (Sistemas de Lisado de Reticulocitos acoplados a TNT, Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los lisados de reticulocitos que contenían las moléculas TRAF marcadas se pre-aclararon primeramente utilizando las cuentas de control después de incubación con las cuentas recubiertas con la proteína de fusión indicadas en tampón de fijación (HEPES 50 mM [pH 7,4], NaCl 250 mM, Nonidet P-40 0,25% (v/v), 10% glicerol, EDTA 2 mM) a 4° Celsius durante 2 horas. Después de lavar 4 veces con tampón de fijación, las moléculas TRAF fijadas se eluyeron de las cuentas en tampón de carga SDS, se separaron por SDS-PAGE, se secaron y se expusieron a film de rayos X.

Se observó fijación por encima de los niveles de ruido de fondo con TRAFs 1, 2 y 3. No se observaron niveles superiores al ruido de fondo con TRAFs 4, 5 y 6. La capacidad de TWEAKR para fijarse a TRAFs 1, 2, y 3 demuestra que TWEAKR es capaz de inducir una señal a la célula por el camino TRAF, y transmitir por tanto una señal proliferativa a la célula hospedadora. Este experimento proporciona evidencia adicional de que TWEAKR es el receptor funcional para TWEAK. El mismo ilustra también un medio adicional por el cual puede inhibirse la señalización: por interrupción de la interacción TRAF-TWEAKR con una molécula pequeña, o por el uso de una variante dominante negativa de la molécula TRAF.

EJEMPLO 6

Actividad de TWEAKR-Fc en un Ensayo de Proliferación de Células Endoteliales

Se utilizó un ensayo de proliferación de células endoteliales para cuantificar la inhibición de la proliferación inducida por bFGF o TWEAK por TWEAKR-Fc in vitro. En este ensayo, la proliferación de células endoteliales se mide después de 4 días de crecimiento celular en pocillos de microtitulación utilizando una molécula marcadora de células denominada calceína AM. Las esterillas expresadas por las células escinden la calceína y hacen que la misma emita fluorescencia cuando se excita a 485 nm. La calceína no escindida no produce fluorescencia. La cantidad de fluorescencia está relacionada directamente con el número de células endoteliales en el pocillo de cultivo. La proliferación de células endoteliales está regulada a menudo por agentes que estimulan y/o inhiben la angiogénesis in vivo.

Se obtuvieron HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana) primarias de una fuente comercial (Clonetics, Walkersville, MD), se cultivaron, y se utilizaron en la pasada 2 a 7. Se dispusieron cultivos replicados por adición de 3000 HUVEC a cada pocillo de microtitulación en medio basal de células endoteliales (EBM, un medio basal de células endoteliales que no contiene factores de crecimiento ni suero, y está basado en las formulaciones de medios desarrolladas por Dr Richard Ham en la Universidad de Colorado, Clonetics) más 0,05% FBS (suero bovino fetal). En el momento de iniciación del cultivo, se añadió FGF-2 (factor de crecimiento de fibroblastos-2, 10

ng/ml) o TWEAK humano (100 ng/ml) a los cultivos en presencia de IgG humana (hulgG, control) o TWEAKR-Fc humano a concentraciones comprendidas entre 0,08 µg/ml y 20 µg/ml (0,25 a 20 µg/ml para el inducido por TWEAK y 0,08 a 6,7 µg/ml para el inducido por FGF-2). Los cultivos que contenían HUVEC se incubaron durante 4 días a 37°C con 5% de CO₂. El cuarto día de cultivo se añadió calceína-AM 4 µM a los cultivos y 2 horas más tarde se evaluaron los pocillos respecto a fluorescencia. Los resultados, expresados como los recuentos de fluorescencia medios (485-530 nm) para pocillos replicados más o menos el SEM se muestran en las Figuras 4 y 5.

