

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 992**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00	(2006.01)
C12N 5/12	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 31/18	(2006.01)
A61P 43/00	(2006.01)
A61K 39/42	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2002 E 02736661 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 1572874**

54 Título: **Anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a los receptores de TRAIL**

30 Prioridad:

25.05.2001 US 293473 P	04.06.2001 US 294981 P
02.08.2001 US 309176 P	21.09.2001 US 323807 P
09.10.2001 US 327364 P	07.11.2001 US 331044 P
14.11.2001 US 331310 P	20.12.2001 US 341237 P
05.04.2002 US 369860 P	

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.01.2014

73 Titular/es:

HUMAN GENOME SCIENCES, INC. (100.0%)
14200 Shady Grove Road
Rockville, MD 20850, US

72 Inventor/es:

SALCEDO, THEODORA;
RUBEN, STEVEN M.;
ROSEN, CRAIG A.;
ALBERT, VIVIAN R.;
DOBSON, CLARIE LOUISE y
VAUGHAN, TRISTAN JOHN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 437 992 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a los receptores de TRAIL

Campo de la invención

5 La presente divulgación se refiere a anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen inmuno-específicamente al receptor de TRAIL TR4. Estos anticuerpos tienen usos en, por ejemplo, la prevención y el tratamiento de cánceres y de otros trastornos proliferativos. La divulgación también se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-TR4, vectores y células huésped que contienen estos ácidos nucleicos. La presente invención se refiere a la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento o mejora de una enfermedad o trastorno, especialmente cáncer y otros trastornos hiperproliferativos, en un animal, preferentemente un ser humano, usando uno o más anticuerpos o fragmentos que se unen inmuno-específicamente a TR4.

Antecedentes de la invención

Muchas acciones biológicas, por ejemplo la respuesta a determinados estímulos y procesos biológicos naturales, están controladas por factores, tales como citocinas. Muchas citocinas actúan a través de receptores uniéndose al receptor y produciendo una respuesta intracelular.

15 Por ejemplo, los factores de necrosis tumoral (TNF) alfa y beta son citocinas que actúan a través de los receptores del TNF y regulan numerosos procesos biológicos, incluida la protección contra infecciones y la inducción del shock y la enfermedad inflamatoria. Las moléculas de TNF pertenecen a la superfamilia de los "ligandos del TNF" y actúan junto con sus receptores o contraligandos, la superfamilia de los "receptores del TNF". Hasta ahora se han identificado al menos dieciocho miembros de la superfamilia de los ligandos del TNF y se han caracterizado al menos diecinueve miembros de la superfamilia de los receptores del TNF (véase, p. ej., Locksley y col., Cell (2001) 104:487-501).

25 Entre los ligandos se incluyen TNF- α , linfotóxina- α (LT- α , también conocido como TNF- β), LT- β (que se encuentra en un complejo heterotrimérico LT- α 2- β), FasL, CD40L, CD27L, CD30L, 4-IBBL, OX40L y el factor de crecimiento neural (NGF). La superfamilia de los receptores del TNF incluye el receptor de p55TNF, el receptor de p75TNF, la proteína relacionada con el receptor de TNF, antígeno FAS o APO-1, CD40, CD27, CD30, 4-IBB, OX40, p75 de baja afinidad y receptor de NGF (Meager, A., Biologicals, 22:291-295 (1994)).

Muchos miembros de la superfamilia de los ligandos del TNF se expresan en linfocitos T activados, lo que implica que son necesarios para las interacciones de los linfocitos T con otros tipos celulares subyacentes a la ontogenia y las funciones celulares. (Meager, A., *anteriormente*).

30 Se ha obtenido bastante información sobre las funciones esenciales de varios miembros de la familia de los receptores del TNF a partir de la identificación y creación de mutantes que anulan la expresión de estas proteínas. Por ejemplo, las mutaciones de origen natural del antígeno FAS y su ligando producen enfermedades linfoproliferativas (Watanabe-Fukunaga, R., y col., Nature 356:314 (1992)), lo que quizá refleje un fallo de la muerte celular programada. Las mutaciones del ligando de CD40 producen un estado de inmunodeficiencia ligado al cromosoma X caracterizado por niveles elevados de inmunoglobulina M y niveles bajos de inmunoglobulina G en plasma, lo que indica un fallo de la activación de linfocitos B dependiente de linfocitos T (Allen, R.C. y col., Science 259:990 (1993)). Las mutaciones dirigidas del receptor del factor de crecimiento neural de baja afinidad producen un trastorno caracterizado por un fallo en la innovación de estructuras periféricas (Lee, K.F. y col. Cell 69:737 (1992)).

40 TNF y LT- α se pueden unir a dos receptores del TNF (los receptores del TNF de 55- y 75 kd). Un gran número de efectos biológicos producidos por TNF y LT- α , que actúan a través de sus receptores, incluyen necrosis hemorrágica de tumores transplantados, citotoxicidad, un papel en el shock endotóxico, inflamación, inmunorregulación, proliferación y respuestas antivirales, así como protección contra los efectos perjudiciales de la radiación ionizante. El TNF y el LT- α están implicados en la patogenia de un amplio abanico de enfermedades, incluidos shock endotóxico, malaria cerebral, tumores, enfermedad autoinmunitaria, SIDA y rechazo del injerto en el huésped (Beutler, B. y Von Huffel, C., Science 264:667-668 (1994)). Las mutaciones en el receptor de p55 producen un incremento en la susceptibilidad a la infección microbiana.

Además, se notificó un dominio de aproximadamente 80 aminoácidos cerca del extremo C de TNFR1 (p55) y Fas como el "dominio de muerte", que es responsable de la transducción de las señales para la muerte celular programada (Tartaglia y col., Cell 74:845 (1993)).

50 La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso fisiológico esencial para el desarrollo normal y la homeostasis de organismos multicelulares (H. Steller, Science 267, 1445-1449 (1995)). Los desarreglos de la apoptosis contribuyen a la patogenia de varias enfermedades humanas, incluyendo el cáncer, trastornos neurodegenerativos y síndrome de deficiencia humana adquirida (C.B. Thompson, Science 267, 1456-1462 (1995)). Recientemente, se ha centrado mucha atención sobre la transducción de la señal y la función biológica de dos receptores de superficie de la muerte celular, Fas/APO-1 y TNFR-1 (J.L. Cleveland, y col., Cell 81, 479-482 (1995); A. Fraser, y col., Cell 85, 781-784 (1996); S. Nagata, y col., Science 267, 1449-56 (1995)). Ambos son miembros de

- la familia del receptor del TNF, que también incluyen TNFR-2, NGFR de baja afinidad, CD40, y CD30, entre otros (C.A. Smith, y col., Science 248, 1019-23 (1990); M. Tewari, y col., en Modular Texts in Molecular and Cell Biology M. Purton, Heldin, Carl, Ed. (Chapman and Hall, London, 1995). Aunque los miembros de la familia se definen por la presencia de repeticiones ricas en cisteína en sus dominios extracelulares, Fas/APO-1 y TNFR-1 también comparten una región de homología intracelular, designada adecuadamente el "dominio de muerte", que está relacionado de forma distante con el gen suicida de *Drosophila*, reaper (P. Golstein, y col., Cell 81, 185-6 (1995); K. White y col., Science 264, 677-83 (1994)). Este dominio de muerte compartido sugiere que ambos receptores interaccionan con un conjunto relacionada de moléculas transductoras de la señal que, hasta recientemente, permanecían sin identificar. La activación de Fas/APO-1 recluta la molécula adaptadora que contiene el dominio de muerte FADD/MORT1 (A.M. Chinnaiyan, y col., Cell 81, 505-12 (1995); M. P. Boldin, y col., J. Biol Chem 270, 7795-8 (1995); F.C. Kischkel, y col., EMBO 14, 5579-5588 (1995)), que a su vez se une y posiblemente activa FLICE/MACH1, un miembro de la familia ICE/CED-3 de proteasas proapoptóticas (M. Muzio y col., Cell 85, 817-827 (1996); M.P. Boldin, y col., Cell 85, 803-815 (1996)). Aunque el papel central de Fas/APO-1 es desencadenar la muerte celular, el TNFR-1 puede señalar una matriz de diversas actividades biológicas muchas de las cuales surgen de su capacidad para activar NF- κ B (L.A. Tartaglia, y col., Immunol Today 13, 151-3 (1992)). De acuerdo con esto, TNFR-1 recluta la molécula adaptadora multivalente TRADD, que como FADD, también contiene un dominio de muerte (H. Hsu, y col., Cell 81, 495-504 (1995); H. Hsu, y col., Cell 84, 299-308 (1996)) Mediante su asociación con una serie de moléculas de señalización, incluidas FADD, TRAF2 y RIP, TRADD puede señalizar la apoptosis y la activación de NF- κ B (H. Hsu, y col., Cell 84, 299-308 (1996); H. Hsu, y col., Immunity 4, 387-396 (1996)).
- Varios grupos han notificado un ligando inductor de la apoptosis relacionada con el TNF y se ha denominado Molécula inductora de la apoptosis I (AIM-I) (solicitud internacional N° WO 97/33899) y ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF o (TRAIL) (Wiley, S.R. y col., Immunity 3:673-682 (1995)). Pitti, R.M. y col., hacen referencia a la nueva molécula como ligando Apo-2 o ("Apo-2L"). Por comodidad, en el presente documento se denominará TRAIL. La secuencia de aminoácidos de TRAIL se proporciona en la SEC ID N°: 66.
- Al contrario que el ligando de FAS, cuyos transcritos parecen estar considerablemente restringidos a los linfocitos T estimulados, en muchos tejidos se ven niveles significativos de TRAIL, transcrito constitutivamente en algunas líneas celulares. Se ha demostrado que TRAIL actúa de forma independiente del ligando FAS (Wiley, S.R., y col., (1995)), *ant*). Los estudios realizados por Marsters, S.A. y col., han indicado que TRAIL activa la apoptosis rápidamente, en un marco de tiempo que es similar a la señalización de muerte efectuada por FAS/Apo-1L pero mucho más rápido de la apoptosis inducida por TNF (Current Biology, 6:750-752 (1996)).
- Se han indentificado hasta cinco receptores de TRAIL, incluyendo TR4 (también conocido como receptor 1 de TRAIL (TRAIL-R1) y receptor 4 de muerte (DR4), Pan y col., Science 276:111-3 (1997), solicitudes de patente internaiconal N°: WO98/32856, WO00/67793, WO99/37684, WO2000/34355, WO99/02653, SEQ ID NO:1); TR7 (también denominado receptor 2 de TRAL (TRAIL-R2), DR5 y KILLER, Pan y col., Science 277:815-8 (1997), Sheridan y col., Science 277:818-21 (1997), Chaudhury y col., Immunity 7:821-30 (1997), solicitudes de patente internacional N°: documentos WO98/46643, WO99/09165, WO99/11791, WO98/41629, WO00/66156 y WO98/35986, SEC ID N°: 3); TR1 (también denominado factor inhibidor de la osteoclastogénesis de la osteoprotegrina (OPG) (OCIF), TNFRSF11B y FTHMA-090 (solicitudes de patente internacional N° WO98/12344, WO2000/54651, WO2001/04137, WO66/26217, WO98/07840, WO2000/21554, WO99/53942 y WO2001/03719, SEQ ID NO:5); TR5 (también denominado receptor 3 de TRAIL (TRAIL-R3), receptor de tipo señuelo 1 (DcR1) y TRID) (Degli-Esposti y col., J. Exp. Med. 186:1165-70 (1997), solicitudes de patente internacional N° WO98/30693, WO00/71150, WO99/00423, EP867509, WO98/58062, SEC ID N° 2); y TR10 (también denominado receptor 4 de TRAIL (TRAIL-R4), DcR2 y TRUND, Pan y col., FEBS Lett. 424:41-5 (1998), Degli-Eposti y col., Immunity 7:813-20 (1997), solicitudes de patente internacional N° WO98/54202, WO00/73321, WO2000/08155, WO99/03992, WO 2000/34355 y WO9910484, SEC ID N° 4). TR4 y TR7 contienen dominios de muerte en sus colas citoplásmicas y el disparo de estos receptores tiene como resultado la apoptosis. Por otro lado, TR1, TR5 y TR10 pueden inhibir la apoptosis inducida por el ligando citotóxico TRAIL, en parte porque sus dominios de muerte citoplasmáticos no existen o están truncados, respectivamente.
- Los efectos de los ligandos de la familia del TNF y los receptores de la familia del TNF son variados e influyen sobre numerosas funciones, tanto normales como anormales, en los procesos biológicos del sistema de mamíferos. Por tanto, existe la clara necesidad de identificar y caracterizar composiciones, tales como anticuerpos, que influyen sobre la actividad biológica de los receptores de TNF, tanto en estados normales como patológicos. En concreto, existe la necesidad de aislar y caracterizar anticuerpos que modulen las actividades biológicas de los receptores de TRAIL. Chuntharapai y col., J. Immunol., 2001; 166(8):4891-4898 divulgan la inhibición dependiente de isotipo del crecimiento tumoral *in vivo* mediante anticuerpos monoclonales frente al receptor de la muerte. El documento WO 99/37684 divulga anticuerpos frente al receptor 4 de la muerte (DR4), que sufren reacciones cruzadas con Apo-2, y usos de los mismos. El documento WO 00/73349 divulga anticuerpos DR4, que sufren reacciones cruzadas con Apo-2, y usos de los mismos.

Sumario de la invención

- La presente divulgación abarca anticuerpos (incluidas moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos de los mismos) que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido de TR4. En

concreto, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo, que comprende: (a) la secuencia de aminoácidos del dominio VH de SEC ID N° 43 o la secuencia de aminoácidos del dominio VH expresado por el hibridoma de n° de depósito en la ATCC PTA-3570; y (b) la secuencia de aminoácidos del dominio VL de SEC ID N° 43 o la secuencia de aminoácidos del dominio VL expresado por el hibridoma de n° de depósito en la ATCC PTA-3570, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une inmunoespecíficamente a TR4. La invención proporciona también un anticuerpo o fragmento del mismo, que comprende: (a) la secuencia de aminoácidos de las 3 CDR de VH de SEC ID N° 43 o la secuencia de aminoácidos de las 3 CDR de VH expresadas por el hibridoma de n° de depósito en la ATCC PTA-3570; y (b) la secuencia de aminoácidos de las 3 CDR de VL de SEC ID N° 43 o la secuencia de aminoácidos de las 3 CDR de VL expresadas por el hibridoma de n° de depósito en la ATCC PTA-3570, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une inmunoespecíficamente a TR4.

La presente invención proporciona también un procedimiento para detectar la expresión de un polipéptido de TR4 que comprende: (a) analizar la expresión de un polipéptido de TR4 en una muestra biológica de un individuo usando el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención; y (b) comparar el nivel de un polipéptido de TR4 con un nivel estándar de un receptor polipeptídico de TRAIL. En realizaciones muy preferidas, la presente invención se refiere a prevenir, tratar o mejorar cánceres y otros trastornos hiperproliferativos (p. ej., leucemia, carcinoma y linfoma). Otras enfermedades y trastornos que se pueden tratar, prevenir o mejorar con los anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, trastornos neurodegenerativos (p. ej., enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington), trastornos inmunitarios (p. ej., lupus, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia gravis, enfermedad de Hasimoto) y síndrome de inmunodeficiencia), trastornos inflamatorios (p. ej., asma, trastornos alérgicos y artritis reumatoide), enfermedades infecciosas (p. ej., SIDA, infecciones por el virus del herpes y otras infecciones virales) y trastornos proliferativos.

La invención también proporciona el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención para su uso en un procedimiento de tratamiento, prevención o mejora de un cáncer, en el que el procedimiento comprende administrar dicho anticuerpo o fragmento del mismo a un animal. En realizaciones muy preferidas de la presente invención, los anticuerpos de la presente invención son para su uso en procedimientos para prevenir, tratar o mejorar los siguientes tipos de cáncer: cáncer de mama, cáncer de pulmón (incluido cáncer de pulmón macrocítico), cáncer de colon, cáncer de las vías urinarias, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de próstata, leucemia, linfoma no Hodgkin, cáncer esofágico, cáncer de cerebro, leucemia, cáncer de ovarios, cáncer de testículos, melanoma, cáncer de útero, cáncer cervical, cáncer de laringe, cáncer rectal y cánceres de la cavidad oral. En realizaciones específicas, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con agentes quimioterapéuticos, tales como paclitaxel (Taxol), irinotecán (Camptosar, CPT-11), análogos de irinotecán y gemcitabina (GEMZAR™).

La presente invención proporciona también un procedimiento para detectar, diagnosticar, ofrecer un pronóstico o vigilar cánceres y otros trastornos hiperproliferativos, que comprenden: (a) analizar la expresión de un polipéptido de TR4 en una muestra biológica de un individuo usando el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención; y (b) comparar el nivel de un polipéptido de TR4 con un nivel estándar del polipéptido de TR4. En realizaciones muy preferidas, la presente invención se refiere a detectar, diagnosticar u ofrecer un pronóstico de cánceres y otros trastornos hiperproliferativos (p. ej., leucemia, carcinoma y linfoma). Otras enfermedades y trastornos que se pueden detectar, diagnosticar o pronosticar con los anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, trastornos neurodegenerativos (p. ej., enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington), trastornos inmunitarios (p. ej., lupus, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia gravis, enfermedad de Hasimoto) y síndrome de inmunodeficiencia), trastornos inflamatorios (p. ej., asma, trastornos alérgicos y artritis reumatoide), enfermedades infecciosas (p. ej., SIDA, infecciones por el virus del herpes y otras infecciones virales) y trastornos proliferativos.

Otra realización de la presente invención incluye el uso de los anticuerpos de la invención como herramienta diagnóstica para vigilar la expresión de la expresión de TR4 en las células. En concreto, la invención proporciona un procedimiento para detectar la expresión del polipéptido de TR4 que comprende: (a) analizar un polipéptido de TR4 en una muestra biológica de un individuo usando el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención; y (b) comparar el nivel de un polipéptido de TR4 con un nivel estándar de un receptor polipeptídico de TRAIL.

Los presentes inventores han generad Fv de cadena sencilla (scFv) que se unen inmunoespecíficamente a polipéptidos TR4 (p. ej., SEC ID N° 1). Estos scFV se enumeran en la Tabla 1. Además, las líneas celulares modificadas mediante ingeniería para expresar los anticuerpos correspondientes a estos scFv se depositan en la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") en cuanto a las fechas enumeradas en la Tabla 1 y se les da los números de depósito de ATCC identificados en la Tabla 1. La ATCC está ubicada en 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. El depósito en la ATCC se ha hecho bajo los términos del Tratado de Budapest en el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para propósitos de procedimiento de patente.

También se describen en el presente documento los polinucleótidos que codifican los scFv, así como las secuencias de aminoácidos que codifican los scFv. En el presente documento también se describen moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos o variantes de estos scFv (p. ej., dominios VH, CDR de VH, dominios VL o CDR de VL, que tienen una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los scFv a los que se hace referencia en la Tabla 1), que se unen inmunoespecíficamente a TR4 o a fragmentos o variantes del

mismo, además de las moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos y/o moléculas. También se describen en el presente documento anticuerpos, o fragmentos o variantes de los mismos, que se unen a regiones/dominios extracelulares de TR4 o fragmentos y variantes de los mismos.

5 La presente invención también proporcionan anticuerpos de la invención que se acoplan a un marcador detectable, tal como una enzima, un marcador fluorescente, un marcador luminiscente o un marcador bioluminiscente. La presente invención también proporciona anticuerpos de la invención que están acoplados a un agente terapéutico o citotóxico. La presente invención también proporciona anticuerpos de la invención que están acoplados a un marcador radioactivo.

10 La presente invención también proporciona anticuerpos de la invención que actúan como agonistas de TR4. En realizaciones específicas, los anticuerpos de la invención estimulan la apoptosis de las células que expresan TR4. En otras realizaciones específicas, los anticuerpos de la invención inhiben la unión de TRAIL a TR4. En otras realizaciones específicas, los anticuerpos de la invención regulan por aumento la expresión de TR4.

En el presente documento también se describen anticuerpos que inhiben la apoptosis de células que expresan TR4 y anticuerpos que regulan por disminución la expresión de TR4.

15 En realizaciones adicionales, los anticuerpos de la invención tienen una constante de disociación (K_D) de 10^{-7} M o menor. En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención tienen una constante de disociación (K_D) de 10^{-9} M o menor.

20 La presente invención proporciona además anticuerpos de la invención que estimulan la apoptosis de las células que expresan TR4 mejor que una concentración igual de los polipéptidos TRAIL estimula la apoptosis de células que expresan TR4.

La presente invención proporciona además anticuerpos de la invención que estimulan la apoptosis de células que expresan TR4 de igual forma en presencia o ausencia de reactivos de entrecruzamiento de anticuerpos; y/o estimulan la apoptosis con igual o mayor potencia que una concentración igual de TRAIL en ausencia de un anticuerpo de entrecruzamiento u otro agente de entrecruzamiento.

25 En realizaciones adicionales, los anticuerpos de la invención tienen una velocidad de disociación (K_{off}) de 10^{-3} /s o menor. En realizaciones adicionales, los anticuerpos de la invención tienen una velocidad de disociación (K_{off}) de 10^{-4} /s o menor. En otras realizaciones adicionales, los anticuerpos de la invención tienen una velocidad de disociación (K_{off}) de 10^{-5} /s o menor.

30 Los anticuerpos de la invención se unen, preferentemente, a TR4 respecto a su capacidad para unirse a otras proteínas (incluyendo TR1, TR5 y TR10).

En ciertas realizaciones, las propiedades de los anticuerpos de la presente invención, como se detallan en los siguientes ejemplos, hacen de los anticuerpos mejores agentes terapéuticos que los anticuerpos de unión a TR4 descritos previamente).

35 En el presente documento también se describen paneles de anticuerpos (incluidas moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos o variantes de anticuerpos), en los que los miembros del panel corresponden a uno, dos, tres, cuatro, cinco, diez, quince, veinte o más anticuerpos diferentes de la invención (p, ej., anticuerpos enteros, Fabs, fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fd, Fv unidos por puentes disulfuro (sdFv), anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) y scFv). En el presente documento también se describen mezclas de anticuerpos, en las que la mezcla corresponde a uno, dos, tres, cuatro, cinco, diez, quince, veinte o más anticuerpos diferentes de la invención (p, ej., anticuerpos enteros, Fabs, fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fd, Fvs unidos por puentes disulfuro (sdFv), anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) y scFv)). En el presente documento se describen composiciones que comprenden, o como alternativa que consisten en, uno, dos, tres, cuatro, cinco, diez, quince, veinte o más anticuerpos de la presente invención (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos de los mismos). Una composición descrita en el presente documento puede comprender, o como alternativa consistir en, uno, dos, tres, cuatro, cinco, diez, quince, veinte o más secuencias de aminoácidos de uno o más anticuerpos o fragmentos o variantes de los mismos. Como alternativa, una composición descrita en el presente documento puede comprender o, como alternativa consistir en, moléculas de ácido nucleico que codifican uno o más anticuerpos de la invención.

45 En el presente documento se describen proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo (incluidas moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos o variantes de los mismos) de la invención, y un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido no relacionado con un anticuerpo o dominio de anticuerpo). Las moléculas de ácido nucleico que codifican estas proteínas de fusión también se describe en el presente documento. Una composición puede comprender, o como alternativa consistir en, uno, dos, tres, cuatro, cinco, diez, quince, veinte o más proteínas de fusión. Como alternativa, una composición puede comprender, o como alternativa consistir en, uno, dos, tres, cuatro, cinco, diez, quince, veinte o más proteínas de fusión.

La presente invención también proporciona una o más moléculas de ácido nucleico, generalmente aisladas, que

codifican un anticuerpo (incluidas moléculas tales como scFv, dominios de VH o dominios de VL, que comprenden, o como alternativa que consisten en, un fragmento de anticuerpo del mismo) de la invención. La invención también proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención. La presente invención también proporciona una célula huésped transformada con una molécula de ácido nucleico de la invención y progenie de la misma. En concreto, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende el vector de la invención o la molécula de ácido nucleico de la invención. La presente invención también proporciona un procedimiento para la producción de un anticuerpo (incluida una molécula que comprende, o como alternativa que consiste en, un fragmento de anticuerpo del mismo) de la invención. En particular, la presente invención proporciona un procedimiento para fabricar un anticuerpo que comprende: (a) expresar el anticuerpo codificado por la molécula de ácido nucleico de la invención; y (b) recuperar dicho anticuerpo; y proporciona un anticuerpo que se puede obtener mediante el procedimiento de la invención. La presente invención también proporciona una línea celular modificada mediante ingeniería para expresar el anticuerpo de la invención; un anticuerpo obtenible mediante expresión de la línea celular de la invención; una célula que produce el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención; una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención; y un kit que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención. Éstos y otros aspectos de la invención se describen con mayor detalle a continuación.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra el efecto del tratamiento con T1014A04 sobre el crecimiento del tumor SW480 en ratones Swiss nu/nu con o sin tratamiento con topotecán a 0,3 mg/kg.

La **Figura 2** muestra el efecto del tratamiento con T1014A04 sobre el crecimiento del tumor SW480 en ratones Swiss nu/nu con o sin tratamiento con topotecán a 0,6 mg/kg.

La **Figura 3** muestra el efecto del tratamiento con 14G03 sobre el crecimiento de tumores tras 28 días con y sin tratamiento con topotecán.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término “anticuerpo”, como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. Como tal, el término anticuerpo abarca no solo moléculas enteras de anticuerpo sino también fragmentos de anticuerpo. Ejemplos de moléculas que se describen con el término “anticuerpo” en el presente documento incluyen, entre otros: Fv de cadena sencilla (scFv), fragmentos Fab, fragmentos FAb', F(ab')₂, Fv unidos por puentes disulfuro (sdFv), Fv y fragmentos que comprende, o como alternativa que consisten en, un dominio VL o VH. Como se usa en el presente documento, las expresiones “Fv de cadena sencilla” o “scFv” se refieren a un polipéptido que comprende un dominio VL del anticuerpo unido a un dominio VH de un anticuerpo. Los anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a TR4 pueden tener reactividad cruzada con otros antígenos. Preferentemente, los anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a TR4 no producen reacción cruzada con otros antígenos (p. ej., otros receptores de TRAIL u otros miembros de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral). Los anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a TR4 se pueden identificar mediante, por ejemplo, inmunoensayos u otras técnicas conocidas para los expertos en la técnica, por ejemplo los inmunoensayos descritos en los ejemplos siguientes.

Los anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, anticuerpos monoclonales, multispecíficos, humanos o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluidos, por ejemplo, anticuerpos anti-Id frente a anticuerpos de la invención), anticuerpos fabricados intracelularmente (es decir, intracuerpos) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), (p. ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase de molécula de inmunoglobulina. En el presente documento se describe un anticuerpo que comprende, o como alternativa que consiste en, un dominio VH, CDR de VH, dominio VL o CDR de VL que tiene una secuencia de anticuerpos de una cualquiera de las indicadas en la Tabla 1, o un fragmento o variante del mismo. En una realización preferida, la inmunoglobulina es un isotipo de IgG1. En otra realización preferida, la inmunoglobulina es un isotipo de IgG4. Las inmunoglobulinas pueden tener una cadena pesada y una ligera. Una serie de cadenas pesadas de IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY pueden aparearse con una cadena ligera de las formas kappa o lambda.

El término “variante”, como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que posee una función similar o idéntica a la de un polipéptido de TR4, un fragmento de un polipéptido de TR4, un anticuerpo anti-TR4 o fragmento de anticuerpo del mismo, pero no necesariamente comprende una secuencia de aminoácidos similar o idéntica de un polipéptido de TR4, un fragmento de un polipéptido de TR4, un anticuerpo anti-TR4 o fragmento de anticuerpo del mismo, o posee una estructura similar o idéntica de un polipéptido de TR4, un fragmento de un polipéptido de TR4, un anticuerpo anti-TR4 o fragmento de anticuerpo del mismo, respectivamente. Una variante que tiene una secuencia de aminoácidos similar se refiere a un polipéptido que satisface al menos uno de los

- siguientes: (a) un polipéptido que comprende, o como alternativa que consisye en, una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de TR4 (SEC ID N°1), un fragmento de un anticuerpo anti-TR4 o fragmento de anticuerpo del mismo (incluyendo un dominio VH, CDR de VH, un dominio VL, o CDR de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera o más scFv indicadas en la Tabla 1) descritos en el presente documento; (b) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos, cuya secuencia complementaria híbrida en condiciones rigurosas con una secuencia de nucleótidos que codifica TR4 (SEC ID N°1), un fragmento de un polipéptido de TR4, un anticuerpo anti-TR4 o fragmento de anticuerpo del mismo (incluyendo un dominio VH, CDR de VH, un dominio VL, o CDR de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las indicadas en la Tabla 1), descritos en el presente documento, de al menos 5 residuos de aminoácidos, al menos 10 residuos de aminoácidos, al menos 15 residuos de aminoácidos, al menos 20 residuos de aminoácidos, al menos 25 residuos de aminoácidos, al menos 30 residuos de aminoácidos, al menos 40 residuos de aminoácidos, al menos 50 residuos de aminoácidos, al menos 60 amino residuos, al menos 70 residuos de aminoácidos, al menos 80 residuos de aminoácidos, al menos 90 residuos de aminoácidos, al menos 100 residuos de aminoácidos, al menos 125 residuos de aminoácidos, o al menos 150 residuos de aminoácidos; y (c) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 %, idéntica a la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de TR4, un fragmento de un polipéptido de TR4, un anticuerpo anti-TR4 o fragmento de anticuerpo del mismo (incluyendo un dominio VH, CDR de VH, un dominio VL, o CDR de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera o más scFvs indicadas en la Tabla 1), que se describen en el presente documento. Un polipéptido con estructura similar a un polipéptido de TR4, un fragmento de un polipéptido de TR4, un anticuerpo anti-TR4 o fragmento de anticuerpo del mismo, descrito en el presente documento se refiere a un polipéptido que tiene una estructura secundaria, terciaria o cuaternaria similar de un polipéptido de TR4, un fragmento de un polipéptido de TR4, un anticuerpo anti-TR4 o fragmento del mismo, descrito en el presente documento. La estructura de un polipéptido se puede determinar mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, entre otros, cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear y microscopía electrónica cristalográfica.
- Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico, se alinean las secuencias para fines comparativos óptimos (p. ej., se pueden introducir espacios en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para una alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico). Después se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácidos o nucleótido en la correspondiente posición en la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en dicha posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad= número de posiciones solapantes idénticas/número total de posiciones x 100%). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud.
- La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede conseguir usando un algoritmo matemático conocido por los expertos en la técnica. Un ejemplo de un algoritmo matemático para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268(1990), modificado como en Karlin y Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877(1993). Los programas BLASTn y BLASTx de Altschul, y col., J. Mol. Biol. 215:403-410(1990) han incorporado dicho algoritmo. Las búsquedas de nucleótidos en BLAST se pueden realizar con el programa BLASTn (puntuación= 100; longitud de texto= 12), para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas en BLAST se pueden realizar con el programa BLASTx (puntuación= 50; longitud de texto= 3) para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas proteicas de la invención. Para obtener alineaciones de huecos con fines comparativos, se puede usar Gapped BLAST como se describe en Altschul y col., Nucleic Acids Res. 25:3589-3402(1997). Como alternativa se puede usar PSI-BLAST para realizar una búsqueda repetida que detecte relaciones distantes entre moléculas (*Id.*). Cuando se usan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-BLAST se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (p. ej., BLASTx y BLASTn). (Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- Otro ejemplo de un algoritmo matemático usado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). El programa ALIGN (versión 2.0), que forma parte del paquete de software para alineación de secuencias GCG ha incorporado dicho algoritmo. Otros algoritmos para análisis de secuencia conocidos en la técnica incluyen ADVANCE y ADAM como se describe en Torellis and Robotti Comput. Appl. Biosci., 10 :3-5(1994); y FASTA descritos en Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8(1988). En FASTA, ktup es una opción de control que establece la sensibilidad y la velocidad de la búsqueda.
- El término "derivado", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido variante que comprende, o como alternativa que consiste en, una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de TR4, un fragmento de un polipéptido de TR4, o un anticuerpo de la invención que se une inmuno-específicamente a un polipéptido de TR4, que se ha alterado mediante la introducción de sustituciones, deleciones o adiciones de residuos aminoácidos. El

término “derivado”, como se usa en el presente documento, también se refiere a un polipéptido de TR4, un fragmento de un polipéptido de TR4, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de TR4 que se ha modificado, por ejemplo mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, un polipéptido de TR4, un fragmento de un polipéptido de TR4, o un anticuerpo anti-TR4 se puede modificar mediante, por ejemplo, glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación mediante grupos protectores/bloqueantes, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína etc. Un derivado de un polipéptido de TR4, un fragmento de un polipéptido de TR4 o un anticuerpo anti-TR4 se pueden modificar mediante modificaciones químicas usando técnicas conocidas por los expertos en la materia, incluidas, entre otras, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina etc. Además, un derivado de un polipéptido de TR4, un fragmento de un polipéptido de TR4 o un anticuerpo anti-TR4 pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos. Un derivado polipeptídico posee una función similar o idéntica a la de un polipéptido de TR4, un fragmento de un polipéptido de TR4 o un anticuerpo anti-TR4 descritos en el presente documento.

El término “epítomos” como se usa en el presente documento se refiere a porciones de TR4 que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferentemente un mamífero. Un epítomo que tiene actividad inmunogénica es una porción de un polipéptido de TR4 que produce una respuesta de anticuerpo en un animal. Un epítomo que tiene actividad antigénica es una porción de TR4 a la que un anticuerpo se une inmunoespecíficamente, según se determina mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, por ejemplo mediante inmunoensayos descritos en el presente documento. Los epítomos antigénicos no necesariamente tienen que ser inmunogénicos.

El término “fragmento” como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácidos, al menos 10 residuos de aminoácidos, al menos 15 residuos de aminoácidos, al menos 20 residuos de aminoácidos, al menos 25 residuos de aminoácidos, al menos 30 residuos de aminoácidos, al menos 35 residuos de aminoácidos, al menos 40 residuos de aminoácidos, al menos 45 residuos de aminoácidos, al menos 50 residuos de aminoácidos, al menos 60 aminoácidos, al menos 70 residuos de aminoácidos, al menos 80 residuos de aminoácidos, al menos 90 residuos de aminoácidos, al menos 100 residuos de aminoácidos, al menos 125 residuos de aminoácidos, al menos 150 residuos de aminoácidos, al menos 175 residuos de aminoácidos, al menos 200 residuos de aminoácidos, o al menos 250 residuos de aminoácidos, de la secuencia de aminoácidos de TR4, o un anticuerpo anti-TR4 (incluyendo moléculas tales como scFv, que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo o variantes del mismo).

El término “proteína de fusión”, como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-TR4 de la invención y una secuencia de aminoácidos de un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido no relacionado con un anticuerpo o dominio de anticuerpo).

El término “célula huésped”, como se usa en el presente documento, se refiere a la célula objeto concreto transfectada con una molécula de ácido nucleico y la progenie o potencial progenie de dicha célula. La progenie puede no ser idéntica a la célula parental transfectada con la molécula de ácido nucleico debido a mutaciones o influencias ambientales que se pueden producir en las generaciones sucesivas o la integración de la molécula de ácido nucleico en el genoma de la célula huésped.

Los anticuerpos de la presente invención se proporcionan, preferentemente, en una forma aislada y, preferentemente, están sustancialmente purificados. Por “aislado” se pretende decir un anticuerpo extraído de su ambiente nativo. Por tanto, por ejemplo, un polipéptido producido y/o contenido dentro de una célula huésped recombinante se considera aislado para los fines de la presente invención.

Estructura del anticuerpo

Se sabe que la unidad estructural básica de los anticuerpos que comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, en el que cada par tiene una cadena “ligera” y una cadena “pesada” (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Véase, *generalmente*, Fundamental Immunology Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Las regiones variables de cada par de cadena ligera/cadena pesada forman el sitio de unión a antígeno.

Por tanto, un anticuerpo de tipo IgG intacto tiene dos sitios de unión. A excepción de los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son los mismos.

Las cadenas exhiben todas ellas la misma estructura general de regiones estructurales (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la

complementariedad o CDR. Las CDR de las cadenas pesadas y ligeras de cada par están alineadas por las regiones estructurales, lo que permite la unión a un epítipo específico. Del extremo N al extremo C, las cadenas ligeras y pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio se realiza de acuerdo con las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia y col. Nature 342:878-883 (1989).

Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante diversos procedimientos, incluidos fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny y col., J Immunol. 148:1547-1553 (1992). Además, los anticuerpos biespecíficos se pueden formar como "diacuerpos" (Holliger y col., "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments" PNAS USA 90:6444-6448 (1993)) o "Janusins" (Traunecker y col., "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" EMBO J 10:3655-3659 (1991) y Traunecker y col., "Janusin: new molecular design for bispecific reagents" Int J Cancer Suppl 7:51-52 (1992)).

La producción de anticuerpos biespecíficos puede ser un proceso relativamente intenso en comparación con la producción de anticuerpos convencionales y los rendimientos y el grado de pureza normalmente son menores para los anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos no existen en forma de fragmentos que tienen un único sitio de unión (p. ej., Fab, Fab', y Fv).

Anticuerpos anti-TR4

Usando tecnología de expresión en fagos, los presentes inventores han identificado moléculas de anticuerpos de cadena sencilla ("scFVs") que se unen inmunoespecíficamente a TR4 (o fragmentos o variantes del mismo). En el presente documento también se describen moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos o variantes de estos scFv (p. ej., incluidos los dominios VH, CDR de VH, dominios VL o CDR de VL, que tienen una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los indicados en la Tabla 1), que se unen inmunoespecíficamente a TR4 (o fragmentos o variantes del mismo) también entran dentro de la invención, como también las moléculas de ácido nucleico que codifican estos scFv y/o moléculas.

En el presente documento se describen scFv que comprenden, o como alternativa que consisten en, una 345-387, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N° 42-53, preferentemente las SEC ID N° 42 y 43 como se indica en la Tabla 1 a continuación. En el presente documento también se describen moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos o variantes de estos scFv (p. ej., incluidos los dominios VH, CDR de VH, dominios VL o CDR de VL, que tienen una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los indicados en la Tabla 1), que se unen inmunoespecíficamente a TR4, como también las moléculas de ácido nucleico que codifican estos scFv y/o moléculas (p. ej., SEC ID N° 54-65).

Los ScFv correspondientes a las SEC ID N° 42-53 se seleccionaron según su capacidad para unirse al polipéptido de TR4.

La presente invención proporciona anticuerpos (incluidas moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos de los mismos) que se unen inmunoespecíficamente a un polipéptido, o a un fragmento polipeptídico de, TR4. En particular, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende (a) la secuencia de aminoácidos del dominio VH de SEC ID N° 43 o la secuencia de aminoácidos del dominio VH expresado por el hibridoma de n° de depósito en la ATCC PTA-3570 y (b) la secuencia de aminoácidos del dominio VL de SEC ID N° 43 o la secuencia de aminoácidos del dominio VL expresado por el hibridoma de n° de depósito en la ATCC PTA-3570, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une inmunoespecíficamente a TR4; y un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende (a) la secuencia de aminoácidos de las 3 CDR de VH de SEC ID N° 43 o la secuencia de aminoácidos de las 3 CDR de VH expresadas por el hibridoma de n° de depósito en la ATCC PTA-3570; y (b) la secuencia de aminoácidos de las 3 CDR de VL de SEC ID N° 43 o la secuencia de aminoácidos de las 3 CDR de VL expresadas por el hibridoma de n° de depósito en la ATCC PTA-3570, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une inmunoespecíficamente a TR4. Otros anticuerpos descritos en el presente documento corresponden a los scFv indicados en la tabla 1. Dichos scFv pueden "convertirse" rutinariamente en moléculas de inmunoglobulina insertando, por ejemplo, las secuencias de nucleótidos que codifican los dominios VH y VL del scFv en un vector de expresión que contiene las secuencias del dominio constante y modificarse mediante ingeniería para dirigir la expresión de la molécula de inmunoglobulina, como se describe con mayor detalle en el ejemplo 5 siguiente.

Las líneas celulares NS0 que expresan anticuerpos de tipo IgG1 que comprenden los dominios VH y VL de scFv se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") en las fechas indicadas en la Tabla 1 y poseen los números de depósito de la ATCC identificados en la Tabla 1. La ATCC está ubicada en 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. El depósito en la ATCC se ha hecho bajo los términos del Tratado de Budapest en el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para propósitos de procedimiento de patente.

En el presente documento se describen anticuerpos que comprenden los dominios VH y VL de los scFv en la tabla 1.

En una realización preferida, un anticuerpo de la invención es el anticuerpo expresado por la línea celular TRAIL (NSO) 14G03 #39 P:14 7/2/01 (véase la Tabla 1).

- 5 En el presente documento también se describe un anticuerpo expresado por la línea celular NSO α TRAIL 1985 BU #81 P:15 6/21/01 (véase la Tabla 1).

En el presente documento también se describe un anticuerpo expresado por la línea celular NSO anti-TRAIL 14F08 #28 P:11 (véase la Tabla 1).

Tabla 1: scFv que se unen inmunoespecíficamente a los receptores TRAIL

scFv	Proteína de ScFv SEC ID N°	ADN de ScFv SEC ID N°	AA del dominio VH	AA de la CDR de VH	AA de la CDR2 de VH	AA de la CDR3 de VH	AA del dominio VL	AA de la CDR1 de VL	AA de la CDR2 de VL	AA de la CDR3 de VL	Anficerpo que expresa la línea celular	N° de depósito en la ATCC	Fecha de depósito en la ATCC
T1014A04	42	54	1 - 118	26 - 35	50 - 66	99 - 107	135 - 245	157 - 170	186 - 192	225 - 234	NSO αTRAIL 1985 BU #81 P: 15 6/21/01	PTA - 3571	30 de julio de 2001
T1014G03	43	55	1 - 118	26 - 35	50 - 66	99 - 107	135 - 245	157 - 170	186 - 192	225 - 234	TRAIL (NSO) 14G03 #39 P: 14 7/2/01	PTA - 3570	30 de julio de 2001
T1014A02	44	56	1 - 116	26 - 35	50 - 65	98 - 105	134 - 244	156 - 168	184 - 190	223 - 233			
T1014A12	45	57	1 - 118	26 - 35	50 - 66	99 - 107	135 - 245	157 - 170	186 - 192	225 - 234			
T1014B01	46	58	1 - 118	26 - 35	50 - 66	99 - 107	135 - 245	157 - 170	186 - 192	225 - 234			
T1014B11	47	59	1 - 118	26 - 35	50 - 66	99 - 107	135 - 245	157 - 170	186 - 192	225 - 234			
T1014F08	48	60	1 - 118	26 - 35	50 - 66	99 - 107	135 - 245	157 - 170	186 - 192	225 - 234	NSO anti - TRAIL 14F08 #28 P:11	PTA - 3675	29 de agosto de 2001
T1014G04	49	61	1 - 118	26 - 35	50 - 66	99 - 107	135 - 245	157 - 170	186 - 192	225 - 234			
T1015A02	50	62	1 - 123	26 - 37	52 - 67	100 - 112	140 - 250	162 - 174	190 - 196	229 - 239			
T1015A07	51	63	1 - 118	26 - 35	50 - 66	99 - 107	135 - 245	157 - 170	186 - 192	225 - 234			
T1015E01	52	64	1 - 118	26 - 35	50 - 66	99 - 107	135 - 245	157 - 170	186 - 192	225 - 234			
T1006F07	53	65	1 - 125	26 - 35	50 - 66	99 - 114	142 - 249	164 - 174	190 - 196	229 - 238			

La presente invención abarca anticuerpos (incluidas moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos de los mismos) que se unen inmunoespecíficamente a TR4. Un polipéptido de TR4 incluye, entre otros, TR4 (SEC ID N°1) o el polipéptido codificado por el ADNc en el clon HCUDS60 contenido en el depósito en la ATCC 97853 depositado el 21 de enero de 1997. En el presente documento también se describen anticuepros que se pueden unir inmunoespecíficamente a TR4 como se ha descrito anteriormente y a TR7 (SEC ID N° 3) o el polipéptido codificado por el ADNc en el clon HLYBX88 contenido en el depósito de la ATCC 97920 depositado el 7 de marzo de 1997. Los receptores de TRAIL pueden producirse mediante expresión recombinante de los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de las SEC ID N° 1-5, (TR4, TR5, TR7, TR10 y TR1; por ejemplo los ADNc en la ATCC con números de depósito 97853, (TR4) 97798 (TR5, depositado el 20 de noviembre de 1996), 97920 (TR7) o 209040 (TR10, depositado el 15 de mayo de 1997).

Los anticuerpos de la invención se unen, preferentemente, a TR4 (SEC ID N°1) respecto a su capacidad para unirse a otras proteínas incluyendo TR1, TR5, TR7 o TR10 (SEC ID N° 5, 2, 3 y 4) o fragmentos, variantes o proteínas de fusión de los mismos. También se describen en el presente documento anticuerpos que se unen, preferentemente, a TR4 y TR7 (SEC ID N°1 y 3) o fragmentos o variantes de los mismos respecto a su capacidad para unirse a otras proteínas incluyendo TR1, TR5 o TR10 (SEC ID N° 5, 2 y 4) o fragmentos, variantes o proteínas de fusión de los mismos. En el presente documento también se describen los anticuerpos que se unen a TR1 TR4, TR5, TR7 y TR10 (SEC ID N° 5, 1, 2, 3, y 4). Una capacidad del anticuerpo para unirse, preferentemente, a un antígeno en comparación con otro antígeno se puede determinar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica.