TWEAKR-Fc inhibía específicamente la proliferación de HUVEC inducida por TWEAK de una manera dependiente de la dosis cuando se comparaba con hulgG que no afectaba a la proliferación inducida por TWEAK (Figura 4). Adicionalmente, TWEAKR-Fc inhibía la proliferación basal de HUVEC observada durante el cultivo en EBM más 0,05% FBS, en comparación con hulgG, que no lo hacía. Resulta interesante que TWEAKR-Fc inhibía también la proliferación de HUVEC mediada por FGF-2 a concentraciones mayores que 2 µg/ml, en comparación con hulgG que no afectaba a la respuesta proliferativa de HUVEC inducida por FGF-2 (Figura 5). Estos resultados demuestran que TWEAKR-Fc inhibe la proliferación de HUVEC inducida por la adición de TWEAK humano recombinante exógeno. El hecho de que TWEAKR-Fc inhibe parcialmente la proliferación de HUVEC inducida por suero indica que HUVEC produce TWEAK endógeno que promueve el crecimiento/supervivencia de las EC (células endoteliales) por la vía de TWEAKR. La atenuación por TWEAKR-Fc de la proliferación inducida por FGF-2 indica que al menos parte de la respuesta EC a FGF-2 depende de la interacción endógena TWEAK-TWEAKR.

EJEMPLO 7

Inhibición de la Neovascularización por los Antagonistas de TWEAKR en un Modelo Murino de Isquemia Cardíaca/Injerto

La supervivencia del tejido cardíaco trasplantado heterotópicamente de un ratón donante a la piel de la oreja de otro ratón genéticamente similar requiere neovascularización adecuada por el corazón trasplantado y el tejido circundante, a fin de promover la supervivencia y energía para la función del músculo cardíaco. La vasculatura inadecuada en el sitio de trasplante causa una isquemia excesiva en el corazón, deterioro tisular, y fallo del tejido para injertarse. Los agentes que antagonizan los factores implicados en la migración de las células endoteliales y la formación de vasos pueden disminuir la angiogénesis en el sitio del trasplante, limitando con ello la función del tejido de injerto y finalmente el injerto propiamente dicho. Se utiliza un modelo murino de isoinjerto cardíaco heterotópico para demostrar los efectos de los antagonistas de TWEAKR, con inclusión de anticuerpos y TWEAKR-Fc, sobre la neovascularización.

Los receptores BALB/c hembra (= 12 semanas de edad) reciben injertos de corazón neonatales de ratones donantes de la misma variedad. El tejido del corazón donante se injerta en el pabellón de la oreja izquierda del receptor el día 0 y los ratones se dividen en dos grupos. El grupo de control recibe IgG humana (Hu IgG), y el otro grupo recibe el antagonista de TWEAKR, ambos por vía intraperitoneal. Los tratamientos se continúan durante 5 días consecutivos. La funcionalidad de los injertos se determina por monitorización de la actividad pulsátil visible los días 7 y 14 después del injerto. Se determina la inhibición del injerto funcional, en función de la dosis de antagonista de TWEAKR. La histología de los corazones trasplantados se examina a fin de visualizar los efectos del antagonista de TWEAKR sobre el edema en el sitio del trasplante y la vasculatura de los tejidos hospedador y donante (utilizando, v.g., la tinción de Factor VIII).

EJEMPLO 8

Tratamiento de Tumores con Antagonistas de TWEAKR

Antagonistas de TWEAKR, con inclusión de anticuerpos y TWEAKR-Fc, se testan en modelos animales de tumores sólidos. El efecto de los antagonistas de TWEAKR se determina por medida de la frecuencia de tumores y el crecimiento del tumor.

Los ejemplos arriba presentados no deben considerarse exhaustivos o limitantes del alcance de la invención. El especialista experto comprenderá que son posibles variaciones y modificaciones a la vista de la doctrina que antecede, debiendo entenderse que tales modificaciones y variaciones están dentro del alcance de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> WILEY, Steven R. IMMUNEX CORPORATION
- <120> Receptor TWEAK
- <130> 2968-WO
- <140> No asignado todavía
- <141> 2000-12-19
- <150> 60/172,878
- <151> 1999-12-20
- <150> 60/203,347
- <151> 2000-05-10
- <160> 7
- <170> PatentIn Ver. 2.0
- <210> 1
- <211> 898
- <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <221> CDS
- <222> (52).(873)
- <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: constructo de la proteína de fusión de TWEAK humana
- <400> 1

```

tctcagagggc cacgcgttta aacgtcgagg tacctatccc gggccgccac c atg gct 57
                                     Met Ala
                                     1

aca ggc tcc cgg acg tcc ctg ctc ctg gct ttt ggc ctg ctc tgc ctg 105
Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu Cys Leu
      5                10                15

ccc tgg ctt caa gag ggc agt gca act agt tct gac cgt atg aaa cag 153
Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Thr Ser Ser Asp Arg Met Lys Gln
      20                25                30

ata gag gat aag atc gaa gag atc cta agt aag att tat cat ata gag 201
Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu
      35                40                45

aat gaa atc gcc cgt atc aaa aag ctg att ggc gag cgg act aga tct 249
Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg Thr Arg Ser
      55                60                65

agt ttg ggg agc cgg gca tcg ctg tcc gcc cag gag cct gcc cag gag 297
Ser Leu Gly Ser Arg Ala Ser Leu Ser Ala Gln Glu Pro Ala Gln Glu
      70                75                80
    
```