20 Polipéptidos TR4

Los anticuerpos de la presente invención se unen inmunoespecíficamente a TR4. La sección siguiente describe los polipéptidos TR4, fragmentos y variantes que se pueden unir mediante los anticuerpos de la invención con más detalle. Los polipéptidos TR4, fragmentos y variantes que se pueden unir mediante los anticuerpos de la invención también se describen en los números de publicación interacciona, por ejemplo los documentos WO98/32856 y WO00/67793.

Los anticuerpos de la presente invención se unen inmunoespecíficamente al polipéptido de TR4. Un anticuerpo que se unen inmunoespecíficamente a TR4, en algunas realizaciones, se unen a fragmentos, variantes (incluyendo especies ortólogas de TR4), multímeros o formas modificadas de TR4. Por ejemplo, un anticuerpo inmunoespecífico de TR4 se puede unir al resto TR4 de una proteína de fusión que comprende todo o una porción de TR4.

Las proteínas TR4 se pueden encontrar como monómeros o multímeros (es decir, dímeros, trímeros, tetrámeros y multímeros superiores). De acuerdo con lo anterior, la presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a proteínas TR4 encontradas como monómeros o como parte de multímeros. En realizaciones específicas, los anticuerpos de la invención se unen a monómeros, dímeros, trímeros o tetrámeros de TR4. En realizaciones adicionales, los anticuerpos de la invención se unen al menos a dímeros, al menos a trímeros o al menos a tetrámeros que contienen uno o más polipéptidos TR4.

Los anticuerpos de la invención pueden unirse a homómeros o heterómeros de TR4. Como se usa en el presente documento, el término homómero se refiere a un multímero que solo contiene proteínas TR4 (incluyendo fragmentos de TR4, variantes y proteínas de fusión, como se describe en el presente documento). Estos homómeros pueden contener proteínas TR4 que tienen secuencias polipeptídicas idénticas o diferentes. En una realización específica, un homómero es un multímero que solo contiene proteínas TR4 que tienen una secuencia polipeptídica idéntica. En otra realización específica, los anticuerpos de la invención se unen a homómeros de TR4 que contienen proteínas TR4 que tienen secuencias polipeptídicas diferentes. En realizaciones específicas, los anticuerpos de la invención se unen a un homodímero de TR4 (p. ej., que contienen proteínas TR4 que tienen secuencias polipeptídicas idénticas o diferentes). En tratamientos adicionales, los anticuerpos de la invención se unen al menos a un homodímero, al menos a un homotrímero o al menos a un homotetrámero de TR4.

En realizaciones específicas, los anticuerpos de la presente invención se unen a homotrímeros de TR4 (p. ej., que contienen proteínas TR4 que tienen secuencias polipeptídicas idénticas o diferentes),

Como se usa en el presente documento, el término heterómero se refiere a un multímero que contiene proteínas heterólogas (es decir, proteínas que contienen secuencias polipeptídicas que no corresponden a secuencias polipeptídicas codificadas por el gen TR4) además de las proteínas TR4. En una realización específica, los anticuerpos de la invención se unen a un heterodímero, un heterotrímero o un heterotetrámero. En tratamientos adicionales, los anticuerpos de la invención se unen al menos a un homodímero, al menos a un homotrímero o al menos a un homotetrámero que contiene uno o más polipéptidos TR4.

En realizaciones específicas, los anticuerpos de la presente invención se unen a un hetertrímero de TR4 (p. ej., que contienen 1 o 2 proteínas TR4 y 2 o 1, respectivamente, proteínas TR7).

Los multímeros unidos por uno o más anticuerpos de la invención puede ser el resultado de asociaciones hidrófobas, hidrófilas, iónicas y/o covalentes y/o pueden estar indirectamente unidas mediante, por ejemplo, formación de liposomas. Por tanto, en una realización, los multímeros unidos por uno o más anticuerpos de la

invención, tales como, por ejemplo, homodímeros u homotrímeros, se forman cuando las proteínas TR4 entran en contacto unas con otras en solución. En otra realización, los heteromultímeros unidos por uno o más anticuerpos de la invención, tales como, por ejemplo, heterotrímeros o heterotetrámeros, se forman cuando las proteínas entran en contacto con los anticuerpos frente a los polipéptidos TR4 (incluyendo los anticuerpos frente a la secuencia de polipéptidos heterólogos en una proteína de fusión) en solución. En otras realizaciones, los multímeros unidos por uno o más anticuerpos de la invención están formados mediante asociaciones covalentes con y/o entre las proteínas TR4. Dichas asociaciones covalentes pueden implicar uno o más residuos de aminoácidos contenidos en la secuencia de polipéptidos de la proteína (p. ej., la secuencia polipeptídica citada en la SEC ID N° 1 o el polipéptido codificado por el clon de ADNc depositado en la ATCC con el número de depósito 97853). En un ejemplo, las asociaciones covalentes se entrecruzan entre los residuos de cisteína localizados dentro de las secuencias polipeptídicas de las proteínas que interaccionan en el polipéptido nativo (es decir, de origen natural). En otro ejemplo, las asociaciones covalentes son la consecuencia de manipulación química o recombinante. Como alternativa, dichas asociaciones covalentes pueden implicar uno o más residuos de aminoácidos contenidos en la secuencia polipeptídica heteróloga en una proteína de fusión TR4. En un ejemplo, las asociaciones covalentes se producen entre la secuencia heteróloga contenida en una proteína de fusión (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Número 5.478.925). En un ejemplo específico, las asociaciones covalentes se producen entre la secuencia heteróloga contenida en una proteína de fusión TR4-Fc (como se describe en el presente documento). En otro ejemplo específico, las asociaciones covalentes de las proteínas de fusión se producen entre las secuencias polipeptídicas heterólogas de otro miembro ligando/receptor de la familia del TNF que es capaz de formar multímeros asociados covalentemente, tal como, por ejemplo, osteoprotegerina (véase, por ejemplo, la publicación internacional número WO 98/49305).

Los multímeros que pueden estar unidos por uno o más anticuerpos de la invención se pueden generar usando técnicas químicas conocidas en la materia. Por ejemplo, proteínas que se desea que estén contenidas en los multímeros pueden entrecruzarse químicamente usando moléculas ligadoras y técnicas de optimización de longitud de la molécula ligadora conocidas en la materia (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N° 5.478.925). Adicionalmente, los multímeros que pueden estar unidos mediante uno o más anticuerpos de la invención se pueden generar usando técnicas conocidas en la materia para formar uno o más entrecruzamientos intermoleculares entre los residuos de cisteína localizados dentro de la secuencia polipeptídica de las proteínas que se desea que estén contenidas en el multímero (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Número 5.478.925). Adicionalmente, las proteínas que pueden estar unidas mediante uno o más anticuerpos de la invención se pueden modificar de forma rutinaria mediante la adición de cisteína o biotina al extremo C o al extremo N de la secuencia polipeptídica de la proteína y se pueden aplicar técnicas conocidas en la materia para generar multímeros que contengan una o más de estas proteínas modificadas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Número 5.478.925). Adicionalmente se pueden aplicar técnicas conocidas en la materia para generar liposomas que contienen los componentes proteicos que se desean contener en el multímero que puede estar unido mediante uno o más anticuerpos de la invención (véase, por ejemplo, la patente número 5.478.925).

Como alternativa, los multímeros que pueden estar unidos por uno o más anticuerpos de la invención se pueden generar usando técnicas de ingeniería genética conocidas en la materia. En una realización, las proteínas contenidas en los multímeros que pueden estar unidas mediante uno o más anticuerpos de la invención se producen de forma recombinante usando la tecnología de las proteínas de fusión descritas en el presente documento o, de otro modo, conocidas en la materia (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N° 5.478.925). En una realización, los polinucleótidos que codifican un homodímero que puede estar unido mediante uno o más anticuerpos de la invención se generan ligando una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de TR4 a una secuencia que codifica un polipéptido ligador y, después, además un polinucleótido sintético que codifica el producto traducido del polipéptido en orientación inversa desde el extremo C original al extremo N (que carece de la secuencia líder) (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Número 5.478.925). En otra realización, se aplican técnicas recombinantes descritas en el presente documento o, por el contrario, conocidas en la materia, para generar polipéptidos TR4 recombinantes que contienen un dominio transmembrana y que se pueden incorporar mediante técnicas de reconstitución de membrana en liposomas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Número 5.478.925). En otra realización, dos o más polipéptidos TR4 están unidos mediante ligadores sintéticos (p. ej., ligadores peptídicos, de hidratos de carbono o poliméricos solubles). Ejemplos incluyen los ligadores peptídicos descritos en la patente de EE.UU. N° 5.073.627. Las proteínas que comprenden muchos polipéptidos TR4 separados por ligadores peptídicos se pueden producir usando tecnología de ADN recombinante convencional. En realizaciones específicas, los anticuerpos de la invención se unen a proteínas que comprenden muchos polipéptidos TR4 separados por ligadores peptídicos.

Otro procedimiento para preparar polipéptidos TR4 multiméricos implica el uso de polipéptidos TR4 condensados a una cremallera de leucina o a una secuencia polipeptídica de leucina. Los dominios de la cremallera de leucina y los dominios de la cremallera de isoleucina que estimulan la multimerización de las proteínas en las que se encuentran. Inicialmente, las cremalleras de leucina se identificaron en varias proteínas de unión del ADN (Landschulz y col., Science 240:1759, (1988)), Entre las cremalleras de leucina conocidas se encuentran los péptidos de origen natural y derivados de los mismos que forman dímeros o trímeros. Ejemplos de dominios de cremallera de leucina adecuados para producir proteínas TR4 multiméricas solubles son los descritos en la solicitud de PCT WO 94/10308. Las proteínas de fusión recombinantes que comprenden un polipéptido de TR4 soluble condensado a un

peptide que forma dímeros o trímeros en solución se expresan en células huésped adecuadas y el TR4 multimérico soluble resultante se recupera del sobrenadante del cultivo usando técnicas conocidas en la materia. En realizaciones específicas, los anticuerpos de la invención se unen a los monómeros de proteína de fusión en cremallera de leucina-TR4 y/o multímeros de proteína de fusión en cremallera de leucina-TR4.

- 5 Se cree que ciertos miembros de la familia de proteínas del TNF existen en forma trimérica (Beutler y Huffel, Science 264:667, 1994; Banner y col., Cell 73:431, 1993). Por tanto, el TR4 trimérico puede ofrecer la ventaja de una actividad biológica potenciada. Restos de cremallera de leucina preferidos son los que preferentemente forman trímeros. Un ejemplo es una cremallera de leucina derivada de la proteína D del surfactante pulmonar (SPD) como describen Hoppe y col., (FEBS Letters 344:191, (1994)) y en la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 10 08/446,922. En realizaciones específicas, los anticuerpos de la invención se unen a los trímeros de proteína de fusión de cremallera de leucina-TR4.

Otros péptidos derivados de proteínas triméricas de origen natural se pueden usar en la preparación de TR4 trimérico. En realizaciones específicas, los anticuerpos de la invención se unen a monómeros de la proteína de fusión-TR4 y/o trímeros de la proteína de fusión-TR4.

- 15 Los anticuerpos que se unen a los polipéptidos del receptor de TR4 se pueden unir a ellos como polipéptidos aislados o en su estado natural. Por "polipéptido aislado" se pretende decir un polipéptido extraído de su ambiente nativo. Por tanto, un polipéptido producido y/o contenido dentro de una célula huésped recombinante se considera aislado para los fines de la presente invención. Asimismo, se pretenden como "polipéptidos aislados" los polipéptidos que se han purificado, parcial o sustancialmente, de una célula huésped recombinante. Por ejemplo, una versión 20 producida de forma recombinante del polipéptido de TR4 se purifica sustancialmente mediante el procedimiento de una etapa descrito por Smith y Johnson, Gene 67:31-40 (1988). Por tanto, los anticuerpos de la presente invención se pueden unir a los polipéptidos receptores de TR4 producidos de forma recombinante. En una realización específica, los anticuerpos de la presente invención se unen a un receptor de TR4 expresado sobre la superficie de una célula que comprende un polinucleótido que codifica los aminoácidos 1 a 468 de SEC ID Nº 1 asociados operablemente a una secuencia reguladora que controla la expresión génica.

- Los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden unir a fragmentos polipeptídicos de TR4 que comprenden, o como alternativa que consisten en, una secuencia de aminoácidos contenida en la SEC ID Nº 1, codificados por el ADNc contenido en el número de depósito en la ATCC 97853 o codificados por ácidos nucleicos que hibridan (p. ej., en condiciones de hibridación rigurosas) con la secuencia de nucleótidos contenida en el número 30 de depósito en la ATCC 97853^o la hebra complementaria de la misma. Los fragmentos de polipéptidos pueden estar "libres" o comprendidos dentro de un polipéptido más grande del cual el fragmento forma una parte o región, lo más preferentemente como una única región continua. Los anticuerpos de la presente invención se pueden unir a fragmentos polipeptídicos, incluyendo, por ejemplo, fragmentos que comprenden, o como alternativa que consisten en, aproximadamente los residuos de aminoácidos: 1 a 23, 24 a 43, 44 a 63, 64 a 83, 84 a 103, 104 a 123, 124 a 143, 144 a 163, 164 a 183, 184 a 203, 204 a 223, 224 a 238, 239 a 264, 265 a 284, 285 a 304, 305 a 324, 325 a 35 345, 346 a 366, 367 a 387, 388 a 418, 419 a 439, y/o 440 a 468 de la SEC ID Nº 1. En este contexto "aproximadamente" incluye el valor citado particularmente, mayor o menor por varios aminoácidos (5, 4, 3, 2, o 1) en uno de los extremos o en ambos. Además, los fragmentos polipeptídicos unidos por los anticuerpos descritos en el presente documento pueden tener una longitud de al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 40 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175 o 200. En este contexto, "aproximadamente" incluye el valor citado particularmente, mayor o menor por varios aminoácidos (5, 4, 3, 2, or 1) en uno de los extremos o en ambos

- Preferentemente, los anticuerpos descritos en la presente invención se unen a fragmentos polipeptídicos seleccionados del grupo: un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, el dominio extracelular del receptor de TR4 (que se ha predicho que constituye los residuos de aminoácidos de aproximadamente 24 a 45 aproximadamente 238 en la SEC ID Nº 1), un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, dominios ricos en cisteína de TR4 (los cuales se pueden encontrar en el fragmento proteico que consiste en los residuos de aminoácidos de aproximadamente 131 a aproximadamente 229 en la SEC ID Nº 1); un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, el dominio rico en cisteína de TR4 que consiste en los residuos de aminoácidos de aproximadamente 131 a aproximadamente 183 en la SEC ID Nº 1); un polipéptido que comprende, 50 o como alternativa que consiste en, el dominio rico en cisteína de TR4 que consiste en los residuos de aminoácidos de aproximadamente 184 a aproximadamente 229 en la SEC ID Nº 1); un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, un dominio transmembrana del receptor de TR4 (que se ha predicho que constituye los residuos de aminoácidos de aproximadamente 239 a aproximadamente 264 en la SEC ID Nº 1); un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, un fragmento del polipéptido de TR4 maduro predicho que el 55 fragmento tiene una actividad funcional de TR4 (p. ej., actividad antigénica o actividad biológica); un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, el dominio intracelular del receptor de TR4 (que se ha predicho que constituye los residuos de aminoácidos de aproximadamente 265 a aproximadamente 46 en la SEC ID Nº 1); un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, los dominios extracelulares e intracelulares del receptor de TR4 con todo o parte del dominio transmembrana delecionado; un polipéptido que comprende, o como 60 alternativa que consiste en, el dominio de muerte del receptor de TR4 (que se ha predicho que constituye los residuos de aminoácidos de aproximadamente 379 a aproximadamente 422 en la SEC ID Nº 1); y un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, uno, dos, tres, cuatro o más porciones portadoras del epítipo de la

proteína receptora de TR4. En ejemplos adicionales, los fragmentos de polipéptido comprenden, o como alternativa consisten en, cualquier combinación de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o los 8 de los miembros anteriores, Los residuos de aminoácidos que constituyen los dominios intracelular, extracelular y transmembrana del receptor de TR4 se han predicho mediante análisis informático. Por tanto, como un experto apreciaría, los residuos de aminoácidos que constituyen estos dominios pueden variar ligeramente (p. ej., en aproximadamente 1 a aproximadamente 15 residuos de aminoácidos) dependiendo de los criterios usados para definir cada dominio. En el presente documento también se describen polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

Se cree que uno o ambos motivos extracelulares de TR4 ricos en cisteína es importante para las interacciones entre TR4 y sus ligandos (p. ej., TRAIL). De acuerdo con esto, en casos muy preferidos, los anticuerpos descritos en el presente documento se unen a fragmentos polipeptídicos TR4 que comprenden, o como alternativa que consisten en, los residuos aminoácidos 131 a 183 y/ 184 a 229 de la SEC ID N° 1. En otro caso muy preferido, los anticuerpos descritos en el presente documento se unen a polipéptidos TR4 que comprenden, o como alternativa que consisten en, los motivos extracelulares ricos en cisteína (residuos aminoácidos 131 a 229 de la SEC ID N° 1). En otro caso preferido, los anticuerpos descritos en el presente documento se unen a polipéptidos TR4 que comprenden, o como alternativa que consisten en, el dominio soluble extracelular de TR4 (residuos aminoácidos 24-238 de la SEC ID N°1). En casos muy preferidos, los anticuerpos descritos en el presente documento que se unen a todo o a una porción del dominio soluble extracelular de TR4 (p. ej., uno o ambos dominios ricos en cisteína) impiden la unión del ligando TRAIL a TR4. En otros casos muy preferidos, los anticuerpos descritos en el presente documento que se unen a todo o a una porción del dominio soluble extracelular de TR4 (p. ej., uno o ambos dominios ricos en cisteína) son agonistas del receptor TR4. En otros casos muy preferidos, los anticuerpos descritos en el presente documento que se unen a todo o a una porción del dominio soluble extracelular de TR4 (p. ej., uno o ambos dominios ricos en cisteína) inducen la muerte celular de la célula que expresa el receptor TR4.

Los anticuerpos descritos en el presente documento también se pueden unir a fragmentos que comprenden, o como alternativa que consisten en, características estructurales o funcionales de TR4. Dichos fragmentos incluyen residuos de aminoácidos que comprenden regiones alfa-hélice y de formación de alfa-hélice ("regiones alfa"), regiones lámina beta o de formación de lámina beta ("regiones beta"), regiones de giros y formadoras de giros ("regiones de giro"), regiones de hélice o de formación de hélice ("regiones de hélice", regiones hidrófilas, regiones hidrófobas, regiones antipáticas alfa, regiones antipáticas beta, regiones de formación de superficie y regiones de índice antigénico alto (es decir, que contienen cuatro o más aminoácidos contiguos que tienen un índice antigénico superior o igual a 1,5, identificado usando los parámetros por defecto del programa de Jameson-Wolf) del TR4 completo (es decir, de longitud completa). Ciertas regiones preferidas son las indicadas en la Tabla 2 e incluyen, entre otras, regiones de los tipos mencionados anteriormente identificadas mediante análisis de la secuencia de aminoácidos representada en (SEC ID N° 1), dichas regiones preferidas incluyen regiones alfa predichas de Garnier-Robson, regiones beta, regiones de giro y regiones de hélice; regiones alfa predichas de Chou-Fasman, regiones beta y regiones de giro; regiones hidrófilas predichas de Kyte-Doolittle; regiones anfipáticas alfa y beta de Eisenberg; regiones de formación de superficie de Emini; y regiones de índice antigénico alto de Jameson-Wolf, como se predice usando los parámetros por defecto de estos programas informáticos.

Los datos que representan las características estructurales y funcionales de TR4 expuestas en la tabla 2, como se ha descrito anteriormente, se generaron usando los diversos módulos y algoritmos del DNA*STAR con los parámetros por defecto. La columna I representa los resultados de un análisis de Garnier-Robson de las regiones de alfa hélice; la Columna II representa los resultados de un análisis de Chou-Fasman las regiones de alfa hélice; la Columna III representa los resultados de un análisis de Garnier Robson de las regiones de lámina beta; la Columna IV representa los resultados de un análisis de Chou-Fasman de las regiones de lámina beta; la Columna V representa los resultados de un análisis de Garnier Robson de las regiones de giro; la Columna VI representa los resultados de un análisis de Chou-Fasman de las regiones de giro; la Columna VII representa los resultados de un análisis de Garnier Robson de las regiones de hélice; la Columna VIII representa un gráfico de hidrofiliidad de Kyte-Doolittle; Columna; la Columna IX representa los resultados de un análisis de Eisenberg de regiones anfipáticas alfa; la Columna X representa los resultados de un análisis de Eisenberg de regiones anfipáticas beta; la Columna XI representa los resultados de un análisis de Karplus-Schultz de regiones flexibles; la Columna XII representa la puntuación del índice antigénico de Jameson-Wolf; y la Columna XIII representa el gráfico de probabilidad de superficie de Emini.

En un ejemplo preferido, los datos representados en las columnas VIII, XII, and XIII de la tabla 2 se pueden usar para determinar las regiones de TR4 que exhiben un elevado grado de potencial de antigeneicidad. Las regiones de alta antigeneicidad se determinan a partir de los datos presentados en las columnas VIII, XII, y/o XIII eligiendo los valores que representan regiones del polipéptido que es probable que se expongan en la superficie del polipéptido en un ambiente en el que se puede producir reconocimiento antigénico en el proceso de iniciación de una respuesta inmunitaria.

Las regiones preferidas mencionadas anteriormente son las indicadas en la Tabla 2 e incluyen, entre otras, regiones de los tipos mencionados anteriormente identificadas mediante análisis de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 1. Como se indica en la Tabla 2, dichas regiones preferidas incluyen regiones alfa de Garnier-Robson, regiones beta, regiones de giro y regiones de hélice, regiones alfa de Chou-Fasman, regiones beta y regiones de giro, regiones hidrófilas de Kyte-Doolittle, regiones anfipáticas alfa y beta de Eisenberg, regiones flexibles de

Karplus-Schulz; regiones de índice antigénico alto de Jameson-Wolf y regiones de formación de superficie de Emini. Entre los fragmentos polipeptídicos preferidos unidos por uno o más anticuerpos descritos en el presente documento son los que comprenden las regiones de TR4 que combinan varias características estructurales, tales como varias (p. ej., 1, 2, 3 o 4) de las mismas o diferentes características de la región que se indican anteriormente y en la tabla 2.

5

Tabla 2

Res.	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Met	1	.	.	B	0,12	.	.	.	-0,10	0,90
Ala	2	C	-0,08	*	*	.	0,25	1,08
Pro	3	C	0,42	*	*	.	0,10	0,86
Pro	4	T	C	-0,04	*	*	.	1,05	1,69
Pro	5	A	T	.	0,31	.	*	F	1,00	1,24
Ala	6	A	T	.	0,10	.	*	F	1,00	1,10
Arg	7	A	T	.	0,34	.	*	.	0,10	0,58
Val	8	.	.	B	B	.	.	.	-0,03	.	*	.	-0,30	0,37
His	9	.	.	B	B	.	.	.	-0,52	.	*	.	-0,30	0,37
Leu	10	.	.	B	B	.	.	.	-1,12	.	*	.	-0,60	0,17
Gly	11	.	.	B	B	.	.	.	-1,12	.	*	.	-0,60	0,18
Ala	12	.	.	B	B	.	.	.	-2,09	.	*	.	-0,60	0,14
Phe	13	.	.	B	B	.	.	.	-1,54	.	*	.	-0,60	0,12
Leu	14	.	.	B	B	.	.	.	-1,72	.	.	.	-0,60	0,18
Ala	15	.	.	B	B	.	.	.	-0,91	.	.	.	-0,60	0,27
Val	16	.	.	B	B	.	.	.	-0,78	.	.	.	-0,60	0,51
Thr	17	.	.	B	B	.	.	.	-0,53	.	.	F	-0,45	0,95
Pro	18	.	.	.	B	.	.	C	-0,13	.	.	F	0,05	0,93
Asn	19	T	C	0,09	.	.	F	0,60	1,69
Pro	20	T	C	0,09	.	.	F	0,60	1,18
Gly	21	T	T	.	0,64	.	.	F	0,65	0,77
Ser	22	T	C	0,61	.	.	F	0,45	0,64
Ala	23	C	0,51	.	.	F	0,25	0,41
Ala	24	T	C	0,51	.	.	F	0,45	0,60
Ser	25	.	.	B	.	.	T	.	0,13	.	.	F	0,85	0,78

ES 2 437 992 T3

(continuación)

Res.	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Gly	26	A	T	.	-0,11	.	.	F	0,85	0,78
Thr	27	A	T	.	-0,40	.	.	F	0,85	0,78
Glu	28	A	A	-0,40	.	.	F	0,45	0,58
Ala	29	A	A	-0,12	.	.	.	0,30	0,60
Ala	30	A	A	-0,03	.	.	.	0,30	0,60
Ala	31	A	A	0,01	.	.	.	0,30	0,53
Ala	32	A	A	0,37	.	.	.	-0,30	0,71
Thr	33	A	T	.	-0,49	*	.	F	1,00	1,40
Pro	34	A	T	.	-0,19	.	.	F	1,00	1,03
Ser	35	.	.	B	.	.	T	.	0,06	.	.	F	0,40	1,07
Lys	36	.	.	B	.	.	T	.	0,34	.	.	F	0,25	0,73
Val	37	.	.	B	B	.	.	.	0,63	.	.	F	-0,15	0,64
Trp	38	.	.	B	B	.	.	.	0,36	.	.	F	-0,15	0,64
Gly	39	.	.	B	B	.	.	.	0,22	*	*	F	-0,15	0,32
Ser	40	C	0,63	*	*	F	-0,05	0,43
Ser	41	T	C	-0,30	*	*	F	0,45	0,80
Ala	42	T	C	0,56	*	*	F	1,05	0,57
Gly	43	T	C	0,63	*	*	F	1,35	0,73
Arg	44	.	.	B	.	.	T	.	1,09	*	*	F	1,49	0,84
Ile	45	.	.	B	1,04	*	*	F	1,78	1,63
Glu	46	.	.	B	1,00	*	*	F	2,12	1,63
Pro	47	.	.	B	.	.	T	.	1,24	*	*	F	2,51	0,83
Arg	48	T	T	.	1,70	*	*	F	3,40	1,17
Gly	49	T	T	.	1,24	*	*	F	3,06	1,32
Gly	50	T	T	.	1,54	*	*	F	2,57	0,84
Gly	51	T	C	0,73	*	*	F	2,03	0,44
Arg	52	T	C	0,73	*	*	.	1,39	0,36

ES 2 437 992 T3

(continuación)

Res.	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Gly	53	.	.	B	.	.	T	.	0,31	*	*	F	0,85	0,57
Ala	54	.	.	B	.	.	T	.	0,36	.	*	F	0,85	0,83
Leu	55	.	.	B	0,10	.	*	F	0,65	0,57
Pro	56	.	.	B	0,10	.	*	F	-0,25	0,57
Thr	57	.	.	B	-0,01	.	*	F	-0,25	0,55
Ser	58	.	.	B	.	.	T	.	0,30	.	.	F	0,10	1,16
Met	59	.	.	B	.	.	T	.	0,54	.	.	F	0,40	1,02
Gly	60	.	.	B	.	.	T	.	1,14	.	.	F	0,25	0,70
Gln	61	T	T	.	1,06	.	.	F	0,65	0,81
His	62	C	0,78	.	*	F	0,40	1,10
Gly	63	T	C	1,19	.	*	F	0,60	1,12
Pro	64	T	C	1,20	.	*	F	1,20	1,27
Ser	65	T	C	1,66	.	*	F	1,05	0,94
Ala	66	.	.	B	.	.	T	.	1,07	.	*	F	1,30	1,86
Arg	67	.	.	B	0,76	*	*	.	1,29	1,22
Ala	68	.	.	B	1,21	*	*	.	1,48	0,90
Arg	69	.	.	B	.	.	T	.	0,83	.	*	.	2,17	1,74
Ala	70	.	.	B	.	.	T	.	0,92	.	*	F	2,51	0,90
Gly	71	T	T	.	1,17	.	*	F	3,40	1,37
Arg	72	T	.	0,84	.	*	F	2,71	0,69
Ala	73	T	C	1,54	*	.	F	2,48	1,06
Pro	74	T	C	1,22	*	.	F	2,70	2,10
Gly	75	T	C	1,22	*	.	F	2,62	1,66
Pro	76	T	C	1,68	*	*	F	2,24	1,66
Arg	77	C	1,57	*	.	F	2,60	2,10
Pro	78	.	A	B	1,57	*	.	F	1,94	3,68
Ala	79	.	A	B	1,48	*	.	F	1,68	2,40
Arg	80	.	A	B	1,61	*	*	F	1,42	1,64

ES 2 437 992 T3

(continuación)

Res.	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Glu	81	.	A	B	1,93	*	*	F	1,16	1,64
Ala	82	A	A	1,01	*	*	F	0,90	3,19
Ser	83	A	T	.	1,33	*	*	F	1,30	1,34
Pro	84	A	T	.	1,07	*	*	F	1,30	1,52
Arg	85	A	T	.	0,92	*	*	F	1,00	1,12
Leu	86	A	T	.	0,97	.	*	.	0,85	1,13
Arg	87	A	.	.	B	.	.	.	1,24	.	*	.	0,75	1,46
Val	88	A	.	.	B	.	.	.	0,84	*	*	.	0,75	1,08
His	89	A	.	.	B	.	.	.	1,10	.	*	.	-0,15	1,13
Lys	90	A	.	.	B	.	.	.	0,29	*	*	F	0,90	1,16
Thr	91	.	.	B	B	.	.	.	0,24	*	*	F	0,00	1,35
Phe	92	.	.	B	B	.	.	.	-0,72	*	*	.	-0,30	0,74
Lys	93	.	.	B	B	.	.	.	-0,72	*	*	.	-0,30	0,27
Phe	94	.	.	B	B	.	.	.	-1,03	*	.	.	-0,60	0,14
Val	95	.	.	B	B	.	.	.	-1,93	*	.	.	-0,60	0,16
Val	96	.	.	B	B	.	.	.	-2,43	.	*	.	-0,60	0,06
Val	97	.	.	B	B	.	.	.	-2,54	.	*	.	-0,60	0,06
Gly	98	.	.	B	B	.	.	.	-2,59	.	*	.	-0,60	0,06
Val	99	.	.	B	B	.	.	.	-2,74	.	.	.	-0,60	0,15
Leu	100	.	.	B	B	.	.	.	-2,74	*	.	.	-0,60	0,15
Leu	101	.	.	B	B	.	.	.	-2,10	*	.	.	-0,60	0,11
Gln	102	.	.	B	B	.	.	.	-1,54	*	.	.	-0,60	0,23
Val	103	.	.	B	B	.	.	.	-1,50	.	.	.	-0,60	0,37
Val	104	.	.	B	.	.	T	.	-1,23	.	.	.	-0,20	0,61
Pro	105	.	.	B	.	.	T	.	-1,01	*	.	F	0,25	0,35
Ser	106	A	T	.	-0,51	*	.	F	-0,05	0,48
Ser	107	A	T	.	-1,40	*	*	F	0,25	0,94
Ala	108	A	-0,50	.	*	F	0,05	0,43

ES 2 437 992 T3

(continuación)

Res.	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Ala	109	A	-0,46	.	*	.	0,50	0,63
Thr	110	A	-0,28	.	*	.	-0,10	0,39
Ile	111	A	0,02	.	*	.	-0,10	0,53
Lys	112	.	.	B	0,32	.	*	.	0,50	0,87
Leu	113	.	.	B	0,61	.	*	F	1,05	1,04
His	114	.	.	B	0,31	.	*	F	1,30	1,99
Asp	115	T	C	0,28	*	*	F	1,80	0,70
Gln	116	T	T	.	0,86	.	*	F	1,65	0,84
Ser	117	T	T	.	0,81	.	.	F	2,50	0,89
Ile	118	T	T	.	1,62	.	.	F	2,25	0,92
Gly	119	C	1,37	.	.	F	1,00	0,92
Thr	120	C	1,37	.	.	F	0,45	0,72
Gln	121	.	.	B	.	.	.	C	1,33	.	.	F	0,65	1,79
Gln	122	.	.	B	1,33	.	.	F	0,20	2,46
Trp	123	.	.	B	2,01	.	.	.	0,05	2,28
Glu	124	C	1,54	.	.	.	0,25	2,04
His	125	C	1,51	.	.	.	0,10	0,97
Ser	126	T	C	1,51	.	.	F	0,45	0,91
Pro	127	T	T	.	0,70	.	.	F	1,55	0,91
Leu	128	T	T	.	0,32	.	.	F	0,65	0,55
Gly	129	T	T	.	0,11	.	.	F	0,65	0,22
Glu	130	T	.	.	-0,07	.	.	F	0,45	0,22
Leu	131	.	.	B	-0,11	*	.	.	0,18	0,42
Cys	132	.	.	B	-0,20	*	.	F	1,21	0,42
Pro	133	.	.	B	.	.	T	.	0,58	*	*	F	1,69	0,32
Pro	134	T	T	.	1,03	.	*	F	1,47	0,53
Gly	135	T	T	.	0,73	.	*	F	2,80	1,94
Ser	136	T	C	1,54	*	.	F	2,32	1,68

ES 2 437 992 T3

(continuación)

Res.	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
His	137	C	2,32	*	.	F	2,48	1,88
Arg	138	.	.	B	2,32	*	.	F	2,34	3,72
Ser	139	.	.	B	2,19	*	.	F	2,40	4,29
Glu	140	T	.	.	1,94	*	.	F	2,86	3,12
Arg	141	T	T	.	1,58	*	.	F	3,40	1,61
Pro	142	T	T	.	1,61	.	*	F	2,91	0,64
Gly	143	T	T	.	1,61	.	*	F	2,57	0,60
Ala	144	T	T	.	1,24	.	*	.	2,08	0,60
Cys	145	T	.	.	0,93	.	*	.	1,41	0,21
Asn	146	.	.	B	0,82	.	*	.	0,84	0,30
Arg	147	.	.	B	0,69	*	.	.	1,01	0,52
Cys	148	.	.	B	.	.	T	.	0,18	*	.	F	1,83	0,96
Thr	149	.	.	B	.	.	T	.	0,42	*	.	F	1,70	0,44
Glu	150	.	.	B	.	.	T	.	0,84	*	.	F	1,53	0,22
Gly	151	.	.	B	.	.	T	.	0,53	*	.	F	0,76	0,65
Val	152	.	.	B	B	.	.	.	0,42	.	*	F	0,19	0,65
Gly	153	.	.	B	B	.	.	.	0,50	.	.	.	-0,13	0,61
Tyr	154	.	.	B	B	.	.	.	0,51	.	.	.	-0,60	0,62
Thr	155	.	.	B	B	.	.	.	0,51	.	.	F	-0,30	1,12
Asn	156	.	.	.	B	.	.	C	0,86	.	.	F	0,20	1,81
Ala	157	T	T	.	0,90	.	.	F	0,80	1,86
Ser	158	T	T	.	0,54	.	.	F	0,80	1,06
Asn	159	T	T	.	0,20	.	.	F	0,35	0,57
Asn	160	T	T	.	-0,16	*	.	F	0,35	0,57
Leu	161	.	A	B	-0,97	*	.	.	-0,60	0,23
Phe	162	.	A	B	-0,59	.	.	.	-0,60	0,12
Ala	163	.	A	B	-0,96	.	.	.	-0,60	0,11
Cys	164	.	A	B	-1,27	*	.	.	-0,60	0,07

ES 2 437 992 T3

(continuación)

Res.	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Leu	165	.	.	B	.	.	T	.	-1,86	.	.	.	-0,20	0,12
Pro	166	.	.	B	.	.	T	.	-1,71	*	.	.	-0,20	0,12
Cys	167	T	T	.	-0,97	*	.	.	0,20	0,12
Thr	168	A	T	.	-0,68	.	.	.	0,10	0,30
Ala	169	A	-0,01	.	.	.	0,50	0,26
Cys	170	A	T	.	0,80	.	.	.	0,70	0,80
Lys	171	A	T	.	1,01	.	.	F	1,15	0,96
Ser	172	A	T	.	1,68	.	*	F	1,30	1,65
Asp	173	A	T	.	2,10	.	*	F	1,30	5,33
Glu	174	A	A	2,39	.	*	F	0,90	5,22
Glu	175	A	A	2,84	.	*	F	1,24	5,22
Glu	176	A	A	2,13	.	*	F	1,58	4,83
Arg	177	.	A	.	.	T	.	.	2,12	.	.	F	2,32	1,50
Ser	178	T	C	1,81	.	.	F	2,86	1,25
Pro	179	T	T	.	1,50	*	.	F	3,40	1,04
Cys	180	T	T	.	1,61	*	.	F	2,61	0,77
Thr	181	T	T	.	1,61	*	.	F	2,67	1,12
Thr	182	T	.	.	1,19	*	*	F	2,38	1,16
Thr	183	T	T	.	0,90	.	.	F	2,49	3,13
Arg	184	T	T	.	0,44	.	.	F	2,40	2,19
Asn	185	T	T	.	1,11	.	.	F	2,50	0,81
Thr	186	T	T	.	0,76	*	.	F	2,25	0,98
Ala	187	T	.	.	1,11	*	.	.	1,65	0,27
Cys	188	T	.	.	1,21	*	.	.	1,40	0,33
Gln	189	.	.	B	0,76	*	.	.	0,75	0,36
Cys	190	.	.	B	0,44	.	.	.	0,50	0,35
Lys	191	.	.	B	.	.	T	..	0,06	.	*	F	0,85	0,94
Pro	192	T	T	.	0,76	.	.	F	0,65	0,47

ES 2 437 992 T3

(continuación)

Res.	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Gly	193	T	T	.	1,42	.	*	F	1,74	1,72
Thr	194	.	.	B	.	.	T	.	1,42	.	*	F	1,68	1,38
Phe	195	.	.	B	2,09	.	*	F	1,82	1,49
Arg	196	T	.	.	1,74	.	*	F	2,56	2,42
Asn	197	T	T	.	1,37	.	*	F	3,40	2,25
Asp	198	T	T	.	1,71	.	*	F	3,06	2,63
Asn	199	T	C	1,42	.	*	F	2,52	2,32
Ser	200	A	T	.	1,46	.	*	F	1,98	1,43
Ala	201	A	1,46	.	*	.	1,14	0,46
Glu	202	A	1,50	*	.	.	0,80	0,56
Met	203	A	0,83	*	.	.	1,11	0,83
Cys	204	A	T	.	0,53	*	.	.	1,62	0,44
Arg	205	T	T	.	0,52	*	.	.	2,33	0,34
Lys	206	T	T	.	0,77	*	.	F	2,49	0,50
Cys	207	T	T	.	0,10	*	.	F	3,10	0,92
Ser	208	T	.	.	0,49	*	*	F	2,59	0,25
Thr	209	T	.	.	1,27	*	*	F	1,98	0,19
Gly	210	T	.	.	0,81	*	.	F	1,67	0,71
Cys	211	.	.	B	.	.	T	.	0,17	*	*	F	1,16	0,53
Pro	212	T	T	.	-0,02	*	*	F	1,25	0,36
Arg	213	T	T	.	0,32	*	*	F	0,65	0,27
Gly	214	.	.	B	.	.	T	.	-0,22	*	*	.	0,85	1,01
Met	215	.	.	B	B	.	.	.	0,17	*	*	.	0,30	0,48
Val	216	.	.	B	B	.	.	.	0,83	*	*	.	0,79	0,49
Lys	217	.	.	B	B	.	.	.	0,38	*	*	.	0,98	0,83
Val	218	.	.	B	B	.	.	.	-0,04	*	*	F	1,32	0,45
Lys	219	.	.	B	B	.	.	.	0,09	.	*	F	1,51	0,88
Asp	220	.	.	B	0,40	.	*	F	1,90	0,68

ES 2 437 992 T3

(continuación)

Res.	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Cys	221	.	.	B	0,96	.	*	F	0,81	0,96
Thr	222	T	C	0,91	.	*	F	1,62	0,65
Pro	223	T	T	.	0,88	.	*	F	1,63	0,65
Trp	224	T	T	.	0,83	.	*	F	0,54	0,84
Ser	225	A	T	.	0,17	.	.	F	1,00	1,01
Asp	226	A	A	-0,02	.	.	F	0,45	0,35
Ile	227	A	A	0,26	*	.	.	-0,30	0,25
Glu	228	A	A	0,51	*	.	.	0,30	0,25
Cys	229	.	A	B	0,80	*	.	.	0,60	0,30
Val	230	A	A	0,80	*	*	.	0,60	0,74
His	231	A	A	0,46	*	*	.	0,60	0,58
Lys	232	A	A	1,34	*	.	F	0,60	1,06
Glu	233	.	A	.	.	T	.	.	1,00	*	.	F	1,30	2,30
Ser	234	T	T	.	1,63	*	.	F	1,70	1,68
Gly	235	T	T	.	2,49	*	.	F	1,70	1,14
Asn	236	T	T	.	1,63	*	.	F	1,40	1,06
Gly	237	T	C	1,30	*	.	F	0,45	0,55
His	238	.	.	.	B	.	.	C	0,44	.	.	.	-0,40	0,59
Asn	239	.	.	.	B	.	.	C	-0,14	.	.	.	-0,40	0,27
Ile	240	.	.	B	B	.	.	.	-0,61	.	.	.	-0,60	0,19
Trp	241	.	.	B	B	.	.	.	-1,47	.	.	.	-0,60	0,12
Val	242	.	.	B	B	.	.	.	-1,98	.	.	.	-0,60	0,05
Ile	243	.	.	B	B	.	.	.	-2,26	.	.	.	-0,60	0,06
Leu	244	.	.	B	B	.	.	.	-3,07	.	.	.	-0,60	0,08
Val	245	.	.	B	B	.	.	.	-3,03	.	.	.	-0,60	0,09
Val	246	.	.	B	B	.	.	.	-3,60	.	.	.	-0,60	0,09
Thr	247	.	.	B	B	.	.	.	-2,96	.	.	.	-0,60	0,08
Leu	248	.	.	B	B	.	.	.	-2,88	.	.	.	-0,60	0,17

ES 2 437 992 T3

(continuación)

Res.	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Val	249	.	.	B	B	.	.	.	-2,88	.	*	.	-0,60	0,19
Val	250	.	.	B	B	.	.	.	-2,83	.	.	.	-0,60	0,11
Pro	251	.	.	B	B	.	.	.	-2,83	.	.	.	-0,60	0,11
Leu	252	.	.	B	B	.	.	.	-3,11	.	.	.	-0,60	0,11
Leu	253	A	.	.	B	.	.	.	-3,16	.	.	.	-0,60	0,15
Leu	254	A	.	.	B	.	.	.	-3,11	.	.	.	-0,60	0,07
Val	255	A	.	.	B	.	.	.	-3,14	.	.	.	-0,60	0,07
Ala	256	A	.	.	B	.	.	.	-3,79	.	.	.	-0,60	0,06
Val	257	.	.	B	B	.	.	.	-3,64	.	.	.	-0,60	0,05
Leu	258	.	.	B	B	.	.	.	-3,50	.	.	.	-0,60	0,04
Ile	259	.	.	B	B	.	.	.	-3,36	.	.	.	-0,60	0,02
Val	260	.	.	B	B	.	.	.	-3,39	.	.	.	-0,60	0,02
Cys	261	.	.	B	B	.	.	.	-3,14	.	.	.	-0,60	0,01
Cys	262	.	.	B	B	.	.	.	-2,59	.	.	.	-0,60	0,02
Cys	263	.	.	B	B	.	.	.	-2,12	.	.	.	-0,60	0,03
Ile	264	.	.	B	B	.	.	.	-1,90	.	.	.	-0,60	0,06
Gly	265	T	T	.	-1,39	.	.	F	0,35	0,06
Ser	266	T	T	.	-1,07	.	.	F	0,35	0,11
Gly	267	T	T	.	-0,40	.	.	F	0,65	0,16
Cys	268	T	T	.	0,06	.	.	F	1,25	0,27
Gly	269	T	.	.	0,99	.	*	F	1,39	0,31
Gly	270	T	.	.	0,67	.	.	F	2,03	0,62
Asp	271	T	C	0,37	.	*	F	2,37	0,62
Pro	272	T	T	.	0,71	*	*	F	2,91	0,62
Lys	273	T	T	.	1,49	*	*	F	3,40	1,05
Cys	274	.	.	B	.	.	T	.	0,98	*	*	.	2,51	1,23
Met	275	.	.	B	B	.	.	.	0,66	*	*	.	1,62	0,59
Asp	276	.	.	B	B	.	.	.	-0,04	*	*	.	1,28	0,16

ES 2 437 992 T3

(continuación)

Res.	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Arg	277	.	.	B	B	.	.	.	-0,12	.	*	.	0,04	0,26
Val	278	.	.	B	B	.	.	.	-0,06	.	*	.	-0,60	0,27
Cys	279	.	.	B	B	.	.	.	-0,20	.	.	.	0,30	0,32
Phe	280	.	.	B	B	.	.	.	0,06	.	*	.	-0,60	0,13
Trp	281	.	.	B	B	.	.	.	-0,76	.	.	.	-0,60	0,18
Arg	282	.	.	B	B	.	.	.	-1,68	.	.	.	-0,60	0,28
Leu	283	.	.	B	B	.	.	.	-0,71	.	.	.	-0,60	0,26
Gly	284	.	.	.	B	T	.	.	-0,39	.	*	.	-0,20	0,49
Leu	285	.	.	.	B	.	.	C	0,10	.	*	.	0,50	0,25
Leu	286	.	.	.	B	.	.	C	0,04	.	*	.	0,20	0,46
Arg	287	.	.	.	B	.	.	C	-0,66	.	.	F	0,65	0,46
Gly	288	T	C	0,16	.	.	F	1,35	0,57
Pro	289	T	C	0,50	.	*	F	2,70	1,19
Gly	290	T	C	1,31	*	*	F	3,00	1,01
Ala	291	A	T	.	1,53	.	.	F	2,50	1,65
Glu	292	A	1,39	.	.	F	2,00	1,08
Asp	293	A	1,73	.	.	F	1,70	1,48
Asn	294	A	T	.	1,94	.	*	.	1,45	2,36
Ala	295	A	T	.	1,40	.	*	.	1,15	2,36
His	296	A	T	.	1,18	*	.	.	1,00	0,99
Asn	297	A	T	.	0,88	.	.	.	0,10	0,51
Glu	298	A	0,88	*	.	.	-0,10	0,67
Ile	299	A	0,29	*	*	.	-0,10	0,80
Leu	300	A	0,88	*	*	.	-0,10	0,50
Ser	301	A	0,61	*	.	F	0,65	0,48
Asn	302	A	T	.	-0,20	*	.	F	0,25	0,92
Ala	303	A	T	.	-0,50	*	.	F	0,25	0,92
Asp	304	A	T	.	0,08	*	.	F	0,85	0,92

ES 2 437 992 T3

(continuación)

Res.	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Ser	305	T	C	0,19	*	.	F	1,05	0,83
Leu	306	.	.	.	B	.	.	C	-0,37	*	.	F	0,05	0,71
Ser	307	.	.	B	B	.	.	.	-0,67	*	.	F	-0,15	0,31
Thr	308	.	.	B	B	.	.	.	-0,08	*	.	.	-0,60	0,31
Phe	309	.	.	B	B	.	.	.	-0,08	*	.	.	-0,30	0,66
Val	310	A	.	.	B	.	.	.	0,22	.	.	F	-0,15	0,85
Ser	311	A	A	0,43	.	.	F	0,00	1,03
Glu	312	A	A	0,73	.	.	F	0,00	1,17
Gln	313	A	A	0,74	.	.	F	0,90	2,73
Gln	314	A	A	1,44	.	.	F	0,90	2,73
Met	315	A	A	2,30	.	.	F	0,90	2,73
Glu	316	A	A	2,39	.	.	F	0,90	2,73
Ser	317	A	A	1,80	.	*	F	0,90	2,44
Gln	318	A	A	1,80	.	*	F	0,90	2,49
Glu	319	A	A	0,99	.	*	F	0,90	2,40
Pro	320	A	A	1,28	.	*	F	0,90	1,48
Ala	321	A	A	0,93	.	.	F	0,60	1,23
Asp	322	A	A	.	B	.	.	.	0,38	.	.	F	0,45	0,70
Leu	323	A	A	.	B	.	.	.	0,07	.	.	F	-0,15	0,34
Thr	324	.	A	B	B	.	.	.	-0,79	.	.	F	-0,15	0,48
Gly	325	.	A	B	B	.	.	.	-0,58	.	.	.	-0,30	0,21
Val	326	.	.	B	B	.	.	.	-0,29	.	.	.	-0,60	0,45
Thr	327	.	.	B	B	.	.	.	-0,50	.	.	.	-0,60	0,42
Val	328	.	.	B	B	.	.	.	-0,03	.	*	F	-0,17	0,65
Gln	329	.	.	B	B	.	.	.	0,28	.	*	F	0,11	0,87
Ser	330	T	C	0,03	.	*	F	2,04	1,05
Pro	331	T	.	0,89	.	*	F	2,32	1,42
Gly	332	T	T	.	0,53	.	*	F	2,80	1,42

ES 2 437 992 T3

(continuación)

Res.	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Glu	333	A	T	.	0,58	.	*	F	1,97	0,57
Ala	334	.	.	B	-0,23	.	*	.	0,74	0,30
Gln	335	.	.	B	-0,28	.	.	.	0,46	0,25
Cys	336	.	.	B	-0,28	.	.	.	0,18	0,14
Leu	337	.	.	B	-0,52	.	*	.	-0,40	0,22
Leu	338	-0,52	.	*	.	-0,40	0,13
Gly	339	.	A	C	-0,52	.	*	F	0,05	0,42
Pro	340	A	A	-0,52	.	*	F	-0,15	0,51
Ala	341	A	A	-0,20	.	*	F	0,60	1,07
Glu	342	A	A	0,31	.	*	F	0,90	1,07
Ala	343	A	A	1,12	*	*	F	0,75	0,93
Glu	344	A	A	1,58	.	*	F	0,90	1,60
Gly	345	A	A	1,90	.	*	F	0,90	1,80
Ser	346	A	T	.	2,60	.	*	F	1,30	3,50
Gln	347	A	T	.	1,79	.	*	F	1,30	3,96
Arg	348	A	T	.	1,57	.	*	F	1,30	3,30
Arg	349	.	.	B	.	.	T	.	0,71	.	*	F	1,30	2,03
Arg	350	.	.	B	B	.	.	.	0,84	.	*	F	0,75	0,87
Leu	351	.	.	B	B	.	.	.	0,56	.	*	.	0,60	0,69
Leu	352	.	.	B	B	.	.	.	0,56	.	*	.	0,30	0,35
Val	353	.	.	B	B	.	.	.	0,10	*	*	.	-0,30	0,29
Pro	354	.	.	B	.	.	T	.	-0,60	*	.	.	-0,20	0,35
Ala	355	T	T	.	-0,71	.	*	.	0,50	0,43
Asn	356	T	C	-0,11	.	.	F	1,65	0,96
Gly	357	T	C	0,39	.	.	F	1,95	0,96
Ala	358	C	1,24	.	.	F	2,20	1,37
Asp	359	T	C	1,14	.	.	F	3,00	1,48
Pro	360	T	.	0,92	*	.	F	2,50	2,16

ES 2 437 992 T3

(continuación)

Res.	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Thr	361	T	.	0,32	.	.	F	1,90	1,76
Glu	362	A	T	.	-0,14	.	.	F	1,60	1,04
Thr	363	A	.	.	B	.	.	.	-0,26	.	.	F	0,15	0,56
Leu	364	A	.	.	B	.	.	.	-0,96	*	.	.	-0,60	0,33
Met	365	A	.	.	B	.	.	.	-0,74	*	.	.	-0,60	0,17
Leu	366	A	.	.	B	.	.	.	-0,39	*	.	.	-0,60	0,19
Phe	367	A	.	.	B	.	.	.	-1,09	*	.	.	-0,60	0,47
Phe	368	A	.	.	B	.	.	.	-1,37	*	.	.	-0,60	0,41
Asp	369	A	.	.	B	.	.	.	-0,56	*	.	.	-0,60	0,50
Lys	370	A	A	-0,84	*	.	.	-0,30	0,93
Phe	371	A	A	.	B	.	.	.	-0,89	*	.	.	-0,30	0,75
Ala	372	A	A	.	B	.	.	.	-0,40	*	.	.	-0,30	0,34
Asn	373	.	A	B	B	.	.	.	-0,40	*	.	.	-0,60	0,26
Ile	374	.	A	B	B	.	.	.	-0,40	*	.	.	-0,60	0,26
Val	375	.	A	B	B	.	.	.	-0,74	.	.	.	-0,60	0,43
Pro	376	.	A	.	B	.	.	C	-0,33	.	.	.	-0,10	0,36
Phe	377	T	T	.	0,26	.	.	.	0,20	0,54
Asp	378	T	T	.	0,26	.	.	F	0,80	1,21
Ser	379	T	T	.	0,33	.	.	F	1,40	1,35
Trp	380	A	T	.	0,59	*	*	F	0,40	1,29
Asp	381	A	A	0,91	*	.	F	-0,15	0,76
Gln	382	A	A	1,61	*	.	.	-0,15	1,11
Leu	383	A	A	0,80	*	.	.	-0,15	1,84
Met	384	A	A	1,10	*	.	.	0,30	0,91
Arg	385	A	A	0,58	*	.	.	0,30	0,87
Gln	386	A	A	0,27	*	.	.	-0,30	0,87
Leu	387	A	A	0,31	*	.	.	0,45	1,27
Asp	388	A	A	1,12	*	.	.	0,75	1,30

ES 2 437 992 T3

(continuación)

Res.	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Leu	389	A	A	1,72	*	.	F	0,60	1,21
Thr	390	A	T	.	0,72	*	.	F	1,30	2,54
Lys	391	A	T	.	0,72	.	*	F	1,30	1,07
Asn	392	A	T	.	0,68	*	*	F	1,30	2,16
Glu	393	A	T	.	-0,18	*	.	F	1,30	1,11
Ile	394	.	.	B	B	.	.	.	0,74	*	.	F	0,75	0,41
Asp	395	.	.	B	B	.	.	.	0,47	*	*	.	0,60	0,50
Val	396	.	.	B	B	.	.	.	0,08	*	*	.	0,60	0,29
Val	397	.	.	B	B	.	.	.	-0,23	.	.	.	0,51	0,41
Arg	398	.	.	B	.	.	T	.	-0,82	*	.	.	1,12	0,36
Ala	399	.	.	B	.	.	T	.	-0,28	*	.	.	0,73	0,49
Gly	400	T	T	.	-0,49	*	.	F	2,09	0,65
Thr	401	T	C	0,02	*	*	F	2,10	0,51
Ala	402	C	0,88	*	*	F	1,09	0,50
Gly	403	T	C	0,18	.	*	F	1,68	0,85
Pro	404	T	C	-0,04	.	.	F	1,47	0,59
Gly	405	T	C	0,06	.	.	F	1,26	0,48
Asp	406	A	T	.	-0,22	*	.	F	0,25	0,76
Ala	407	A	A	-0,23	.	.	.	-0,30	0,50
Leu	408	A	A	-0,70	.	.	.	-0,60	0,50
Tyr	409	A	A	-1,09	*	.	.	-0,60	0,25
Ala	410	A	A	-0,70	*	.	.	-0,60	0,24
Met	411	A	A	-0,99	*	.	.	-0,60	0,59
Leu	412	A	A	-1,26	*	.	.	-0,60	0,39
Met	413	A	A	-0,44	*	.	.	-0,60	0,29
Lys	414	A	A	.	B	.	.	.	-0,16	*	.	.	-0,60	0,47
Trp	415	A	A	.	B	.	.	.	0,12	*	.	.	0,15	1,14
Val	416	A	A	.	B	.	.	.	0,38	*	*	.	0,45	1,66

ES 2 437 992 T3

(continuación)

Res.	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Asn	417	A	T	.	1,30	*	.	F	1,75	0,82
Lys	418	A	T	.	1,90	*	.	F	2,20	1,53
Thr	419	T	C	1,27	*	.	F	3,00	3,32
Gly	420	T	C	1,26	*	.	F	2,70	2,08
Arg	421	T	.	.	1,22	*	.	F	2,40	1,40
Asn	422	T	C	1,19	*	.	F	1,65	0,68
Ala	423	.	.	B	.	.	T	.	0,83	.	.	.	1,00	0,93
Ser	424	.	.	B	.	.	T	.	0,33	.	.	.	0,70	0,69
Ile	425	.	.	B	.	.	T	.	-0,13	.	*	.	-0,20	0,35
His	426	.	A	B	-0,24	.	*	.	-0,60	0,29
Thr	427	.	A	B	-0,83	*	*	.	-0,60	0,36
Leu	428	A	A	-1,06	*	*	.	-0,60	0,52
Leu	429	A	A	-0,76	*	*	.	-0,60	0,31
Asp	430	A	A	0,24	*	*	.	-0,30	0,38
Ala	431	A	A	-0,32	*	*	.	0,30	0,89
Leu	432	A	A	-0,01	*	*	.	0,75	1,07
Glu	433	A	A	0,80	*	*	.	0,75	1,11
Arg	434	A	A	1,72	*	*	F	0,90	1,90
Met	435	A	A	1,69	*	*	F	0,90	4,52
Glu	436	A	A	1,69	*	*	F	0,90	3,55
Glu	437	A	A	2,54	*	.	F	0,90	1,83
Arg	438	A	A	2,54	*	*	F	0,90	3,70
His	439	A	A	2,48	*	*	F	0,90	3,70
Ala	440	A	A	2,19	*	*	F	0,90	4,28
Lys	441	A	A	2,19	*	*	F	0,90	1,53
Glu	442	A	A	2,19	*	.	F	0,90	1,95
Lys	443	A	A	1,27	*	*	F	0,90	3,22
Ile	444	A	A	0,49	*	*	F	0,90	1,33

ES 2 437 992 T3

(continuación)

Res.	Posición	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Gln	445	A	A	0,22	*	*	F	0,75	0,63
Asp	446	A	A	0,18	*	*	F	-0,15	0,23
Leu	447	A	A	-0,12	*	.	.	-0,30	0,56
Leu	448	A	A	-0,51	*	.	.	0,55	0,43
Val	449	A	A	0,42	*	.	F	0,95	0,26
Asp	450	A	T	.	-0,28	*	.	F	1,60	0,62
Ser	451	T	T	.	-1,17	.	.	F	2,25	0,65
Gly	452	T	T	.	-0,60	.	.	F	2,50	0,62
Lys	453	.	.	B	.	.	T	.	-0,60	.	.	F	1,25	0,58
Phe	454	.	A	B	0,26	.	.	.	0,15	0,36
Ile	455	.	A	B	0,26	.	.	.	0,20	0,62
Tyr	456	.	A	B	0,21	*	.	.	0,55	0,52
Leu	457	.	A	B	0,24	*	.	.	-0,03	0,59
Glu	458	.	A	B	-0,14	.	.	F	0,54	1,22
Asp	459	.	A	.	.	T	.	.	0,26	.	.	F	1,66	0,77
Gly	460	T	T	.	0,56	.	.	F	2,78	1,26
Thr	461	T	C	-0,06	*	.	F	2,70	0,73
Gly	462	T	C	0,46	*	.	F	2,13	0,33
Ser	463	T	C	-0,36	.	.	F	1,26	0,44
Ala	464	A	-0,36	.	.	.	0,14	0,25
Val	465	.	.	B	-0,40	.	.	.	0,17	0,44
Ser	466	.	.	B	-0,48	.	.	.	-0,10	0,42
Leu	467	.	.	B	-0,52	.	.	.	-0,10	0,53
Glu	468	A	-0,61	.	.	.	0,50	0,92

En el presente documento también se describe un anticuerpo que se une a un péptido o polipéptido que comprende una porción portadora de epítomos de un polipéptido descrito en el presente documento. El epítomo de esta porción polipeptídica es un epítomo inmunogénico o antigénico de un polipéptido. Un "epítomo inmunogénico" se define como una parte de una proteína que provoca una respuesta de anticuerpos cuando toda la proteína es el inmunógeno. Por otro lado, una región de una molécula proteica a la que se puede unir un anticuerpo se define como un "epítomo antigénico". El número de epítomos inmunogénicos de una proteína generalmente es inferior al número de epítomos antigénicos. Véase, por ejemplo, Geysen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998- 4002 (1983.).

En cuanto a la selección de péptidos o polipéptidos portadores de un epítipo antigénico (es decir, que contengan una región de una molécula proteica a la que se puede unir un anticuerpo), en la técnica se sabe que los péptidos sintéticos relativamente cortos que simulan una parte de una secuencia proteica son rutinariamente capaces de producir un antisuero que reacciona con la proteína parcialmente imitada. Véase, por ejemplo, Sutcliffe, J. G., Shinnick, T. M., Green, N. y Learner, R.A. (1983) Antibodies that react with predetermined sites on proteins. *Science* 219:660-666. Los péptidos capaces de producir sueros reactivos a las proteínas con frecuencia se representan en la secuencia primaria de una proteína, se pueden caracterizar por un conjunto de sencillas normas químicas y no están confinados a regiones inmunodominantes de proteínas intactas (es decir, epítipos inmunogénicos) ni a los extremos amino o carboxilo.

Por tanto, los péptidos y polipéptidos portadores de epítipos antigénicos son útiles para producir anticuerpos, incluidos anticuerpos monoclonales, que se unen a un polipéptido de TR4. Véase, por ejemplo, Wilson y col., *Cell* 37:767-778 (1984) at 777. Los péptidos y polipéptidos portadores de epítipos antigénicos contienen, preferentemente, una secuencia de al menos siete, más preferentemente al menos nueve y, lo más preferentemente, entre al menos aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos contenidos dentro de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1.

Los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden unir a uno o más polipéptidos o péptidos antigénicos de TR4, incluyendo, entre otros: un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos de aproximadamente 35 a aproximadamente 92 de SEC ID N°:1; un polipéptido que comprende residuos aminoácidos de aproximadamente 114 a aproximadamente 160 de SEC ID N°:1; un polipéptido que comprende residuos aminoácidos de aproximadamente 169 a aproximadamente 240 de SEC ID N°:1; un polipéptido que comprende residuos aminoácidos de aproximadamente 267 a aproximadamente 298 de SEC ID N°:1; un polipéptido que comprende residuos aminoácidos de aproximadamente 330 a aproximadamente 364 de SEC ID N°:1; un polipéptido que comprende residuos aminoácidos de aproximadamente 391 a aproximadamente 404 de SEC ID N°:1; y/o un polipéptido que comprende residuos aminoácidos de aproximadamente 418 a aproximadamente 465 de SEC ID N°:1. En este contexto "aproximadamente" incluye el intervalo citado particularmente, mayor o menor por varios (5, 4, 3, 2 o 1) aminoácidos, en uno de los extremos o en ambos extremos. Como se ha indicado anteriormente, los inventores han determinado que los fragmentos polipeptídicos anteriores son regiones antigénicas de la proteína TR4. Los polipéptidos y péptidos de TR4 portadores de epítipo se pueden producir por cualquier medio convencional. Houghten, R.A., "General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5131-5135 (1985). Este proceso de "Síntesis peptídica múltiple simultánea (SMPS)" se describe adicionalmente en la patente de EE.UU. n° 4.631.211 de Houghten y col. (1986).

Como apreciará un experto en la técnica, los polipéptidos TR4 y los fragmentos portadores del epítipo de los mismos descritos en el presente documento (p. ej., que corresponden a una porción del dominio extracelular tal como, por ejemplo, los residuos de aminoácidos 1 a 240 de SEC ID N° 1 se pueden combinar con partes del dominio constante de las inmunoglobulinas (IgG), dando como resultado polipéptidos quiméricos. Estas proteínas de fusión facilitan la purificación y muestran una semivida *in vivo* incrementada. Esto se ha mostrado para, por ejemplo, proteínas quiméricas que consisten en los dos primeros dominios del polipéptido CD4 humano y varios dominios de las regiones constantes de las cadenas pesada o ligera de las inmunoglobulinas de mamífero (EPA 394,827; Trauneker y col., *Nature* 331:84- 86 (1988)). Las proteínas de fusión que tienen una estructura dimerica unida por puentes disulfuro debido a la parte de la IgG también puede ser más eficiente en la unión y neutralización de otras moléculas que la proteína TR4 monomérica o del fragmento proteico solo (Fountoulakis y col., *J Biochem* 270:3958-3964 (1995)). Por tanto, los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden unir a proteínas de fusión que comprenden todos o una porción de un polipéptido de TR4 tal como TR4.

Se puede usar la tecnología de ADN recombinante conocida por los expertos en la técnica para crear nuevas proteínas mutantes o "muteínas" que incluyen una o varias sustituciones, deleciones, adiciones de aminoácidos o proteínas de fusión. Dichos polipéptidos modificados pueden mostrar, por ejemplo, una actividad potenciada o una estabilidad incrementada. Además, se pueden purificar en rendimientos mayores y muestran mejor solubilidad que el correspondiente polipéptido natural, al menos en determinadas condiciones de purificación y almacenamiento. Los anticuerpos descritos en el presente documento también se pueden unir a dichos polipéptidos de TR4 modificados o fragmentos o variantes de los polipéptidos de TR4.

Por ejemplo, para muchas proteínas, incluido el dominio extracelular de una proteína asociada a la membrana o de la o las formas maduras de una proteína secretada, en la técnica se sabe que uno o más aminoácidos se pueden eliminar del extremo N o del extremo C sin que se produzca una pérdida sustancial de la función biológica, o pérdida de la capacidad para unirse a un anticuerpo específico. Por ejemplo, Ron y col., *J. Biol. Chem.*, 268:2984-2988 (1993) notificaron proteínas de KGF modificadas que tienen actividad de unión a heparina incluso si faltaban 3, 8, o 27 residuos de aminoácidos en el extremo amino. En el presente ejemplo, dado que TR4 es un miembro de la familia del polipéptido receptor que contiene el dominio de muerte (DDCR), las deleciones de aminoácidos en el extremo N hasta el residuo de cisteína en la posición 109 de la SEC ID N° 1 pueden conservar algo de actividad biológica como la capacidad para inducir la apoptosis. No cabría esperar que los polipéptidos que tienen deleciones adicionales en el extremo N que incluyan al residuo de cisteína en la posición 109 (C-109) en la SEC ID N° 1 retuvieran dichas actividades biológicas porque este residuo está conservado entre los miembros de la familia y

puede ser necesario para formar un puente disulfuro para proporcionar estabilidad estructural que es necesaria para la unión del ligando.

No obstante, aunque la delección de uno o más aminoácidos del extremo N de una proteína tenga como resultado la modificación o la pérdida de una o más funciones biológicas de la proteína, se pueden seguir conservando otras actividades funcionales (p. ej., actividades biológicas, capacidad para formar multímeros, capacidad para unirse al ligando de TR4 (p. ej., TRAIL). Por ejemplo, generalmente se conservará la capacidad de los polipéptidos de TR4 acortados para inducir y/o unirse a anticuerpos que reconocen las formas completas o maduras de los polipéptidos de TR4 cuando se eliminan del extremo N menos de la mayoría de los residuos del polipéptido completo o maduro.

Si un polipéptido concreto que carece de residuos en el extremo N de un polipéptido completo conserva dichas actividades inmunológicas o no se puede determinar fácilmente mediante procedimientos de rutina descritos en el presente documento y, por otro lado, se conoce en la técnica. No es improbable que un polipéptido de TR4 con un gran número de residuos de aminoácidos en el extremo N delecionados puede conservar algunas actividades biológicas o inmunogénicas. De hecho, los péptidos compuestos por tan pocos como seis residuos de aminoácidos de TR4 pueden provocar, a menudo, una respuesta inmunitaria.

De acuerdo con lo anterior, en el presente documento se describen anticuerpos que se unen a polipéptidos que tienen uno o más residuos delecionados del extremo amino de la secuencia de aminoácidos de TR4 de SEC ID N° 1 hasta el residuo de serina en la posición número 463 y polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos. En particular, en el presente documento se describen anticuerpos que se unen a polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de los residuos n¹-468 de SEC ID N°1, en la que n¹ es un número entero de 2 a 463 correspondiente a la posición del residuo de aminoácido en la SEC ID N° 1.

Más en concreto, en el presente documento se describen anticuerpos que se unen a polipéptidos que comprenden, o como alternativa que consisten en, la secuencia de aminoácidos de los residuos de A-2 a E-468; P-3 a E-468; P-4 a E-468; P-5 a E-468; A-6 a E-468; R-7 a E-468; V-8 a E-468; H-9 a E-468; L-10 a E-468; G-11 a E-468; A-12 a E-468; F-13 a E-468; L-14 a E-468; A-15 a E-468; V-16 a E-468; T-17 a E-468; P-18 a E-468; N-19 a E-468; P-20 a E-468; G-21 a E-468; S-22 a E-468; A-23 a E-468; A-24 a E-468; S-25 a E-468; G-26 a E-468; T-27 a E-468; E-28 a E-468; A-29 a E-468; A-30 a E-468; A-31 a E-468; A-32 a E-468; T-33 a E-468; P-34 a E-468; S-35 a E-468; K-36 a E-468; V-37 a E-468; W-38 a E-468; G-39 a E-468; S-40 a E-468; S-41 a E-468; A-42 a E-468; G-43 a E-468; R-44 a E-468; I-45 a E-468; E-46 a E-468; P-47 a E-468; R-48 a E-468; G-49 a E-468; G-50 a E-468; G-51 a E-468; R-52 a E-468; G-53 a E-468; A-54 a E-468; L-55 a E-468; P-56 a E-468; T-57 a E-468; S-58 a E-468; M-59 a E-468; G-60 a E-468; Q-61 a E-468; H-62 a E-468; G-63 a E-468; P-64 a E-468; S-65 a E-468; A-66 a E-468; R-67 a E-468; A-68 a E-468; R-69 a E-468; A-70 a E-468; G-71 a E-468; R-72 a E-468; A-73 a E-468; P-74 a E-468; G-75 a E-468; P-76 a E-468; R-77 a E-468; P-78 a E-468; A-79 a E-468; R-80 a E-468; E-81 a E-468; A-82 a E-468; S-83 a E-468; P-84 a E-468; R-85 a E-468; L-86 a E-468; R-87 a E-468; V-88 a E-468; H-89 a E-468; K-90 a E-468; T-91 a E-468; F-92 a E-468; K-93 a E-468; F-94 a E-468; V-95 a E-468; V-96 a E-468; V-97 a E-468; G-98 a E-468; V-99 a E-468; L-100 a E-468; L-101 a E-468; Q-102 a E-468; V-103 a E-468; V-104 a E-468; P-105 a E-468; S-106 a E-468; S-107 a E-468; A-108 a E-468; A-109 a E-468; T-110 a E-468; I-111 a E-468; K-112 a E-468; L-113 a E-468; H-114 a E-468; D-115 a E-468; Q-116 a E-468; S-117 a E-468; I-118 a E-468; G-119 a E-468; T-120 a E-468; Q-121 a E-468; Q-122 a E-468; W-123 a E-468; E-124 a E-468; H-125 a E-468; S-126 a E-468; P-127 a E-468; L-128 a E-468; G-129 a E-468; E-130 a E-468; L-131 a E-468; C-132 a E-468; P-133 a E-468; P-134 a E-468; G-135 a E-468; S-136 a E-468; H-137 a E-468; R-138 a E-468; S-139 a E-468; E-140 a E-468; R-141 a E-468; P-142 a E-468; G-143 a E-468; A-144 a E-468; C-145 a E-468; N-146 a E-468; R-147 a E-468; C-148 a E-468; T-149 a E-468; E-150 a E-468; G-151 a E-468; V-152 a E-468; G-153 a E-468; Y-154 a E-468; T-155 a E-468; N-156 a E-468; A-157 a E-468; S-158 a E-468; N-159 a E-468; N-160 a E-468; L-161 a E-468; F-162 a E-468; A-163 a E-468; C-164 a E-468; L-165 a E-468; P-166 a E-468; C-167 a E-468; T-168 a E-468; A-169 a E-468; C-170 a E-468; K-171 a E-468; S-172 a E-468; D-173 a E-468; E-174 a E-468; E-175 a E-468; E-176 a E-468; R-177 a E-468; S-178 a E-468; P-179 a E-468; C-180 a E-468; T-181 a E-468; T-182 a E-468; T-183 a E-468; R-184 a E-468; N-185 a E-468; T-186 a E-468; A-187 a E-468; C-188 a E-468; Q-189 a E-468; C-190 a E-468; K-191 a E-468; P-192 a E-468; G-193 a E-468; T-194 a E-468; F-195 a E-468; R-196 a E-468; N-197 a E-468; D-198 a E-468; N-199 a E-468; S-200 a E-468; A-201 a E-468; E-202 a E-468; M-203 a E-468; C-204 a E-468; R-205 a E-468; K-206 a E-468; C-207 a E-468; S-208 a E-468; T-209 a E-468; G-210 a E-468; C-211 a E-468; P-212 a E-468; R-213 a E-468; G-214 a E-468; M-215 a E-468; V-216 a E-468; K-217 a E-468; V-218 a E-468; K-219 a E-468; D-220 a E-468; C-221 a E-468; T-222 a E-468; P-223 a E-468; W-224 a E-468; S-225 a E-468; D-226 a E-468; I-227 a E-468; E-228 a E-468; C-229 a E-468; V-230 a E-468; H-231 a E-468; K-232 a E-468; E-233 a E-468; S-234 a E-468; G-235 a E-468; N-236 a E-468; G-237 a E-468; H-238 a E-468; N-239 a E-468; I-240 a E-468; W-241 a E-468; V-242 a E-468; I-243 a E-468; L-244 a E-468; V-245 a E-468; V-246 a E-468; T-247 a E-468; L-248 a E-468; V-249 a E-468; V-250 a E-468; P-251 a E-468; L-252 a E-468; L-253 a E-468; L-254 a E-468; V-255 a E-468; A-256 a E-468; V-257 a E-468; L-258 a E-468; I-259 a E-468; V-260 a E-468; C-261 a E-468; C-262 a E-468; C-263 a E-468; I-264 a E-468; G-265 a E-468; S-266 a E-468; G-267 a E-468; C-268 a E-468; G-269 a E-468; G-270 a E-468; D-271 a E-468; P-272 a E-468; K-273 a E-468; C-274 a E-468; M-275 a E-468; D-276 a E-468; R-277 a E-468; V-278 a E-468; C-279 a E-468; F-280 a E-468; W-281 a E-468; R-282 a E-468; L-283 a E-468; G-284 a E-468; L-285 a E-468; L-286 a E-468; R-287 a E-468; G-288 a E-468; P-289 a E-468; G-290 a E-468; A-291 a E-468; E-292 a E-468; D-293 a E-468; N-294 a E-468; A-295 a E-468; H-296 a E-468; N-297 a E-468; E-298 a E-468; I-299 a E-468; L-300 a E-468; S-301 a E-468; N-302 a E-468; A-303 a E-468; D-304 a E-468; S-305 a E-468; L-306 a E-468; S-307 a E-468; T-308 a E-468; F-309 a E-468; V-310 a E-468; S-311 a E-468; E-312 a

5 E-468; Q-313 a E-468; Q-314 a E-468; M-315 a E-468; E-316 a E-468; S-317 a E-468; Q-318 a E-468; E-319 a E-468; P-320 a E-468; A-321 a E-468; D-322 a E-468; L-323 a E-468; T-324 a E-468; G-325 a E-468; V-326 a E-468; T-327 a E-468; V-328 a E-468; Q-329 a E-468; S-330 a E-468; P-331 a E-468; G-332 a E-468; E-333 a E-468; A-334 a E-468; Q-335 a E-468; C-336 a E-468; L-337 a E-468; L-338 a E-468; G-339 a E-468; P-340 a E-468; A-341 a E-468; E-342 a E-468; A-343 a E-468; E-344 a E-468; G-345 a E-468; S-346 a E-468; Q-347 a E-468; R-348 a E-468; R-349 a E-468; R-350 a E-468; L-351 a E-468; L-352 a E-468; V-353 a E-468; P-354 a E-468; A-355 a E-468; N-356 a E-468; G-357 a E-468; A-358 a E-468; D-359 a E-468; P-360 a E-468; T-361 a E-468; E-362 a E-468; T-363 a E-468; L-364 a E-468; M-365 a E-468; L-366 a E-468; F-367 a E-468; F-368 a E-468; D-369 a E-468; K-370 a E-468; F-371 a E-468; A-372 a E-468; N-373 a E-468; I-374 a E-468; V-375 a E-468; P-376 a E-468; F-377 a E-468; D-378 a E-468; S-379 a E-468; W-380 a E-468; D-381 a E-468; Q-382 a E-468; L-383 a E-468; M-384 a E-468; R-385 a E-468; Q-386 a E-468; L-387 a E-468; D-388 a E-468; L-389 a E-468; T-390 a E-468; K-391 a E-468; N-392 a E-468; E-393 a E-468; I-394 a E-468; D-395 a E-468; V-396 a E-468; V-397 a E-468; R-398 a E-468; A-399 a E-468; G-400 a E-468; T-401 a E-468; A-402 a E-468; G-403 a E-468; P-404 a E-468; G-405 a E-468; D-406 a E-468; A-407 a E-468; L-408 a E-468; Y-409 a E-468; A-410 a E-468; M-411 a E-468; L-412 a E-468; M-413 a E-468; K-414 a E-468; W-415 a E-468; V-416 a E-468; N-417 a E-468; K-418 a E-468; T-419 a E-468; G-420 a E-468; R-421 a E-468; N-422 a E-468; A-423 a E-468; S-424 a E-468; I-425 a E-468; H-426 a E-468; T-427 a E-468; L-428 a E-468; L-429 a E-468; D-430 a E-468; A-431 a E-468; L-432 a E-468; E-433 a E-468; R-434 a E-468; M-435 a E-468; E-436 a E-468; E-437 a E-468; R-438 a E-468; H-439 a E-468; A-440 a E-468; K-441 a E-468; E-442 a E-468; K-443 a E-468; I-444 a E-468; Q-445 a E-468; D-446 a E-468; L-447 a E-468; L-448 a E-468; V-449 a E-468; D-450 a E-468; S-451 a E-468; G-452 a E-468; K-453 a E-468; F-454 a E-468; I-455 a E-468; Y-456 a E-468; L-457 a E-468; E-458 a E-468; D-459 a E-468; G-460 a E-468; T-461 a E-468; G-462 a E-468; y/o S-463a E-468 de la secuencia de TR4 de la SEC ID N° 1.

25 En otro ejemplo, las deleciones en el extremo N del polipéptido de TR4 se pueden describir mediante la fórmula general n^2 a 238, en la que n^2 es un número de 2 a 238 correspondiente a la secuencia de aminoácidos identificada de la SEC ID N° 1. En ejemplos específicos, los anticuerpos descritos en el presente documento se unen a deleciones en el extremo N del TR4 que comprenden, o como alternativa que consisten en, la secuencia de aminoácidos de los residuos; A-2 a H-238; P-3 a H-238; P-4 a H-238; P-5 a H-238; A-6 a H-238; R-7 a H-238; V-8 a H-238; H-9 a H-238; L-10 a H-238; G-11 a H-238; A-12 a H-238; F-13 a H-238; L-14 a H-238; A-15 a H-238; V-16 a H-238; T-17 a H-238; P-18 a H-238; N-19 a H-238; P-20 a H-238; G-21 a H-238; S-22 a H-238; A-23 a H-238; A-24 a H-238; S-25 a H-238; G-26 a H-238; T-27 a H-238; E-28 a H-238; A-29 a H-238; A-30 a H-238; A-31 a H-238; A-32 a H-238; T-33 a H-238; P-34 a H-238; S-35 a H-238; K-36 a H-238; V-37 a H-238; W-38 a H-238; G-39 a H-238; S-40 a H-238; S-41 a H-238; A-42 a H-238; G-43 a H-238; R-44 a H-238; I-45 a H-238; E-46 a H-238; P-47 a H-238; R-48 a H-238; G-49 a H-238; G-50 a H-238; G-51 a H-238; R-52 a H-238; G-53 a H-238; A-54 a H-238; L-55 a H-238; P-56 a H-238; T-57 a H-238; S-58 a H-238; M-59 a H-238; G-60 a H-238; Q-61 a H-238; H-62 a H-238; G-63 a H-238; P-64 a H-238; S-65 a H-238; A-66 a H-238; R-67 a H-238; A-68 a H-238; R-69 a H-238; A-70 a H-238; G-71 a H-238; R-72 a H-238; A-73 a H-238; P-74 a H-238; G-75 a H-238; P-76 a H-238; R-77 a H-238; P-78 a H-238; A-79 a H-238; R-80 a H-238; E-81 a H-238; A-82 a H-238; S-83 a H-238; P-84 a H-238; R-85 a H-238; L-86 a H-238; R-87 a H-238; V-88 a H-238; H-89 a H-238; K-90 a H-238; T-91 a H-238; F-92 a H-238; K-93 a H-238; F-94 a H-238; V-95 a H-238; V-96 a H-238; V-97 a H-238; G-98 a H-238; V-99 a H-238; L-100 a H-238; L-101 a H-238; Q-102 a H-238; V-103 a H-238; V-104 a H-238; P-105 a H-238; S-106 a H-238; S-107 a H-238; A-108 a H-238; A-109 a H-238; T-110 a H-238; I-111 a H-238; K-112 a H-238; L-113 a H-238; H-114 a H-238; D-115 a H-238; Q-116 a H-238; S-117 a H-238; I-118 a H-238; G-119 a H-238; T-120 a H-238; Q-121 a H-238; Q-122 a H-238; W-123 a H-238; E-124 a H-238; H-125 a H-238; S-126 a H-238; P-127 a H-238; L-128 a H-238; G-129 a H-238; E-130 a H-238; L-131 a H-238; C-132 a H-238; P-133 a H-238; P-134 a H-238; G-135 a H-238; S-136 a H-238; H-137 a H-238; R-138 a H-238; S-139 a H-238; E-140 a H-238; R-141 a H-238; P-142 a H-238; G-143 a H-238; A-144 a H-238; C-145 a H-238; N-146 a H-238; R-147 a H-238; C-148 a H-238; T-149 a H-238; E-150 a H-238; G-151 a H-238; V-152 a H-238; G-153 a H-238; Y-154 a H-238; T-155 a H-238; N-156 a H-238; A-157 a H-238; S-158 a H-238; N-159 a H-238; N-160 a H-238; L-161 a H-238; F-162 a H-238; A-163 a H-238; C-164 a H-238; L-165 a H-238; P-166 a H-238; C-167 a H-238; T-168 a H-238; A-169 a H-238; C-170 a H-238; K-171 a H-238; S-172 a H-238; D-173 a H-238; E-174 a H-238; E-175 a H-238; E-176 a H-238; R-177 a H-238; S-178 a H-238; P-179 a H-238; C-180 a H-238; T-181 a H-238; T-182 a H-238; T-183 a H-238; R-184 a H-238; N-185 a H-238; T-186 a H-238; A-187 a H-238; C-188 a H-238; Q-189 a H-238; C-190 a H-238; K-191 a H-238; P-192 a H-238; G-193 a H-238; T-194 a H-238; F-195 a H-238; R-196 a H-238; N-197 a H-238; D-198 a H-238; N-199 a H-238; S-200 a H-238; A-201 a H-238; E-202 a H-238; M-203 a H-238; C-204 a H-238; R-205 a H-238; K-206 a H-238; C-207 a H-238; S-208 a H-238; T-209 a H-238; G-210 a H-238; C-211 a H-238; P-212 a H-238; R-213 a H-238; G-214 a H-238; M-215 a H-238; V-216 a H-238; K-217 a H-238; V-218 a H-238; K-219 a H-238; D-220 a H-238; C-221 a H-238; T-222 a H-238; P-223 a H-238; W-224 a H-238; S-225 a H-238; D-226 a H-238; I-227 a H-238; E-228 a H-238; C-229 a H-238; V-230 a H-238; H-231 a H-238; K-232 a H-238; y/o E-233 a H-238; de la secuencia del dominio extracelular de TR4 de la SEC ID N° 1.

60 Como se ha mencionado anteriormente, aunque la deleción de uno o más aminoácidos del extremo C de una proteína tenga como resultado la modificación o la pérdida de una o más funciones biológicas de la proteína, se pueden seguir conservando otras actividades funcionales (p. ej., actividades biológicas, capacidad para formar multímeros, capacidad para unirse al ligando de TR4 (p. ej., TRAIL). Por ejemplo, generalmente se conservará la capacidad del polipéptido de TR4 acortado para inducir y/o unirse a anticuerpos que reconocen las formas completas o maduras de los polipéptidos de TR4 cuando se eliminan del extremo C menos de la mayoría de los

residuos del polipéptido completo o maduro. Si un polipéptido concreto que carece de residuos en el extremo C de un polipéptido completo conserva dichas actividades inmunológicas o no se puede determinar fácilmente mediante procedimientos de rutina descritos en el presente documento y, por otro lado, se conoce en la técnica. No es improbable que un polipéptido de TR4 con un gran número de residuos de aminoácidos en el extremo C delecionados puede conservar algunas actividades biológicas o inmunogénicas. De hecho, los péptidos compuestos por tan pocos como seis residuos de aminoácidos de TR4 pueden provocar, a menudo, una respuesta inmunitaria.

De acuerdo con lo anterior, en el presente documento se describen anticuerpos que se unen a polipéptidos que tienen uno o más residuos delecionados del extremo carboxi de la secuencia de aminoácidos de la secuencia polipeptídica de TR4 de SEC ID N° 1 hasta el residuo de alanina en la posición número 30 y polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos. En particular, en el presente documento se describen anticuerpos que se unen a polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de los residuos 24-m¹ de SEC ID N°1, en la que m¹ es un número entero de 30 a 467 correspondiente a la posición del residuo de aminoácido en la SEC ID N° 1.