ES 2 433 011 T3

```

gag ctg gtg gca gag gag gac cag gac cgg tcg gaa ctg aat ccc cag      345
Glu Leu Val Ala Glu Glu Asp Gln Asp Pro Ser Glu Leu Asn Pro Gln
      85                      90                      95

aca gaa gaa agc cag gat cct gcg cct ttc ctg aac cga cta gtt cgg      393
Thr Glu Glu Ser Gln Asp Pro Ala Pro Phe Leu Asn Arg Leu Val Arg
      100                      105                      110

cct cgc aga agt gca cct aaa ggc cgg aaa aca cgg gct cga aga gcg      441
Pro Arg Arg Ser Ala Pro Lys Gly Arg Lys Thr Arg Ala Arg Arg Ala
      115                      120                      125                      130

atc gca gcc cat tat gaa gtt cat cca cga cct gga cag gac gga gcg      489
Ile Ala Ala His Tyr Glu Val His Pro Arg Pro Gly Gln Asp Gly Ala
      135                      140                      145

cag gca ggt gtg gac ggg aca gtg agt ggc tgg gag gaa gcc aga atc      537
Gln Ala Gly Val Asp Gly Thr Val Ser Gly Trp Glu Glu Ala Arg Ile
      150                      155                      160

aac agc tcc agc cct ctg cgc tac aac cgc cag atc ggg gag ttt ata      585
Asn Ser Ser Ser Pro Leu Arg Tyr Asn Arg Gln Ile Gly Glu Phe Ile
      165                      170                      175

gtc acc cgg gct ggg ctc tac tac ctg tac tgt cag gtg cac ttt gat      633
Val Thr Arg Ala Gly Leu Tyr Tyr Leu Tyr Cys Gln Val His Phe Asp
      180                      185                      190

gag ggg aag gct gtc tac ctg aag ctg gac ttg ctg gtg gat ggt gtg      681
Glu Gly Lys Ala Val Tyr Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val Asp Gly Val
      195                      200                      205                      210

ctg gcc ctg cgc tgc ctg gag gaa ttc tca gcc act gcg gcc agt tcc      729
Leu Ala Leu Arg Cys Leu Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ser
      215                      220                      225

ctc ggg ccc cag ctc cgc ctc tgc cag gtg tct ggg ctg ttg gcc ctg      777
Leu Gly Pro Gln Leu Arg Leu Cys Gln Val Ser Gly Leu Leu Ala Leu
      230                      235                      240

cgg cca ggg tcc tcc ctg cgg atc cgc acc ctc ccc tgg gcc cat ctc      825
Arg Pro Gly Ser Ser Leu Arg Ile Arg Thr Leu Pro Trp Ala His Leu
      245                      250                      255

aag gct gcc ccc ttc ctc acc tac ttc gga ctc ttc cag gtt cac tga      873
Lys Ala Ala Pro Phe Leu Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val His
      260                      265                      270

gcgccgcgg atctgtttaa actag      898

```

<210> 2
<211> 273
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: constructo de la proteína de fusión de TWEAK humana

<400> 2

ES 2 433 011 T3

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

His

<210> 3
 <211> 868
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>

ES 2 433 011 T3

<221> CDS
 <222> (53)..(442)

<400> 3

```

gcttgaattc aataactata acggtcctaa ggtagcgaag aggacgtgca ct atg gct 58
                                                    Met Ala
                                                    1

cgg ggc tgc ctg cgc cgg ttg ctg cgg ctc ctc gtg ctg ggg ctc tgg 106
Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly Leu Trp
      5                               10                               15

ctg gcg ttg ctg cgc tcc gtg gcc ggg gag caa gcg cca ggc acc gcc 154
Leu Ala Leu Leu Arg Ser Val Ala Gly Glu Gln Ala Pro Gly Thr Ala
      20                               25                               30

ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg 202
Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met
      35                               40                               45

gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc 250
Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly
      55                               60                               65

tgc gct gca gca cct cct gcc ccc ttc cgg ctg ctt tgg ccc atc ctt 298
Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Pro Ile Leu
      70                               75                               80

ggg ggc gct ctg agc ctg acc ttc gtg ctg ggg ctg ctt tct ggc ttt 346
Gly Gly Ala Leu Ser Leu Thr Phe Val Leu Gly Leu Ser Gly Phe
      85                               90                               95

ttg gtc tgg aga cga tgc cgc agg aga gag aag ttc acc acc ccc ata 394
Leu Val Trp Arg Arg Cys Arg Arg Arg Glu Lys Phe Thr Thr Pro Ile
      100                               105                               110

gag gag acc ggc gga gag ggc tgc cca gct gtg gcg ctg atc cag tga 442
Glu Glu Thr Gly Gly Glu Gly Cys Pro Ala Val Ala Leu Ile Gln
      115                               120                               125                               130

caatgtgcc cctgccagcc ggggctcgcc cactcatcat tcattcatcc attctagagc 502

cagtctctgc ctcccagacg cggcggggagc caagctcctc caaccacaag gggggtgggg 562

ggcggtgaat cacctctgag gcctgggccc agggttcagg ggaaccttcc aaggtgtctg 622

gttgccctgc ctctggctcc agaacagaaa gggagcctca cgctggctca cacaaaacag 682

ctgacactga ctaaggaact gcagcatttg cacaggggag ggggggtgcc tccttcctag 742

aggccctggg ggccaggctg acttgggggg cagacttgac actaggcccc actcactcag 802

atgtcctgaa attccaccac gggggtcacc ctgggggggtt agggacctat ttttaacact 862

agagggg 868
    
```

<210> 4
 <211> 129

ES 2 433 011 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

Gln

<210> 5

<211> 129

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 5

ES 2 433 011 T3

```

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

```

Gln

<210> 6

<211> 932

<212> DNA

<213> .Secuencia Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(930)

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: constructo de la proteína de fusión del receptor TWEAK humano

<400> 6

ES 2 433 011 T3

atg gct cgg ggc tcg ctg cgc cgg ttg ctg cgg ctc ctc gtg ctg ggg	48
Met Ala Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly	
1 5 10 15	
ctc tgg ctg gcg ttg ctg cgc tcc gtg gcc ggg gag caa gcg cca ggc	96
Leu Trp Leu Ala Leu Leu Arg Ser Val Ala Gly Glu Gln Ala Pro Gly	
20 25 30	
acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag	144
Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys	
35 40 45	
tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc	192
Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys	
50 55 60	
ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc ccc ttc cgg ctg ctt tgg aga	240
Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Arg	
65 70 75 80	
tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc	288
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala	
85 90 95	
gag ggc gcg ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc	336
Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	
100 105 110	
ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg	384
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	
115 120 125	
agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg	432
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	
130 135 140	
gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc	480
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser	
145 150 155 160	
acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg	528
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	
165 170 175	

ES 2 433 011 T3

```

aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc 576
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
      180                               185                               190

ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca 624
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
      195                               200                               205

cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag 672
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
      210                               215                               220

gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc 720
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
      225                               230                               235                               240

gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg 768
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
      245                               250                               255

cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc 816
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
      260                               265                               270

acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc 864
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
      275                               280                               285

gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc 912
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
      290                               295                               300

ctg tct ccg ggt aaa tga ac 932
Leu Ser Pro Gly Lys
      305                               310

```

<210> 7

<211> 309

<212> PRT

<213>Secuencia Artificial

<220>

<223>Descripción de la Secuencia Artificial: constructo de la proteína de fusión del receptor TWEAK humano

<400> 7

ES 2 433 011 T3

Met Ala Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly
1 5 10 15

Leu Trp Leu Ala Leu Leu Arg Ser Val Ala Gly Glu Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
35 40 45

Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
50 55 60

Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Arg
65 70 75 80

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
85 90 95

Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
100 105 110

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
115 120 125

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
130 135 140

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
145 150 155 160

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
165 170 175

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
180 185 190

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
195 200 205

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
210 215 220

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
225 230 235 240

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
245 250 255

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
260 265 270

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
275 280 285

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
290 295 300

Leu Ser Pro Gly Lys
305

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un polipéptido aislado que comprende un fragmento soluble del dominio extracelular del Receptor TWEAK que tiene la capacidad para fijar TWEAK en la fabricación de un medicamento para uso en la inhibición de la angiogénesis en un mamífero, en donde el dominio extracelular del Receptor TWEAK está constituido por la secuencia expuesta en los residuos 28 a 79 de SEQ ID NO: 7.
- 10 2. Uso de un anticuerpo que se fija específicamente al dominio extracelular del Receptor TWEAK en la fabricación de un medicamento para uso en la modulación de la angiogénesis en un mamífero, en donde el dominio extracelular del Receptor TWEAK está constituido por la secuencia que se expone en los residuos 28 a 79 de SEQ ID NO: 7.
- 15 3. El uso, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el mamífero es un humano.
4. El uso, según la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende un polipéptido Fc o dominio de cremallera de leucina.
- 20 5. El uso, según la reivindicación 2, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo constituido por anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos transgénicos y anticuerpos humanos.
6. El uso, según la reivindicación 2 o la reivindicación 5, en donde el anticuerpo está conjugado a un radioisótopo, a una toxina derivada de plantas, hongos, o bacterias tal como ricina A o toxina de la difteria, o a otro veneno químico.
- 25 7. El uso, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el polipéptido o el anticuerpo rompe la interacción entre el Receptor TWEAK y una molécula TRAF.
8. El uso, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende adicionalmente tratar el mamífero con un agente quimioterapéutico.
- 30 9. El uso, según la reivindicación 8, en donde el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo constituido por agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de vinca y otros agentes quimioterapéuticos derivados de plantas, nitrosoureas, antibióticos antitumorales, enzimas antitumorales, inhibidores de topoisomerasas, análogos de platino, supresores adrenocorticales, hormonas, agonistas de hormonas, antagonistas de hormonas, anticuerpos, agentes inmunoterapéuticos, factores de las células de la sangre, agentes radioterapéuticos y modificadores de la respuesta biológica.
- 35 10. El uso, según la reivindicación 8, en donde el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo constituido por cisplatino, ciclofosfamida, mecloretamina, melfalán, bleomicina, carboplatino, fluorouracilo, 5-fluorodesoxiuridina, metotrexato, taxol, asparaginasa, vincristina, y vinblastina, linfoquinas y citoquinas tales como interleuquinas, interferones (con inclusión de alfa, beta, o delta), y TNF, clorambucil, busulfán, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, dacarbacina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, vindesina, etoposido, teniposido, dactinomycin, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, L-asparaginasa, hidroxiaurea, metilhidracina, mitotano, tamoxifeno, y Fluoximesterona.
- 45 11. El uso, según la reivindicación 8, en donde el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo constituido por ligando Flt3, ligando CD40, interleuquina-2, interleuquina-12, ligando 4-1BB, anticuerpos anti-4-1BB, antagonistas de TNF y antagonistas del receptor de TNF, TRAIL, agonistas CD148, antagonistas de VEGF, antagonistas del receptor de VEGF, y antagonistas de Tek.
- 50 12. El uso, según la reivindicación 2, para promoción de la angiogénesis.
13. El uso, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para inhibición de la angiogénesis.
- 55 14. El uso de un anticuerpo, según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13 para:
- (a) tratar una deficiencia de vascularización en tejido cardiaco o periférico, con inclusión de enfermedad de las arterias coronarias, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, angina de pecho, déficits de la circulación periférica, lesión isquemia/reperfusión de los miembros;
- 60 (b) mejora de la curación de las heridas, trasplante de órganos, reimplantación de dedos o miembros seccionados, o injerto vascular o de piel; o
- (c) uso en asociación con cirugía de baipass o angioplastia.
- 65