Más en concreto, en el presente documento se describen anticuerpos que se unen a polipéptidos que comprenden, o como alternativa que consisten en, la secuencia de aminoácidos de los residuos A-24 a L-467; A-24 a S-466; A-24 a V-465; A-24 a A-464; A-24 a S-463; A-24 a G-462; A-24 a T-461; A-24 a G-460; A-24 a D-459; A-24 a E-458; A-24 a L-457; A-24 a Y-456; A-24 a I-455; A-24 a F-454; A-24 a K-453; A-24 a G-452; A-24 a S-451; A-24 a D-450; A-24 a V-449; A-24 a L-448; A-24 a L-447; A-24 a D-446; A-24 a Q-445; A-24 a I-444; A-24 a K-443; A-24 a E-442; A-24 a K-441; A-24 a A-440; A-24 a H-439; A-24 a R-438; A-24 a E-437; A-24 a E-436; A-24 a M-435; A-24 a R-434; A-24 a E-433; A-24 a L-432; A-24 a A-431; A-24 a D-430; A-24 a L-429; A-24 a L-428; A-24 a T-427; A-24 a H-426; A-24 a I-425; A-24 a S-424; A-24 a A-423; A-24 a N-422; A-24 a R-421; A-24 a G-420; A-24 a T-419; A-24 a K-418; A-24 a N-417; A-24 a V-416; A-24 a W-415; A-24 a K-414; A-24 a M-413; A-24 a L-412; A-24 a M-411; A-24 a A-410; A-24 a Y-409; A-24 a L-408; A-24 a A-407; A-24 a D-406; A-24 a G-405; A-24 a P-404; A-24 a G-403; A-24 a A-402; A-24 a T-401; A-24 a G-400; A-24 a A-399; A-24 a R-398; A-24 a V-397; A-24 a V-396; A-24 a D-395; A-24 a I-394; A-24 a E-393; A-24 a N-392; A-24 a K-391; A-24 a T-390; A-24 a L-389; A-24 a D-388; A-24 a L-387; A-24 a Q-386; A-24 a R-385; A-24 a M-384; A-24 a L-383; A-24 a Q-382; A-24 a D-381; A-24 a W-380; A-24 a S-379; A-24 a D-378; A-24 a F-377; A-24 a P-376; A-24 a V-375; A-24 a I-374; A-24 a N-373; A-24 a A-372; A-24 a F-371; A-24 a K-370; A-24 a D-369; A-24 a F-368; A-24 a F-367; A-24 a L-366; A-24 a M-365; A-24 a L-364; A-24 a T-363; A-24 a E-362; A-24 a T-361; A-24 a P-360; A-24 a D-359; A-24 a A-358; A-24 a G-357; A-24 a N-356; A-24 a A-355; A-24 a P-354; A-24 a V-353; A-24 a L-352; A-24 a L-351; A-24 a R-350; A-24 a R-349; A-24 a R-348; A-24 a Q-347; A-24 a S-346; A-24 a G-345; A-24 a E-344; A-24 a A-343; A-24 a E-342; A-24 a A-341; A-24 a P-340; A-24 a G-339; A-24 a L-338; A-24 a L-337; A-24 a C-336; A-24 a Q-335; A-24 a A-334; A-24 a E-333; A-24 a G-332; A-24 a P-331; A-24 a S-330; A-24 a Q-329; A-24 a V-328; A-24 a T-327; A-24 a V-326; A-24 a G-325; A-24 a T-324; A-24 a L-323; A-24 a D-322; A-24 a A-321; A-24 a P-320; A-24 a E-319; A-24 a Q-318; A-24 a S-317; A-24 a E-316; A-24 a M-315; A-24 a Q-314; A-24 a Q-313; A-24 a E-312; A-24 a S-311; A-24 a V-310; A-24 a F-309; A-24 a T-308; A-24 a S-307; A-24 a L-306; A-24 a S-305; A-24 a D-304; A-24 a A-303; A-24 a N-302; A-24 a S-301; A-24 a L-300; A-24 a I-299; A-24 a E-298; A-24 a N-297; A-24 a H-296; A-24 a A-295; A-24 a N-294; A-24 a D-293; A-24 a E-292; A-24 a A-291; A-24 a G-290; A-24 a P-289; A-24 a G-288; A-24 a R-287; A-24 a L-286; A-24 a L-285; A-24 a G-284; A-24 a L-283; A-24 a R-282; A-24 a W-281; A-24 a P-280; A-24 a C-279; A-24 a V-278; A-24 a R-277; A-24 a D-276; A-24 a M-275; A-24 a C-274; A-24 a K-273; A-24 a F-272; A-24 a D-271; A-24 a G-270; A-24 a G-269; A-24 a C-268; A-24 a G-267; A-24 a S-266; A-24 a G-265; A-24 a I-264; A-24 a C-263; A-24 a C-262; A-24 a C-261; A-24 a V-260; A-24 a I-259; A-24 a L-258; A-24 a V-257; A-24 a A-256; A-24 a V-255; A-24 a L-254; A-24 a L-253; A-24 a L-252; A-24 a P-251; A-24 a V-250; A-24 a V-249; A-24 a L-248; A-24 a T-247; A-24 a V-246; A-24 a V-245; A-24 a L-244; A-24 a I-243; A-24 a V-242; A-24 a W-241; A-24 a I-240; A-24 a N-239; A-24 a H-238; A-24 a G-237; A-24 a N-236; A-24 a G-235; A-24 a S-234; A-24 a E-233; A-24 a K-232; A-24 a H-231; A-24 a V-230; A-24 a C-229; A-24 a E-228; A-24 a I-227; A-24 a D-226; A-24 a S-225; A-24 a W-224; A-24 a P-223; A-24 a T-222; A-24 a C-221; A-24 a D-220; A-24 a K-219; A-24 a V-218; A-24 a K-217; A-24 a V-216; A-24 a M-215; A-24 a G-214; A-24 a R-213; A-24 a P-212; A-24 a C-211; A-24 a G-210; A-24 a T-209; A-24 a S-208; A-24 a C-207; A-24 a K-206; A-24 a R-205; A-24 a C-204; A-24 a M-203; A-24 a E-202; A-24 a A-201; A-24 a S-200; A-24 a N-199; A-24 a D-198; A-24 a N-197; A-24 a R-196; A-24 a F-195; A-24 a T-194; A-24 a G-193; A-24 a P-192; A-24 a K-191; A-24 a C-190; A-24 a Q-189; A-24 a C-188; A-24 a A-187; A-24 a T-186; A-24 a N-185; A-24 a R-184; A-24 a T-183; A-24 a T-182; A-24 a T-181; A-24 a C-180; A-24 a P-179; A-24 a S-178; A-24 a R-177; A-24 a E-176; A-24 a E-175; A-24 a E-174; A-24 a D-173; A-24 a S-172; A-24 a K-171; A-24 a C-170; A-24 a A-169; A-24 a T-168; A-24 a C-167; A-24 a P-166; A-24 a L-165; A-24 a C-164; A-24 a A-163; A-24 a F-162; A-24 a L-161; A-24 a N-160; A-24 a N-159; A-24 a S-158; A-24 a A-157; A-24 a N-156; A-24 a T-155; A-24 a Y-154; A-24 a G-153; A-24 a V-152; A-24 a G-151; A-24 a E-150; A-24 a T-149; A-24 a C-148; A-24 a R-147; A-24 a N-146; A-24 a C-145; A-24 a A-144; A-24 a G-143; A-24 a P-142; A-24 a R-141; A-24 a E-140; A-24 a S-139; A-24 a R-138; A-24 a H-137; A-24 a S-136; A-24 a G-135; A-24 a P-134; A-24 a P-133; A-24 a C-132; A-24 a L-131; A-24 a E-130; A-24 a G-129; A-24 a L-128; A-24 a P-127; A-24 a S-126; A-24 a H-125; A-24 a E-124; A-24 a W-123; A-24 a Q-122; A-24 a Q-121; A-24 a T-120; A-24 a G-119; A-24 a I-118; A-24 a S-117; A-24 a Q-116; A-24 a D-115; A-24 a H-114; A-24 a L-113; A-24 a K-112; A-24 a I-111; A-24 a T-110; A-24 a A-109; A-24 a A-108; A-24 a S-107; A-24 a S-106; A-24 a P-105; A-24 a V-104; A-24 a V-103; A-24 a G-102; A-24 a L-101; A-24 a L-100; A-24 a V-99; A-24 a G-98; A-24 a V-97; A-24 a V-96; A-24 a V-95; A-24 a F-94; A-24 a K-93; A-24 a F-92; A-24 a T-91; A-24 a K-90; A-24 a H-89; A-24 a V-88; A-24 a R-87; A-24 a L-86; A-24 a R-85; A-24 a P-84; A-24 a S-83; A-24 a A-82; A-24 a E-81; A-24 a R-80; A-24 a A-79; A-24 a P-78; A-24 a R-77; A-24 a P-76; A-24 a G-75; A-24 a P-74; A-24 a A-73; A-24 a R-72; A-24 a G-71; A-24 a A-70; A-24 a R-69; A-24 a A-68; A-24 a R-67; A-24 a A-66; A-24 a S-65; A-24 a P-64; A-24 a G-63; A-24

a H-62; A-24 a Q-61; A-24 a G-60; A-24 a M-59; A-24 a S-58; A-24 a T-57; A-24 a P-56; A-24 a L-55; A-24 a A-54; A-24 a G-53; A-24 a R-52; A-24 a G-51; A-24 a G-50; A-24 a G-49; A-24 a R-48; A-24 a P-47; A-24 a E-46; A-24 a I-45; A-24 a R-44; A-24 a G-43; A-24 a A-42; A-24 a S-41; A-24 a S-40; A-24 a G-39; A-24 a W-38; A-24 a V-37; A-24 a K-36; A-24 a S-35; A-24 a P-34; A-24 a T-33; A-24 a A-32; A-24 a A-31; y/o A-24 a A-30 de la secuencia de TR4 de SEC ID N^o1.

En otro ejemplo, los anticuerpos descritos en el presente documento se unen a las delecciones en el extremo C del polipéptido de TR4 que se pueden describir mediante la fórmula general 24-m², en la que m² es un número de 30 a 238 correspondiente a la secuencia de aminoácidos identificada de la SEC ID N^o 1. En ejemplos específicos, los anticuerpos descritos en el presente documento se unen a polipéptidos de TR4 que comprenden, o como alternativa que consisten en, la secuencia de aminoácidos de los residuos: A-24 a G-237; A-24 a N-236; A-24 a G-235; A-24 a S-234; A-24 a E-233; A-24 a K-232; A-24 a H-231; A-24 a V-230; A-24 a C-229; A-24 a E-228; A-24 a I-227; A-24 a D-226; A-24 a S-225; A-24 a W-224; A-24 a P-223; A-24 a T-222; A-24 a C-221; A-24 a K-219; A-24 a V-218; A-24 a K-217; A-24 a V-216; A-24 a M-215; A-24 a G-214; A-24 a R-213; A-24 a P-212; A-24 a C-211; A-24 a G-210; A-24 a T-209; A-24 a S-208; A-24 a C-207; A-24 a K-206; A-24 a R-205; A-24 a C-204; A-24 a M-203; A-24 a E-202; A-24 a A-201; A-24 a S-200; A-24 a N-199; A-24 a D-198; A-24 a N-197; A-24 a R-196; A-24 a F-195; A-24 a T-194; A-24 a G-193; A-24 a P-192; A-24 a K-191; A-24 a C-190; A-24 a Q-189; A-24 a C-188; A-24 a A-187; A-24 a T-186; A-24 a N-185; A-24 a R-184; A-24 a T-183; A-24 a T-182; A-24 a T-181; A-24 a C-180; A-24 a P-179; A-24 a S-178; A-24 a R-177; A-24 a E-176; A-24 a E-175; A-24 a E-174; A-24 a D-173; A-24 a S-172; A-24 a K-171; A-24 a C-170; A-24 a A-169; A-24 a T-168; A-24 a C-167; A-24 a P-166; A-24 a L-165; A-24 a C-164; A-24 a A-163; A-24 a F-162; A-24 a L-161; A-24 a N-160; A-24 a N-159; A-24 a S-158; A-24 a A-157; A-24 a N-156; A-24 a T-155; A-24 a Y-154; A-24 a G-153; A-24 a V-152; A-24 a G-151; A-24 a E-150; A-24 a T-149; A-24 a C-148; A-24 a R-147; A-24 a N-146; A-24 a C-145; A-24 a A-144; A-24 a G-143; A-24 a P-142; A-24 a R-141; A-24 a E-140; A-24 a S-139; A-24 a R-138; A-24 a H-137; A-24 a S-136; A-24 a G-135; A-24 a P-134; A-24 a P-133; A-24 a C-132; A-24 a L-131; A-24 a E-130; A-24 a G-129; A-24 a L-128; A-24 a P-127; A-24 a S-126; A-24 a H-125; A-24 a E-124; A-24 a W-123; A-24 a Q-122; A-24 a Q-121; A-24 a T-120; A-24 a G-119; A-24 a I-118; A-24 a S-117; A-24 a Q-116; A-24 a D-115; A-24 a H-114; A-24 a L-113; A-24 a K-112; A-24 a I-111; A-24 a T-110; A-24 a A-109; A-24 a A-108; A-24 a S-107; A-24 a S-106; A-24 a P-105; A-24 a V-104; A-24 a V-103; A-24 a Q-102; A-24 a L-101; A-24 a L-100; A-24 a V-99; A-24 a G-98; A-24 a V-97; A-24 a V-96; A-24 a V-95; A-24 a F-94; A-24 a K-93; A-24 a F-92; A-24 a T-91; A-24 a K-90; A-24 a H-89; A-24 a V-88; A-24 a R-87; A-24 a L-86; A-24 a R-85; A-24 a P-84; A-24 a S-83; A-24 a A-82; A-24 a E-81; A-24 a R-80; A-24 a A-79; A-24 a P-78; A-24 a R-77; A-24 a P-76; A-24 a G-75; A-24 a P-74; A-24 a A-73; A-24 a R-72; A-24 a G-71; A-24 a A-70; A-24 a R-69; A-24 a A-68; A-24 a R-67; A-24 a A-66; A-24 a S-65; A-24 a P-64; A-24 a G-63; A-24 a H-62; A-24 a Q-61; A-24 a G-60; A-24 a M-59; A-24 a S-58; A-24 a T-57; A-24 a P-56; A-24 a L-55; A-24 a A-54; A-24 a G-53; A-24 a R-52; A-24 a G-51; A-24 a G-50; A-24 a G-49; A-24 a R-48; A-24 a P-47; A-24 a E-46; A-24 a I-45; A-24 a R-44; A-24 a G-43; A-24 a A-42; A-24 a S-41; A-24 a S-40; A-24 a G-39; A-24 a W-38; A-24 a V-37; A-24 a K-36; A-24 a S-35; A-24 a P-34; A-24 a T-33; A-24 a A-32; A-24 a A-31; y/o A-24 a A-30; de la secuencia del dominio extracelular de TR4 de SEC ID N^o1.

En el presente documento también se describen anticuerpos que se unen a polipéptidos que tienen uno o más residuos del extremo carboxi de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de TR4 de SEC ID N^o1 hasta C-221 de SEC ID N^o 1. En concreto, en el presente documento se describen anticuerpos proporcionados que se unen a polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de los residuos 1-m⁹ de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N^o 1, en la que m⁹ es cualquier número entero en el intervalo de 221-468 y el residuo C-221 es la posición del primer residuo del extremo C del polipéptido completo de TR4 (mostrado en la SEC ID N^o1) que se cree que es necesario para la actividad de unión al receptor de la proteína TR4.

En el presente documento también se describen anticuerpos que se unen a polipéptidos en los que se ha delecionado tanto en el extremo amino como en el extremo carboxi de un polipéptido de TR4 uno o más aminoácidos, que se pueden describir en general como que tienen los residuos n¹- m¹ y/o n²- m² de la SEC ID N^o1, en la que n¹, n², m¹ y m² son números enteros como se ha descrito en lo que antecede.

En el presente documento también se describen anticuerpos que se unen a un polipéptido que consiste en una porción de la secuencia de aminoácidos de TR4 completa codificada por el clon de ADNc contenido en el depósito de la ATCC N^o 97853, en el que esta porción excluye de 1 a aproximadamente 108 aminoácidos del extremo amino de la secuencia de aminoácidos completa codificada por el clon de ADN contenido en el depósito de la ATCC n1 97853 o de 1 a aproximadamente 247 aminoácidos del extremo carboxi, o cualquier combinación de las delecciones de los extremos amino y carboxi anteriores, de la secuencia de aminoácidos completa codificada por el clon de ADNc contenido en el depósito de la ATCC n1 97853.

Preferentemente, los anticuerpos descritos en el presente documento se unen a fragmentos de TR4 que comprenden una porción del dominio extracelular, es decir dentro de los residuos 24-238 de SEC ID N^o 1, ya que cabe esperar que cualquier porción en el mismo sea soluble.

En la técnica se reconocerá que algunas secuencias de aminoácidos de TR4 se pueden variar sin que se produzcan efectos significativos sobre la estructura o función de la proteína. Si se contemplan estas diferencias en la secuencia, debe recordarse que habrá áreas cruciales en la proteína que determinan la actividad. Normalmente, dichas áreas comprenderán residuos que forman el sitio de unión al ligando o el dominio de muerte o que forman

estructuras terciarias que afectan a estos dominios.

Por tanto, en el presente documento también se describen anticuerpos que se unen a variaciones de la proteína TR4 que muestran una actividad sustancial de la proteína TR4 o que incluyen regiones de TR4 tales como los fragmentos proteicos que se tratan más adelante. Dichos mutantes incluyen delecciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones. Las guías que conciernen a qué cambios de aminoácidos es más probable que sean fenotípicamente silentes se pueden encontrar en Bowie, J.U. y col., Science 247:1306-1310 (1990)..

Por tanto, los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden unir a un fragmento, derivado o análogo del polipéptido de la SEC ID N° 1 o que están codificados por el ADNc en la ATCC con el depósito 97853. Dichos fragmentos, variantes o derivados pueden ser (i) uno en el que al menos uno o más de los residuos de aminoácidos está sustituido con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente, uno o más residuos de aminoácidos conservados y, más preferentemente, al menos uno pero menos de diez residuos de aminoácidos conservados) y dicho residuo de aminoácido sustituido puede o no estar codificado por el código genético, o (ii) uno en el que uno o más de los residuos de aminoácidos incluye un grupo sustituyente o (iii) uno en el que el polipéptido maduro está condensado con otro compuesto yal como un compuesto que aumente la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), o (iv) uno en el que los aminoácidos adicionales están condensados con el polipéptido maduro tal como un péptido de la región de fusión Fc o secuencia líder o secretora de la IgG o una secuencia que se usa para la purificación del polipéptido maduro o una secuencia propeptica. Se estima que dichos fragmentos, derivados y análogos están dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas del presente documento.

De particular interés son las sustituciones de aminoácidos cargados por otro aminoácido cargado y por aminoácidos neutros o con carga negativa. Esto último tiene como resultado proteínas con carga positiva reducida para mejorar las características de la proteína TR4. La prevención de la agregación es muy deseable. La agregación de proteínas no solo da lugar a una pérdida de actividad sino que también puede suponer un problema a la hora de preparar formulaciones farmacéuticas, ya que pueden ser inmunogénicas. (Pinckard y col., Clin Exp. Immunol. 2:331-340 (1967); Robbins y col., Diabetes 36:838-845 (1987); Cleland y col., Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377 (1993)).

La sustitución de los aminoácidos también puede modificar la selectividad de la unión a los receptores de la superficie celular. Ostade y col., Nature 361:266-268 (1993) describen determinadas mutaciones que tienen como resultado la unión selectiva del TNF-alfa a solo uno de los dos tipos conocidos de receptores de TNF. Por tanto, los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden unir a un receptor TR4 que contiene una o más sustituciones, delecciones o adiciones de aminoácidos, bien de mutaciones naturales o bien por manipulación humana.

Como se ha indicado, los cambios son, preferentemente, de una naturaleza menor, tal como sustituciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al plegamiento o a la actividad de la proteína (véase la tabla 3).

TABLA 3. Sustituciones conservadoras de aminoácidos

Aromáticos	Fenilalanina
	Triptófano
	Tirosina
Hidrófobos	Leucina
	Isoleucina
	Valina
Polares	Glutamina
	Asparagina

Básicos	Arginina Lisina Histidina
---------	---------------------------------

(continuación)

Ácidos	Ácido aspártico Ácido glutámico
Pequeño	Alanina Serina Treonina Metionina Glicina

5 En ejemplos específicos, el número de sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°1 y/o cualquiera de los fragmentos polipeptídicos descritos en el presente documento (p. ej., el dominio extracelular o el dominio intracelular) es 75, 70, 60, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 or 30-20, 20-15, 20-10, 15-10, 10-1, 5-10, 1-5, 1-3 o 1-2.

10 En ejemplos específicos, los anticuerpos descritos en el presente documento se unen a polipéptidos de TR4 o fragmentos o variantes de los mismos (especialmente un fragmento que comprende, o como alternativa que consiste en, el dominio extracelular soluble de TR4), que contiene una cualquiera o más de las siguientes mutaciones conservadoras en TR4.-{ }- M1 sustituido por A, G, I, L, S, T, o V; A2 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; A6 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; R7 sustituido por H, o K; V8 sustituido por A, G, I, L, S, T, o M; H9 sustituido por K, o R; L10 sustituido por A, G, I, S, T, M, o V; G11 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; A12 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; F13 sustituido por W, o Y; L14 sustituido por A, G, I, S, T, M, o V; A15 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; V16 sustituido por A, G, I, L, S, T, o M; T 17 sustituido por A, G, I, L, S, M, o V; N19 sustituido por Q; G21 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; S22 sustituido por A, G, I, L, T, M, o V; A23 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; A24 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; S25 sustituido por A, G, I, L, T, M, o V; G26 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; T27 sustituido por A, G, I, L, S, M, o V; E28 sustituido por D; A29 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; A30 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; A31 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; A32 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; T33 sustituido por A, G, I, L, S, M, o V; S35 sustituido por A, G, I, L, T, M, o V; K36 sustituido por H, o R; V37 sustituido por A, G, I, L, S, T, o M; W38 sustituido por F, o Y; G39 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; S40 sustituido por A, G, I, L, T, M, o V; S41 sustituido por A, G, I, L, T, M, o V; A42 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; G43 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; R44 sustituido por H, o K; I45 sustituido por A, G, L, S, T, M, o V; E46 sustituido por D; R48 sustituido por H, o K; G49 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; G50 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; G51 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; R52 sustituido por H, o K; G53 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; A54 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; L55 sustituido por A, G, I, S, T, M, o V; T57 sustituido por A, G, I, L, S, M, o V; S58 sustituido por A, G, I, L, T, M, o V; M59 sustituido por A, G, I, L, S, T, o V; G60 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; Q61 sustituido por N; H62 sustituido por K, o R; G63 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; S65 sustituido por A, G, I, L, T, M, o V; A66 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; R67 sustituido por H, o K; A68 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; R69 sustituido por H, o K; A70 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; G71 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; R72 sustituido por H, o K; A73 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; G75 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; R77 sustituido por H, o K; A79 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; R80 sustituido por H, o K; E81 sustituido por D; A82 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; S83 sustituido por A, G, I, L, T, M, o V; R85 sustituido por H, o K; L86 sustituido por A, G, I, S, T, M, o V; R87 sustituido por H, o K; V88 sustituido por A, G, I, L, S, T, o M; H89 sustituido por K, o R; K90 sustituido por H, o R; T91 sustituido por A, G, I, L, S, M, o V; F92 sustituido por W, o Y; K93 sustituido por H, o R; F94 sustituido por W, o Y; V95 sustituido por A, G, I, L, S, T, o M; V96 sustituido por A, G, I, L, S, T, o M; V97 sustituido por A, G, I, L, S, T, o M; G98 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; V99 sustituido por A, G, I, L, S, T, o M; L100 sustituido por A, G, I, S, T, M, o V; L101 sustituido por A, G, I, S, T, M, o V; Q102 sustituido por N; V103 sustituido por A, G, I, L, S, T, o M; V104 sustituido por A, G, I, L, S, T, o M; S106 sustituido por A, G, I,

L, T, M, o V; S107 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; A108 substituído por G, I, L, S, T, M, o V; A109 substituído por G, I, L, S, T, M, o V; T110 substituído por A, G, I, L, S, M, o V; I111 substituído por A, G, L, S, T, M, o V; K112 substituído por H, o R; L113 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; H114 substituído por K, o R; D115 substituído por E; Q116 substituído por N; S117 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; I118 substituído por A, G, L, S, T, M, o V; G119 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; T120 substituído por A, G, I, L, S, M, o V; Q121 substituído por N; Q122 substituído por N; W123 substituído por F, o Y; E124 substituído por D; H125 substituído por K, o R; S126 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; L128 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; G129 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; E130 substituído por D; L131 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; G135 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; S136 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; H137 substituído por K, o R; R138 substituído por H, o K; S139 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; E140 substituído por D; R141 substituído por H, o K; G143 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; A144 substituído por G, I, L, S, T, M, o V; N146 substituído por Q; R147 substituído por H, o K; T149 substituído por A, G, I, L, S, M, o V; E150 substituído por D; G151 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; V152 substituído por A, G, I, L, S, T, o M; G153 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; Y154 substituído por F, o W; T155 substituído por A, G, I, L, S, M, o V; N156 substituído por Q; A157 substituído por G, I, L, S, T, M, o V; S158 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; N159 substituído por Q; N160 substituído por Q; L161 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; F162 substituído por W, o Y; A163 substituído por G, I, L, S, T, M, o V; L165 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; T168 substituído por A, G, I, L, S, M, o V; A169 substituído por G, I, L, S, T, M, o V; K171 substituído por H, o R; S172 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; D173 substituído por E; E174 substituído por D; E175 substituído por D; E176 substituído por D; R177 substituído por H, o K; S178 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; T181 substituído por A, G, I, L, S, M, o V; T182 substituído por A, G, I, L, S, M, o V; T183 substituído por A, G, I, L, S, M, o V; R184 substituído por H, o K; N185 substituído por Q; T186 substituído por A, G, I, L, S, M, o V; A187 substituído por G, I, L, S, T, M, o V; Q189 substituído por N; K191 substituído por H, o R; G193 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; T194 substituído por A, G, I, L, S, M, o V; F195 substituído por W, o Y; R196 substituído por H, o K; N197 substituído por Q; D198 substituído por E; N199 substituído por Q; S200 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; A201 substituído por G, I, L, S, T, M, o V; E202 substituído por D; M203 substituído por A, G, I, L, S, T, o V; R205 substituído por H, o K; K206 substituído por H, o R; S208 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; T209 substituído por A, G, I, L, S, M, o V; G210 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; R213 substituído por H, o K; G214 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; M215 substituído por A, G, I, L, S, T, o V; V216 substituído por A, G, I, L, S, T, o M; K217 substituído por H, o R; V218 substituído por A, G, I, L, S, T, o M; K219 substituído por H, o R; D220 substituído por E; T222 substituído por A, G, I, L, S, M, o V; W224 substituído por F, o Y; S225 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; D226 substituído por E; I227 substituído por A, G, L, S, T, M, o V; E228 substituído por D; V230 substituído por A, G, I, L, S, T, o M; H231 substituído por K, o R; K232 substituído por H, o R; E233 substituído por D; S234 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; G235 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; N236 substituído por Q; G237 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; H238 substituído por K, o R; N239 substituído por Q; I240 substituído por A, G, L, S, T, M, o V; W241 substituído por F, o Y; V242 substituído por A, G, I, L, S, T, o M; I243 substituído por A, G, L, S, T, M, o V; L244 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; V245 substituído por A, G, I, L, S, T, o M; V246 substituído por A, G, I, L, S, T, o M; T247 substituído por A, G, I, L, S, M, o V; L248 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; V249 substituído por A, G, I, L, S, T, o M; V250 substituído por A, G, I, L, S, T, o M; L252 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; L253 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; L254 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; V255 substituído por A, G, I, L, S, T, o M; A256 substituído por G, I, L, S, T, M, o V; V257 substituído por A, G, I, L, S, T, o M; L258 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; I259 substituído por A, G, L, S, T, M, o V; V260 substituído por A, G, I, L, S, T, o M; I264 substituído por A, G, L, S, T, M, o V; G265 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; S266 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; G267 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; G269 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; G270 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; D271 substituído por E; K273 substituído por H, o R; M275 substituído por A, G, I, L, S, T, o V; D276 substituído por E; R277 substituído por H, o K; V278 substituído por A, G, I, L, S, T, o M; F280 substituído por W, o Y; W281 substituído por F, o Y; R282 substituído por H, o K; L283 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; G284 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; L285 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; L286 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; R287 substituído por H, o K; G288 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; G290 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; A291 substituído por G, I, L, S, T, M, o V; E292 substituído por D; D293 substituído por E; N294 substituído por Q; A295 substituído por G, I, L, S, T, M, o V; H296 substituído por K, o R; N297 substituído por Q; E298 substituído por D; I299 substituído por A, G, L, S, T, M, o V; L300 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; S301 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; N302 substituído por Q; A303 substituído por G, I, L, S, T, M, o V; D304 substituído por E; S305 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; L306 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; S307 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; T308 substituído por A, G, I, L, S, M, o V; F309 substituído por W, o Y; V310 substituído por A, G, I, L, S, T, o M; S311 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; E312 substituído por D; Q313 substituído por N; Q314 substituído por N; M315 substituído por A, G, I, L, S, T, o V; E316 substituído por D; S317 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; Q318 substituído por N; E319 substituído por D; A321 substituído por G, I, L, S, T, M, o V; D322 substituído por E; L323 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; T324 substituído por A, G, I, L, S, M, o V; G325 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; V326 substituído por A, G, I, L, S, T, o M; T327 substituído por A, G, I, L, S, M, o V; V328 substituído por A, G, I, L, S, T, o M; Q329 substituído por N; S330 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; G332 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; E333 substituído por D; A334 substituído por G, I, L, S, T, M, o V; Q335 substituído por N; L337 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; L338 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; G339 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; A341 substituído por G, I, L, S, T, M, o V; E342 substituído por D; A343 substituído por G, I, L, S, T, M, o V; E344 substituído por D; G345 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; S346 substituído por A, G, I, L, T, M, o V; Q347 substituído por N; R348 substituído por H, o K; R349 substituído por H, o K; R350 substituído por H, o K; L351 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; L352 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; V353 substituído por A, G, I, L, S, T, o M; A355 substituído por G, I, L, S, T, M, o V; N356 substituído por Q; G357 substituído por A, I, L, S, T, M, o V; A358 substituído por G, I, L, S, T, M, o V; D359 substituído por E; T361 substituído por A, G, I, L, S, M, o V; E362 substituído por D; T363 substituído por A, G, I, L, S, M, o V; L364 substituído por A, G, I, S, T, M, o V; M365 substituído por A, G, I, L, S, T, o V;

L366 sustituido por A, G, I, S, T, M, o V; F367 sustituido por W, o Y; F368 sustituido por W, o Y; D369 sustituido por E; K370 sustituido por H, o R; F371 sustituido por W, o Y; A372 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; N373 sustituido por Q; I374 sustituido por A, G, L, S, T, M, o V; V375 sustituido por A, G, I, L, S, T, o M; F377 sustituido por W, o Y; D378 sustituido por E; S379 sustituido por A, G, I, L, T, M, o V; W380 sustituido por F, o Y; D381 sustituido por E; Q382 sustituido por N; L383 sustituido por A, G, I, S, T, M, o V; M384 sustituido por A, G, I, L, S, T, o V; R385 sustituido por H, o K; Q386 sustituido por N; L387 sustituido por A, G, I, S, T, M, o V; D388 sustituido por E; L389 sustituido por A, G, I, S, T, M, o V; T390 sustituido por A, G, I, L, S, M, o V; K391 sustituido por H, o R; N392 sustituido por Q; E393 sustituido por D; I394 sustituido por A, G, L, S, T, M, o V; D395 sustituido por E; V396 sustituido por A, G, I, L, S, T, o M; V397 sustituido por A, G, I, L, S, T, o M; R398 sustituido por H, o K; A399 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; G400 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; T401 sustituido por A, G, I, L, S, M, o V; A402 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; G403 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; G405 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; D406 sustituido por E; A407 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; L408 sustituido por A, G, I, S, T, M, o V; Y409 sustituido por F, o W; A410 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; M411 sustituido por A, G, I, L, S, T, o V; L412 sustituido por A, G, I, S, T, M, o V; M413 sustituido por A, G, I, L, S, T, o V; K414 sustituido por H, o R; V415 sustituido por F, o Y; V416 sustituido por A, G, I, L, S, T, o M; N417 sustituido por Q; K418 sustituido por H, o R; T419 sustituido por A, G, I, L, S, M, o V; G420 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; R421 sustituido por H, o K; N422 sustituido por Q; A423 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; S424 sustituido por A, G, I, L, T, M, o V; I425 sustituido por A, G, L, S, T, M, o V; H426 sustituido por K, o R; T427 sustituido por A, G, I, L, S, M, o V; L428 sustituido por A, G, I, S, T, M, o V; L429 sustituido por A, G, I, S, T, M, o V; D430 sustituido por E; A431 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; L432 sustituido por A, G, I, S, T, M, o V; E433 sustituido por D; R434 sustituido por H, o K; M435 sustituido por A, G, I, L, S, T, o V; E436 sustituido por D; E437 sustituido por D; R438 sustituido por H, o K; H439 sustituido por K, o R; A440 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; K441 sustituido por H, o R; E442 sustituido por D; K443 sustituido por H, o R; I444 sustituido por A, G, L, S, T, M, o V; Q445 sustituido por N; D446 sustituido por E; L447 sustituido por A, G, I, S, T, M, o V; L448 sustituido por A, G, I, S, T, M, o V; V449 sustituido por A, G, I, L, S, T, o M; D450 sustituido por E; S451 sustituido por A, G, I, L, T, M, o V; G452 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; K453 sustituido por H, o R; F454 sustituido por W, o Y; I455 sustituido por A, G, L, S, T, M, o V; Y456 sustituido por F, o W; L457 sustituido por A, G, I, S, T, M, o V; E458 sustituido por D; D459 sustituido por E; G460 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; T461 sustituido por A, G, I, L, S, M, o V; G462 sustituido por A, I, L, S, T, M, o V; S463 sustituido por A, G, I, L, T, M, o V; A464 sustituido por G, I, L, S, T, M, o V; V465 sustituido por A, G, I, L, S, T, o M; S466 sustituido por A, G, I, L, T, M, o V; L467 sustituido por A, G, I, S, T, M, o V; y/o E468 sustituido por D de SEC ID N°1.

En ejemplos específicos, los anticuerpos descritos en el presente documento se unen a polipéptidos de TR4 o fragmentos o variantes de los mismos (especialmente un fragmento que comprende, o como alternativa que consiste en, el dominio soluble extracelular de TR4) que contiene una cualquiera o más de las siguientes mutaciones no conservadoras en TR4: M1 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; A2 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; P3 sustituido por D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o C; P4 sustituido por D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o C; P5 sustituido por D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o C; A6 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; R7 sustituido por D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; V8 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; H9 sustituido por D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; L10 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; G11 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; A12 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; F13 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; L14 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; A15 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; V16 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; T17 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; P18 sustituido por D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o C; N19 sustituido por D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; P20 sustituido por D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o C; G21 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S22 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; A23 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; A24 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S25 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; G26 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; T27 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; E28 sustituido por H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; A29 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; A30 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; A31 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; A32 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; T33 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; P34 sustituido por D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o C; S35 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; K36 sustituido por D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; V37 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; W38 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; G39 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S40 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S41 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; A42 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; G43 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; R44 sustituido por D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; I45 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; E46 sustituido por H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; P47 sustituido por D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o C; R48 sustituido por D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; G49 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; G50 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; G51 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; R52 sustituido por D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; G53 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; A54 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; L55 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; P56 sustituido por D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, o C; T57 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S58 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; M59 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; G60 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; Q61 sustituido por D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; H62 sustituido por D, E, A, G, I,

D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; N422 sustituido por D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, o C; A423 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S424 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; I425 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; H426 sustituido por D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; T427 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; L428 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; L429 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; D430 sustituido por H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; A431 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; L432 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; E433 sustituido por H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; R434 sustituido por D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; M435 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; E436 sustituido por H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; E437 sustituido por H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; R438 sustituido por D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; H439 sustituido por D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; A440 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; K441 sustituido por D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; E442 sustituido por H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; K443 sustituido por D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; I444 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; Q445 sustituido por D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; D446 sustituido por H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; L447 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; L448 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; V449 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; D450 sustituido por H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; S451 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; G452 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; K453 sustituido por D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; F454 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; 1455 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; Y456 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, o C; L457 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; E458 sustituido por H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; D459 sustituido por H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C; G460 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; T461 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; G462 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S463 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; A464 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; V465 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; S466 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; L467 sustituido por D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, o C; y/o E468 sustituido por H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, o C de SEC ID N°1.

Los aminoácidos en la proteína TR4 que son esenciales para la función se pueden identificar mediante procedimientos conocidos en la técnica, tal como mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis de barrido con alanina (Cunningham y Wells, Science 244:1081 (1989)). Este último procedimiento introduce mutaciones sencillas de alanina en cada residuo en la molécula. Las moléculas mutantes resultantes se analizan después para determinar su actividad biológica, tal como la unión al receptor o la actividad proliferativa *in vitro* o *in vivo*. Los sitios cruciales para la unión ligando-receptor también se pueden determinar mediante análisis estructural, tal como cristalización, resonancia magnética nuclear o marcaje de fotoafinidad (Smith y col., J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992) y de Vos y col., Science 255:306-312 (1992)). En ejemplos preferidos, los anticuerpos descritos en el presente documento se unen a regiones de TR4 que son esenciales para la función de TR4. En otros ejemplos preferidos, los anticuerpos descritos en el presente documento se unen a regiones de TR4 que son esenciales para la función de TR4 e inhiben o anulan la función de TR4. En otros ejemplos preferidos, los anticuerpos descritos en el presente documento se unen a regiones de TR4 que son esenciales para la función de TR4 y potencian la función de TR4.

Adicionalmente, se puede usar modificación por ingeniería de proteína para mejorar o alterar las características de los polipéptidos de TR4. Se puede usar la tecnología de ADN recombinante conocida por los expertos en la técnica para crear nuevas proteínas mutantes o "muteínas" que incluyen una o varias sustituciones, deleciones, adiciones de aminoácidos o proteínas de fusión. Dichos polipéptidos modificados pueden mostrar, por ejemplo, una actividad potenciada o una estabilidad incrementada. Además, se pueden purificar en rendimientos mayores y muestran mejor solubilidad que el correspondiente polipéptido natural, al menos en determinadas condiciones de purificación y almacenamiento. Los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden unir a dichos polipéptidos de TR4 modificados.

Se pueden producir variantes de origen no natural de TR4 usando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica, que incluyen, entre otros, mutagénesis mediada por oligonucleótidos, barrido con alanina, mutagénesis con PCR, mutagénesis dirigida a sitio (véase, por ejemplo, Carter y col., Nucl. Acids Res. 13:4331 (1986); y Zoller y col., Naccl. Acids Res. 10:6487 (1982)), mutagénesis por casete (véase, por ejemplo, Wells y col., Gene 34:315 (1985)), mutagénesis con selección por restricción (véase, por ejemplo, Wells y col., Philos. Trans. R. Soc. London SerA 317:415 (1986)).

Por tanto, en el presente documento se describen anticuerpos que se unen a derivados y análogos de TR4 en los que se han delecionado, añadido o sustituido uno o más residuos de aminoácidos para generar polipéptidos de TR4 que son más adecuados para expresión, aumento etc. en las células huésped elegidas. Por ejemplo, los residuos de cisteína se pueden deleccionar o sustituir por otro residuo de aminoácido con el fin de eliminar los puentes disulfuro; los sitios de glucosilación unida a N se pueden alterar o eliminar para conseguir, por ejemplo, expresión de un producto homogéneo que se recupera con más facilidad y se purifica en huéspedes de levaduras que se sabe que hiperglucosilan sitios unidos a N. Con este fin, varias sustituciones de aminoácidos en uno o las dos posiciones de aminoácidos, primera o tercera, en una cualquiera o más de las secuencias de reconocimiento de glucosilación en los polipéptidos de TR4 y/o una deleción de aminoácido en la segunda posición de una cualquiera o más de estas secuencias de reconocimiento evitarán la glucosilación del TR4 en la secuencia del tripéptido modificada (véase, por ejemplo, Miyajimo y col., EMBO J 5(6):1193-1197). Adicionalmente, uno o más de los residuos de aminoácidos de

los polipéptidos de TR4 (p. ej., residuos arginina y lisina) se pueden delecionar o sustituir por otro residuo para eliminar un procesamiento indeseado por proteasas tales como, por ejemplo, furinas o kexinas.

Los anticuerpos descritos en el presente documento también incluyen anticuerpos que se unen a un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, el polipéptido codificado por el ADNc depositado (teniendo el depósito en la ATCC el número de acceso 97853) que incluye la secuencia líder, un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, el polipéptido maduro codificado por el ADNc depositado menos la secuencia líder (es decir, la proteína madura); un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, el polipéptido de SEC ID N° 1 que incluye la secuencia líder; un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, el polipéptido de SEC ID N° 1 menos la metionina en el extremo amino; un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, el polipéptido de SEC ID N° 1 menos la secuencia líder; un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, el dominio extracelular de TR4; un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, el dominio rico en cisteína de TR4; un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, el dominio transmembrana de TR4; un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, el dominio intracelular de TR4; un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, el dominio de muerte de TR4; un polipéptido que comprende, o como alternativa que consiste en, los polipéptidos solubles que comprenden todo o parte de los dominios extracelular e intracelular pero que carecen del dominio transmembrana; así como polipéptidos que tienen una identidad de al menos el 80%, más preferentemente una identidad de al menos el 90% o el 95%, todavía más preferentemente una identidad de al menos el 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con los polipéptidos descritos en lo que antecede (p. ej., el polipéptido codificado por el clon de ADNc depositado (teniendo el depósito en la ATCC el número de acceso 97853), el polipéptido de SEC ID N° 1 y porciones de dichos polipéptidos con al menos 30 aminoácidos y, más preferentemente, al menos 50 aminoácidos.

Por polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un, por ejemplo, 95 % "idéntica" a una secuencia de aminoácidos de referencia de un polipéptido de TR4 se pretende significar que la secuencia de aminoácidos del polipéptido es idéntica a la secuencia de referencia a excepción de que la secuencia polipeptídica puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia del polipéptido de TR4. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 95% idéntica con una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta un 5 % de los residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia se pueden delecionar o sustituir por otro aminoácido o una serie de aminoácidos hasta el 5% de los residuos de aminoácidos totales en la secuencia de referencia se pueden insertar en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia se pueden producir en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier punto entre dichas posiciones terminales entremezcladas individualmente entre los residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

En la práctica, si cualquier polipéptido concreto tiene es al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % or 99 % idéntico a, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°1 o a la secuencia de aminoácidos codificada por los clones de ADNc depositados se puede determinar convencionalmente usando programas informáticos conocidos, como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711. Al usar Bestfit o cualquier otro programa de alineación de secuencias para determinar si una secuencia concreta es, por ejemplo, un 95% idéntica a una secuencia de referencia, los parámetros se fijan, por supuesto, de modo que el porcentaje de identidad se calcule sobre la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia y que se permitan los huecos en la homología de hasta un 5% del número total de residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia.

En un ejemplo específico, la identidad entre una secuencia de referencia (problema) (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeto, también denominado alineación de la secuencia global, se determinar usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag y col., (Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)). Los parámetros preferidos usados en la alineación de aminoácidos FASTDB son: Matriz= PAM 0, k-tuple= 2, penalización por apareamiento erróneo= 1, penalización por unión=20, longitud del grupo de aleatorización= 0, puntuación de corte= 1, tamaño de la ventana= longitud de la secuencia, penalización por espacio=5, penalización por tamaño del espacio = 0,05, tamaño de la ventana= 500 o la longitud de la secuencia de aminoácidos sujeto, lo que sea más corto. De acuerdo con la presente realización, si la secuencia sujeto es más corta que la secuencia problema debido a sus delecciones en los extremos N o C, no por las delecciones internas, se realiza una corrección manual de los resultados para tener en cuenta el hecho de que el programa FASTDB no representa los truncamientos en los extremos N y C de la secuencia sujeto al calcular el porcentaje de identidad global. Para las secuencias sujeto truncadas en los extremos N y C, respecto a la secuencia problema, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de residuos de la secuencia problema que está en los extremos N y C de la secuencia sujeto, que no están apareados/alineados con un residuo sujeto correspondiente, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia problema. Si un residuo está apareado/alineado o no se determina mediante los resultados de la alineación de secuencias FASTDB. Después, este porcentaje se resta del porcentaje de identidad, calculado mediante el programa FASTDB anterior usando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación final del porcentaje de identidad. Esta puntuación final del porcentaje de identidad es lo que se usa para los fines de la esta realización. Solo los residuos en los extremos N y C de la secuencia sujeto que no están apareadas/alineadas con la secuencia problema se consideran para los fines de ajustar manualmente la puntuación del porcentaje de identidad. Es decir, solo las posiciones de los residuos problema fuera de los residuos más lejanos en los extremos N y C de la

5 secuencia sujeto. Por ejemplo, una secuencia sujeto de 90 residuos de aminoácidos se alinea con una secuencia problema de 100 residuos para determinar el porcentaje de identidad. La deleción se produce en el extremo N de la secuencia sujeto y, por tanto, la alineación FASTDB no muestra un apareamiento/alineación de los primeros 10 residuos en el extremo N. Los 10 residuos no apareados representan el 10% de la secuencia (número de residuos en los extremos N y C no apareados/número total de residuos en la secuencia problema) de modo que se resta un 10% de la puntuación del porcentaje de identidad calculado mediante el programa FASTDB. Si los 90 residuos restantes estuvieran perfectamente alineados, el porcentaje final de identidad sería del 90%. En otro ejemplo, una secuencia sujeto de 90 residuos se compara con una secuencia problema de 100 residuos. Esta vez, las deleciones son deleciones internas de modo que no hay residuos en los extremos N o C de la secuencia sujeto que no están apareados/alineados con el problema. En este caso, el porcentaje de identidad calculado mediante FASTDB no se corrige manualmente. De nuevo, solo los residuos en posiciones fuera de los extremos N y C de la secuencia sujeto, como se muestra en la alineación FASTDB, que no están apareados/alineados con la secuencia problema se corrigen de forma manual. Para los fines de esta realización no se van a realizar otras correcciones manuales.

15 La presente solicitud también está dirigida a anticuerpos que se unen a proteínas que contienen polipéptidos idénticos en al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a la secuencia del polipéptido de TR4 expuesta en el presente documento como $n^1\text{-m}^1$ y/o $n^2\text{-m}^2$. En realizaciones preferidas, la solicitud está dirigida a anticuerpos que se unen a proteínas que contienen polipéptidos idénticos en al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a los polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de las deleciones específicas en los extremos N y C de TR4 citadas en el presente documento.

20 En ciertos ejemplos preferidos, los anticuerpos descritos en el presente documento se unen a las proteínas de fusión de TR4 como se ha descrito en lo que antecede, en los que la porción de TR4 de la proteína de fusión son las descritas como $n^1\text{-m}^1$ y/o $n^2\text{-m}^2$ en el presente documento.

Los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden unir a los polipéptidos del receptor de TRAIL modificados

25 Se contempla específicamente que los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden unir a formas modificadas de las proteínas TR4 (SEC ID N°1).

30 En ejemplos específicos, los anticuerpos descritos en el presente documento se unen a polipéptidos de TR4 (como los descritos en lo que antecede), incluidos, entre otros, polipéptidos de TR4 purificados de forma natural, polipéptidos de TR4 producidos mediante procedimientos sintéticos químicos y polipéptidos de TR4 producidos mediante técnicas recombinantes en un huésped procarionta o eucariota, incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, de levaduras, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos usando, por ejemplo, las composiciones y procedimientos recombinantes descritos en lo que antecede. Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos pueden estar glicosilados o no glicosilados. Además, los polipéptidos de TR3 pueden incluir también un residuo de metionina inicial modificado, en algunos como resultado de procedimientos mediados por el huésped.

35 Además, las proteínas TR4 que están unidas por los anticuerpos descritos en el presente documento pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en la materia (p. ej., véase Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., N.Y. (1983), y Hunkapiller, y col., Nature 310:105-111 (1984)). Por ejemplo, un péptido correspondiente a un fragmento de un polipéptido de TR4 se puede sintetizar mediante el uso de un sintetizador peptídico. Además, si se desea, se pueden introducir aminoácidos no clásicos o análogos de aminoácidos químicos como una sustitución o adición en la secuencia polipeptídica de TR4. Aminoácidos no clásicos incluyen, entre otros, los isómeros D de los aminoácidos comunes ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α -amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-aminobutírico, g-Abu, e-Ahx, ácido 6-amino hexanoico, Aib, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos diseñados tales como β -metil aminoácidos, α -metilaminoácidos, $N\alpha$ -metilaminoácidos y análogos de aminoácidos en general. Además, el aminoácido puede ser D (dextrorrotatorio) o L (levorrotatorio).

40 En el presente documento también se describen anticuerpos que se unen a polipéptidos de TR4 que se modifican de forma diferencial durante o después de la traducción mediante, por ejemplo, entre otros, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivación mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a una molécula de anticuerpo o a otro ligando celular etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, incluidas, entre otras, escisión química específica mediante bromuro de cianógeno, tripsina, quimotripsina, papaína, proteasa V8, NaBH_4 , acetilación, formilación, oxidación, reducción, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina etc.