- 5 15. Un antagonista de TWEAKR que comprende un polipéptido aislado que comprende un fragmento soluble de un dominio extracelular del Receptor TWEAK que tiene la capacidad para fijarse a TWEAK para uso en medicina, en donde el dominio extracelular del Receptor TWEAK está constituido por la secuencia que se expone en los residuos 28 a 79 de SEQ ID NO: 7.
- 10 16. Un método de identificación de un compuesto que es capaz de modular la angiogénesis, comprendiendo el método identificar un compuesto de test que se fija a un dominio extracelular del Receptor TWEAK, en donde el compuesto de test no es TWEAK, y en donde el dominio extracelular del Receptor TWEAK está constituido por la secuencia que se expone en los residuos 28 a 79 de SEQ ID NO: 7.
- 15 17. Un método de la reivindicación 16, comprendiendo el método identificar un compuesto de test que afecta a la interacción entre TWEAK y un dominio extracelular del Receptor TWEAK, en donde el dominio extracelular del Receptor TWEAK está constituido por la secuencia que se expone en los residuos 28 a 79 de SEQ ID NO: 7.
- 20 18. Un método de identificación de un compuesto que es capaz de modular la angiogénesis, comprendiendo el método identificar un compuesto de test que modula la angiogénesis por modulación de la interacción entre un Receptor TWEAK y TRAF, en donde el Receptor TWEAK comprende un dominio extracelular constituido por la secuencia que se expone en los residuos 28 a 79 de SEQ ID NO: 7.
- 25 19. El método de una de las reivindicaciones 16-18 que comprende adicionalmente determinar la capacidad del compuesto de test para modular la proliferación de células endoteliales y/o la migración y/o angiogénesis de las células endoteliales.
20. El método de una de las reivindicaciones 17-19, en donde la modulación es estimulante.
21. El método de una de las reivindicaciones 17-19, en donde la modulación es inhibidora.

```

1  MAPGWPRSLPQILVLGFGVLVLMRAAAGEQAPGTSPCSSGSSWSADLDKCM 50
  || | | | .:|||| | |:| . ||||| | . ||| ||||| |||||
1  MARGSLRRLRLLVLGLWLALLRSVAGEQAPGTAPCSRGSWSADLDKCM 50
  . . . . .
51  DCASCPARPHSDFCLGCAAAPPAHFRLWLPILGGALSLVLVLAIVSSFLV 100
  |||| | |||| | |||| | |||| | |||| | |||| | || . || | || |
51  DCASCRARPHSDFCLGCAAAPPAFRLWLPILGGALSLTFVLGLLSGFLV 100
  . . .
101 WRRCCRREKFTTPIEETGGEGCPGVALIQ 129
  |||| | |||| | |||| | |||| | |||| | |||| |
101 WRRCCRREKFTTPIEETGGEGCPAVALIQ 129

```

Fig. 1

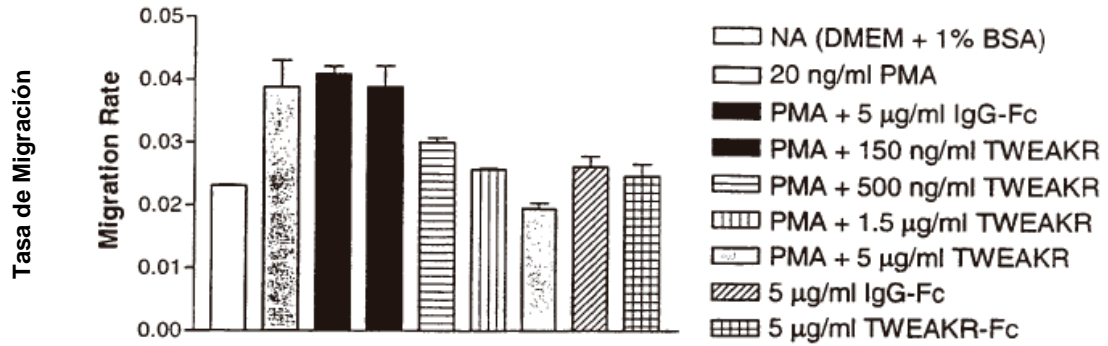


Fig. 2

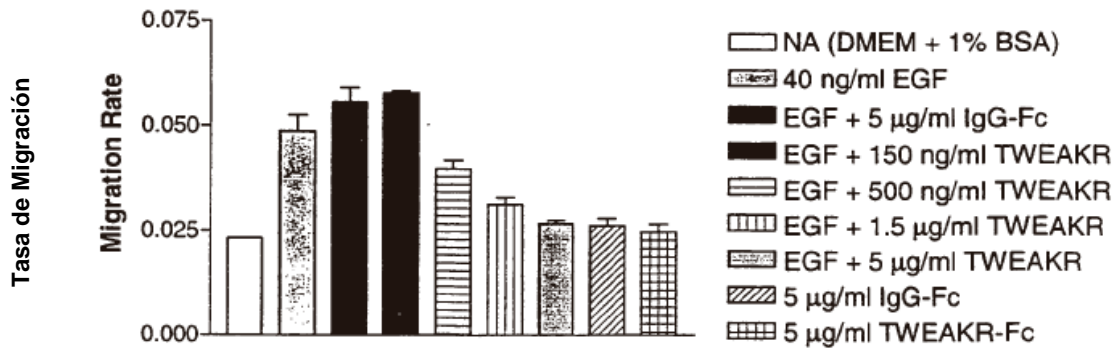


Fig. 3

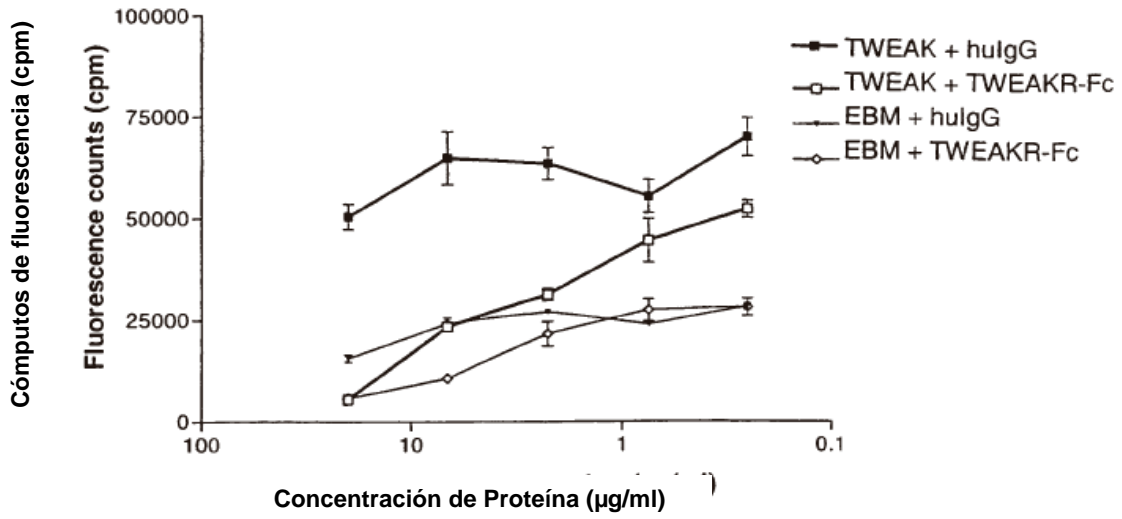


Fig. 4

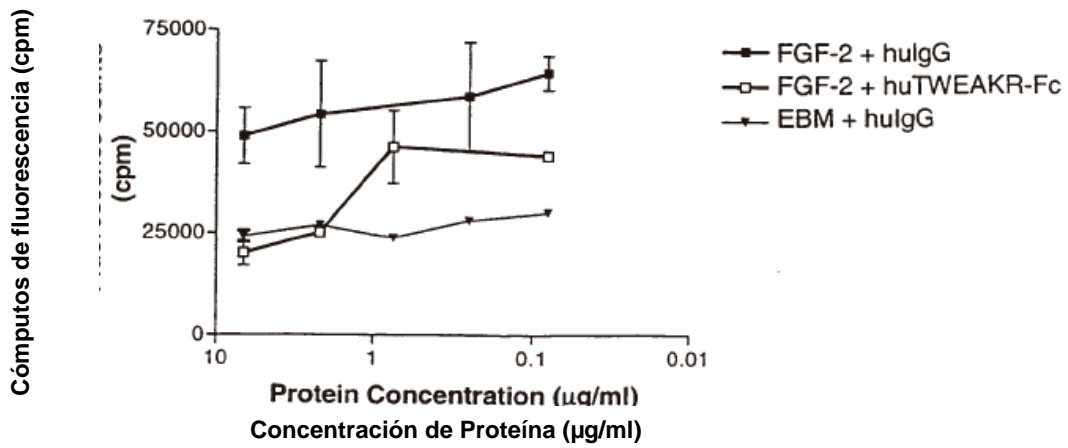


Fig. 5