55 Modificaciones postraduccionales adicionales de los polipéptidos de TR4, por ejemplo, cadenas de hidratos de carbono unidas a O o unidas a N, procesamiento de los extremos en N-terminal o en C-terminal), unión de restos químicos a la estructura de aminoácidos, modificaciones químicas de las cadenas de hidratos de carbono unidas a O o unidas a N, y adición o deleción de un residuo de metionina en el extremo N como resultado de la expresión en

células huésped procariotas. Los polipéptidos también se pueden modificar con un marcador detectable, tal como un marcador enzimático, fluorescente, isotópico o de afinidad, para permitir la detección y el aislamiento de la proteína.

En el presente documento también se describen anticuerpos que se unen a derivados modificados químicamente de los polipéptidos de TR4 que pueden proporcionar ventajas adicionales, tales como un incremento de la solubilidad, la estabilidad y el tiempo en circulación del polipéptido o una disminución de la inmunogenicidad (véase la patente de EE.UU. nº 4.179.337). Los restos químicos para la derivación se pueden seleccionar a partir de polímeros hidrosolubles tales como polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico y similares. Los polipéptidos se pueden modificar en posiciones aleatorias dentro de la molécula o en posiciones predeterminadas dentro de la molécula y pueden incluir uno, dos, tres o más restos químicos unidos.

El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. Para el polietilenglicol, el peso molecular preferido está entre 1 kDa y aproximadamente 100 kDa (el término "aproximadamente" indica que en las preparaciones de polietilenglicol, algunas moléculas pesarán más, algunas menos, que el peso molecular indicado) para facilitar la manipulación y la fabricación. Se pueden usar otros tamaños en función del perfil terapéutico deseado (p. ej., la duración de la liberación sostenida deseada, los efectos, si existe alguno, sobre la actividad biológica, la facilidad de la manipulación, el grado o la falta de antigeneicidad y otros efectos conocidos del polietilenglicol sobre una proteína terapéutica o análogo). Por ejemplo, el polietilenglicol puede tener un peso molecular promedio de aproximadamente 200, 500, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 5.500, 6.000, 6.500, 7.000, 7.500, 8.000, 8.500, 9.000, 9.500, 10.000, 10.500, 11.000, 11.500, 12.000, 12.500, 13.000, 13.500, 14.000, 14.500, 15.000, 15.500, 16.000, 16.500, 17.000, 17.500, 18.000, 18.500, 19.000, 19.500, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 50.000, 55.000, 60.000, 65.000, 70.000, 75.000, 80.000, 85.000, 90.000, 95.000 o 100.000 kDa.

Como se ha indicado en lo que antecede, el polietilenglicol puede tener una estructura ramificada. Los polietilenglicoles ramificados se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 5.643.575; Morpurgo y col., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56:59-72 (1996); Vorobjev y col., *Nucleosides Nucleotides* 18:2745-2750 (1999); y Caliceti y col., *Bioconjug. Chem.* 10:638-646 (1999).

Las moléculas de polietilenglicol (u otros restos químicos) deberán unirse a la proteína teniendo en cuenta los efectos sobre dominios funcionales o antigénicos de la proteína. Los expertos en la técnica disponen de una serie de procedimientos de unión, por ejemplo el documento EP 0 401 384 (acoplamiento de PEG a G-CSF), véase también Malik y col., *Exp. Hematol.* 20:1028-1035 (1992) (que indican pegilación de GM-CSF usando cloruro de tresilo). Por ejemplo, el polietilenglicol puede unirse de forma covalente mediante residuos de aminoácidos a través de un grupo reactivo, tal como un grupo amino o carboxilo libre. Los grupos reactivos son aquéllos a los que se puede unir una molécula de polietilenglicol activado. Los residuos de aminoácidos que tienen un grupo amino libre pueden incluir residuos de lisina y los residuos de aminoácidos en el extremo N; los que tienen un grupo carboxilo libre pueden incluir residuos de ácido aspártico, residuos de ácido glutámico y el residuo de aminoácido en el extremo C. También se pueden usar grupos sulfhidrilo como grupo reactivo para unir las moléculas de polietilenglicol. Para fines terapéuticos se prefiere la unión en un grupo amino, tal como la unión en el extremo N o el grupo de lisina.

Como se ha sugerido anteriormente, el polietilenglicol se puede unir a las proteínas mediante unión a cualquiera de una serie de residuos de aminoácidos. Por ejemplo, el polietilenglicol se puede unir a proteínas mediante enlaces covalentes a residuos de lisina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico o cisteína. Se pueden usar una o más sustancias químicas de reacción para unir el polietilenglicol a residuos de aminoácidos específicos (p. ej., lisina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico o cisteína) de la proteína o a más de un tipo de residuo de aminoácido (p. ej., lisina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína y combinaciones de los mismos) de la proteína.

Se pueden desear específicamente proteínas modificadas químicamente en el extremo N. Usando polietilenglicol como ilustración de la presente composición, se puede seleccionar a partir de diversas moléculas de polietilenglicol (por peso molecular, ramificación, etc.), la proporción entre moléculas de polietilenglicol y moléculas de proteína (o péptido) en la mezcla de reacción, el tipo de reacción de pegilación que se va a realizar y el procedimiento para obtener la proteína pegilada en el extremo N seleccionada. El procedimiento de obtención de la preparación pegilada en el extremo N (es decir, separar este resto de otros restos monopegilados en caso necesario) se puede realizar mediante purificación del material pegilado en el extremo N de una población de moléculas proteicas pegiladas. Determinadas proteínas modificadas químicamente en la modificación en el extremo N se pueden conseguir mediante alquilación reductora que explota la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios (lisina frente al extremo N) disponible para derivar en una proteína concreta. En las condiciones de reacción adecuadas se consigue una derivación sustancialmente selectiva de la proteína en el extremo N con un polímero que contiene un grupo carbonilo.

Como se ha indicado anteriormente, la pegilación de las proteínas se puede conseguir por un número cualquiera de medios. Por ejemplo, el polietilenglicol se puede unir a la proteína bien directamente o mediante un ligador intermedio. En Delgado y col., *Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys.* 9:249-304 (1992); Francis y col., *Intern. J. of Hematol.* 68:1-18 (1998); patente de EE.UU. nº 4.002.531; patente de EE.UU. nº 5.349.052; el documento WO 95/06058 y el documento WO 98/32466 se describen sistemas sin ligadores para unir el polietilenglicol a las proteínas.

Un sistema para unir el polietilenglicol directamente a los residuos de aminoácidos de las proteínas sin un ligador intermedio usa MPEG tresilado, que se produce mediante la modificación de monometoxi polietilenglicol (MPEG) usando cloruro de tresilo ($\text{CISO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$). Tras la reacción de la proteína con MPEG tresilado, el polietilenglicol está directamente unido a los grupos amina de la proteína. Por tanto, en el presente documento se describen conjugados de proteína-polietilenglicol producidos mediante la reacción de las proteínas de la invención con una molécula de polietilenglicol que tiene un grupo 2,2,2-trifluoroetano sulfonilo.

El polietilenglicol también se puede unir a proteínas usando una serie de diferentes ligadores intermedios. Por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.612.460 divulga ligadores de uretano para conectar el polietilenglicol a las proteínas. Los conjugados de proteína-polietilenglicol en los que el polietilenglicol está unido a la proteína mediante un ligador también se pueden producir mediante reacción de las proteínas con compuestos tales como MPEG-succinimidilsuccinato, MPEG activado con 1,1'-carbonildiimidazol, MPEG-2,4,5-triclorofenilcarbonato, MPEG-p-nitrofenolcarbonato y varios derivados de MPEG-succinato. Una serie de derivados de polietilenglicol adicionales y sustancias químicas de reacción para unir el polietilenglicol a las proteínas se describen en el documento WO 98/32466. Los productos proteicos pegilados producidos usando las sustancias químicas de reacción indicadas en el presente documento se incluyen en el alcance de la invención.

El número de restos de polietilenglicol unidos a cada polipéptido de TR4 (es decir, el grado de sustitución) también puede variar. Por ejemplo, las proteínas pegiladas de la invención pueden unirse, de media, a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, o más moléculas de polietilenglicol. De un modo similar, el grado promedio de sustitución dentro de intervalos tales como 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19 o 18-20 restos de polietilenglicol por molécula de proteína. En, por ejemplo, Delgado y col., Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys. 9:249-304 (1992) se tratan procedimientos para determinar el grado de sustitución.

Como se ha mencionado, los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden unir a polipéptidos de TR4 que se han modificado mediante procedimientos naturales, tal como procesamiento postraduccional, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o en grados variables en varios sitios en un polipéptido de TR4 dado. Los polipéptidos de TR4 pueden estar ramificados como resultado de, por ejemplo, ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos de TR4 cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden ser el resultado de procesos naturales postraducionales o pueden fabricarse mediante procedimientos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado nucleotídico, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de puentes disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación gamma, glicosilación, formación de anclajes GPI, hidroxilación, yodinación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas, tales como arginilación y ubiquitinación. (Véase, por ejemplo, PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pág. 1-12 (1983); Seifter y col., Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990); Rattan y col., Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:48-62 (1992)).

Anticuerpos anti-TR4

En el presente documento se describen anticuerpos (p. ej., anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras unidas mediante puentes disulfuro) que se unen inmunoespecíficamente a TR4 (SEC ID N°1) o a fragmentos o variantes del mismo, en los que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera son las mismas que la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada y de una cadena ligera expresadas por uno o más scFv o líneas celulares indicadas en la Tabla 1. En el presente documento también se describen anticuerpos (cada uno compuesto por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras unidas por puentes disulfuro para formar un anticuerpo) que se unen inmunoespecíficamente a TR4 o a fragmentos o variantes del mismo, en los que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada o la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera son las mismas que la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada o de una cadena ligera expresadas por uno o más scFv o líneas celulares indicadas en la Tabla 1. La unión inmunoespecífica a los polipéptidos de TR4 puede determinarse mediante inmunoensayos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento para analizar la unión específica anticuerpo-antígeno. Las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos o variantes de estos anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a TR4 también entran dentro de la invención, así como las moléculas de ácido nucleico que codifican estas moléculas de anticuerpos, fragmentos y/o variantes (p. ej., SEC ID N° 54-65).

En el presente documento también se describen anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a un TR4 o a un fragmento o variante del mismo, comprenden un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las cadenas pesadas expresadas por al menos uno de los scFv o líneas celulares indicadas en la Tabla 1 y/o una cualquiera de las cadenas ligeras expresadas por al menos uno de los scFv o líneas celulares indicadas en la Tabla 1.

En una realización de la presente invención, los anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a un TR4 o a un fragmento o variante del mismo, comprenden (a) la secuencia de aminoácidos del dominio VH de SEC ID N° 43 o la secuencia de aminoácidos del dominio VH expresada por el hibridoma del depósito en la ATCC N° PTA-3570 y (b) la secuencia de aminoácidos del dominio VL de SEC ID N° 43 o la secuencia de aminoácidos del dominio VL expresada por el hibridoma del depósito en la ATCC N° PTA-3570. También se describen en el presente documento anticuerpos que comprenden la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los scFv indicados en la Tabla 1; la secuencia de aminoácidos de un dominio VH y un dominio VL de un scFv sencillo indicado en la Tabla 1; y la secuencia de aminoácidos de un dominio VH y un dominio VL de diferentes scFv indicados en la Tabla 1. Las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos o variantes de anticuerpos de los dominios VH y/o VL de al menos uno de los scFv indicados en la Tabla 1 que se unen inmunoespecíficamente a un TR4 también se describen en el presente documento, así como las moléculas de ácido nucleico que codifican estos dominios VH y VL, moléculas, fragmentos y/o variantes.

La presente invención también proporciona anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a TR4, en los que dichos anticuerpos comprenden, o como alternativa consisten en, (a) la secuencia de aminoácidos de las 3 CDR de VH de SEC ID N° 43 o la secuencia de aminoácidos de las 3 CDR de VH expresadas por el hibridoma del depósito en la ATCC N° PTA-3570 y (b) la secuencia de aminoácidos de las 3 CDR de VL de SEC ID N° 43 o la secuencia de aminoácidos de las 3 CDR de VL expresadas por el hibridoma del depósito en la ATCC N° PTA-3570. También se describen en el presente documento anticuerpos que comprenden o que consisten en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de uno, dos, tres o más de las CDR de VH contenidas en un dominio VH de uno o más scFv indicados en la Tabla 1. En particular, en el presente documento se describen anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a un receptor de TRAIL, que comprende, o como alternativa que consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH contenida en un dominio VH de uno o más scFv indicados en la Tabla 1. En otro ejemplo, los anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a TR4 comprenden, o como alternativa consisten en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR2 de VH contenida en un dominio VH de uno o más scFv indicados en la Tabla 1. En un ejemplo preferido, los anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a TR4 comprenden, o como alternativa consisten en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VH contenida en un dominio VH de uno o más scFv indicados en la Tabla 1. En el presente documento también se describen moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, estos anticuerpos, o fragmentos o variantes de anticuerpo de los mismos, que se unen inmunoespecíficamente a TR4 o a un fragmento de TR4 o variante del mismo, así como moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos, moléculas, fragmentos y/o variantes (p. ej., SEC ID N° 54-65).

En el presente documento también se describen anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a un polipéptido, o fragmento polipeptídico o variante de TR4, en los que dichos anticuerpos comprenden, o como alternativa consisten en, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de las 3 CDR de VL contenidas en un dominio VL de uno o más scFv indicados en la Tabla 1. En particular, en el presente documento se describen anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a TR4, que comprenden, o como alternativa que consisten en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL contenida en un dominio VL de uno o más scFv indicados en la Tabla 1. En otro ejemplo, los anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a TR4 comprenden, o como alternativa consisten en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR2 de VL contenida en un dominio VL de uno o más scFv indicados en la Tabla 1. En un ejemplo preferido, los anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a TR4 comprenden, o como alternativa consisten en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VL contenida en un dominio VL de uno o más scFv indicados en la Tabla 1. En el presente documento también se describen moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, estos anticuerpos, o fragmentos o variantes de anticuerpo de los mismos, que se unen inmunoespecíficamente a TR4 o a un fragmento de TR4 o variante del mismo, así como moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos, moléculas, fragmentos y/o variantes (p. ej., SEC ID N° 54-65).

En el presente documento también se describen anticuerpos (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos o variantes de anticuerpo) que se unen inmunoespecíficamente a un polipéptido de TR4 o a un fragmento o variante de TR4, en los que dichos anticuerpos comprenden o, como alternativa consisten en, uno, dos, tres o más CDR de VH y uno, dos, tres o más CDR de VL, como están contenidas en un dominio VH o dominio VL de uno o más scFv indicados en la Tabla 1. En particular, en el presente documento se describen anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a un polipéptido o fragmento polipeptídico o variante de TR4, en el que dichos anticuerpos comprenden, o como alternativa consisten en, una CDR1 de VH y una CDR1 de VL, una CDR1 de VH y una CDR2 de VL, a una CDR1 de VH y una CDR3 de VL, una CDR2 de VH una CDR1 de VL, una CDR2 de VH y una CDR2 de VL, una CDR2 de VH y una CDR3 de VL, una CDR3 de VH y una CDR1 de VH, una CDR3 de VH y una CDR2 de VL, una CDR3 de VH y una CDR3 de VL, o cualquier combinación de los mismos, de las CDR de CH y las CDR de VL contenidas en un dominio VH o un dominio VL de uno o más scFv indicados en la Tabla 1. En un ejemplo preferido, una o más de estas combinaciones proceden del mismo scFv que se divulga en la Tabla 1. En el presente documento también se describen moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos o variantes de estos anticuerpos, que se unen inmunoespecíficamente a TR4, así como moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos, moléculas, fragmentos o variantes (p. ej., SEC ID N° 54-65).

Moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-TR4

La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico, generalmente aisladas, que codifican un anticuerpo de la invención (incluidas moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo de las mismas). En una realización específica, las moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo de la invención comprenden, o como alternativa consisten en, la SEC ID N° 55 o un fragmento de la misma.

En el presente documento se describe una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo (incluidas moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo o variantes de los mismos), que comprende, o como alternativa que consiste en, un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los dominios VH de al menos uno de los scFv indicados en la Tabla 1 y un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de un dominio VL de al menos uno de los scFv indicados en la Tabla 1. En otro ejemplo, una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento codifica un anticuerpo (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos o variantes de los mismos), que comprende, o como alternativa que consiste en, un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los dominios VH de al menos uno de los scFv indicados en la Tabla 1 o un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de un dominio VL de al menos uno de los scFv indicados en la Tabla 1.

En el presente documento también se describen anticuerpos que comprenden, o como alternativa que consisten en, variantes (incluidos derivados) de las moléculas de anticuerpos (p. ej., los dominios VH y/o los dominios VL) descritas en el presente documento, anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a TR4 o a un fragmento o variante del mismo. Las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica se pueden usar para introducir mutaciones en la secuencia nucleotídica que codifica una molécula de la invención, incluidas mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR, que tienen como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, las variantes (incluyendo los derivados) codifican menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos, o menos de 2 sustituciones de aminoácidos respecto al dominio VH, a la CDR1 de VH, a la CDR2 de VH, a la CDR3 de VH, al dominio VL, a la CDR1 de VL, a la CDR2 de VL o a la CDR3 de VL de referencia. Una "sustitución conservadora de aminoácido" es una en la que el residuo de aminoácido está sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Como alternativa, se pueden introducir mutaciones aleatorias a lo largo de toda o parte de la secuencia codificadora, tal como mediante mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes se pueden someter a detección selectiva según la actividad biológica para identificar mutantes que conserven actividad (p. ej., la capacidad para unirse a TR4).

Por ejemplo, es posible introducir mutaciones únicamente en las regiones estructurales o únicamente en las regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser silenciosas o mutaciones neutras de sentido erróneo, es decir que tienen ninguno, o poco efecto, sobre la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codones o mejorar la producción de anticuerpos de un hibridoma. Como alternativa, las mutaciones no neutras de sentido erróneo pueden alterar la capacidad de un anticuerpo para unirse a un antígeno. Es probable que la localización de la mayoría de las mutaciones silenciosas o neutras de sentido erróneo sea en las regiones estructurales, mientras que es probable la localización de la mayoría de las mutaciones no neutras de sentido erróneo sea en las CDR, aunque esto no es un requisito absoluto. Un experto en la técnica sería capaz de diseñar y analizar moléculas mutantes con propiedades deseadas, tales como la ausencia de alteración de la actividad de unión a antígeno o la alteración en la actividad de unión (p. ej., mejoras en la actividad de unión al antígeno o cambios en la especificidad del anticuerpo). Tras la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de forma rutinaria y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada (p. ej., la capacidad para unirse inmuno-específicamente a TR4) se puede determinar usando las técnicas descritas en el presente documento o modificando de forma rutinaria las técnicas conocidas en la materia.

En el presente documento también se describe un anticuerpo (incluyendo una molécula que comprende, o como alternativa que consiste en, un fragmento de anticuerpo o variante del mismo) que se une inmuno-específicamente a TR4 o a un fragmento o variante del mismo, comprende, o como alternativa consiste en, una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida con una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la que codifica uno de los dominios VH o VL de uno o más scFv indicados en la Tabla 1 en condiciones rigurosas, por ejemplo hibridación con el ADN unido al filtro en 6X cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45°C seguida de uno o más lavados en 0,2 x SSC/0,1% de SDS a aproximadamente 50-65°C, en condiciones altamente rigurosas, por ejemplo hibridación con el ácido nucleico unido al filtro en 6x SSC a

aproximadamente 45°C seguida de uno o más lavados en 0,1x SSC/0,2% de SDS a aproximadamente 68 °C o en otras condiciones rigurosas de hibridación que son conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. y col., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., New York en las páginas 6.3.1 - 6.3.6 y 2.10.3). Las moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos también se describen en el presente documento.

En la técnica se conoce bien que los polipéptidos, o fragmentos o variantes de los mismos, con secuencias de aminoácidos similares a menudo tienen una estructura similar y muchas de las mismas actividades biológicas. Por tanto, en un ejemplo, un anticuerpo (incluida una molécula que comprende, o como alternativa que consiste en, un fragmento de anticuerpo o variante del mismo) que se une inmunoespecíficamente a TR4 o a fragmentos o variantes de TR4, comprende, o como alternativa consiste en, un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de al menos un scFv indicado en la Tabla 1.

En otro ejemplo, un anticuerpo (incluida una molécula que comprende, o como alternativa que consiste en, un fragmento de anticuerpo o variante del mismo) que se une inmunoespecíficamente a TR4 o a un fragmento o variante de TR4, comprende, o como alternativa consiste en, un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, or al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de un dominio VL de al menos un scFv indicado en la Tabla 1.

Procedimientos de producción de anticuerpos

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se preparan, preferentemente, mediante el uso de una biblioteca de expresión de scFv en fagos. Las tecnologías usadas para alcanzar este resultado se divulgan en las patentes, solicitudes y referencias divulgadas en el presente documento.

En los procedimientos de expresión en fagos, los dominios de anticuerpo funcional se expresan sobre la superficie de las partículas del fago que portan las secuencias polinucleotídicas que los codifican. En particular, las secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL se amplifican a partir de bibliotecas de ADNc de animales (p. ej., bibliotecas de ADNc de tejidos linfoides de ser humano o murino) o bibliotecas de ADNc sintético. Los ADN que codifican los dominios VH y VL se unen a través de un ligador de scFv mediante PCR y se clonan en un vector fagemido (p. ej., p CANTAB 6 o pComb 3 HSS). El vector se somete a electroporación en *E. coli* y *E. coli* se infecta con el fago colaborador. El fago usado en estos procedimientos es, normalmente, un fago filamentoso, incluidos fd y M13, y los dominios VH y VL están, normalmente, condensados de forma recombinante con el gen III o el gen VIII del fago. Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno de interés (es decir un polipéptido del receptor de TRAIL o un fragmento del mismo) se pueden seleccionar o identificar con el antígeno, por ejemplo usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado por una superficie sólida o esfera. Ejemplos de procedimientos de expresión en fagos que se pueden usar para fabricar los anticuerpos de la presente invención incluyen, entre otros, los divulgados en Brinkman y col., 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames y col., 1995, J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough y col., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic y col., Gene 187 9-18 (1997); Burton y col., Advances in Immunology 57:191-280(1994); la solicitud de PCT N° PCT/GB91/O1 134; las publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18719; WO 93/1 1236; WO 95/15982; WO 95/20401; WO97/13844; y las patentes de EE.UU. N° 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.717; 5.780.225; 5.658.727; 5.735.743 y 5.969.108.

Para algunos usos, tales como para la maduración por afinidad *in vitro* de un anticuerpo de la invención, puede ser útil para expresar los dominios VH y VL de uno o más scFv indicados en la Tabla 1 como anticuerpos monocatenarios o fragmentos Fab en una biblioteca de expresión en fagos. Por ejemplo, los ADNc que codifican los dominios VH y VL de los scFv indicados en la Tabla 1 se pueden expresar en todas las combinaciones posibles usando una biblioteca de expresión en fagos, lo que permite la selección de combinaciones VH/VL que se unen a polipéptidos de TR4 con características de unión preferidas tales como afinidad mejorada o mejores velocidades de disociación. Adicionalmente, en concreto, los segmentos VH y VL, las regiones CDR de los dominios VH y VL de los scFv indicados en la Tabla 1 se pueden mutar *in vitro*. La expresión de los dominios VH y VL con CDR "mutantes" en una biblioteca de expresión en fagos permite la selección de combinaciones de VH/VL que se unen a polipéptidos de TR4 con características de unión preferidas, tales como afinidad mejorada o mejores velocidades de disociación.

Procedimientos adicionales de producción de anticuerpos

Los anticuerpos de la invención (incluidos fragmentos de anticuerpos) se pueden producir por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, se apreciará que los anticuerpos de acuerdo con la presente invención se pueden expresar en líneas celulares distintas a las líneas celulares de hibridoma. Las secuencias que codifican los ADNc o clones genómicos para los anticuerpos concretos se pueden usar para transformar células

huésped adecuadas de mamífero o no de mamífero o para generar bibliotecas de expresión en fagos, por ejemplo. Adicionalmente, los anticuerpos polipeptídicos de la invención se pueden sintetizar químicamente o producir mediante el uso de sistemas de expresión recombinantes.

5 Un modo de producir los anticuerpos de la invención sería clonar los dominios VH y/o VL de los scFv indicados en la Tabla 1. Con el fin de aislar los dominios VH y VL de bacterias transfectadas con un vector que contiene los scFv, se pueden usar cebadores para PCR complementarios de las secuencias de nucleótidos de H o VL (véase el Ejemplo 5) para amplificar las secuencias de VH y VL. Después, los productos de PCR se pueden clonar usando vectores que tienen, por ejemplo, un sitio de clonación para el producto de la PCR que consiste en un saliente nucleotídico de T sencillo en 5' y 3' que es complementario al nucleótido adenina sencillo saliente añadido sobre los extremos 5' y 3' de los productos de PCR mediante muchas ADN polimerasa' usadas para las reacciones de PCR. Después, los dominios VH y VL se pueden secuenciar usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Como alternativa, los dominios VH y VL se pueden amplificar usando cebadores específicos del vector diseñados para amplificar todo el scFv (es decir, el dominio VH, el ligador y el dominio VL).

15 Los genes de VH o VL clonados se pueden introducir en uno o más vectores de expresión adecuados. A modo de ejemplo no limitante, se pueden usar cebadores de PCR, incluidas las secuencias nucleotídicas de VH o VL, un sitio de restricción y una secuencia flanqueante para proteger el sitio de restricción, para amplificar las secuencias de VH o VL. Usando técnicas de clonación conocidas para los expertos en la técnica, los dominios VH amplificados por PCR se pueden clonar en vectores que expresan la región constante de la inmunoglobulina, por ejemplo, la región constante de la IgG1 o la IgG4 humana para los dominios VH y las regiones constantes kappa o lambda humanas para los dominios VL kappa y lambda, respectivamente. Preferentemente, los vectores para expresar los dominios VH o VL comprenden un promotor adecuado para dirigir la expresión de las cadenas pesada y ligera en el sistema de expresión elegido, una señal de secreción, un sitio de clonación para el dominio variable de la inmunoglobulina, los dominios constantes de la inmunoglobulina y un marcador de selección, tal como, neomicina. Los dominios VH y VL también se pueden clonar en un único vector que exprese las regiones constantes necesarias. Después, los vectores de conversión de la cadena pesada y los vectores de conversión de la cadena ligera se co-transfectan en líneas celulares para generar líneas celulares estables o transitorias que expresen anticuerpos de longitud completa, por ejemplo IgG, usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Guo y col., J. Clin. Endocrinol. Metab. 82:925-31 (1997), y Ames y col., J. Immunol. Methods 184:177-86 (1995)).

30 La invención proporciona polinucleótidos que comprenden, o como alternativa que consisten en, una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de la invención (incluidas moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos del mismo). En el presente documento también se describen polinucleótidos que hibridan en condiciones de hibridación de rigurosidad alta, o como alternativa de rigurosidad intermedia o menor, por ejemplo como se ha definido anteriormente, con los polinucleótidos complementarios de los ácidos nucleicos que tienen una secuencia polinucleotídica que codifica un anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo.

35 Se pueden obtener los polinucleótidos y determinar la secuencia nucleotídica de los polinucleótidos por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Si se conocen las secuencias de aminoácidos de los dominios VH, dominios VL y CDR de los mismos, las secuencias nucleotídicas que codifican estos anticuerpos se pueden determinar usando procedimientos bien conocidos en la técnica, es decir los codones de nucleótidos que se sabe que codifican aminoácidos concretos se ensamblan de tal modo que generan un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o de la invención. Dicho polinucleótido que codifica el anticuerpo se puede ensamblar a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (p. ej., como se ha descrito en Kutmeier y col., 1994, BioTechniques 17:242 (1994)), que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, la hibridación y la unión de dichos oligonucleótidos y, después, la amplificación de los oligonucleótidos ligados mediante PCR.

45 Como alternativa, un polinucleótido que codifica un anticuerpo (incluidas moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo de las mismas) se puede generar a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada. Si no se dispone de un clon que contenga un ácido nucleico que codifica un anticuerpo concreto, pero se conoce la secuencia de la molécula del anticuerpo, un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina puede sintetizarse químicamente u obtenerse a partir de una fuente adecuada (p. ej., una biblioteca de ADNc de anticuerpos o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o un ácido nucleico, preferentemente ARN poliA+, aislado de, cualquier tejido o célula que exprese el anticuerpo, tales como células de hibridoma o líneas de linfocitos B transformadas con el virus de Epstein Barr que expresan un anticuerpo de la invención) mediante amplificación por PCR usando cebadores sintéticos que pueden hibridar con los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación usando una sonda oligonucleotídica específica de la secuencia génica concreta para identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. A continuación, los ácidos nucleicos amplificados generados mediante PCR se pueden clonar en vectores de clonación replicables usando cualquier procedimiento bien conocido en la técnica.

60 Una vez que se determina la secuencia de nucleótidos del anticuerpo (incluidas moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo de las mismas), la secuencia de nucleótidos del anticuerpo se puede manipular usando procedimientos bien conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida, PCR etc. (véase, por ejemplo, las

técnicas descritas en Sambrook y col., 1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY y Ausubel y col., eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo para crear sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

5 En un ejemplo específico, los dominios de VH y VL de uno o más scFV indicados en la Tabla 1, o fragmentos o variantes de los mismos, se insertan dentro de regiones estructurales usando técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia. En un ejemplo específico, se insertan uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de las CDR de los dominios VH y/o VL de uno o más scFV indicados en la Tabla 1, o fragmentos o variantes de los mismos, dentro de las regiones estructurales usando técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia. Las regiones
10 estructurales pueden ser de origen natural o regiones estructurales consenso y, preferentemente, regiones estructurales humanas (véase, por ejemplo, en Chothia y col. *J. Mol. Biol.* 278: 457-479 (1998) un listado de las regiones estructurales y las CDR codifican un anticuerpo (incluidas moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo o variantes de los mismos) que se une específicamente a un receptor de TRAIL. Preferentemente, como se ha tratado anteriormente, se pueden fabricar polinucleótidos que codifican
15 variantes de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos dentro de las regiones estructurales y, preferentemente, las sustituciones de aminoácidos no alteran significativamente la unión del anticuerpo a su antígeno. Adicionalmente, dichos procedimientos se pueden usar para realizar sustituciones o deleciones de aminoácidos de una o más residuos de cisteína en la región variable que participan en un enlace disulfuro intracatenario para generar moléculas de anticuerpo, o fragmentos o variantes de anticuerpo, que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracatenarios. La presente invención abarca otras alteraciones en el polinucleótido y están dentro de la experiencia de la técnica.

La capacidad para clonar y reconstruir loci humanos de tamaño de megabases en YACS y para introducirlos en la línea germinal de ratón proporciona un potente enfoque para deducir los componentes funcionales de los loci muy
25 muy grandes o mapeados en bruto, así como generar modelos útiles de enfermedad humana. Además, la utilización de esta tecnología para sustituir los loci de ratón con sus equivalentes humanos podría proporcionar información única sobre la expresión y regulación de productos génicos humanos durante el desarrollo, su comunicación con otros sistemas, y su implicación en la inducción y progresión de la enfermedad.

Una aplicación práctica importante de dicha estrategia es la "humanización" del sistema inmunitario humoral de ratón. La introducción de loci de inmunoglobulina (Ig) humana en ratones en los que los genes de la Ig endógena se han inactivado ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos subyacentes a la expresión programada y el ensamblaje de los anticuerpos, así como su papel en el desarrollo de los linfocitos B. Además, dicha estrategia podría proporcionar una fuente ideal para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (AcMo), un importante hito hacia el cumplimiento de la promesa del tratamiento con anticuerpos en la enfermedad humana.

35 Cabe esperar que los anticuerpos completamente humanos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas a los anticuerpos monoclonales de ratón o derivados de ratón y, por tanto, que incrementen la eficacia y la seguridad de los anticuerpos administrados. Cabe esperar que el uso de anticuerpos completamente humanos proporcione una ventaja sustancial en el tratamiento de enfermedades humanas crónicas y recurrentes, tales como cáncer, que requieren administraciones repetidas de anticuerpos.

40 Un enfoque hacia este objetivo era modificar mediante ingeniería cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con fragmentos grandes de los loci de Ig humana previendo que dichos ratones producen un gran repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Los fragmentos grandes de Ig humana podrían conservar la gran diversidad génica variable, así como la regulación adecuada de producción y expresión de anticuerpos. Explotando la maquinaria del ratón para diversificar y seleccionar anticuerpos y la falta de tolerancia inmunológica a proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducidos en estas cepas de ratón debería dar anticuerpos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluidos antígenos humanos.
45 Usando la tecnología del hibridoma, se podrían producir y seleccionar anticuerpos monoclonales humanos específicos de antígeno con la especificidad deseada.

Esta estrategia general se demostró en relación con la generación de las primeras cepas Xenomouse™ como se publicó en 1994. Véase Green y col., *Nature Genetics* 7:13-21 (1994). Las cepas Xenomouse™ se modificaron mediante ingeniería con los cromosomas artificiales de levadura (YACS) que contienen fragmentos de configuración de la línea germinal de 245 y 10 190 kb del locus de la cadena pesada humana y del locus de la cadena ligera kappa, respectivamente, que contenían secuencias centrales de las regiones variable y constante. Id. Se demostró que los YAC que contenían Ig humana eran compatibles con el sistema de ratón para el reordenamiento y expresión de anticuerpos y eran capaces de sustituir los genes de Ig de ratón inactivados. Esto se demostró mediante su capacidad para inducir desarrollo de linfocitos B, para producir un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos completamente humanos y para generar anticuerpos monoclonales humanos específicos de antígeno. Estos resultados también sugirieron que la introducción de porciones más grandes de los loci de Ig humana que contenían un número mayor de genes V, elementos reguladores adicionales y regiones constantes de Ig humana podrían
55 recapitular sustancialmente el repertorio completo que es característico de la respuesta humoral humana a la infección y a la inmunización. Recientemente se ha extendido el trabajo de Green y col. a la introducción de más de
60

aproximadamente el 80% del repertorio de anticuerpos humanos mediante la introducción de fragmentos de YAC de configuración de línea germinal de tamaño en megabases de los loci de la cadena pesada humana y los loci de la cadena ligera, respectivamente, para producir ratones Xenomouse™. Véase Méndez y col. Nature Genetics 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits J Exp. Med. 188:483-495 (1998), Green, Journal of Immunological Methods 231:11-23 (1999) y la solicitud de patente de EE.UU. con número de serie 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996.

Dicho enfoque se trata y delinea adicionalmente en las solicitudes de patente de EE.UU. con N° de serie 07/466.008, presentada el 12 de enero de 1990, 07/710,515, presentada el 8 de noviembre de 1990, 07/919,297, presentada el 24 de julio de 1992, 07/922,649, presentada el 30 de julio de 1992, 08/031,801, presentada el 15 de marzo de 1993, 08/112,848, presentada el 27 de agosto de 1993, 08/234,145, presentada el 28 de abril de 1994, 08/376,279, presentada el 20 de enero de 1995, 08/430, 938, presentada el 27 de abril de 1995, 0-8/464,584, presentada el 5 de junio de 1995, 08/464,582, presentada el 5 de junio de 1995, 08/471,191, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462,837, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486,853, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486,857, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486,859, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462,513, presentada el 5 de junio de 1995, 08/724,752, presentada el 2 de octubre de 1996 y 08/759,620, presentada el 3 de diciembre de 1996. Véase también Mendez y col., Nature Genetics 15:146-156 (1997) y Green y Jakobovits J Exp. Med. 188:483 495 (1998). Véase también la patente Europea N° EP 0 471 151 B1, publicada la concesión el 12 de junio de 1996, la solicitud de patente internacional n° WO 94/02602, publicada el 3 de febrero de 1994, la solicitud de patente internacional n° WO 96/34096, publicada el 31 de octubre de 1996 y el documento WO 98/24893, publicado el 11 de junio de 1998.

Las respuestas de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) han conducido a la industria a preparar anticuerpos quiméricos o, por otro lado, humanizados. Aunque los anticuerpos quiméricos tienen una región constante humana y una región variable murina, cabe esperar que se observen determinadas respuestas de anticuerpos humanos anti-quiméricos (HACA), en particular en usos crónicos o de múltiples dosis del anticuerpo. Por tanto, sería deseable proporcionar anticuerpos completamente humanos contra polipéptidos de TR4 con el fin de invalidar los problemas y/o efectos de las respuestas HAMA o HACA.

Los anticuerpos monoclonales específicos de los polipéptidos de TR4 se pueden preparar usando la tecnología del hibridoma. (Kohler y col., Nature 256:495 (1975); Kohler y col., Eur. J. Immunol. 6:511 (1976); Kohler y col., Eur. J. Immunol. 6:292 (1976); Hammerling y col., en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., pág. 571-681 (1981)). En resumen, los ratones Xenomouse™ pueden inmunizarse con polipéptidos de TR4. Tras la inmunización, los esplenocitos de estos ratones se extrajeron y condensaron con una línea celular de mieloma adecuada. Cualquier línea celular de mieloma adecuada se puede usar de acuerdo con la presente invención; no obstante, es preferible usar la línea celular de mieloma parental (SP2O), disponible en la ATCC. Tras la fusión, las células de hibridoma resultantes se mantienen selectivamente en medio HAT y después se clonan mediante dilución límite como describen Wands y col., (Gastroenterology 80:225-232 (1981)). Las células de hibridoma obtenidas mediante esta selección se analizaron después para identificar los clones que secretan anticuerpos capaces de unirse a los polipéptidos de TR4.

Para algunos usos, incluido el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos humanos o quiméricos. Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Véanse también las patentes de EE.UU. n° 4.44.87 y 4.716.111; y las publicaciones de PCT WO 98/46645, WO 98/50435, WO 98/24893, WO98/16654, WO 96/34096, WO 96/35735 y WO 91/10741. En una realización específica, los anticuerpos de la presente invención comprenden uno o más dominios VH y VL de la invención y regiones constantes de otra molécula de inmunoglobulina, preferentemente una inmunoglobulina humana. En una realización específica, los anticuerpos de la presente invención comprenden una o más CDR correspondientes a los dominios VH y VL de la invención y regiones estructurales de otra molécula de inmunoglobulina, preferentemente una molécula de inmunoglobulina humana. En el presente documento también se describe un anticuerpo que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más CDR de VL o CDR de VH correspondientes a uno o más de los dominios VH o VL de uno o más scFv indicados en la Tabla 1, o fragmentos o variantes de los mismos, y regiones estructurales (y, opcionalmente, una o más CDR o derivadas de los anticuerpos expresados por los scFv indicados en la Tabla 1) de una molécula de inmunoglobulina humana. En el presente documento también se describe un anticuerpo que comprende una CDR3 de VH, una CDR3 de VL, o ambas, correspondientes a los mismos scFv o diferentes scFv seleccionados de los scFv indicados en la Tabla 1, o fragmentos o variantes de los mismos, y regiones estructurales de una inmunoglobulina humana.

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo derivan de diferentes moléculas de inmunoglobulina, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo humano y una región constante de inmunoglobulina no humana (p. ej., murina) o al contrario. En la técnica se conocen los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos, Véase, por ejemplo, Science 229:1202 (1985); Oi y col., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies y col., J. Immunol. Methods 125:191-202 (1989); las patentes de EE.UU. N° 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una o más CDR de especies humanas y regiones estructurales de una molécula de inmunoglobulina no humana (p. ej., regiones estructurales de una molécula de inmunoglobulina murina, canina o felina) (o al contrario) se pueden producir usando varias técnicas conocidas en la materia, incluyendo, por ejemplo, injertos de CDR (documento EP 239,400; publicación de PCT WO

91/09967; las patentes de EE.UU. Nº 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), revestimiento o recubrimiento (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka y col., 1994, *Protein Engineering* 7:805; Roguska y col., *PNAS* 91:969-973 (1994)), e intercambio de cadenas (patente de EE.UU. nº 5.565.352). En un ejemplo preferido, los anticuerpos quiméricos comprenden una CDR3 humana que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR3 de VH o de las CD3 de VL de un dominio VH o VL de uno o más de los scFv indicados en la Tabla 1, o una variante de los mismos, y regiones estructurales no humanas o regiones estructurales humanas diferentes de las estructuras en los correspondientes scFv divulgados en la Tabla 1. A menudo, los residuos básicos en las regiones estructurales se sustituirán por el correspondiente residuo del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones en la estructura se identifican mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo mediante modelización de las interacciones de los residuos de la CDR y la estructura para identificar los residuos de la estructura importantes para la unión al antígeno y comparación de secuencias para identificar residuos de la estructura inusuales en posiciones concretas. (Véase, p. ej., Queen y col., la patente de EE.UU. Nº 5.585.089 y Riechmann y col., 1988, *Nature* 352:323 (1988)).

Los intracuerpos son anticuerpos, a menudo scFv, que se expresan en una molécula de ácido nucleico recombinante y se modifican mediante ingeniería para que se retengan intracelularmente (p. ej., que queden retenidos en el citoplasma, el retículo endoplásmico o el periplasma). Los intracuerpos se pueden usar para, por ejemplo, anular la función de una proteína a la que se une el intracuerpo. La expresión de los intracuerpos también se puede regular mediante el uso de promotores inducibles en el vector de expresión de ácido nucleico que comprende el intracuerpo. Los intracuerpos de la invención se pueden producir usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como los divulgados y revisados en Chen y col., *Hum. Gene Ther.* 5:595-601 (1994); Marasco, W.A., *Gene Ther.* 4:11-15 (1997); Rondon y Marasco, *Annu. Rev. Microbiol.* 51:257-283 (1997); Proba y col., *J. Mol. Biol.* 275:245-253 (1998); Cohen y col., *Oncogene* 17:2445-2456 (1998); Ohage y Steipe, *J. Mol. Biol.* 291:1119-1128 (1999); Ohage y col., *J. Mol. Biol.* 291:1129-1134 (1999); Wirtz y Steipe, *Protein Sci.* 8:2245-2250 (1999); Zhu y col., *J. Immunol. Methods* 231:207-222 (1999); y las referencias citadas en los mismos.

La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención (incluyendo fragmentos de anticuerpos del mismo (p. ej., una cadena ligera o pesada de un anticuerpo de la invención) requiere la construcción de uno o más vectores de expresión que contienen un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo (p. ej., un anticuerpo entero, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una porción del mismo (que preferentemente, aunque no necesariamente, contiene el dominio variable de la cadena pesada o ligera)), de la invención, el o los vectores para la producción de la molécula de anticuerpo se pueden producir mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la materia. Por tanto, en el presente documento se describen procedimientos para preparar una proteína expresando un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo. Se pueden usar procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan secuencias que codifican anticuerpos y las señales adecuadas de control de la transcripción y la traducción. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Por tanto, la invención proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica una molécula de anticuerpo de la invención (p. ej., un anticuerpo entero, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un dominio variable de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una porción del mismo, o una CDR de la cadena pesada o ligera, un Fv de una sola cadena o fragmentos del mismo) operablemente unida a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, la publicación de PCR WO 86/05807; la publicación de PCT WO 89/01036; y las patentes de EE.UU. nº 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo pueden clonarse en dicho vector para la expresión de la cadena pesada completa, la cadena ligera completa, o las cadenas pesada y ligera completas.

El o los vectores de expresión se transfieren(n) a una célula huésped mediante técnicas convencionales y, después, las células transfectadas se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención. Por tanto, la invención incluye células huésped que contienen uno o más polinucleótidos que codifican(n) un anticuerpo de la invención (p. ej., un anticuerpo entero, una cadena pesada o ligera del mismo, o una porción del mismo, o un anticuerpo de cadena sencilla o un fragmento del mismo) operablemente unidos a un promotor heterólogo. En realizaciones preferidas para la expresión de moléculas de anticuerpos enteros, los vectores que codifican las cadenas pesada y ligera se pueden coexpresar en la célula huésped para la expresión de toda la molécula de inmunoglobulina, como se detalla más adelante.

Para expresar las moléculas de anticuerpo de la invención se pueden usar varios sistemas de vectores de expresión huésped. Dichos sistemas huésped-expresión representan vehículos mediante los cuales se pueden producir las secuencias de codificación de interés y, posteriormente, se pueden purificar, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias nucleotídicas codificadoras adecuadas, expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Estos incluyen, entre otros, partículas de bacteriófagos modificadas mediante ingeniería para expresar fragmentos de anticuerpos o variantes de los mismos (anticuerpos monocatenarios), microorganismos tales como bacterias (p. ej., *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, de ADN plasmídico o de ADN de cósmido, que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; levaduras (p. ej., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión recombinante de levaduras que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; sistemas de células

de insecto infectadas con vectores de expresión recombinante de virus (p. ej., baculovirus) que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión en virus recombinantes (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión en plásmidos recombinante (p. ej., plásmido Ti) que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (p. ej., células COS, CHO, BHK, 293, 3T3, NS0) que alojan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (p. ej., el promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (p. ej., el promotor tardío de adenovirus, el promotor 7,5 K del virus vacunal). Preferentemente, las células bacterianas, tales como *Escherichia coli*, y, más preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de moléculas de anticuerpo recombinante enteras, se usan para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero, tal como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector, como el elemento promotor del gen temprano intermedio mayor del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking y col., Gene 45:101 (1986); Cockett y col., Bio/Technology 8:2 (1990); Bebbington y col., Bio/Techniques 10:169 (1992); Keen y Hale, Cytotechnology 18:207 (1996)).

En los sistemas bacterianos, de forma ventajosa se pueden seleccionar numerosos vectores de expresión en función del uso previsto para la molécula de anticuerpo que se exprese. Por ejemplo, cuando se ha de producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de niveles elevados de productos proteicos de fusión que se purifiquen fácilmente. Dichos vectores incluyen, entre otros, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther y col., EMBO 1. 2:1791 (1983)), en el que la secuencia codificadora del anticuerpo puede estar unida individualmente en el vector dentro del marco de la región de codificación lacZ, de modo que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res 13:3101-3109 (1985); Van Heeke y Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)); y similares. También se pueden usar vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión-S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse con facilidad a partir de células lisadas mediante adsorción y unión en una matriz de perlas de glutatión-agarosa, seguida de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se han diseñado para que incluyan trombina o sitios de escisión por la proteasa del factor Xa de modo que el producto del gen diana clonado se pueda liberar de la fracción GST.

En un sistema de insectos, como vector para expresar genes extraños se puede usar el virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV). El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. Las secuencias que codifican el anticuerpo se pueden clonar individualmente en regiones no esenciales (p. ej., el gen de la poliedrina) del virus y se pueden colocar bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de la poliedrina).

En células huésped de mamífero se puede usar numerosos sistemas de expresión basados en virus. En los ejemplos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia de codificación de anticuerpo de interés se puede unir a un complejo de adenovirus de control de la transcripción/traducción, por ejemplo el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Después, este gen quimérico se puede insertar en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (p. ej., región E1 o E3) tendrá como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en huéspedes infectados (p. ej., véase, Logan y Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8 1:355-359 (1984)). También se pueden requerir señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de las secuencias de codificación de anticuerpo insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación tiene que estar en fase con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales exógenas de control de la traducción y los codones de iniciación pueden tener diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión se puede potenciar mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción etc. adecuados (véase, por ejemplo, Bittner y col., Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987)).

Además, se puede escoger una cepa de célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas o que modifique y procese el producto génico del modo específico deseado. Dichas modificaciones (p. ej., glicosilación) y procesamiento (p. ej., escisión) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación postraduccionales de proteínas y productos génicos. Se pueden escoger líneas celulares o sistemas de huéspedes adecuados de modo que se asegure una correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña expresada. Con este fin se pueden usar células huésped eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico. Dichas células huésped de mamífero incluyen, entre otras, células CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, NS0, MDCK, 293, 3T3, W138, y, en particular, líneas celulares concretas de cáncer de mama, por ejemplo BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, y una línea celular de glándula mamaria normal, tal como, por ejemplo, CRL7030 y HsS78Bst.

Para la producción a largo plazo y con un rendimiento alto de proteínas recombinantes se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable el anticuerpo de pueden modificar mediante ingeniería. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células huésped se pueden transformar con ADN controlado mediante elementos de control de la expresión adecuados (p. ej., promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación etc.)

y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN extraño, las células modificadas por ingeniería se pueden dejar crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido y, después, se pasan a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que, a su vez, se pueden clonar y expandir en las líneas celulares. Este procedimiento puede usarse de forma ventajosa para modificar mediante ingeniería las líneas celulares que expresan la molécula de anticuerpo. Dichas líneas celulares modificadas por ingeniería pueden ser particularmente útiles en la detección selectiva y la evaluación de composiciones que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Se pueden usar numerosos sistemas de selección, incluidos, entre otros, los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler y col., Cell 11:223 (1977)), se pueden usar los genes de la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992)) y de adenina fosforibosiltransferasa (Lowy y col., Cell 22:8 17 (1980)) en las células tk-, hgprr- or aprt-, respectivamente. Asimismo, se puede usar resistencia antimetabolito como la base de la selección para los genes siguientes: *dhfr*, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler y col., Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980); O'Hare y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); *gpt*, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); *neo*, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Clinical Pharmacy, 12:488-505; Wu y Wu, Biotherapy, 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science, 260:926-932 (1993); y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217 (1993); TIB TECH 11(5):155-215 (May, 1993)); e *hygro*, que confiere resistencia a higromicina (Santerre y col., Gene 30:147 (1984)). Los procedimientos habitualmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante se pueden aplicar de forma rutinaria para seleccionar el clon recombinante deseado y dichos procedimientos se describen en, por ejemplo, Ausubel y col. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli y col. (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin y col., 1981, J. Mol. Biol. 150:1 (1981).

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo se pueden aumentar mediante amplificación en vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells" en DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa el anticuerpo es amplificable, el incremento del nivel del inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con la secuencia de codificación del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse y col., Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983)).

Los vectores que usan la glutamina sintasa (GS) o DHFR como marcadores seleccionables se pueden amplificar en presencia de los fármacos metionina sulfoximina o metotrexato, respectivamente. Una ventaja de los vectores basados en glutamina sintasa es la disponibilidad de líneas celulares (p. ej., la línea celular del mieloma murino NS0) que son negativas para la glutamina sintasa. Los sistemas de expresión de glutamina sintasa también pueden funcionar en las células que expresan glutamina sintasa (p. ej., células de ovario de hámster chino (CHO) proporcionando un inhibidor adicional para evitar el funcionamiento del gen endógeno. Un sistema de expresión de la glutamina sintasa y componentes del mismo se detallan en las publicaciones PCT: WO87/04462; WO86/05807; WO89/01036; WO89/10404; y WO91/06657. De forma adicional, los vectores de expresión de glutamina sintasa que se pueden usar de acuerdo con la presente invención están disponibles comercialmente en suministradores, incluido, por ejemplo, Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH). La expresión y la producción de anticuerpos monoclonales usando un sistema de expresión de GS en células de mieloma murino se describe en Bebbington y col., Bio/technology 10:169(1992) y en Biblia y Robinson Biotechnol. Prog. 11:1 (1995).

La célula huésped se puede co-transfecta con dos vectores de expresión de la invención, en el que el primer vector codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión igual de los polipéptidos de la cadena pesada y de la cadena ligera. Como alternativa, se puede usar un solo vector que codifica, y es capaz de expresar, ambos polipéptidos, de la cadena pesada y de la cadena ligera. En estas situaciones, la cadena ligera se introduce, preferentemente, antes que la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2 197 (1980)). Las secuencias codificadoras de las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que se ha producido una molécula de anticuerpo de la invención (incluyendo moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo del mismo) se han sintetizado químicamente o expresado de forma recombinante, se puede purificar mediante expresión cualquier procedimiento conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, o, más en general, una molécula proteica tal como, por ejemplo, mediante cromatografía (p. ej., cromatografía en columna de intercambio iónico, de afinidad, particularmente de afinidad por el antígeno específico después de la proteína A y de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención se pueden condensar con secuencias de polipéptidos heterólogos descritas en el presente documento, o conocidas de otro modo en la técnica, por que facilitan la purificación.

Caracterización de los anticuerpos anti-TR4

- Los anticuerpos de la presente invención (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos de los mismos) también se pueden describir o especificar en términos de su unión a polipéptidos de TR4 o a fragmentos o variantes de los polipéptidos de TR4. En realizaciones específicas, los anticuerpos de la invención se unen a polipéptidos de TR4, o a fragmentos o variantes de los mismos, con una constante de disociación o K_D inferior o igual a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M o 10^{-5} M. Más preferentemente, los anticuerpos de la invención se unen a polipéptidos de TR4, o a fragmentos o variantes de los mismos, con una constante de disociación o K_D inferior o igual a 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M o 10^{-8} M. Incluso más preferentemente, los anticuerpos de la invención se unen a polipéptidos de TR4, o a fragmentos o variantes de los mismos, con una constante de disociación o K_D inferior o igual a 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M o 10^{-15} M. La invención abarca anticuerpos que se unen a polipéptidos de TR4 con una constante de disociación o K_D que está dentro de uno cualquiera de los intervalos que están entre cada uno de los valores citados individuales.
- En realizaciones específicas, los anticuerpos de la invención se unen a polipéptidos de TR4, o a fragmentos o variantes de los mismos, con una velocidad de disociación (k_{off}) inferior o igual a $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 10^{-2} s^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o 10^{-3} s^{-1} . Más preferentemente, los anticuerpos de la invención se unen a polipéptidos de TR4, o a fragmentos o variantes de los mismos, con una velocidad de disociación (k_{off}) inferior o igual a $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 10^{-4} s^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, or 10^{-5} s^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 10^{-6} s^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ o 10^{-7} s^{-1} . La invención abarca anticuerpos que se unen a polipéptidos de TR4 con una velocidad de disociación (k_{off}) que está dentro de uno cualquiera de los intervalos que están entre cada uno de los valores citados individuales.

- En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención se unen a polipéptidos de TR4, o a fragmentos o variantes de los mismos, con una velocidad de asociación (k_{on}) superior o igual a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ or $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Más preferentemente, los anticuerpos de la invención se unen a polipéptidos de TR4, o a fragmentos o variantes de los mismos, con una velocidad de asociación (k_{on}) superior o igual a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, or $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. La invención abarca anticuerpos que se unen a polipéptidos de TR4 con una velocidad de asociación (k_{on}) que está dentro de uno cualquiera de los intervalos que están entre cada uno de los valores citados individuales.

- Los anticuerpos de la invención (incluidas moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos de los mismos) que se unen inmuno específicamente a un polipéptido o a un fragmento polipeptídico o variante de los polipéptidos de TR4 humano (SEC ID N° 1). En otra realización, los anticuerpos de la invención se unen inmuno específicamente a un polipéptido o a un fragmento polipeptídico o variante de los polipéptidos de TR4 de simio. En otra realización más, los anticuerpos de la invención se unen inmuno específicamente a un polipéptido o a un fragmento polipeptídico o variante de los polipéptidos de TR4 murinos. En una realización, los anticuerpos de la invención se unen inmuno específicamente a polipéptidos de TR4 de simio y humanos. En otra realización, los anticuerpos de la invención se unen inmuno específicamente a polipéptidos de TR4 humanos y a polipéptidos de TR4 murinos. Más preferentemente, los anticuerpos de la invención se unen, preferentemente, a polipéptidos de TR4 humanos en comparación con polipéptidos de TR4 murinos.

- En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la presente invención (incluidas moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos de los mismos) se unen inmuno específicamente a polipéptidos de TR4 y no producen reacción cruzada con cualquier otro antígeno. En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención se unen inmuno específicamente a polipéptidos de TR4 (p. ej., SEC ID N°1 o fragmentos o variantes de la misma) y no producen reacciones cruzadas con uno o más miembros adicionales de los polipéptidos de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (p. ej., TR1, TR5, TR10 BCMA, TACI, CD30, CD27, OX40, 4-1BB, CD40, NGFR, TNFR1, TNFR2, Fas y NGFR).

- En una realización preferida, los anticuerpos de la invención se unen, preferentemente, a TR4 (SEC ID N°1), o a fragmentos y variantes del mismo respecto a su capacidad para unirse a TR1, TR5, TR7 o TR10 (SEC ID N° 2-5) o a fragmentos, variantes de los mismos. En otras realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención se unen, preferentemente, a TR4 y TR7 (SEC ID N°1 y 3) o fragmentos o variantes de los mismos respecto a su capacidad para unirse a TR1, TR5 o TR10 (SEC ID N° 5, 2 y 4) o fragmentos y variantes de los mismos. En otras realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención se unen a TR1, TR4, TR5, TR7 y TR10 (SEC ID N° 5). Una capacidad del anticuerpo para unirse, preferentemente, a un antígeno en comparación con otro antígeno se puede determinar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica.

- A modo de ejemplo no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une a dicho primer antígeno con una constante de disociación (K_D) que es inferior a la K_D del anticuerpo para el segundo antígeno. En otra realización no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une a dicho primer antígeno con una afinidad (es decir, K_D) que es al menos un orden de magnitud inferior a la K_D del anticuerpo para el segundo antígeno. En otra realización no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une a dicho

primer antígeno con una afinidad (es decir, K_D) que es al menos dos órdenes de magnitud inferior a la K_D del anticuerpo para el segundo antígeno.

En otra realización no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une a dicho primer antígeno con una velocidad de disociación (k_{off}) que es inferior a la k_{off} del anticuerpo para el segundo antígeno. En otra realización no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une a dicho primer antígeno con una k_{off} que es al menos un orden de magnitud inferior a la k_{off} del anticuerpo para el segundo antígeno. En otra realización no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une a dicho primer antígeno con una k_{off} que es al menos dos órdenes de magnitud inferior a la k_{off} del anticuerpo para el segundo antígeno.

La invención también abarca anticuerpos (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos de los mismos) que tienen una o más de las mismas características biológicas que uno o más de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por "características biológicas" se pretende significar las actividades o propiedades *in vitro* o *in vivo* de los anticuerpos, tales como, por ejemplo, la capacidad para unirse a los polipéptidos de TR4 (p. ej., receptores de TRAIL incluidos en la membrana), la capacidad para estimular la actividad biológica mediada por TR4 (p. ej., para estimular la apoptosis de las células que expresan TR4, véase el Ejemplo 4); la capacidad para bloquear sustancialmente el ligando de TR4 (p. ej., TRAIL (SEC ID N° 66), también conocido como AIM-1, solicitud internacional n° WO 97/35899 y solicitud de patente de EE.UU. 5.771.223), o un fragmento, variante o proteína de fusión del mismo, que se une al receptor de TRAIL, véase el ejemplo 3; o la capacidad para regular por aumento la expresión de TR4 sobre la superficie de las células. Otras actividades biológicas que pueden tener los anticuerpos contra los polipéptidos de TR4 descritos e el presente documento incluyen, entre otros, la capacidad para inhibir la actividad biológica mediada por TR4 (p. ej., para inhibir la apoptosis de las células que expresan TR4) o la capacidad para regular por disminución la expresión de TR4 sobre la superficie de las células. Opcionalmente, los anticuerpos de la invención se unirán al mismo epítipo que al menos uno de los anticuerpos a los que se hace referencia específicamente en el presente documento. Dicha unión al epítipo se puede determinar de forma rutinaria usando ensayos conocidos en la técnica.

La presente invención también proporciona anticuerpos (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos o variantes de los mismos) que estimulan las actividades biológicas mediadas por TR4. En una realización, un anticuerpo que estimula las actividades biológicas mediadas por TR4 comprende, o como alternativa consiste en, un dominio VH y/o VL de al menos uno de los scFv indicados en la Tabla 1, o un fragmento o variante del mismo. En una realización específica, un anticuerpo que estimula las actividades biológicas mediadas por TR4 comprende, o como alternativa consiste en, un dominio VH y VL de uno cualquiera de los scFv indicados en la Tabla 1, o un fragmento o variante del mismo. Las moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos también están abarcadas por la invención.

La presente invención también proporciona anticuerpos (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos o variantes de los mismos) que estimulan la apoptosis de las células que expresan TR4 (véase el ejemplo 4). En el presente documento se describe un anticuerpo que estimula la apoptosis de las células que expresan TR4 y que comprende, o como alternativa consiste en, un dominio VH y/o VL de al menos uno de los scFv indicados en la Tabla 1, o un fragmento o variante del mismo. En el presente documento también se describe un anticuerpo que estimula la apoptosis de las células que expresan TR4 y que comprende, o como alternativa consiste en, un dominio VH y VL de uno cualquiera de los scFv indicados en la Tabla 1, o un fragmento o variante del mismo. Las moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos también se describen en el presente documento.

En realizaciones preferidas, la presente invención también proporciona anticuerpos (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo de los mismos) que estimulan la apoptosis de las células que expresan TR4 de igual forma en presencia o ausencia de reactivos de entrecruzamiento de anticuerpos, tal como, por ejemplo, células reactivas de Fc anti-Ig (véase, por ejemplo, el ejemplo 4). En una realización específica, los anticuerpos de la presente invención estimulan la apoptosis de las células HeLa de igual forma en presencia o ausencia de un reactivo de entrecruzamiento del anticuerpo anti-Fc de Ig. En otra realización específica, los anticuerpos de la presente invención estimulan la apoptosis de las células HeLa de igual forma en presencia o ausencia de un reactivo de entrecruzamiento del anticuerpo anti-Fc de Ig en presencia de 2 microgramos/mililitro de cicloheximida. En otra realización, los anticuerpos de la presente invención estimulan la apoptosis de las células SW480 de igual forma en presencia o ausencia de un reactivo de entrecruzamiento del anticuerpo anti-Fc de Ig. En otra realización específica, los anticuerpos de la presente invención estimulan la apoptosis de las células SW480 de igual forma en presencia o ausencia de un reactivo de entrecruzamiento del anticuerpo anti-Fc de Ig en presencia de 2 microgramos/mililitro de cicloheximida.

En otras realizaciones preferidas, la presente invención también proporciona anticuerpos (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo de los mismos) que estimulan la apoptosis de las células que expresan TR4 al menos igual que una concentración igual (en términos de, por ejemplo, nanogramos/mililitro) del polipéptido TRAIL (incluyendo, fragmentos polipeptídicos, variantes o proteínas de fusión de TRAIL) estimula la apoptosis de las células que expresan TR4 (véase, por ejemplo, el ejemplo 4). En una realización específica, los anticuerpos de la invención estimulan la apoptosis de las células que expresan TR4 mejor

- que una concentración igual (en términos de, por ejemplo, nanogramos/mililitro) del polipéptidos TRAIL (incluyendo fragmentos polipeptídicos, variantes o proteínas de fusión de TRAIL) estimula la apoptosis de células que expresan TR4. En una realización específica, los anticuerpos de la invención estimulan la apoptosis de las células HeLa mejor que una concentración igual (en términos de, por ejemplo, nanogramos/mililitro) del polipéptido TRAIL (incluyendo fragmentos polipeptídicos, variantes o proteínas de fusión de TRAIL) estimula la apoptosis de las células que expresan TR4. En otra realización específica, los anticuerpos de la presente invención estimulan la apoptosis de las células HeLa mejor que una concentración igual (en términos de, por ejemplo, nanogramos/mililitro) del polipéptido TRAIL (incluyendo fragmentos polipeptídicos, variantes o proteínas de fusión de TRAIL) estimula la apoptosis de las células que expresan TR4 en presencia de 2 microgramos/mililitro de cicloheximida.
- En otras realizaciones preferidas, la presente invención también proporciona anticuerpos (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo de los mismos) que estimulan más la apoptosis de las células que expresan TR4 cuando se administran en combinación con un fármaco quimioterapéutico o los anticuerpos solos estimulan la apoptosis de las células que expresan el receptor. En realizaciones específicas, los anticuerpos de la presente invención estimulan más la apoptosis de las células que expresan TR4 cuando se administran en combinación con topotecán que la estimulación de las la apoptosis de las células que expresan el receptor por topotecán solo o los anticuerpos solos. En realizaciones específicas, los anticuerpos de la presente invención estimulan más la apoptosis de las células que expresan TR4 cuando se administran en combinación con cicloheximida que la estimulación de las la apoptosis de las células que expresan el receptor por cicloheximida sola o los anticuerpos solos.
- La presente invención también proporciona anticuerpos (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo los mismos) que bloquean o inhiben la unión de TRAIL a un polipéptido de TR4 (véase el ejemplo 3). En el presente documento se describe un anticuerpo que bloquea o inhibe la unión de TRAIL a TR4 y que comprende, o como alternativa consiste en, un dominio VH y/o VL de al menos uno de los scFv indicados en la Tabla 1, o un fragmento o variante del mismo. En el presente documento también se describe un anticuerpo que bloquea o inhibe la unión de TRAIL a TR4 y que comprende, o como alternativa consiste en, un dominio VH y/o VL de uno cualquiera de los scFv indicados en la Tabla 1, o un fragmento o variante del mismo. Las moléculas de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos también se describen en el presente documento.
- En el presente documento también se describen proteínas de fusión que comprenden, o como alternativa que consisten en, un anticuerpo (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos o variantes de los mismos) que se unen inmuno específicamente a TR4 y un polipéptido heterólogo. Preferentemente, el polipéptido heterólogo con el que se condensa el anticuerpo es útil para la función o es útil para dirigir a las células que expresan TR4. En el presente documento también se describen anticuerpos biespecíficos en los que un sitio de unión al anticuerpo es específico de TR4 y el segundo sitio de unión al anticuerpo es específico de un polipéptido heterólogo tal como TR7 o un antígeno específico de tumor. En un ejemplo alternativo, el polipéptido heterólogo al que se condensa el anticuerpo es útil para dirigir el anticuerpo a una célula tumoral. En un ejemplo, una proteína de fusión descrita en el presente documento comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera o más de los dominios VH de un anticuerpo de la invención o la secuencia de aminoácido de uno cualquiera o más de los dominios VL de un anticuerpo de la invención o fragmentos o variantes del mismo, y una secuencia polipeptídica heteróloga. En otro ejemplo, una proteína de fusión descrita en el presente documento comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera, dos, tres o más de las CDR de VH de un anticuerpo de la invención o la secuencia de aminoácido de uno cualquiera, dos, tres o más de las CDR de VL de un anticuerpo de la invención o fragmentos o variantes del mismo, y una secuencia polipeptídica heteróloga. En un ejemplo preferido, la proteína de fusión comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VH de un anticuerpo de la invención, o fragmento o variante del mismo, y una secuencia polipeptídica heteróloga, en la que la proteína de fusión se une inmuno específicamente a TR4. En otro ejemplo, una proteína de fusión comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos un dominio VH de un anticuerpo de la invención y la secuencia de aminoácido de al menos un dominio VL de un anticuerpo de la invención o fragmentos o variantes del mismo, y una secuencia polipeptídica heteróloga. Preferentemente, los dominios VH y VL de la proteína de fusión corresponden a un anticuerpo sencillo (o scFv o fragmento Fab) de la invención. En otro ejemplo más, una proteína de fusión descrita en el presente documento comprende, o como alternativa consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera, dos, tres o más de las CDR de VH de un anticuerpo de la invención y la secuencia de aminoácido de uno cualquiera, dos, tres o más de las CDR de VL de un anticuerpo de la invención o fragmentos o variantes del mismo, y una secuencia polipeptídica heteróloga. Preferentemente, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de las CDR de VH o de las CDR de VL corresponden a un anticuerpo sencillo (o scFv o fragmento Fab) de la invención. Las moléculas de ácido nucleico que codifican estas proteínas de fusión también se describen en el presente documento.
- Los anticuerpos de la presente invención (incluidos fragmentos de anticuerpo de los mismos) se pueden caracterizar de varios modos. En particular, los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la invención se pueden analizar según la capacidad para unirse inmuno específicamente a TR4 o a un fragmento o variante de TR4, usando técnicas descritas en el presente documento o modificando de forma rutinaria técnicas conocidas en la técnica. Los

ensayos de la capacidad de los anticuerpos de la invención para unirse inmunoespecíficamente a TR4 a un fragmento o variante de TR4 se pueden realizar en solución (p. ej., Houghten, *Bio/Techniques* 13:412-421(1992)), sobre perlas (e.g., Lam, *Nature* 354:82-84 (1991)), sobre chips (p. ej., Fodor, *Nature* 364:555-556 (1993)), sobre bacterias (p. ej., patente de EE.UU. n° 5.223.409), sobre esporas (p. ej., patente de EE.UU. n° 5,571,698; 5,403,484; y 5,223,409), sobre plásmidos (p. ej., Cull y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869 (1992)) o sobre fagos (p. ej., Scott and Smith, *Science* 249:386-390 (1990); Devlin, *Science* 249:404-406 (1990); Cwirla y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7178-7182 (1990); y Felici, *J. Mol. Biol.* 222:301-310 (1991)). Los anticuerpos que se han identificado que se unen inmunoespecíficamente a TR4 o a un fragmento o variante de TR4 se pueden analizar según su especificidad y afinidad por TR4 o un fragmento o variante de TR4, usando o modificando de forma rutinaria las técnicas descritas en el presente documento o, por otro lado, conocidas en la materia.

Los anticuerpos de la invención se pueden analizar según la unión inmunoespecífica a los polipéptidos de TR4 y la reactividad cruzada con otros antígenos mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, los inmunoensayos que se pueden usar para analizar la unión inmunoespecífica y la reactividad cruzada incluyen, entre otros, sistemas de ensayo competitivo y no competitivo usando técnicas tales como análisis BIAcore (véase, por ejemplo, el Ejemplo 2), análisis FACS (clasificador celular activado por fluorescencia), inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunosorción ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, transferencias de tipo western, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos con proteína A, por citar algunos. Dichos ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel y col., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York). Ejemplos de inmunoensayos se describen brevemente más adelante (pero no se pretende que sean limitantes).

Los ELISA comprenden preparar el antígeno, revestir el pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, eliminar mediante lavado el antígeno que no se ha unido a los pocillos, añadir el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto detectable, tal como un sustrato enzimático (p. ej., peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) a los pocillos e incubar durante un periodo de tiempo, eliminar mediante lavado los anticuerpos no unidos o los anticuerpos unidos de forma inespecífica y detectar la presencia del antígeno unido específicamente al antígeno que reviste el pocillo. En los ELISA, el anticuerpo de interés no tiene que estar conjugado con un compuesto detectable; en su lugar, se puede añadir al pocillo un segundo anticuerpo (que reconoce el anticuerpo de interés) conjugado con un compuesto detectable. Como alternativa, el antígeno no tiene que estar directamente revistiendo el pocillo, en su lugar las placas de ELISA se pueden revestir con un anticuerpo anti-Fc de Ig y el antígeno en forma de una proteína de fusión receptor de TRAIL-Fc se puede unir al anti-Fc de Ig que reviste la placa. Esto puede ser deseable para mantener la proteína antigénica (p. ej., los polipéptidos de TR4) en una conformación más nativa de la que puede tener cuando reviste directamente una placa. En otra alternativa, en lugar de revestir el pocillo con el antígeno, el anticuerpo puede revestir el pocillo. En este ejemplo, la molécula detectable podría ser el antígeno conjugado con un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (p. ej., peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina). Un experto en la técnica conocerá los parámetros que se pueden modificar para aumentar la señal detectada, así como otras variaciones de ELISA conocidas en la técnica. Para una discusión adicional sobre los ELISA, véase, por ejemplo, Ausubel y col., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York en 11.2.1.

La afinidad de unión de un anticuerpo (incluyendo un scFv u otra molécula que comprende, o como alternativa que consiste en, fragmentos o variantes del mismo) por un antígeno y la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno se pueden determinar mediante ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de antígenos marcados (p. ej., antígeno marcado con ^3H o ^{125}I), o un fragmento o variante del mismo con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno sin marcar y la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo de la presente invención por TR4 y las velocidades de disociación se pueden determinar a partir de los datos mediante análisis del gráfico del trazado. La competición con un segundo anticuerpo también se puede determinar usando radioinmunoensayos. En este caso, un polipéptido de TR4 se incuba con un anticuerpo de la presente invención conjugado con un compuesto marcado (p. ej., un compuesto marcado con ^3H o ^{125}I) en presencia de cantidades crecientes de un segundo anticuerpo anti-TR4 no marcado. Este tipo de ensayo competitivo entre dos anticuerpos también se puede usar para determinar si dos anticuerpos se unen al mismo o a diferentes epítopos.

En una realización preferida, el análisis cinético BIAcore se usa para determinar la unión y las velocidades de disociación de los anticuerpos (incluidos los fragmentos de anticuerpo o variantes de los mismos) a un receptor de TRAIL o fragmentos de un receptor de TRAIL. El análisis cinético BIAcore comprende analizar la unión y la disociación de los anticuerpos de circuitos con receptores de TRAIL inmovilizados sobre su superficie como se describe con detalle en el Ejemplo 2.

En general, los protocolos de inmunoprecipitación comprenden lisar una población de células en un tampón de lisis, tal como tampón RIPA (1% de NP-40 o Triton X-100, 1% de desoxicolato sódico, 0,1% de SDS, NaCl 0,15 M, fosfato sódico 0,01 M a pH 7,2, 1% de Trasylol) suplementado con fosfatasa proteica y/o inhibidores de la proteasa (p. ej., EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato sódico), añadir el anticuerpo de interés al lisado celular, incubar durante un periodo de tiempo (p. ej., de 1 a 4 horas) a 40 °C, añadir perlas de sefarosa con proteína A y/o proteína G al lisado

celular, incubar durante aproximadamente una hora o más a 40 °C, lavar las perlas en tampón de lisis y resuspender las perlas en tampón de SDS/muestra. La capacidad del anticuerpo de interés para inmunoprecipitar un antígeno concreto se puede evaluar mediante, por ejemplo, análisis de transferencia de tipo western. Un experto en la técnica conocerá los parámetros que se pueden modificar para aumentar la unión del anticuerpo a un antígeno y disminuir el fondo (p. ej., aclarar previamente el lisado celular con perlas de sefarosa). Para una discusión adicional sobre los protocolos de inmunoprecipitación, véase, por ejemplo, Ausubel y col., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York en 10.16.1.

En general, el análisis de transferencia de tipo western comprende preparar muestras de proteínas, electroforesis de las muestras de proteínas en un gel de poli(acrilamida) (p. ej., 8 % - 20 % de SDS-PAGE dependiendo del peso molecular del antígeno), transferir la muestra proteica desde el gel de poli(acrilamida) a una membrana, tal como nitrocelulosa, PVDF o nailon, bloquear la membrana en solución de bloqueo (p. ej., PBS con 3% de BSA o leche desgrasada), lavar la membrana en tampón de lavado (p. ej., PBS-Tween 20), bloquear la membrana con anticuerpo primario (el anticuerpo de interés) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado; bloquear la membrana con un anticuerpo secundario (que reconoce el anticuerpo primario, por ejemplo un anticuerpo anti-humano) conjugado con un sustrato enzimático (p. ej., peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) o molécula radioactiva (p. ej., ³²P o ¹²⁵I) diluida en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado y detectar la presencia del antígeno. Un experto en la técnica conocerá los parámetros que se pueden modificar para aumentar la señal detectada y para reducir el ruido de fondo. Para una discusión adicional sobre los protocolos de transferencia de tipo western, véase, por ejemplo, Ausubel y col., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York en 10.8.1.

Conjugados de anticuerpos

En el presente documento se describen anticuerpos (incluidos fragmentos de anticuerpo o variantes de los mismos) condensados de forma recombinante o conjugados químicamente (incluidas conjugaciones covalentes y no covalentes) con un polipéptido heterólogo (o una porción del mismo, preferentemente al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos del polipéptido) para generar las proteínas de fusión. La fusión no necesariamente tiene que ser directa, sino que se puede producir mediante secuencias ligadoras. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención se pueden usar para dirigir los polipéptidos heterólogos a tipos celulares concretos (p. ej., células de cáncer, *in vitro* o *in vivo*, condensando o conjugando los polipéptidos heterólogos con anticuerpos de la invención que son específicos de antígenos de superficie celular concretos o que se unen a antígenos que se unen a receptores concretos de la superficie celular. Los anticuerpos de la invención también se pueden condensar con albúmina (incluyendo, entre otras, seroalbúmina humana recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.876.969, concedida el 2 de marzo de 1999, la patente EP 0 413 622 y la patente de EE.UU. N° 5.766.883, concedida el 16 de junio de 1998), que tiene como resultado polipéptidos quiméricos. En un ejemplo preferido, los polipéptidos y/o anticuerpos de la presente invención (incluidos fragmentos de los mismos) se condensan con la forma madura de la seroalbúmina humana (es decir, los aminoácidos 1-585 de la seroalbúmina humana como se muestra en las Figuras 1 y 2 de la patente EP 0322 094). En otro ejemplo preferido, los polipéptidos y/o anticuerpos de la presente invención (incluidos fragmentos de los mismos) se condensan con fragmentos polipeptídicos que comprenden, o como alternativa que consisten en, residuos de aminoácidos 1-z de la seroalbúmina humana, en la que z es un número entero de 369 a 419, como se describe en la patente de EE.UU. 5.766.883. Los polipéptidos y/o anticuerpos de la presente invención (incluidos fragmentos de los mismos) se pueden condensar con el extremo N o el extremo C de la proteína heteróloga (p. ej., polipéptido de Fc de la inmunoglobulina o polipéptido de la seroalbúmina humana). Los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión se describen en el presente documento. Dichas proteínas de fusión pueden, por ejemplo, facilitar la purificación y pueden aumentar la semivida *in vivo*. Los anticuerpos condensados o conjugados con los polipéptidos heterólogos también se pueden usar en inmunoensayos *in vitro* y en procedimientos de purificación usando procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Harbor y col., en lo que antecede, y la publicación de PCT WO 93/2 1232; documento EP 439.095; Naramura y col., Immunol. Lett. 39:91-99 (1994); la patente de EE.UU. 5.474.981; Gillies y col., PNAS 89:1428-1432 (1992); Fell y col., J. Immunol. 146:2446-2452 (1991).

En el presente documento también se describen composiciones que comprenden, o como alternativa que consisten en, polipéptidos heterólogos condensados o conjugados con fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, los polipéptidos heterólogos se pueden condensar o conjugar con un fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento F(ab)₂ o una porción de los mismos. En la técnica se conocen procedimientos para condensar o conjugar polipéptidos con porciones de anticuerpos. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5.356.603; 5.622.929; 5.359.046; 5.349.053; 5.447.851; 5.112.946; el documento EP 307.434; el documento EP 367.166; las publicaciones de PCT WO 96/04388; WO 9 1/06570; Ashkenazi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539 (1991); Zheng y col., J. Immunol. 154:5590-5600 (1995); y Vil y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11357- 11341 (1992).

Se pueden generar proteínas de fusión adicionales mediante las técnicas de barajado de genes, barajado de motivos, barajado de exones y/o barajado de codones (en conjunto denominado "barajado de ADN"). El barajado de ADN puede emplearse para modular las actividades de los anticuerpos (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo o variantes de los mismos), procedimientos que se pueden usar para generar anticuerpos con actividad alterada (p. ej., anticuerpos con mayores afinidades y menores

velocidades de disociación). Véase, en general, las patentes de EE.UU. N° 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458, y Patten y col., Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-35 (1997); Harayama, Trends Biotechnol. 16(2):76-82 (1998); Hansson, y col., J. Mol. Biol. 287:265-76 (1999); y Lorenzo y Blasco, Biotechniques 24(2):308-13 (1998). En un ejemplo, los polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención se pueden alterar mediante mutagénesis aleatoria mediante PCR propensa a errores, inserción aleatoria de nucleótidos u otros procedimientos antes de la recombinación. EN otro ejemplo, una o más porciones de un polinucleótido que codifica un anticuerpo en el que las porciones se unen inmunoespecíficamente a TR4 se pueden recombinar con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos etc. de una o más moléculas heterólogas.

Además, los anticuerpos de la presente invención (incluidos los fragmentos de anticuerpo de los mismos) se pueden condensar con secuencias marcadoras, tales como polipéptidos, para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina, tal como la marca proporcionada en un vector pQe (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Como se ha descrito en Gentz y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras marcas peptídicas útiles para la purificación incluyen, entre otros, la marca de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson y col., Cell 37:767 (1984)) y la marca FLAG® (Stratagene, La Jolla, CA).

La presente invención abarca además anticuerpos (incluidos fragmentos de anticuerpo de los mismos) conjugados con un agente diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos pueden usarse en diagnóstico para, por ejemplo, monitorizar o pronosticar el desarrollo o progresión de un tumor como parte de un procedimiento de análisis clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen terapéutico dado. La detección se puede facilitar mediante acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen, entre otras, varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, metales emisores de positrones que usan varias tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos. La sustancia detectable se puede acoplar o conjugar directamente con el anticuerpo o indirectamente mediante un intermedio (tal como, por ejemplo, un ligador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.741.900 para iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para su uso como diagnóstico de acuerdo con la presente invención. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen, entre otras, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen, entre otros, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen, entre otros, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina, un ejemplo de material luminiscente incluye, entre otros, luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen, entre otros, luciferasa, luciferina y acuorina, y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen, entre otros, yodo (^{111}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{111}In , ^{112}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, $^{115\text{m}}\text{In}$), tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno ($^{99\text{m}}\text{Mo}$), xenon (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , y ^{97}Ru .

Además, un anticuerpo de la invención (incluido un scFv u otra molécula que comprende, o como alternativa que consiste en, fragmentos de anticuerpo del mismo) se puede acoplar o conjugar con un resto terapéutico tal como una citotoxina, por ejemplo un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ion metálico radiactivo, por ejemplo emisores de alfa tales como, por ejemplo, ^{213}Bi , u otros radiisótopos tales como, por ejemplo, ^{103}Pd , ^{135}Xe , ^{131}I , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{35}S , ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , ^{90}Y , ^{117}In , ^{186}Re , ^{188}Re y ^{166}Ho . En realizaciones específicas, un anticuerpo o fragmento del mismo está unido a quelantes macrocíclicos que quelan iones radiometálicos, incluidos, entre otros, ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{166}Ho , y ^{153}Sm , a polipéptidos. En realizaciones específicas, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA). En otras realizaciones específicas, el DOTA se une a un anticuerpo de la invención o fragmento del mismo a través de una molécula ligadora. Ejemplos de moléculas ligadoras útiles para conjugar DOTA con un polipéptido se conocen habitualmente en la técnica, véase, por ejemplo, DeNardo y col., Clin Cancer Res. 4(10):2483-90, 1998; Peterson y col., Bioconjug. Chem. 10(4):553-7, 1999; y Zimmerman y col., Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50, 1999.

Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Ejemplos incluyen, entre otros, paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, timidina cinasa, endonucleasa, ARNasa y puromicina, y fragmentos, variantes u homólogos de los mismos. Agentes terapéuticos incluyen, entre otros, antimetabolitos (p. ej., metotrexato 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo descabazina), agentes alquilantes (p.ej., mecloretanamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (e.g., daunorubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p.ej., dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)), y agentes antimetabólicos (p.ej., vincristina y vinblastina).

Las técnicas conocidas en la materia se pueden aplicar a anticuerpos marcadores de la invención. Dichas técnicas incluyen, entre otras, el uso de agentes de conjugación bifuncional (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n°

5.756.065; 5.714.711; 5.696.239; 5.652.371; 5.505.931; 5.489.425; 5.435.990; 5.428.139; 5.342.604; 5.274.119; 4.994.560; y 5.808.003) y reacciones de acoplamiento directo (p. ej., Bolton-Hunter y Chloramine-T reaction).

Los anticuerpos de la invención que son conjugados se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada, el agente terapéutico o resto farmacológico no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, entre otros, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, toxina alfa, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica, saporina, momordina, gelonina, proteína antiviral de la hierba carmín, alfasarcina y la toxina del cólera; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferón alfa, interferón β , factor de crecimiento neural, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, activador del plasminógeno tisular, un agente apoptótico, por ejemplo TNF-alfa, TNF-beta, AIM I (véase la publicación internacional n° WO 97/35899), AIM II (véase la publicación internacional n° WO 97/34911), el ligando Fas (Takahashi y col., *Int. Immunol.*, 6:1567-1574 (1994)), VEGF (véase, la publicación internacional n° WO 99/23105), un agente trombótico o un agente antiangiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina; o modificadores de la respuesta biológica tal como, por ejemplo, linfocinas, interleucina 1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de las colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

Los anticuerpos de la invención (incluidos fragmentos de anticuerpo de los mismos) también se pueden fijar a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Dichos soportes sólidos incluyen, entre otros, vidrio, celulosa, poli(acrilamida), nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Las técnicas para conjugar un resto terapéutico con anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Amon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld y col., (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson y col. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents en Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera y col. (eds.), pág. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin y col. (eds.), pág. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe y col., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982).

Como alternativa, un anticuerpo de la invención se puede conjugar con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como describe Segal en la patente de EE.UU. n° 4.676.980.

Un anticuerpo de la invención (incluidas otras moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, un fragmento de anticuerpo del mismo), con o sin un resto terapéutico conjugado al mismo, administrado solo o en combinación con factor(es) citotóxicos y/o citocina(s) se puede usar como agente terapéutico.

35 Usos de los anticuerpos de la invención

Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar para, por ejemplo, entre otros, purificar, detectar y dirigir los polipéptidos, incluidos procedimientos diagnósticos y terapéuticos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos tienen uso en inmunoensayos para medir de forma cualitativa y cuantitativa los niveles de polipéptidos de TR4 en muestras biológicas. Véase, *por ejemplo*, Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988).

40 Inmunofenotipado

Los anticuerpos de la invención se pueden usar para inmunofenotipar las líneas celulares y las muestras biológicas (véase, por ejemplo, el ejemplo 4). El producto de la traducción del gen TR4 puede ser útil como marcador celular específico o, más específicamente, como marcador celular que se expresa de forma diferencial en varias etapas de diferenciación y/o de maduración de tipos celulares concretos, en particular de tumores y células cancerosas. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra un epítipo específico, o combinación de epítipos, permitirán la detección selectiva de poblaciones celulares que expresan el marcador. Se pueden usar varias técnicas utilizando anticuerpos monoclonales para la detección selectiva de poblaciones celulares que expresan el o los marcadores e incluyen separación magnética usando perlas magnéticas recubiertas por anticuerpo, "adsorción" con anticuerpo unido a una matriz sólida (Es decir, placa) y citometría de flujo (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.985.660; y Morrison y col., *Cell*, 96:737-49 (1999)).

Estas técnicas permiten la detección selectiva de poblaciones concretas de células, como lo que se podría encontrar las neoplasias malignas hematológicas (es decir, enfermedad residual mínima (ERM) en pacientes con leucemia aguda) y células "no propias" en trasplantes para prevenir la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH). Como alternativa, estas técnicas permiten la detección selectiva de células madre y progenitoras hematopoyéticas capaces de sufrir proliferación y/o diferenciación, como se podría encontrar en la sangre del cordón umbilical humano.

Mapeo de epítomos

La presente invención proporciona anticuerpos (incluidos fragmentos de anticuerpo de los mismos) que se pueden usar para identificar los epítomos de un polipéptido de TR4. En particular, los anticuerpos de la presente invención se pueden usar para identificar epítomos de un polipéptido de TR4 humano (p. ej., la SEC ID N° 1) o un polipéptido expresado en células humanas; un TR4 o polipéptido de TR4 murino expresado en células murinas; un receptor del polipéptido de TR4 de rata o un polipéptido de TR4 expresado en células de rata; o un polipéptido de TR4 de mono o un polipéptido de TR4 expresado en células de mono, usando técnicas descritas en el presente documento o, de otro modo, conocidas en la materia. Se puede producir fragmentos que funcionan como epítomos mediante cualquier medio convencional. (Véase, por ejemplo, Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5131-5135 (1985), que se describen además en la patente de EE.UU N° 4.711.211.) Los epítomos identificados de los anticuerpos de la presente invención pueden usarse, por ejemplo, como candidatos a vacunas, es decir para inmunizar un individuo para producir anticuerpos contra las formas de origen natural de los polipéptidos de TR4.

Usos diagnósticos de los anticuerpos

Los anticuerpos marcados de la invención (incluidas moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos de los mismos) que se unen específicamente a un polipéptido de TR4 se pueden usar con fines diagnósticos para detectar, pronosticar o vigilar enfermedades y/o trastornos. En realizaciones específicas, los anticuerpos marcados de la invención (incluidas moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos de los mismos) que se unen específicamente a un polipéptido de TR4 se pueden usar con fines diagnósticos para detectar, pronosticar o vigilar enfermedades y/o trastornos asociados con la expresión y/o actividad aberrante de TR4.

La invención proporciona la detección de la expresión de un polipéptido de TR4 que comprende: (a) analizar la expresión de un polipéptido de TR4 en una muestra biológica de un individuo usando uno o más anticuerpos de la invención que se une inmuno-específicamente a TR4; y (b) comparar el nivel de un polipéptido de TR4 en la muestra biológica con un nivel estándar del polipéptido de TR4, (p. ej., el nivel en las muestras biológicas normales).

En el presente documento también se describe la detección de la expresión aberrante de un polipéptido de TR4 mediante un procedimiento que comprende: (a) analizar la expresión de un polipéptido de TR4 en una muestra biológica de un individuo usando uno o más anticuerpos de la invención que se une inmuno-específicamente a TR4; y (b) comparar el nivel de un polipéptido de TR4 en la muestra biológica con un nivel estándar de un polipéptido de TR4, por ejemplo en las muestras biológicas normales, de modo que un aumento o disminución del nivel analizado de un polipéptido de TR4 en comparación con el nivel estándar de un polipéptido de TR4 es indicativo de expresión aberrante.

Por "muestra biológica" se pretende significar cualquier fluido y/o célula obtenida de un individuo, fluido corporal, tejido corporal, célula corporal, línea celular, cultivo tisular u otra fuente que puede contener una proteína o ARNm del polipéptido de TR4. Los fluidos corporales incluyen, entre otros, suero, plasma, orina, líquido sinovial, fluido espinal, saliva y moco. Las muestras de tejido se pueden extraer de prácticamente cualquier tejido del cuerpo. Las muestras de tejido también se pueden obtener de material de autopsia. En la técnica se conocen bien procedimientos para obtener biopsias tisulares y fluidos corporales de mamíferos. Cuando la muestra biológica debe incluir ARNm, la fuente preferida es una biopsia de tejido.

Los anticuerpos de la invención (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos de los mismos) que se unen específicamente a un polipéptido de TR4 se pueden usar con fines diagnósticos para detectar, diagnosticar, pronosticar o vigilar cánceres y otros trastornos y/o enfermedades hiperproliferativas y/o enfermedades o afecciones asociadas con las mismas. En el presente documento se describe la detección de la expresión aberrante de un polipéptido de TR4 mediante un procedimiento que comprende: (a) analizar la expresión de un polipéptido de TR4 en una muestra biológica de un individuo usando uno o más anticuerpos de la invención que se une inmuno-específicamente a un polipéptido de TR4; y (b) comparar el nivel de un polipéptido de TR4 con un nivel estándar de un polipéptido de TR4, por ejemplo en muestras biológicas normales, de modo que un aumento o disminución del nivel analizado de un polipéptido de TR4 en comparación con el nivel estándar de un polipéptido de TR4 es indicativo de un cáncer y/o un trastorno hiperproliferativo.

En algunos casos TRAIL ha mostrado que mata de forma selectiva las células tumorales (véase, por ejemplo, Oncogene 19:3363-71 (2000)). Esto puede ser un resultado de la expresión diferencial de los receptores de TRAIL en células normales y cancerosas. Por tanto, en realizaciones específicas, un incremento en el nivel analizado de un polipéptido de TR4 es indicativo de un cáncer y/o de un trastorno hiperproliferativo.

Otros informes sugieren que la disminución de la expresión de TR4 por las células tumorales puede ser un mecanismo por el cual las células tumorales evaden el sistema inmunitario (véase, por ejemplo, Int. J. Oncol. 16:917-25 (2000)). Por tanto, en otras realizaciones específicas, una disminución del nivel analizado del polipéptido de TR4 es indicativa de un cáncer y/o un trastorno hiperproliferativo.

En el presente documento se describe la detección y el diagnóstico de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión aberrante de TR4 en un animal, preferentemente un mamífero y, más preferentemente, un ser humano.

En un caso, el diagnóstico descrito comprende: a) administrar (por ejemplo, por vía parenteral, subcutánea o intraperitoneal) a un sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo marcado de la invención (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo del mismo) que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de TR4; b) esperar un intervalo de tiempo tras la administración para dejar que el anticuerpo marcado se concentre preferentemente en los sitios en el sujeto en los que se expresa el polipéptido de TR4 (y para que la molécula marcada se elimine hasta el nivel basal); c) determinar el nivel basal y d) detectar el anticuerpo marcado en el sujeto de modo que la detección del anticuerpo marcado o fragmento del mismo por encima del nivel basal y por encima o por debajo del nivel observado en una persona sin la enfermedad o trastorno indica que el sujeto tiene una enfermedad o trastorno concreto asociado con la expresión aberrante del polipéptido de TR4. El nivel basal se puede determinar mediante varios procedimientos que incluyen comparar la cantidad de molécula marcada detectada con un valor estándar determinado anteriormente para un sistema concreto.

Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de imagen usado determinarán la cantidad del resto de imagen necesaria para producir imágenes diagnósticas. En el caso de un resto radioisótopo, para un sujeto humano, la cantidad de radiactividad inyectada normalmente variará de aproximadamente 5 a 20 milicurios de ⁹⁹Tc. El anticuerpo marcado se acumulará después, preferentemente, en la localización de las células que contienen la proteína específica. La obtención de imagen del tumor *in vivo* se describe en S.W. Burchiel y col., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." (Capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel y B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982).

Dependiendo de diversas variables, incluidos el tipo de marcador usado y el modo de administración, el intervalo de tiempo tras la administración para dejar que la molécula marcada se concentre, preferentemente, en los sitios en el sujeto y para que la molécula marcada sin unir se elimine hasta el nivel basal es de 6 a 48 horas o de 6 a 24 horas o de 6 a 12 horas. En otro caso, el intervalo de tiempo tras la administración es de 5 a 20 días o de 5 a 10 días.

En un ejemplo, la vigilancia de la enfermedad o trastorno se lleva a cabo repitiendo el procedimiento para diagnosticar la enfermedad o trastorno, por ejemplo un mes después del diagnóstico inicial, seis meses después del diagnóstico inicial, un año después del diagnóstico inicial etc.

La presencia de la molécula marcada se puede detectar en el paciente usando procedimientos conocidos en la técnica para escaneo *in vivo*. Estos procedimientos dependen del tipo de marcador usado. Los expertos en la técnica podrán determinar el procedimiento adecuado para detectar un marcador concreto. Los procedimientos y dispositivos que se pueden usar en los procedimientos diagnósticos son, entre otros, tomografía computerizada (TC), gammagrafía de cuerpo entero tal como tomografía de emisión de positrones (PET), obtención de imágenes por resonancia magnética (RM) y ecografía.

En un ejemplo específico, la molécula está marcada con un radioisótopo y se detecta en el paciente usando un instrumento quirúrgico de respuesta a radiación (Thurston y col., patente de EE.UU. N° 5.441.050). En otro ejemplo, la molécula se marca con un compuesto fluorescente y se detecta en el paciente usando un instrumento de escaneo de respuesta a fluorescencia. En otro ejemplo, la molécula está marcada con un metal emisor de positrones y se detecta en el paciente usando tomografía de emisión de positrones. En otro ejemplo más, la molécula está marcada con un marcador paramagnético y se detecta en un paciente usando un procedimiento de obtención de imágenes por resonancia magnética (RM).

Usos terapéuticos de los anticuerpos

Uno o más anticuerpos de la presente invención (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo de los mismos) que se unen inmunoespecíficamente a TR4 se pueden usar local o sistémicamente en el cuerpo como agente terapéutico. La presente invención también está dirigida a anticuerpos o fragmentos de los mismos para su uso en tratamientos a base de anticuerpos que implican administrar los anticuerpos de la invención (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo de los mismos) a un animal, preferentemente un mamífero y, lo más preferentemente, un ser humano, para prevenir o tratar una o más de las enfermedades, trastornos o afecciones divulgadas. Los compuestos terapéuticos de la invención incluyen, entre otros, anticuerpos de la invención y ácidos nucleicos que codifican anticuerpos (y anticuerpos antiidiotípicos) de la invención como se describe en el presente documento. En una realización, los anticuerpos de la invención se pueden usar para tratar, mejorar o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones, incluidas, entre otras, una cualquiera o más de las enfermedades, trastornos o afecciones descritas en el presente documento. El tratamiento y/o prevención de enfermedades, trastornos o afecciones incluye, entre otros, aliviar los síntomas asociados con esas enfermedades, trastornos o afecciones. Los anticuerpos de la invención se pueden proporcionar en composiciones farmacéuticamente aceptables como se sabe en la técnica o como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, las propiedades de los anticuerpos de la presente invención, como se detallan en los siguientes ejemplos, hacen de los anticuerpos mejores agentes terapéuticos que los anticuerpos de unión a TR4 descritos previamente.

Usos terapéuticos de los anticuerpos para tratar cánceres

- En realizaciones muy preferidas, los anticuerpos de la invención que se unen a TR4 y estimulan la apoptosis de las células que expresan TR4 se usan para tratar, prevenir o mejorar el cáncer: En realizaciones específicas, los anticuerpos de la invención se usan para inhibir la progresión o metástasis de los cánceres y otros trastornos relacionados. Los cánceres y trastornos relacionados incluyen, entre otros, cáncer de colon, cáncer cervical, leucemia (incluidas leucemias agudas (p. ej., leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (incluidas las leucemias mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia)) y leucemias crónicas (p. ej., leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica)), policitemia vera, linfomas (p. ej., enfermedad de Hodgkin y enfermedad de no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de las cadenas pesadas y tumores sólidos, incluyend, entre otros, sarcomas y carcinomas tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomas, rhabdomyosarcoma, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma nedukar, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto colédoco, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma de vejiga urinaria, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.
- En realizaciones muy preferidas, los anticuerpos de la invención que se unen a TR4 y estimulan la apoptosis de las células que expresan TR4 se usan para tratar, prevenir o mejorar el cáncer.
- En realizaciones muy preferidas, los anticuerpos de la invención que se unen a TR4 y estimulan la apoptosis de las células que expresan TR4 se usan para tratar, prevenir o mejorar el melanoma.
- En realizaciones muy preferidas, los anticuerpos de la invención que se unen a TR4 y estimulan la apoptosis de las células que expresan TR4 se usan para tratar, prevenir o mejorar cánceres del hígado, tales como hepatomas.
- En realizaciones muy preferidas, los anticuerpos de la invención que se unen a TR4 y estimulan la apoptosis de las células que expresan TR4 se usan para tratar, prevenir o mejorar cánceres del sistema nervioso central tales como meduloblastoma, neuroblastoma y glioblastoma.
- De acuerdo con la presente invención se ha demostrado la expresión del receptor TR4 de TRAIL en el tejido de carcinoma de pulmón, el tejido de carcinoma de vejiga urinaria y el tejido de carcinoma de ovarios. Adicionalmente, de acuerdo con la presente invención el receptor TR4 de TRAIL ha mostrado que se expresa en tejido tumoral mamario primario, de colon, de pulmón y de estómago. (Véase el Ejemplo 9). Por tanto, en realizaciones muy preferidas, los anticuerpos de la invención que se unen a TR4 y estimulan la apoptosis de las células que expresan TR4 se usan para tratar el cáncer de pulmón. En otras realizaciones muy preferidas, los anticuerpos de la invención que se unen a TR4 y estimulan la apoptosis de las células que expresan TR4 se usan para tratar el cáncer de vejiga urinaria. En otras realizaciones muy preferidas, los anticuerpos de la invención que se unen a TR4 y estimulan la apoptosis de las células que expresan TR4 se usan para tratar el cáncer de ovarios. En otras realizaciones muy preferidas, los anticuerpos de la invención que se unen a TR4 y estimulan la apoptosis de las células que expresan TR4 se usan para tratar el cáncer de mama. En otras realizaciones muy preferidas, los anticuerpos de la invención que se unen a TR4 y estimulan la apoptosis de las células que expresan TR4 se usan para tratar el cáncer de colon y/o el cáncer colorrectal. En otras realizaciones muy preferidas, los anticuerpos de la invención que se unen a TR4 y estimulan la apoptosis de las células que expresan TR4 se usan para tratar el cáncer de estómago.
- En realizaciones muy preferidas, los anticuerpos de la invención que se unen a TR4 y estimulan la apoptosis de las células que expresan TR4 se usan para tratar, prevenir o mejorar cáncer renal, melanoma, cáncer de páncreas y cánceres de hígado, tales como hepatomas.
- En otra realización, los anticuerpos de la invención que se unen a TR4 y estimulan la apoptosis de las células que expresan TR4 se usan para tratar enfermedades y/o trastornos asociados con un incremento de la supervivencia celular o la inhibición de la apoptosis, incluyendo cánceres (tales como linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones en p53 y tumores dependientes de hormonas, incluyendo, entre otros, cáncer de colon, tumores cardíacos, cáncer de páncreas, melanoma, retinoblastoma, glioblastoma, cáncer de pulmón, cáncer intestinal, cáncer testicular, cáncer de estómago, neuroblastoma, mixoma, mioma, linfoma, endotelioma, osteoblastoma, osteoclastoma, osteosarcoma, condrosarcoma, adenoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, sarcoma de Kaposi y cáncer de ovarios); trastornos autoinmunitarios (tal como esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, tiroiditis de Hashimoto, cirrosis biliar, enfermedad de Behcet, enfermedad de Crohn, polimiositis, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide por glomerulonefritis relacionada con el sistema inmunitario) e infecciones virales (tales como virus de herpes, virus de la viruela y adenovirus), enfermedad del injerto contra el huésped, rechazo agudo de un injerto y rechazo crónico de un injerto. En realizaciones preferidas, los anticuerpos y las composiciones de anticuerpo de la invención se usan para inhibir el crecimiento, la progresión y/o la metástasis de los cánceres, en

particular de los indicados en lo que antecede. En realizaciones preferidas, los anticuerpos y las composiciones de anticuerpo de la invención no son hepatotóxicos, *in vitro* o *in vivo*.

Usos terapéuticos adicionales de los anticuerpos

5 En otra realización, la invención proporciona el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención para su uso en un procedimiento de inhibir el crecimiento o matar las células que expresan TR4, comprendiendo el procedimiento, o como alternativa consistiendo el procedimiento en, administrar a un animal en el que se desea dicha inhibición del crecimiento, o muerte, de las células que expresan TR4, el anticuerpo o fragmentos del mismo o el anticuerpo en combinación con otros compuestos terapéuticos tales como agentes quimioterapéuticos en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de las células que expresan TR4 o matarlas.

10 En el presente documento también se describe un procedimiento para potenciar la apoptosis inducida por un ligando de la familia del TNF (especialmente TRAIL (SEC ID N° 66)), que implica administrar a una célula que expresa un polipéptido de TR4 una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención, preferentemente un anticuerpo agonista anti-TR4 capaz de inducir o incrementar la señalización mediada por TR4. Preferentemente, la señalización mediada por TR4 aumenta o es inducida por un anticuerpo de la invención para tratar una enfermedad en la que se exhibe
15 disminución de la apoptosis o disminución de la expresión de citocinas y de moléculas de adhesión.

En el presente documento también se describe un procedimiento para inhibir la apoptosis inducida por un ligando de la familia del TNF (especialmente TRAIL (SEC ID N° 66)), que implica administrar a una célula que expresa un polipéptido de TR4 una cantidad eficaz de un anticuerpo descrito en el presente documento, preferentemente un anticuerpo antagonista anti-TR4 capaz de disminuir la señalización mediada por TR4. Preferentemente, la señalización mediada por TR4 se disminuye para tratar una enfermedad en la que se exhibe incremento de la apoptosis o la expresión de NFκB.
20

Por "agonista" de TR4 se pretende decir compuestos de origen natural y sintéticos capaces de aumentar o potenciar la apoptosis mediada por el receptor de TRAIL. Por "antagonista" de TR4 se pretende decir compuestos de origen natural y sintéticos capaces de inhibir la apoptosis mediada por el receptor de TRAIL. Si cualquier candidato "agonista" o "antagonista" puede potenciar o inhibir, respectivamente, la apoptosis se puede determinar usando ensayos de respuesta celular al ligando/receptor de la familia del TNF conocidos en la técnica, incluyendo los descritos con más detalle a continuación.
25

Los anticuerpos de la invención se pueden usar para tratar, mejorar o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con la expresión y/o la actividad aberrante de TR4 o el ligando de TR4, incluyendo, entre otras una cualquiera o más de las enfermedades, trastornos o afecciones descritas en el presente documento. El tratamiento y/o prevención de enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con la expresión y/o la actividad aberrante de TR4 o la expresión y/o la actividad aberrante del ligando de TR4 incluye, entre otros, aliviar los síntomas asociados con esas enfermedades, trastornos o afecciones. Los anticuerpos de la invención se pueden proporcionar en composiciones farmacéuticamente aceptables como se sabe en la técnica o como se describe en el presente documento.
30
35

Además, los anticuerpos de la presente invención (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo de los mismos) que activan actividades biológicas mediadas por el receptor de TRAIL (p. ej., la inducción de la apoptosis en las células que expresan el receptor de TRAIL) se pueden administrar a un animal para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o trastorno descrito en el presente documento, en particular cánceres y otros trastornos hiperproliferativos. Estos anticuerpos pueden potenciar o activar todas o un subconjunto de las actividades biológicas del receptor de TRAIL, por ejemplo induciendo un cambio conformacional en el receptor de TRAIL. En una realización específica, un anticuerpo de la presente invención que incrementa la actividad de TR4 en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 %, al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos diez veces, al menos veinte veces, al menos cincuenta veces, o al menos cien veces respecto a la actividad de TR4 en ausencia del anticuerpo se administra a un animal para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o trastorno. En otra realización específica, una combinación de anticuerpos, una combinación de fragmentos de anticuerpo o una combinación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que aumentan la actividad de TR4 en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 %, al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos diez veces, al menos veinte veces, al menos cincuenta veces, o al menos cien veces respecto a la actividad de TR4 en ausencia de dichos anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpo, se administra a un animal para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o trastorno.
40
45
50
55

Además, los anticuerpos de la presente invención (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que

consisten en, fragmentos de anticuerpo de los mismos) que activan actividades biológicas mediadas por TR4 (p. ej., la inducción de la apoptosis en las células que expresan TR4) se pueden administrar a un animal para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o trastorno asociado con expresión aberrante de TR4, falta de la función de TR4, expresión aberrante del ligando de TR4 o falta de la función del ligando de TR4. Estos anticuerpos pueden potenciar o activar todas o un subconjunto de las actividades biológicas del receptor de TRAIL, por ejemplo induciendo un cambio conformacional en el receptor de TRAIL. En una realización específica, un anticuerpo de la presente invención que incrementa la actividad de TR4 en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 %, al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos diez veces, al menos veinte veces, al menos cincuenta veces, o al menos cien veces respecto a la actividad de TR4 en ausencia del anticuerpo se administra a un animal para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión aberrante de TR4, la falta de función de TR4, la expresión aberrante del ligando de TR4 o la falta de función del ligando de TR4. En otra realización específica, una combinación de anticuerpos, una combinación de fragmentos de anticuerpo o una combinación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que aumentan la actividad de TR4 en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 %, al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos diez veces, al menos veinte veces, al menos cincuenta veces, o al menos cien veces respecto a la actividad de TR4 en ausencia de dichos anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpo, se administra a un animal para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión aberrante de TR4, la falta de función de TR4 o la expresión aberrante del ligando de TR4 o la falta de función del ligando de TR4.

Los anticuerpos de la presente invención (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo de los mismos) que funcionan como agonistas de un receptor de TRAIL, preferentemente de la transducción de la señal de TR4, se pueden administrar a un animal para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o trastorno asociado con expresión aberrante de TR4, falta de la función de TR4, expresión aberrante del ligando de TR4 o falta de la función del ligando de TR4. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención que imitan la acción de la unión de TRAIL a TR4, completamente o en parte, agonistas de TR4, se pueden administrar a un animal para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o trastorno asociado con expresión aberrante de TR4, falta de la función de TR4, expresión aberrante del ligando de TR4 o falta de la función del ligando de TR4. Como ejemplo alternativo, los anticuerpos descritos en el presente documento que alteran o impiden la interacción entre TR4 y su ligando o inhiben, reducen o evitan la transducción de la señal a través de TR4 se pueden administrar a un animal para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o trastorno asociado con expresión aberrante de TR4, falta de la función de TR4, expresión aberrante del ligando de TR4 o falta de la función del ligando de TR4. Los anticuerpos descritos en el presente documento que no impiden la unión de TR4 a su ligando pero inhiben o regulan por disminución la transducción de la señal a través de TR4 se pueden administrar a un animal para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o trastorno asociado con expresión aberrante de TR4, falta de la función de TR4, expresión aberrante del ligando de TR4 o falta de la función del ligando de TR4. La capacidad de un anticuerpo de la invención para potenciar, inhibir, regular por aumento o regular por disminución la transducción de la señal de TR4 se puede determinar mediante técnicas descritas en el presente documento o, por otro lado, conocidas en la técnica. Por ejemplo, la activación del receptor inducida por TRAIL y la activación de moléculas de señalización se pueden determinar detectando la asociación de proteínas adaptadoras tales como FADD y TRADD con TR4, mediante inmunoprecipitación seguida por análisis de transferencia de tipo western (por ejemplo, como se describe en el presente documento).

Además, los anticuerpos de la presente invención (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo de los mismos) que activan actividades biológicas mediadas por TR4 (p. ej., la inducción de la apoptosis en las células que expresan TR4) se pueden administrar a un animal para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o trastorno asociado con expresión aberrante de TR4, falta de la función de TR4, expresión aberrante del ligando de TR4 o falta de la función del ligando de TR4. Estos anticuerpos pueden potenciar o activar todas o un subconjunto de las actividades biológicas del receptor de TRAIL, por ejemplo induciendo un cambio conformacional en el receptor de TRAIL. En una realización específica, un anticuerpo de la presente invención que incrementa la actividad de TR4 en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 %, al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos diez veces, al menos veinte veces, al menos cincuenta veces, o al menos cien veces respecto a la actividad de TR4 en ausencia del anticuerpo se administra a un animal para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión aberrante de TR4, la falta de función de TR4, la expresión aberrante del ligando de TR4 o la falta de función del ligando de TR4. En otra realización específica, una combinación de anticuerpos, una combinación de fragmentos de anticuerpo o una combinación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que aumentan la actividad de TR4 en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al

menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 %, al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos diez veces, al menos veinte veces, al menos cincuenta veces, o al menos cien veces respecto a la actividad de TR4 en ausencia de dichos anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpo, se administra a un animal para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión aberrante de TR4, la falta de función de TR4 o la expresión aberrante del ligando de TR4 o la falta de función del ligando de TR4.

En un ejemplo específico, un anticuerpo descrito en el presente documento (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo o variantes del mismo) que inhibe o regula por disminución, completa o parcialmente, la actividad de TR4 (p. ej., estimulación de la apoptosis) en al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 60 %, al menos un 50 %, al menos un 45 %, al menos un 40 %, al menos un 35 %, al menos un 30 %, al menos un 25 %, al menos un 20 %, o al menos un 10 % respecto a la actividad de TR4 en ausencia del anticuerpo se administra a un animal para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o trastorno asociado con expresión aberrante de TR4, función excesiva de TR4, expresión aberrante del ligando de TR4 o función excesiva del ligando de TR4. En otro ejemplo, una combinación de anticuerpos, una combinación de fragmentos de anticuerpo, una combinación de variantes de anticuerpos o una combinación de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y/o variantes que inhiben o regulan por disminución la actividad de TR4 en al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 65 %, al menos un 60 %, al menos un 55 %, al menos un 50 %, al menos un 45 %, al menos un 40 %, al menos un 35 %, al menos un 30 %, al menos un 25 %, al menos un 20% o al menos un 10% respecto a la actividad de TR4 en ausencia de dichos anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y/o variantes de anticuerpos, se administra a un animal para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o trastorno asociado con expresión aberrante de TR4, función excesiva de TR4, expresión aberrante del ligando de TR4 o función excesiva del ligando de TR4.

En un ejemplo, las composiciones terapéuticas o farmacéuticas descritas en el presente documento se administran a un animal para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o trastorno asociado con un incremento de la apoptosis incluyendo, entre otros, SIDA, trastornos neurodegenerativos (tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, degeneración cerebelosa), síndromes mielodisplásicos (tales como anemia aplásica), lesión isquémica (tal como la causada por infarto de miocardio, ictus y lesión por reperfusión), enfermedad hepática inducida por toxina (tal como la causada por el alcohol), shock séptico, caquexia y anorexia. En otro caso, las composiciones terapéuticas o farmacéuticas descritas en el presente documento se administran a un animal para tratar, prevenir o mejorar una insuficiencia de la médula ósea, por ejemplo anemia aplásica y el síndrome mielodisplásico.

Las composiciones terapéuticas o farmacéuticas descritas en el presente documento también se pueden administrar para tratar, prevenir o mejorar el rechazo de un órgano o la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) y/o afecciones asociadas con estas. El rechazo de órganos se produce por la destrucción de las células inmunitarias huésped de tejido transplantado a través de una respuesta inmunitaria. De un modo similar, una respuesta inmunitaria también está implicada en el EICH pero, en este caso, las células inmunitarias transplantadas extrañas destruyen los tejidos del huésped. La muerte celular inducida por las funciones efectoras de las células inmunitarias es una muerte apoptótica. Por tanto, la administración de los anticuerpos descritos en el presente documento (p. ej., los que inhiben la apoptosis) puede ser un tratamiento eficaz en la prevención del rechazo de órganos o la EICH.

En otra realización, las composiciones terapéuticas o farmacéuticas descritas en el presente documento se administran a un animal para tratar, prevenir o mejorar enfermedades infecciosas. Las enfermedades infecciosas incluyen enfermedades asociadas con infecciones por levaduras, hongos, virus y bacterias. Los virus asociados con infecciones virales que se pueden tratar o prevenir de acuerdo con la presente invención incluyen, entre otros, retrovirus (p. ej., el virus linfotrófico de linfocitos T humanos (HTLV) tipos I y II y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), los virus de herpes (p. ej., el virus del herpes simple (VHS) tipos I y II, el virus de Epstein-Barr, HHV6- HHV8 y el citomegalovirus), arnavirus (p. ej., el virus de la fiebre de lassa), paramixovirus (p. ej., virus morbilivirus, virus sincitial respiratorio humano, sarampión y neumovirus), adenovirus, bunyavirus (p. ej., hantavirus), coronavirus, filovirus (p. ej., el virus de Ébola), flavivirus (p. ej., el virus de la hepatitis C (VHC), el virus de la fiebre amarilla y el virus de la encefalitis japonesa), hepadnavirus (p. ej., los virus de la hepatitis B (VHB)), ortomiovirus (p. ej., los virus de la gripe A, B y C), papovavirus (p. ej., papilomavirus), picornavirus (p. ej., rinovirus, enterovirus y virus de la hepatitis A), virus de la viruela, reoviruses (p. ej., rotavirus), togavirus (p. ej., el virus de la rubéola), rhabdoviruses (p. ej., el virus de la rabia). Patógenos microbianos asociados con infecciones bacterianas incluyen, entre otros, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter (Vibrio) fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Treponema caratenum*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira icterohemorrhagiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis carinii*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma spp.*, *Rickettsia prowazeki*, *Rickettsia*

tsutsugumushi, Chlamydia spp. y Helicobacter pylori.

En otro ejemplo, los anticuerpos y las composiciones de anticuerpos descritos en el presente documento se usan para tratar, prevenir o mejorar enfermedades asociadas con un incremento de la apoptosis incluyendo, entre otros, SIDA, trastornos neurodegenerativos (tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, degeneración cerebelosa), tumores cerebrales o enfermedades asociadas con priones, trastornos autoinmunitarios (tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, tiroiditis de Hashimoto, cirrosis biliar, enfermedad de Behcet, enfermedad de Crohn, polimiositis, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis relacionado con el sistema inmunitario y artritis reumatoide), síndromes mielodisplásicos (tales como anemia aplásica), enfermedad del inherto contra el huésped, lesión isquémica (tal como la causada por infarto de miocardio, ictus y lesión por reperfusión), lesión hepática (p. ej., lesión hepática relacionada con hepatitis, lesión por isquemia/reperfusión, colestosis (lesión del conducto colédoco) y cáncer hepático); enfermedad hepática inducida por toxinas (tal como la causada por el alcohol), shock séptico, caquexia y anorexia. En ejemplos preferidos, los anticuerpos antagonistas anti-TR4 impiden la unión de TRAIL a los receptores de TRAIL a los que están unidos los anticuerpos pero no translucen la señal biológica que da lugar a la apoptosis) se usan para tratar las enfermedades y trastornos indicados en lo que anteceden.

Muchas de las patologías asociadas con el VIH están mediadas por la apoptosis, incluyendo nefropatía inducida por VIH y encefalitis por VIH. Por tanto, en ejemplos preferidos adicionales, los anticuerpos, preferentemente anticuerpos antagonistas anti-TR4, descritos en el presente documento se usan para tratar el SIDA y las enfermedades asociadas con el SIDA. En el presente documento también se describe el uso de anticuerpos para reducir la muerte mediada por TRAIL de los linfocitos T en pacientes infectados por VIH.

En ejemplos adicionales, los anticuerpos descritos en el presente documento, en particular los anticuerpos antagonistas anti-TR4, se administran en combinación con otros inhibidores de la apoptosis de los linfocitos T. Por ejemplo, se ha implicado a la apoptosis mediada por Fas en la pérdida de linfocitos T en individuos con VIH (Katsikis y col., J. Exp. Med. 181:2029-2036, 1995). Por tanto, un paciente susceptible a la muerte de los linfocitos T mediada por el ligando Fas y mediada por TRAIL puede tratarse con un agente que bloquea las interacciones TRAIL/TR4 y un agente que bloquea las interacciones ligando Fas/Fas. Agentes adecuados para bloquear la unión del ligando de Fas a Fas incluyen, entre otros, polipéptidos de Fas solubles, formas multiméricas de los polipéptidos de Fas solubles (p.ej., dímeros de sFas/Fc); anticuerpos anti-Fas que se unen a Fas son transducir la señal biológica que tienen como resultado apoptosis; anticuerpos anti-ligando de Fas que bloquean la unión del ligando de Fas a Fas; y muteínas del ligando de Fas que se unen a Fas pero que no transducen la señal biológica que tiene como resultado la apoptosis. Preferentemente, los anticuerpos usados de acuerdo con este procedimiento son anticuerpos monoclonales. Ejemplos de agentes adecuados para bloquear las interacciones ligando de Fas/Fas, incluyendo el bloqueo de los anticuerpos monoclonales anti-Fas, se describen en la publicación de solicitud internacional número WO 95/10540.

Los agentes adecuados, que también bloquean la unión de TRAIL a TR4, que se pueden administrar con los anticuerpos de la presente invención incluyen, entre otros, polipéptidos de TR4 solubles (p. ej., una forma soluble de OPG, TR5 (publicación de solicitud internacional número WO 98/30693); una forma soluble de TR4 (publicación de solicitud internacional número WO 98/32856); TR7/DR5 (publicación de solicitud internacional número WO 98/41629); y TR10 (publicación de solicitud internacional número WO 98/54202)); formas multiméricas de polipéptidos de TR4 solubles y anticuerpos frente a TR4 que se unen a TR4 sin transducir la señal biológica que tiene como resultado la apoptosis; anticuerpos anti-TRAIL que bloquean la unión de TRAIL a uno o más receptores de TRAIL y muteínas de TRAIL que se unen a receptores de TRAIL pero que no transducen la señal biológica que tiene como resultado la apoptosis.

En el rechazo de un aloinjerto, el sistema inmunitario del animal receptor no se ha sensibilizado anteriormente para responder porque el sistema inmunitario, en su mayor parte, solo está sensibilizado a antígenos ambientales. Los tejidos de otros miembros de la misma especie no se han presentado del mismo modo que, por ejemplo, virus y bacterias. En el caso del rechazo del aloinjerto, se han diseñado regímenes inmunosupresores para evitar que el sistema inmunitario alcance la etapa efectora. No obstante, el perfil inmunitario del rechazo de un xenoinjerto puede ser similar a la recurrencia de la enfermedad más que al rechazo del aloinjerto. En el caso de recurrencia de la enfermedad, el sistema inmunitario ya se ha activado, como pone de manifiesto la destrucción de las células de los islotes nativos. Por tanto, en la recurrencia de la enfermedad, el sistema inmunitario ya está en la etapa efectora. Los anticuerpos de la presente invención (p. ej., anticuerpos agonistas de la invención) pueden suprimir la respuesta inmunitaria a los aloinjertos y a los xenoinjertos porque los linfocitos activados y diferenciados en células efectoras expresarán los polipéptidos TR4 y, por tanto, son susceptibles a los compuestos que potencian la apoptosis. Por tanto, la presente invención proporciona además un procedimiento para crear tejidos inmunitarios privilegiados. Los anticuerpos antagonistas descritos en el presente documento también se pueden usar en el tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria.

Los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención pueden ser útiles para tratar enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide, osteoartritis, psoriasis, septicemia y enfermedad intestinal inflamatoria.

Además, debido a la expresión en linfoblastos de los polipéptidos de TR4, los anticuerpos y las composiciones de

anticuerpos de la invención se pueden usar para tratar esta forma de cáncer. Además, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se pueden usar para tratar varias formas crónicas y agudas de inflamación, tales como artritis reumatoide, osteoartritis, psoriasis, septicemia y enfermedad intestinal inflamatoria.

5 En una realización, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se pueden usar para tratar trastornos cardiovasculares, incluyendo la enfermedad arterial periférica, tal como la isquemia de las extremidades.

10 Las enfermedades cardiovasculares incluyen, entre otras, anomalías cardiovasculares tales como fístula arterioarterial, fistulas arteriovenosas, malformaciones arteriovenosas cerebrales, defectos cardíacos congénitos, atresia pulmonar y síndrome de la cimitarra. Defectos cardíacos congénitos incluyen coartación aórtica, cor triatriatum, anomalías de los vasos coronarios, corazón entrecruzado, dextrocardia, conducto arterial persistente, anomalía de Ebstein, complejo de Eisenmenger, síndrome del corazón izquierdo hipoplástico, levocardia, tetralogía de Fallot, transposición de grandes vasos, doble salida del ventrículo derecho, atresia de la tricúspide, tronco arterial persistente y defectos septales cardíacos, tales como defecto septal aortopulmonar, defectos de la almohadilla endocardial, síndrome de Lutembacher, trilogía de Fallot, defectos septales cardíacos ventriculares.

15 Las enfermedades cardiovasculares incluyen enfermedad cardíaca, tales como arritmias, enfermedad cardíaca carcinoide, gasto cardíaco elevado, gasto cardíaco bajo, taponamiento cardíaco, endocarditis (incluyendo la bacteriana), aneurisma cardíaco, parada cardíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, miocardiopatía congestiva, disnea paroxística, edema cardíaco, hipertrofia cardíaca, miocardiopatía congestiva, hipertrofia del ventrículo izquierdo, hipertrofia del ventrículo derecho, rotura cardíaca postinfarto, rotura del tabique ventricular, enfermedades de las válvulas cardíacas, enfermedades del miocardio, isquemia miocárdica, derrame pericárdico, pericarditis (incluyendo constrictiva y tuberculosa), neumopericardio, síndrome pospericardiotomía, enfermedad cardíaca pulmonar, enfermedad cardíaca reumática, disfunción ventricular, hiperemia, complicaciones cardiovasculares de la gestación, síndrome de la cimitarra, sífilis cardiovascular y tuberculosis cardiovascular.

20 Arritmias incluyen arritmia sinusal, fibrilación auricular, aleteo auricular, bradicardia, extrasístole, síndrome de Adams-Stokes, bloqueo de rama, bloqueo senoauricular, síndrome del QT largo, parasístole, síndrome de Lown-Ganong-Levine, síndrome de preexcitación de tipo Mahaim, síndrome de Wolff-Parkinson-White, síndrome del seno enfermo, taquicardias y fibrilación ventricular. Taquicardias incluyen taquicardia paroxística, taquicardia supraventricular, ritmo idioventricular acelerado, taquicardia de reentrada nodal auriculoventricular, taquicardia auricular ectópica, taquicardia ectópica de la unión, taquicardia de reentrada nodal senoauricular, taquicardia sinusal, Torsades de Pointes y taquicardia ventricular.

30 Valvulopatías cardíacas incluyen insuficiencia de la válvula aórtica, estenosis de la válvula aórtica, soplos cardíacos, prolapso de la válvula aórtica, prolapso de la válvula mitral, prolapso de la válvula tricúspide, insuficiencia de la válvula mitral, estenosis de la válvula mitral, atresia pulmonar, insuficiencia de la válvula pulmonar, estenosis de la válvula pulmonar, atresia de la tricúspide, insuficiencia de la válvula tricúspide y estenosis de la válvula tricúspide.

35 Enfermedades del miocardio incluyen miocardiopatía alcohólica, miocardiopatía congestiva, miocardiopatía hipertrofica, estenosis subvalvular aórtica, estenosis subvalvular pulmonar, miocardiopatía restrictiva, miocardiopatía de Chagas, fibroelastosis endocárdica, fibrosis endomiocárdica, síndrome de Kearns, lesión por reperfusión del miocardio y miocarditis.

40 Isquemias miocárdicas incluyen enfermedad coronaria, tal como angina de pecho, aneurisma coronaria, arteriosclerosis coronaria, trombosis coronaria, vasoespasmo coronario, infarto de miocardio y aturdimiento miocárdico.

45 Las enfermedades cardiovasculares también incluyen enfermedades vasculares tales como aneurismas, angiodisplasia, angiomatosis, angiomatosis bacilar, enfermedad de Hippel-Lindau, síndrome de Klippel-Trenaunay-Weber, síndrome de Sturge-Weber, edema angioneurótico, enfermedades aórticas, arteritis de Takayasu, aortitis, síndrome de Leriche, enfermedades oclusivas arteriales, arteritis, enarteritis, poliarteritis nodosa, trastornos cerebrovasculares, angiopatías diabéticas, retinopatía diabética, embolias, trombosis, eritromegalga, hemorroides, enfermedad venooclusiva hepática, hipertensión, hipotensión, isquemia, enfermedades vasculares periféricas, flebitis, enfermedad venooclusiva pulmonar, enfermedad de Raynaud, síndrome de CREST, oclusión de la vena retiniana, síndrome de la cimitarra, síndrome de la vena cava superior, telangiectasia, telangiectasia ataxia, telangiectasia hemorrágica hereditaria, varicocele, venas varicosas, úlcera varicosa, vasculitis e insuficiencia venosa.

50 Los aneurismas incluyen aneurismas disecantes, falsos aneurismas, aneurismas infectados, rotura de aneurisma, aneurismas aórticos, aneurismas cerebrales, aneurismas coronarios, aneurismas cardíacos y aneurismas ilíacos.

55 Las enfermedades oclusivas arteriales incluyen arteriosclerosis, claudicación intermitente, estenosis de las carótidas, displasias fibromusculares, oclusión vascular mesentérica, enfermedad de Moyamoya, obstrucción de las arterias renales, oclusión de las arterias retinianas y tromboangitis ocluyente.

Los trastornos cerebrovasculares incluyen enfermedades de las arterias carótidas, angiopatía amiloide cerebral, aneurisma cerebral, anoxia cerebral, arteriosclerosis cerebral, malformación arteriovenosa cerebral, enfermedades

de las arterias cerebrales, embolia y trombosis cerebral, trombosis de las arterias carótidas, trombosis sinusal, síndrome de Wallenberg, hemorragia cerebral, hematoma epidural, hematoma subdural, hemorragia subaracnoidea, infarto cerebral, isquemia cerebral (incluyendo transitoria), síndrome de robo de la subclavia, leucomalazia periventricular, cefalea vascular, cefalea en racimos, migraña e insuficiencia vertebrobasilar.

- 5 Embolias incluyen embolias gaseosas, embolias de líquido amniótico, embolia de colesterol, síndrome del pie azul, embolias grasas, embolias pulmonares y tromboembolias. Trombosis incluyen trombosis coronarias, trombosis de las venas hepáticas, oclusión de la vena retiniana, trombosis de las arterias carótidas, trombosis sinusal, síndrome de Wallenberg y tromboflebitis.

- 10 Isquemia incluye isquemia cerebral, colitis isquémica, síndromes compartimentales, síndrome del compartimento anterior, isquemia miocárdica, lesiones por reperfusión e isquemia de las extremidades periféricas. Las vasculitis incluyen aortitis, arteritis, síndrome de Behcet, síndrome de Churg-Strauss, síndrome de los ganglios linfáticos mucocutáneos, tromboangiitis obliterante, vasculitis por hipersensibilidad, púrpura de Schoenlein-Henoch, vasculitis cutánea alérgica y granulomatosis de Wegener.

- 15 En un ejemplo, los anticuerpos y composiciones de anticuerpo descritos en el presente documento se usan para tratar microangiopatías trombóticas. Uno de estos trastornos es la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) (Kwaan, H.C., Semin. Hematol. 24:71 (1987); Thompson y col., Blood 80:1890 (1992)). Los Centros para el Control de Enfermedades de EE.UU. han notificado tasas crecientes de mortalidad asociada con la PTT (Torok y col., Am. J. Hematol. 50:84 (1995)). El plasma de pacientes afectados por PTT (incluidos pacientes VIH+ y VIH-) induce apoptosis de las células endoteliales humanas de origen microvascular dérmico, pero no de origen en vasos grandes (Laurence y col., Blood 87:3245 (1996)). Por tanto, se piensa que el plasma de pacientes con PTT contiene uno o más factores que inducen directa o indirectamente apoptosis. Como se describe en la aplicación de patente internacional número WO 97/01715, TRAIL está presente en el suero de pacientes con PTT y es probable que desempeñe un papel en la inducción de apoptosis de las células endoteliales microvasculares. Otra microangiopatía trombótica es el síndrome urémico hemolítico (HUS) (Moake, J.L., Lancet, 343:393 (1994); Melnyk y col., (Arch. Intern. Med., 155:2077 (1995); Thompson y col., *anteriormente*). Por tanto, en un ejemplo, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos descritos en el presente documento se usan para tratar la afección que a menudo se denomina "HUS del adulto" (aunque también puede afectar a niños). Un trastorno conocido como HUS asociado con la infancia/diarrea difiere en cuanto a la etiología del HUS del adulto. EN otro ejemplo, las afecciones caracterizados por la coagulación de vasos sanguíneos pequeños se pueden tratar usando anticuerpos y composiciones de anticuerpos descritos en el presente documento. Dichas afecciones incluyen, entre otras, las descritas en el presente documento. Por ejemplo, se cree que los problemas cardíacos observados en aproximadamente 5-10% de los pacientes de SIDA pediátricos implica la coagulación de vasos sanguíneos pequeños. La degradación de la microvasculatura en el corazón se ha notificado en pacientes de esclerosis múltiple. Como ejemplo adicional, se contempla el tratamiento del lupus eritematoso sistémico (LES). En un ejemplo, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos descritos en el presente documento, preferentemente anticuerpos antagonistas anti-TR4 descritos en el presente documento, se pueden administrar *in vivo* a un paciente afectado por microangiopatía trombótica. Por tanto, en el presente documento se describe un procedimiento para tratar una microangiopatía trombótica que implica el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo o una composición de anticuerpo descrito en el presente documento.

- 40 Los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se pueden usar en combinación con otros agentes útiles en el tratamiento de un trastorno concreto. Por ejemplo, en un estudio *in vitro* notificado por Laurence y col., (Blood 87:3245 (1996)), se consiguió alguna reducción de la apoptosis mediada por plasma de PTT de las células endoteliales microvasculares usando un anticuerpo de bloqueo anti-Fas, ácido aurintricarboxílico o plasma normal sin crioprecipitado. Por tanto, se puede tratar a un paciente con un anticuerpo o composición de anticuerpo de la invención en combinación con un agente que inhibe la apoptosis mediada por el ligando Fas de células endoteliales, tales como, por ejemplo, un agente descrito en lo que antecede. En una realización, los anticuerpos de la invención y un anticuerpo de bloqueo anti-FAS se administran a un paciente afectado por un trastorno caracterizado por microangiopatía trombótica, tal como PTT o HUS. Ejemplos de anticuerpos monoclonales bloqueantes dirigidos contra el antígeno Fas (CD95) se describen en la publicación de solicitud de patente internacional número WO 95/10540.

- 55 El equilibrio natural entre estimuladores e inhibidores endógenos de la angiogénesis es uno en el que predominan las influencias inhibitoras (Rastinejad y col., Cell 56:345-355 (1989)). En los raros casos en los que se produce neovascularización en condiciones fisiológicas normales, como cicatrización de heridas, regeneración de órganos, desarrollo embrionario y procesos reproductores femeninos, la angiogénesis está rigurosamente regulada y delimitada en el espacio y en el tiempo. En condiciones de angiogénesis patológica tales como las que caracterizan el crecimiento de un tumor sólido, estos controles reguladores fallan. La angiogénesis regulada por incremento se convierte en patológica y mantiene la progresión de muchas enfermedades neoplásicas y no neoplásicas. Una serie de enfermedades graves están dominadas por una neovascularización anormal, incluyendo el crecimiento de tumores sólidos y metástasis, artritis, algunos tipos de trastornos oculares y psoriasis. Véase, por ejemplo, las revisiones de Moses y col., Biotech. 9:710-714 (1991); Folkman y col., N. Engl. J. Med., 353:1757-1771 (1995); Auerbach y col., J. Microvasc. Res. 29:401-411 (1985); Folkman, Advances in Cancer Research, eds. Klein y Weinhouse, Academic Press, New York, pág. 175-203 (1985); Patz, Am. J. Ophthalmol. 94:715-743 (1982); y

Folkman y col., Science 221:719-725 (1983). En una serie de afecciones patológicas, el proceso de angiogénesis contribuye al estado de enfermedad. Por ejemplo, se han acumulado datos significativos que sugieren que el crecimiento de tumores sólidos depende de la angiogénesis. Folkman y Klagsbrun, Science 235:442-447 (1987).

5 La presente invención proporciona el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con neovascularización mediante la administración de un anticuerpo o composiciones de anticuerpos de la invención. Las afecciones malignas y metastásicas que se pueden tratar con los polinucleótidos y polipéptidos de la invención incluyen, entre otras, las neoplasias malignas, tumores sólidos y cánceres descritos en el presente documento y otros conocidos en la técnica (para una revisión de estos trastornos, véase Fishman y col., Medicine, 2ª Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia (1985)).

10 Adicionalmente, los trastornos oculares asociados con la neovascularización que se pueden tratar con un anticuerpo o composición de anticuerpos de la invención incluyen, entre otros: glaucoma neovascular, retinopatía diabética, retinoblastoma, fibroplasia retrolental, uveítis, retinopatía de prematuridad, degeneración macular, neovascularización de injertos corneales, así como otras enfermedades inflamatorias, tumores oculares y enfermedades asociadas con neovascularización de la coroides o del iris. Véase, por ejemplo, las revisiones de
15 Waltman y col., Am. J. Ophthal. 85:704-710 (1978) and Gartner y col., Surv. Ophthal. 22:291-312 (1978).

Adicionalmente, trastornos que se pueden tratar con un anticuerpo o composición de anticuerpo de la invención incluyen, entre otros, hemangioma, artritis, psoriasis, angiofibroma, placas ateroscleróticas, cicatrización retardada de heridas, granulaciones, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, fracturas sin unión, síndrome de Osler-Weber, granuloma piogénico, esclerodermia, tracoma y adherencias vasculares.

20 Los anticuerpos y las composiciones de anticuerpos de la invención son útiles en el diagnóstico y el tratamiento o prevención de una amplia gama de enfermedades y/o afecciones. Dichas enfermedades y afecciones incluyen, entre otros, cáncer (p. ej., cánceres relacionados con células inmunitarias, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, linfoma folicular, cáncer asociado con mutaciones o alternaciones de p53, tumor cerebral, cáncer de vejiga urinaria, cáncer uterocervical, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma pulmonar amicrocítico, carcinoma pulmonar microcítico, cáncer de estómago etc.), trastornos linfoproliferativos (p. ej., linfadenopatía), infección microbiana (p. ej., viral, bacteriana, etc.) (p. ej., infección por VIH-1, infección por VIH-2, infección por virus herpes (incluyendo, entre otros HSV-1, HSV-2, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7, EBV), infección por adenovirus , infección por el virus de la viruela, infección por el virus del papiloma humano, infección por hepatitis (p. ej., VHA, VHB, VHC, etc.), infección por *Helicobacter pylori*, estafilococos invasivos etc.), infección por parásitos, nefritis, enfermedad ósea (p.
25 ej., osteoporosis), aterosclerosis, dolor, trastornos cardiovasculares (p. ej., neovascularización, hipovascularización o circulación reducida (p. ej., enfermedad isquémica (p. ej., infarto de miocardio, ictus, etc.))), SIDA, alergia, inflamación, enfermedad neurodegenerativa (p. ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentaria, degeneración cerebelosa, etc.), rechazo de injerto (agudo o crónico), enfermedad del injerto contral el huésped, enfermedades causadas por osteomiéldisplasia (p. ej., anemia aplásica, etc.), destrucción de tejido articular en reumatismo, enfermedad hepática (p. ej., hepatitis crónica y aguda, lesión hepática y cirrosis), enfermedad autoinmunitaria (p. ej., esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (SLPA), glomerulonefritis por complejo inmunitario, diabetes autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, etc.), miocardiopatía (p. ej., miocardiopatía dilatada), diabetes, complicaciones diabéticas (p. ej., nefropatía diabética, retinopatía diabética), gripe, asma, psoriasis, glomerulonefritis, shock séptico y colitis ulcerosa.
30
35
40

Los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención son útiles en la estimulación de la angiogénesis, cicatrización de heridas (p. ej., heridas, quemaduras y fracturas óseas).

Los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención también son útiles como adyuvantes para potenciar la capacidad de respuesta inmunitaria a un antígeno específico, tal como en respuestas inmunitarias antivirales.

45 Más en general, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención son útiles en la regulación (es decir, elevar o reducir) la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención pueden ser útiles en la preparación o recuperación de cirugía, traumatismo, radioterapia, quimioterapia y trasplante, pueden usarse para reforzar la respuesta inmunitaria y/o recuperación en ancianos e individuos inmunocomprometidos. Como alternativa, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención son útiles
50 como agentes inmunosupresores en, por ejemplo, el tratamiento o prevención de trastornos autoinmunitarios. En realizaciones específicas, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se usan para tratar o prevenir afecciones inflamatorias, alérgicas o autoinmunitarias crónicas, tales como las descritas en el presente documento o, por otro lado, como las conocidas en la técnica.

Administración y composiciones terapéuticas/profilácticas

55 La invención proporciona tratamiento, inhibición y profilaxis mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de anticuerpo (o fragmento del mismo) o composición farmacéutica de la invención, preferentemente un anticuerpo de la invención. En un aspecto preferido, un anticuerpo o fragmento del mismo está sustancialmente purificado (es decir carece sustancialmente de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no

deseados). Preferentemente, el sujeto es un animal, incluyendo, entre otros, animales tales como vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros etc. y, preferentemente, es un mamífero y, más preferentemente, un ser humano.

5 Anteriormente se han descrito formulaciones y procedimientos de administración que se pueden usar cuando el compuesto comprende un ácido nucleico o una inmunoglobulina; formulaciones y vías de administración adecuadas adicionales se pueden seleccionar de entre las descritas en el presente documento más adelante.

10 Se conocen varios sistemas de liberación y se pueden usar para administrar un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención, por ejemplo encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu, y Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un retrovirus u otro vector etc. Los procedimientos de introducción incluyen, entre otros, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Las composiciones se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica u oral. Además, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, incluida la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo fijado a un depósito, tal como un depósito de Ommaya. La administración pulmonar también se puede emplear mediante, por ejemplo, el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente formador de aerosoles.

20 En una realización específica puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en el área que necesite tratamiento, esto se puede conseguir mediante, por ejemplo y sin limitaciones, infusión local durante cirugía, aplicación tópica, por ejemplo junto con un vendaje para heridas después de cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, o por medio de un supositorio o por medio de un implante, siendo dicho implante un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluidas membranas, tales como membranas sialísticas o fibras. Preferentemente, cuando se administra una proteína, incluido un anticuerpo, de la invención se deben tomar precauciones para usar materiales que no absorban la proteína.

25 En otra realización, la composición puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, Science 249: 1527-1535 (1990); Treat, y col., en liposomes in the therapy of infectious disease and cancer, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pág. 3-327; véase, en general, *ibid.*)

30 En otra realización más, la composición puede administrarse mediante un sistema de liberación controlada. En una realización se puede usar una bomba (véase, Langer, ant.; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed Eng. 14:20 1 (1987); Buchwald, y col., Surgery 88:507 (1980); Saudek, y col., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:71 (1983); see also Levy y col., Science 228:190 (1985); During y col., Ann. Neurol. 25:35 1 (1989); Howard y col., J. Neurosurg. 7 1:105 (1989)). En otra realización, un sistema de liberación controlada se puede colocar cerca de la diana terapéutica, es decir el cerebro, de modo que sólo se requiera una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pág. 115-138 (1984)).

Otros sistemas de liberación controlada se tratan en la recapitulación de Langer (Science 249:1527-1535 (1990)).

45 En una realización específica en la que la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica una proteína, el ácido nucleico se puede administrar in vivo para estimular la expresión de su proteína codificada, construyéndola como parte de un vector de expresión de ácido nucleico adecuado y administrarla de modo que pase a ser intracelular, por ejemplo mediante el uso de un vector retroviral (véase la patente de EE.UU. nº 4.980.286) o mediante inyección directa o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (p. ej., una pistola génica; Biolistic, Dupont), o revistiendo con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o mediante administración en unión con un péptido similar a la homeocaja que se sabe que entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot y col., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868 (1991)), etc. Como alternativa, un ácido nucleico se puede introducir intracelularmente e incorporar dentro del ADN de la célula huésped para expresión mediante recombinación homóloga.

55 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o que está en la lista de la farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra la terapéutica. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de origen en petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y

similares. Un vehículo preferido es agua, cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Como vehículos líquidos se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada desecada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede también contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes o tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como supositorio, con aglutinantes tradicionales y vehículos, tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos estándar, tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio etc. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de mismo, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma de administración adecuada al paciente. La formulación debe adaptarse al modo de administración.

En una realización preferida, la composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición puede también incluir un agente solubilizante y un anestésico local, tal como lidocaína, para aliviar el dolor en el punto de la inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o mezclados en forma de dosificación unitaria como, por ejemplo, polvo liofilizado seco o concentrado sin agua, en un envase sellado herméticamente, tal como una ampolla o un sobre, indicando la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar con un bote de infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra mediante inyección se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyectables o solución salina de modo que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración.

Las composiciones de la invención se pueden formular como formas salinas o neutras. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico etc., y las formadas con cationes, tales como los que derivan de sodio, potasio, amoníaco, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína etc.

La cantidad de la composición de la invención que será eficaz en el tratamiento, inhibición y prevención de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión aberrante y/o actividad de un polipéptido de la invención se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar. Además, los ensayos *in vitro* pueden emplearse, opcionalmente, para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimos. La dosis precisa que se va a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno y se decidirá de acuerdo con el juicio del médico encargado y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo con modelos animales o *in vitro*.

Para los anticuerpos, la dosificación administrada a un paciente suele ser de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosis administrada a un paciente está entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg de peso corporal del paciente, más preferentemente, de 1 mg/kg a 10 mg/kg del peso corporal del paciente. En general, los anticuerpos humanos tienen una semivida mayor en el cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies, debido a la respuesta inmunitaria a los polipéptidos extraños. Por tanto, a menudo es posible usar dosis menores de anticuerpos humanos y administrar con menor frecuencia. Además, la dosis y la frecuencia de administración de las composiciones terapéuticas o farmacéuticas de la invención se pueden reducir potenciando la captación y la penetración en el tejido (p. ej., en el cerebro) de los anticuerpos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

En general, se prefiere la administración de productos de un origen de especie o reactividad de especie (en el caso de anticuerpos) que es la misma especie que la del paciente. Por tanto, en una realización preferida, los anticuerpos humanos, fragmentos o ácidos nucleicos se administran a un paciente humano para terapia o profilaxis.

Se prefiere usar anticuerpos de inhibición y/o neutralizantes de afinidad alta y/o potente *in vivo* de la invención (incluyendo las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo de los mismos) que se unen inmunespecíficamente a TR4, o polinucleótidos que codifican los anticuerpos que se unen inmunespecíficamente a TR4, para los inmunoensayos y el tratamiento de trastornos relacionados con los polinucleótidos o polipéptidos de TR4, incluidos los fragmentos de los mismos. Preferentemente estos anticuerpos tendrán una afinidad por TR4 y/o fragmentos polipeptídicos de TR4. Afinidades de unión preferidos incluyen aquellas con una constante de disociación o K_D inferior o igual a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M o 10^{-5} M. Más preferentemente, los anticuerpos de la invención se unen a polipéptidos de TR4, o a fragmentos o variantes de los mismos, con una constante de disociación o K_D inferior o igual a 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M o 10^{-8} M. Incluso más preferentemente, los anticuerpos de la invención se unen a polipéptidos de TR4, o a fragmentos o variantes de los mismos, con una constante de disociación o K_D inferior o igual a 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M.

M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M o 10^{-15} M. En una realización preferida, los anticuerpos de la invención inducen apoptosis de las células que expresan TR4.

Como se trata con más detalle a continuación, los anticuerpos de la presente invención se pueden usar solos o en combinación con otras composiciones. Los anticuerpos pueden además condensarse de forma recombinante con un polipéptido heterólogo en el extremo N o el extremo C o conjugarse químicamente (incluidas conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden condensarse de forma recombinante o conjugarse con moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos radionúclidos o toxinas. Véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la patente de EE.UU. Nº 5.314.995; y el documento 396,387.

El anticuerpo y las composiciones de anticuerpo de la invención se pueden administrar solos o en combinación con otros agentes terapéuticos, incluidos, entre otros, agentes quimioterapéuticos, antibióticos, antivirales, agentes antiretrovirales, agentes antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, agentes inmunoterapéuticos convencionales y citocinas. Las combinaciones se pueden administrar de forma concomitante, por ejemplo como una mezcla, por separado pero simultánea o concurrentemente, o de forma secuencial. Esto incluye presentaciones en las que los agentes combinados se administran juntos como mezcla terapéutica y, también, procedimientos en los que los agentes combinados se administran por separado pero de forma simultánea, por ejemplo mediante vías intravenosas separadas en el mismo individuo. La administración "en combinación" incluye además la administración separada de uno de los compuestos o agentes administrados primero, seguido del segundo.

Tratamientos de combinación con anticuerpos anti-TR4, TRAIL y/o agentes quimioterapéuticos

Los anticuerpos anti-TR4 se pueden administrar en combinación con otros anticuerpos anti-TR4, TRAIL y/o quimioterapéuticos.

En realizaciones específicas, un anticuerpo de la invención que se une específicamente a TR4 se usa o se administra en combinación con un segundo anticuerpo que se une específicamente a TR7. En otra realización, los anticuerpos específicos de TR4 y TR7 son anticuerpos agonistas que inducen apoptosis de las células que expresan TR4 (p. ej., células que expresan TR4 y TR7). En una realización específica, la combinación de tratamiento anti-TR4 y de tratamiento anti-TR7 induce más apoptosis de células que expresan TR4 y TR7 que el tratamiento con anticuerpos anti-TR4 o el tratamiento con anticuerpos anti-TR7 por separado. Los anticuerpos anti-TR4 y anti-TR7 se pueden administrar simultáneamente, secuencialmente o una combinación de administración simultánea o secuencial mediante el régimen de dosificación. En otra realización específica, los anticuerpos anti-TR4 y anti-TR7 se usan o administran en combinación con un fármaco quimioterapéutico, tal como los descritos en el presente documento (véase, por ejemplo a continuación y el ejemplo 4). En una realización concreta, la inducción sinérgica de apoptosis como resultado del tratamiento con anticuerpos anti-TR4 y anti-TR7 es más evidente o más pronunciada cuando los anticuerpos anti-TR4 y anti-TR7 se usan o administran en combinación con un agente quimioterapéutico y/o un agente de reticulación.

En una realización preferida, las composiciones de la invención se administran en combinación con un agente quimioterapéutico. Agentes quimioterapéuticos que se pueden administrar con las composiciones de la invención incluyen, entre otros, derivados de antibióticos (p. ej., doxorubicina (adriamicina), bleomicina, daunorubicina y dactinomicina); antiestrógenos (p. ej., tamoxifeno); antimetabolitos (p. ej., fluorouracilo, 5-FU, metotrexato, floxuridina, interferón alfa-2b, ácido glutámico, plicamicina, mercaptopurina y 6-tioguanina); agentes citotóxicos (p. ej., carmustina, BCNU, lomustina, CCNU, citosina arabinósido, ciclofosfamida, estramustina, hidroxiurea, procarbazine, mitomicina, busulfán, cisplatino y vincristina sulfato); hormonas (p. ej., medroxiprogesterona, estramustina fosfato sódico, etinil estradiol, estradiol, acetato de megestrol, metiltestosterona, dietilstilbestrol difosfato, clorotrianiseno y testolactona); derivados de mostaza de nitrógeno (p. ej., megalán, corambucilo, mecloretamina (mostaza de nitrógeno) y tiotepa); esteroides y combinaciones (p. ej., betametasona fosfatos sódico); y otros (p. ej., dicarbazina, asparaginasa, mitotano, vincristina sulfato, vinblastina sulfato, etopósido, Topotecán, 5-Fluorouracilo, paclitaxel (Taxol), Cisplatino, Cytarabina e IFN-gamma, irinotecán (Camptosar, CPT-11), análogos de irinotecán y gemcitabina (GEMZAR™)).

En una realización específica, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) o cualquier combinación de los componentes de CHOP. En otra realización, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con rituximab. En una realización adicional, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran con rituximab y CHOP, o rituximab y cualquier combinación de los componentes de CHOP.

En realizaciones preferidas adicionales, las composiciones de la invención se administran en combinación con polipéptidos de TRAIL o fragmentos o variantes de los mismos, en particular del dominio soluble extracelular de TRAIL.

En una realización, las composiciones de la invención se administran en combinación con otros miembros de la

familia del TNF o anticuerpos específicos de los miembros de la familia del receptor del TNF. TNF, moléculas relacionadas con TNF o similares a TNF que se pueden administrar con las composiciones de la invención incluyen, entre otros, las formas solubles del TNF-alfa, linfoxina-alfa (LT-alfa, también conocido como TNF-beta), LT-beta (encontrado en el heterotrímero complejo LT-alfa 2-beta), OPGL, FasL, CD27L, CD30L, CD40L, 4-1BBL, DcR3, OX40L, TNF-gamma (publicación internacional n° WO 96/14328), TRAIL, AIM-II (publicación internacional n° WO 97/34911), APRIL (J. Exp. Med. 188(6):1185-1190), endoquina-alfa (publicación internacional n° WO 98/07880), TR6 (publicación internacional n° WO 98/18921, OX40 y neuroquina alfa (publicación internacional n° WO 98/18921, OX40, y factor de crecimiento neural (NGF), y formas solubles de Fas, CD30, CD27, CD40 y 4-1BB, TR2 (publicación internacional n° WO 96/34095), DR3 (publicación internacional n° WO 97/35904), TR5 (publicación internacional n° WO 98/30693), TR6 (publicación internacional n° WO 98/30694), TR7 (publicación internacional n° WO 98/41629), TRANK, TR9 (publicación internacional n° WO 98/56892), TR10 (publicación internacional n° WO 98/54202), 312C2 (publicación internacional n° WO 98/06842) y TR12, y formas solubles de CD154, CD70 y CD153.

Terapias de combinación adicionales

En una realización más preferida, el anticuerpo y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con un antipalúdico, metotrexato, anticuerpos anti-TNF, ENBREL™ y/o sulfasalazina. En una realización, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con metotrexato. En otra realización, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con anticuerpos anti-TNF. En otra realización, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con metotrexato y anticuerpos anti-TNF. En otra realización, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con sulfasalazina. En otra realización específica, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con metotrexato, anticuerpos anti-TNF y sulfasalazina. En otra realización, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con ENBREL™. En otra realización, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con ENBREL™ y metotrexato. En otra realización, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con ENBREL™, metotrexato y sulfasalazina. En otra realización, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con ENBREL™, metotrexato y sulfasalazina. En otras realizaciones, uno o más antipalúdicos se combinan con una de las combinaciones citadas en lo que antecede. En una realización específica, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con un antipalúdico (p. ej., hidroxiclороquina), ENBREL™, metotrexato y sulfasalazina. En otra realización específica, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con un antipalúdico (p. ej., hidroxiclороquina), sulfasalazina, anticuerpo anti-TNF y metotrexato.

Los anticuerpos de la invención (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpo de los mismos) se pueden administrar solos o en combinación con otros regímenes terapéuticos o profilácticos (p. ej., radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia, agentes antitumorales, agentes antiangiogénesis y antiinflamatorios). Esta terapia de combinación se pueden administrar de forma secuencial y/o concomitante.

Los agentes inmunosupresores inespecíficos convencionales que se pueden administrar en combinación con el anticuerpo y composiciones de anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, esteroides, ciclosporina, análogos de ciclosporina, ciclofosfamida, ciclofosfamida IV, metilprednisona, prednisolona, azatioprina, FK-506, 15-desoxiespergualina y otros agentes inmunosupresores que actúan suprimiendo la función de respuesta de los linfocitos T.

En realizaciones específicas, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con inmunosupresores. Las preparaciones de inmunosupresores que se pueden administrar con el anticuerpo y composiciones de anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, ORTHOCLONE™ (OKT3), SANDIMMUNE™/NEORAL™/SANGDYA™ (ciclosporina), PROGRAF™ (tacrolimus), CELLCEPT™ (micofenolato), azatioprina, glucocorticosteroides y RAPAMUNE™ (sirolimus). En una realización específica, los inmunosupresores se pueden usar para prevenir el rechazo de trasplantes de órganos y de médula ósea.

En una realización preferida, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con terapia con esteroides. Los esteroides que se pueden administrar en combinación con el anticuerpo y composiciones de anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, corticosteroides orales, prednisona y metilprednisolona (p.ej., metilprednisolona IV). En una realización específica, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con prednisona. En una realización específica adicional, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con prednisona y un agente inmunosupresor. Agentes inmunosupresores que se pueden administrar con el anticuerpo y composiciones de anticuerpos de la invención y prednisona son los descritos en el presente documento e incluyen, entre otros, azatioprina, ciclofosfamida y ciclofosfamida IV. En otra realización específica, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con metilprednisolona. En una realización específica adicional, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con metilprednisolona y un agente inmunosupresor. Agentes inmunosupresores que se pueden administrar con el anticuerpo y composiciones de anticuerpos de la invención y metilprednisolona son los descritos en el presente

documento e incluyen, entre otros, azatioprina, ciclofosfamida y ciclofosfamida IV.

La invención también abarca combinar los polinucleótidos y/o polipéptidos de la invención (y/o agonistas o antagonistas de los mismos) con otras terapias hematopoyéticas propuestas o convencionales. Por tanto, por ejemplo, los polinucleótidos y/o polipéptidos de la invención (y/o agonistas o antagonistas de los mismos) se pueden combinar con compuestos que exhiben solo efectos estimuladores eritropoyéticos, tales como eritropoyetina, testosterona, estimuladores de células progenitoras, factor de crecimiento similar a la insulina, prostaglandinas, serotonina, AMP cíclico, prolactina y triyodotizonina. También se abarcan combinaciones del anticuerpo y composiciones de anticuerpos de la invención con compuestos generalmente usados para tratar la anemia aplásica, tal como, por ejemplo, metenoleno, estanozolol y nandrolona, para tratar la anemia ferropénica, tales como, por ejemplo, preparaciones de hierro, para tratar la anemia maligna, tales como, por ejemplo, vitamina B₁₂ y/o ácido fólico, y para tratar la anemia hemolítica, tal como, por ejemplo, esteroides adrenocorticales, por ejemplo corticoides. Véase, por ejemplo, Resegotti y col. Panminerva Medica, 23:243-248 (1981); Kurtz, FEBS Letters, 14a:105-108 (1982); McGonigle y col., Kidney Int., 25:437-444 (1984); y Pavlovic-Kantera, Expt. Hematol., 8(supp. 8) 283-291 (1980).

Los compuestos que potencian los efectos o son sinérgicos con la eritropoyetina también son útiles como adyuvantes en el presente documento e incluyen, entre otros, agonistas adrenérgicos, hormonas tiroideas, andrógenos, factores eritropoyéticos hepáticos, eritropoyetinas y eritropoyetinas, véase, por ejemplo, Dunn, "Current Concepts in Erythropoiesis", John Wiley and Sons (Chichester, Inglaterra, 1983); Kalmani, Kidney Int., 22:383-391 (1982); Shahidi, New Eng. J. Med., 289:72-80 (1973); Urabe y col., J. Exp. Med., 149:1314-1325 (1979); Billat y co., Expt. Hematol., 10:135-140 (1982); Naughton y col., Acta Haemat., 69:171-179 (1983); Cognote y col., en el resumen 364, Proceedings 7º Congreso Internacional de Endocrinología (Quebec City, Quebec, 1-7 de julio de 1984); y Rothman y col., 1982, J. Surg. Oncol., 20:105-108 (1982). Procedimientos para estimular la hematopoyesis comprenden administrar a un paciente una cantidad hematopoyéticamente eficaz (es decir, una cantidad que efectúa la formación de células sanguíneas) de una composición farmacéutica que contiene polinucleótidos y/o polipéptidos de la invención (y/o agonistas o antagonistas de los mismos). Los polinucleótidos y/o polipéptidos de la invención y/o agonistas o antagonistas de los mismos se administran al paciente mediante cualquier técnica adecuada, incluyendo, entre otras, las vías parenteral, sublingual, tópica, intrapulmonar e intranasal, y las técnicas que se tratan también en el presente documento. La composición farmacéutica contiene opcionalmente uno o más miembros del grupo que consiste en eritropoyetina, testosterona, estimuladores de las células progenitoras, factor de crecimiento similar a la insulina, prostaglandinas, serotonina, AMP cíclico, prolactina, triyodotizonina, metenoleno, estanozolol y nandrolona, preparaciones de hierro, vitamina B₁₂, ácido fólico y/o esteroides adrenocorticales.

En una realización adicional, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con factores de crecimiento hematopoyéticos. Los factores de crecimiento hematopoyéticos que se pueden administrar con los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, LEUKINE™ (SARGRAMOSTIM™) y NEUPOGEN™ (FILGRASTIM™).

En una realización adicional, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran solos o en combinación con uno o más agentes antiangiogénicos. Agentes antiangiogénicos que se pueden administrar con los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, angiostatina (Entremed, Rockville, MD), troponina-1 (Boston Life Sciences, Boston, MA), factor antiinvasivo, ácido retinoico y derivados del mismo, paclitaxel (Taxol), suramina, inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1, inhibidor tisular de la metaloproteinasa-2, VEGI, inhibidor 1 del activador del plasminógeno, inhibidor 1 del activador del plasminógeno 2 y varias formas del "grupo d" de metales de transición más ligeros.

Los metales de transición del "grupo d" más ligeros incluyen, por ejemplo, especies de vanadio, molibdeno, tungsteno, titanio, niobio y de tántalo. Dichas especies de metales de transición pueden formar complejos de metales de transición. Complejos adecuados de las especies de metales de transición mencionadas anteriormente incluyen complejos oxo de metales de transición.

Ejemplos representativos de complejos de vanadio incluyen complejos de vanadio oxo, tales como complejos de vanadato y de vanadilo. Complejos de vanadato adecuados incluyen complejos de metavanadato y ortovanadato tales como, por ejemplo, metavanadato amónico, metavanadato sódico y ortovanadato sódico. Complejos de vanadilo adecuados incluyen, por ejemplo, acetilacetato de vanadilo y sulfato de vanadilo, incluyendo hidratos de sulfato de vanadilo tales como mono y trihidratos de sulfato de vanadilo.

Ejemplos representativos de complejos de tungsteno y de molibdeno también incluyen complejos oxo. Complejos oxo de tungsteno adecuados incluyen complejos de tungstato y de óxido de tungsteno. Complejos de tungstato adecuados incluyen tungstato amónico, tungstato cálcico, tungstato sódico dihidrato y ácido tungstico. Óxidos de tungsteno adecuados incluyen óxido de tungsteno (IV) y óxido de tungsteno (VI). Complejos oxo de molibdeno adecuados incluyen complejos de molibdato, de óxido de molibdeno y de molibdenilo. Complejos de molibdato adecuados incluyen molibdato amónico y sus hidratos, molibdato sódico y sus hidratos y molibdato potásico y sus hidratos. Óxidos de molibdeno adecuados incluyen óxido de molibdeno (VI), óxido de molibdeno (VI) y ácido molibdico. Complejos de molibdenilo adecuados incluyen, por ejemplo, acetilacetato de molibdenilo. Otros complejos de tungsteno y de molibdeno adecuados incluyen derivados hidroxilo derivados de, por ejemplo, glicerol,

ácido tartárico y azúcares.

Incluido en el contexto de la presente invención también se puede usar una amplia variedad de otros factores antiangiogénicos. Ejemplos representativos incluyen, entre otros, el factor 4 de las plaquetas, sulfato de protamina, derivados de quitina sulfatados (preparados a partir de cáscaras de cangrejo reina) (Murata y col., *Cancer Res.* 51:22-26, (1991); complejo de polisacáridos sulfatados y peptidoglucano (SP- PG) (la función de este compuesto se puede potenciar mediante la presencia de esteroides, tales como estrógenos y citrato de tamoxifeno); etauosporina; moduladores del metabolismo de la matriz, incluyendo, por ejemplo, análogos de prolina, cishidroxi prolina, d,L-3,4-dehidroprolina, tiaprolina, alfa,alfa-dipiridilo, fumarato de aminopropionitrilo; 4-propil-5-(4-piridinil)-2(3H)-oxazolona; metotrexato; mitoxantrona; heparina; interferones; 2 macroglobulina-sérica; ChIMP-3 (Pavloff y col., *J. Bio. Chem.* 267:17321-17326, (1992)); quimostatina (Tomkinson y col., *Biochem J.* 286:475-480, 1992); ciclodextrina tetradecasulfato; eponemicina; camptotecina; Fumagillin (Ingber y col. *Nature* 348:555-557, (1990)); tiomalato sódico de oto ("GST"; Matsubara y Ziff, *J. Clin. Invest.* 79:1440-1446, 1987); anticlagenasa sérica; alfa2-antiplasmina (Holmes y col., *J. Biol. Chem.* 262(4):1659-1664, 1987); bisantreno (National Cancer Institute); disolución de lobenzarit disódico, ácido (N-(2)-carboxifenil-4- cloroantrónico disódico o "CCA"; (Takeuchi y col., *Agents Actions* 36:312-316, 1992); e inhibidores de la metaloproteína tales como BB94.

Factores antiangiogénicos adicionales que también se pueden usar dentro del contexto de la presente invención incluyen talidomida, (Celgene, Warren, NJ); esteroides angiostáticos AGM-1470 (H. Brem and J. Folkman *J. Pediatr. Surg.* 28:445-51 (1993)); un antagonista 3 alfa y beta de la integrina (C. Storgard y col., *J. Clin. Invest.* 103:47-54 (1999)); carboxinaminomidazol; carboxiamidotriazol (CAI) (National Cancer Institute, Bethesda, MD); conbretastatina A-4 (CA4P) (OXiGENE, Boston, MA); escualamina (Magainin Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA); TNP-470, (Tap Pharmaceuticals, Deerfield, IL); ZD-0101 AstraZeneca (Londres, Reino Unido); APRA (CT2584); benefina, biostatina-1 (SC339555); CGP-41251 (PKC 412); CM101; dexrazoxana (ICRF187); DMXAA; endostatina; flavopridiol; genesteína; GTE; ImmTher; Iressa (ZD1839); octreotida (somatostatina); panretina; penicilamina; Photopoint; PI-88; Prinomastat (AG-3540) Puryltin; Suradista (FCE26644); tamoxifeno (Nolvadex); tazaroteno; tetratiomolibdato; Xeloda (capecitabina) y 5-fluorouracilo.

Agentes antiangiogénicos que se pueden administrar en combinación con los compuestos de la invención pueden funcionar mediante varios mecanismos incluyendo, entre otros, la inhibición de la proteólisis de la matriz extracelular, el bloqueo de la función de las moléculas de adhesión de la matriz extracelular-células endoteliales, antagonizando la función de los inductores de la angiogénesis, tales como factores de crecimiento, y la inhibición de los receptores de integrina expresados sobre las células endoteliales en proliferación. Ejemplos de inhibidores antiangiogénicos que interfieren en la proteólisis de la matriz extracelular y que se pueden administrar en combinación con el anticuerpo y las composiciones de anticuerpo de la invención incluyen, entre otros, AG-3540 (Agouron, La Jolla, CA), BAY-12-9566 (Bayer, West Haven, CT), BMS-275291 (Bristol Myers Squibb, Princeton, NJ), CGS-27032A (Novartis, East Hanover, NJ), Marimastat (British Biotech, Oxford, Reino Unido) y Metastat (Aetema, St-Foy, Quebec). Ejemplos de inhibidores antiangiogénicos que actúan bloqueando la función de las moléculas de adhesión a la matriz extracelular de las células endoteliales y que se pueden administrar en combinación con el anticuerpo y las composiciones de anticuerpo de la invención incluyen, entre otros, EMD-121974 (Merck KcgaA Darmstadt, Alemania) y Vitaxin (Ixsys, La Jolla, CA/Medimmune, Gaithersburg, MD). Ejemplos de agentes antiangiogénicos que actúan como antagonistas directos o inhibición de los inductores de la angiogénesis y que se pueden administrar en combinación con el anticuerpo y las composiciones de anticuerpo de la invención incluyen, entre otros, Angiozyme (Ribozyme, Boulder, CO), anticuerpo anti-VEGF (Genentech, S. San Francisco, CA), PTK-787/ZK-225846 (Novartis, Basel, Switzerland), SU-101 (Sugen, S. San Francisco, CA), SU-5416 (Sugen/ Farmacia Upjohn, Bridgewater, NJ) y SU-6668 (Sugen). Otros agentes antiangiogénicos actúan inhibiendo indirectamente la angiogénesis. Ejemplos de inhibidores indirectos de la angiogénesis que se pueden administrar en combinación con el anticuerpo y las composiciones de anticuerpo de la invención incluyen, entre otros, IM-862 (Cytran, Kirkland, WA), interferón-alfa, IL-12 (Roche, Nutley, NJ) y polisulfato de pentosano (Georgetown University, Washington, DC).

En realizaciones concretas, el uso del anticuerpo y las composiciones de anticuerpo de la invención en combinación con agentes antiangiogénicos se contempla para el tratamiento, prevención y/o mejora de cánceres y de otros trastornos hiperproliferativos.

En una realización adicional, el anticuerpo y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con un agente antiviral. Agentes antivirales que se pueden administrar con los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, aciclovir, ribavirina, amantadina y remantidina.

En ciertas realizaciones, se administran terapéuticas de la invención en combinación con agentes antiretrovirales, inhibidores nucleosídicos/nucleotídicos de la transcriptasa inversa (INTI), inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (INNTI) y/o inhibidores de la proteasa (IP). Los INTI que se pueden administrar en combinación con las terapéuticas de la invención incluyen, entre otros, RETROVIR™ (zidovudina/AZT), VIDEX™ (didanosina/ddI), HIVID™ (zalcitabina/ddC), ZERTT™ (estavudina/d4T), EPIVIR™ (lamivudina/3TC) y COMBIVIR™ (zidovudina/lamivudina). Lis INNTI que se pueden administrar combinados con las terapéuticas de la invención incluyen, entre otros, VIRAMUNE™ (nevirapina), RESCRIPTOR™ (delavirdina) y SUSTIVA™ (efavirenz). Los inhibidores de la proteasa que se pueden administrar en combinación con las terapéuticas de la invención incluyen CRIVAN™ (indinavir), NORVIR™ (ritonavir), INVIRASE™ (saquinavir), y VIRACEPT™ (nelfinavir). En una

realización específica, los agentes antirretrovirales, los inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa, los inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa y/o los inhibidores de la proteasa se pueden usar en cualquier combinación con las terapéuticas de la invención para tratar el SIDA y/o para prevenir o tratar la infección por VIH.

5 En una realización adicional, el anticuerpo y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con un agente antibiótico. Los agentes antibióticos que se pueden administrar con el anticuerpo y las composiciones de anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, amoxicilina, aminoglucósidos, betalactámicos (glucopéptido), beta-lactamasas, clindamicina, cloranfenicol, cefalosporinas, ciprofloxacino, eritromicina, fluoroquinolonas, macrólidos, metronidazol, penicilinas, quinolonas, rifampicina, estreptomina, sulfonamida, tetraciclinas, trimetoprim, trimethoprim-sulfametoxazol y vancomicina.

En otras realizaciones, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se pueden administrar en combinación con agentes anti-infecciones oportunistas. Los agentes anti-infecciones oportunistas que se pueden administrar en combinación con el anticuerpo y composiciones de anticuerpo de la invención incluyen, entre otros, TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE™, DAPSONE™, PENTAMIDINE™, ATOVAQUONE™, ISONIAZID™, RIFAMPIN™, PYRAZINAMIDE™, ETHAMBUTOL™, RIFABUTIN, CLARITHROMYCIN™, AZITHROMYCIN™, GANCICLOVIR™, FOSCARNET™, CIDOFOVIR™, FLUCONAZOLE™, ITRACONAZOLE™, KETOCONAZOLE™, ACYCLOVIR™, FAMCICOLVIR™, PYRIMETHAMINE™, LEUCOVORIN™, NEUPOGEN™ (filgrastina/G-CSF) y LEUKINE™ (sargramostim/GM-CSF). En una realización específica, el anticuerpo y composiciones de anticuerpo de la invención se usan en cualquier combinación con TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE™, DAPSONE™, PENTAMIDINE™ y/o ATOVAQUONE™ para tratar profilácticamente, prevenir y/o diagnosticar una infección de neumonía oportunista por *Pneumocystis carinii*. En otra realización específica, el anticuerpo y composiciones de anticuerpo de la invención se usan en cualquier combinación con ISONIAZID™, RIFAMPIN™, PYRAZINAMIDE™, y/o ETHAMBUTOL™ para tratar profilácticamente, prevenir y/o diagnosticar una infección oportunista por el complejo *Mycobacterium avium*. En otra realización específica, el anticuerpo y composiciones de anticuerpo de la invención se usan en cualquier combinación con RIFABUTIN™, CLARITHROMYCIN™, y/o AZITHROMYCIN™ para tratar profilácticamente, prevenir y/o diagnosticar una infección oportunista por *Mycobacterium tuberculosis*. En otra realización específica, el anticuerpo y composiciones de anticuerpo de la invención se usan en cualquier combinación con GANCICLOVIR™, FOSCARNET™, y/o CIDOFOVIR™ para tratar profilácticamente, prevenir y/o diagnosticar una infección oportunista por citomegalovirus. En otra realización específica, el anticuerpo y composiciones de anticuerpo de la invención se usan en cualquier combinación con FLUCONAZOLE™, ITRACONAZOLE™, y/o KETOCONAZOLE™ para tratar profilácticamente, prevenir y/o diagnosticar una infección oportunista fúngica. En otra realización específica, el anticuerpo y composiciones de anticuerpo de la invención se usan en cualquier combinación con ACYCLOVIR™ y/o FAMCICOLVIR™ para tratar profilácticamente, prevenir y/o diagnosticar una infección oportunista por el virus del herpes simple de tipo I y/o de tipo II. En otra realización específica, el anticuerpo y composiciones de anticuerpo de la invención se usan en cualquier combinación con PYRIMETHAMINE™ y/o LEUCOVORIN™ para tratar profilácticamente, prevenir y/o diagnosticar una infección oportunista por *Toxoplasma gondii*. En otra realización específica, el anticuerpo y composiciones de anticuerpo de la invención se usan en cualquier combinación con LEUCOVORIN™ and/or NEUPOGEN™ para tratar profilácticamente, prevenir y/o diagnosticar una infección oportunista bacteriana.

40 En una realización adicional, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran solos o en combinación con un agente antiinflamatorio. Agentes antiinflamatorios que se pueden administrar con el anticuerpo y composiciones de anticuerpo de la invención incluyen, entre otros, glucocorticoides los antiinflamatorios no esteroideos, derivados del ácido aminoarilcarboxílico, derivados del ácido arilacético, derivados del ácido arilbutírico, ácidos arilcarboxílicos, derivados del ácido arilpropiónico, pirazoles, pirazolonas, derivados del ácido salicílico, tiazinacarboxamidas, ácido e-acetamidocaproico, S-adenosilmetionina, ácido 3-amino-4-hidroxi-butírico, amixetrina, bendazac, bencidamina, bucoloma, difenpiramida, ditazol, emorfazona, guaiazuleno, nabumetona, nimesulida, orgoteína, oxaceprol, paranilina, perisoxal, pifoxima, proquazona, proxazol y tenidap.

Los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se pueden administrar solos o en combinación con otros adyuvantes. Los adyuvantes que se pueden administrar con los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, alúmina, alúmina más desoxicolato (ImmunoAg), MTP-PE (Biocine Corp.), QS21 (Genentech, Inc.), BCG y MPL. En una realización específica, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con alúmina. En otra realización específica, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con QS-21. Otros adyuvantes que se pueden administrar con los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, el inmunomodulador del lípido monofosforilo, AdjuVax 100a, QS-21, QS-18, CRL1005, sales de aluminio, MF-59 y tecnología adyuvante virosómica. Las vacunas que se pueden administrar con los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, vacunas dirigidas a la protección contra SPR (sarampión, paperas, rubeola), polio, varicela, tétanos/difteria, hepatitis A, hepatitis B, *Haemophilus influenzae* B, tos ferina, neumonía, gripe, enfermedad de Lyme, rotavirus, cólera, fiebre amarilla, encefalitis japonesa, poliomielitis, rabia, fiebre tifoidea y pertussis y/o PNEUMOVAX-23™. Las combinaciones se pueden administrar de forma concomitante, por ejemplo como una mezcla, por separado pero simultánea o concurrentemente, o de forma secuencial. Esto incluye presentaciones en las que los agentes combinados se administran juntos como mezcla terapéutica y, también, procedimientos en los que los agentes combinados se administran por separado pero de forma simultánea, por

ejemplo mediante vías intravenosas separadas en el mismo individuo. La administración “en combinación” incluye además la administración separada de uno de los compuestos o agentes administrados primero, seguido del segundo.

5 En otra realización específica, el anticuerpo y composiciones de anticuerpo de la invención se usan en combinación con PNEUMOVAX-23™ para tratar, prevenir y/o diagnosticar una infección y/o cualquier enfermedad, trastorno y/o afección asociada. En una realización específica, el anticuerpo y composiciones de anticuerpo de la invención se usan en combinación con PNEUMOVAX-23™ para tratar, prevenir y/o diagnosticar cualquier infección bacteriana grampositiva y/o cualquier enfermedad, trastorno y/o afección asociada. En otra realización específica, el anticuerpo y composiciones de anticuerpo de la invención se usan en combinación con PNEUMOVAX-23™ para tratar, prevenir y/o diagnosticar una infección y/o cualquier enfermedad, trastorno y/o afección asociada con uno o más miembros del género *Enterococcus* y/o del género *Streptococcus*. En otra realización específica, el anticuerpo y composiciones de anticuerpo de la invención se usan en cualquier combinación con PNEUMOVAX-23™ para tratar, prevenir y/o diagnosticar una infección y/o cualquier enfermedad, trastorno y/o afección asociada con uno o más miembros de los estreptococos del grupo B. En otra realización específica, el anticuerpo y composiciones de anticuerpo de la invención se usan en combinación con PNEUMOVAX-23™ para tratar, prevenir y/o diagnosticar una infección y/o cualquier enfermedad, trastorno y/o afección asociada con *Streptococcus pneumoniae*.

20 En una realización preferida, el anticuerpo y composiciones de anticuerpo de la invención se administran en combinación con el ligando CD40 (CD40L), una forma soluble de CD40L (p. ej., AVREND™), fragmentos biológicamente activos, variantes o derivados de CD40L, anticuerpos anti-CD40L (p. ej., anticuerpos agonistas o antagonistas) y/o anticuerpos anti-CD40 (p. ej., anticuerpos agonistas o antagonistas).

25 En otra realización, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con un anticoagulante. Los anticoagulantes que se pueden administrar con los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, heparina, warfarina y aspirina. En una realización específica, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con heparina y/o warfarina. En otra realización específica, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con warfarina. En otra realización específica, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con warfarina y aspirina. En otra realización específica, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con heparina. En otra realización específica, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con heparina y aspirina.

35 En otra realización, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con un agente que suprime la producción de anticuerpos anticardiolipina. En realizaciones específicas, los polinucleótidos de la invención se administran en combinación con un agente que bloquea y/o reduce la capacidad de anticuerpos anticardiolipina para unirse a la proteína plasmática de unión a fosfolípidos beta-2-glicoproteína I (b2GPI).

En una realización preferida, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con un antipalúdico. Los antipalúdicos que se pueden administrar con los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, hidroxiclороquina, cloroquina y/o quinacrina.

40 En una realización preferida, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con un AINE.

45 En una realización no exclusiva, el anticuerpo y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con uno, dos, tres, cuatro, cinco, diez o más de los siguientes fármacos: NRD-101 (Hoechst Marion Roussel), diclofenaco (Dimethaid), oxaprozina potásica (Monsanto), mecasemina (Chiron), T-714 (Toyama), pemetrexed disódico (Eli Lilly), atreleutón (Abbott), valdecoxib (Monsanto), eltenac (Byk Gulden), campath, AGM-1470 (Takeda), CDP-571 (Celltech Chiroscience), CM-101 (CarboMed), ML-3000 (Merckle), CB-2431 (KS Biomedix), CBF-BS2 (KS Biomedix), terapia génica con IL-1Ra (Valentis), JTE-522 (Japan Tobacco), paclitaxel (Angiotech), DW-166HC (Dong Wha), mesilato de darbufelona (Warner-Lambert), receptor 1 soluble del TNF (synergen; Amgen), IPR-6001 (Institute for Pharmaceutical Research), trocade (Hoffman-La Roche), EF-5 (Scotia Pharmaceuticals), BIIL-284 (Boehringer Ingelheim), BIIF-1149 (Boehringer Ingelheim), LeukoVax (Inflammatics), MK-671 (Merck), ST-1482 (Sigma-Tau), y propionato de butixocort (WarnerLambert).

55 En una realización preferida, el anticuerpo y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con uno, dos, tres, cuatro, cinco o más de los siguientes fármacos: metotrexato, sulfasalazina, aurotiomalato sódico, auranofina, ciclosporina, penicilamina, azatioprina, un fármaco antipalúdico (p. ej., como se describe en el presente documento), ciclofosfamida, clorambucilo, oro, ENBREL™ (Etanercept), anticuerpo anti-TNF, LJP 394 (La Jolla Pharmaceutical Company, San Diego, California) y prednisolona.

En una realización adicional, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran solos o en combinación con una o más preparaciones de inmunoglobulina intravenosa. Preparaciones de inmunoglobulina intravenosa que se pueden administrar con el anticuerpo y composiciones de anticuerpos de la invención incluyen,

entre otros, , GAMMAR™, IVEEGAM™, SANDOGLOBULIN™, GAMMAGARD S/D™ y GAMIMUNE™. En una realización específica, el anticuerpo y composiciones de anticuerpos de la invención incluyen se administran en combinación con preparaciones de inmunoglobulina intravenosa en tratamientos de trasplantes (p. ej., trasplante de médula ósea).

- 5 Ligando CD40 (CD40L), una forma soluble de CD40L (p. ej., AVREND™), fragmentos biológicamente activos, variantes o derivados de CD40L, anticuerpos anti-CD40L (p. ej., anticuerpos agonistas o antagonistas) y/o anticuerpos anti-CD40 (p. ej., anticuerpos agonistas o antagonistas).

En una realización adicional, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con citocinas. Las citocinas que se pueden administrar con los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, GM-CSF, G-CSF, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL10, IL12, IL13, IL15, anti-CD40, CD40L, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, TNF-alfa y TNF-beta. En realizaciones preferidas, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran con el receptor de TRAIL. En otra realización, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se pueden administrar con cualquier interleucina, incluyendo, entre otras, IL-1alfa, IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21 e IL-22. En realizaciones preferidas, anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con IL-4 e IL-10.

En una realización, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con una o más quimiocinas. En realizaciones específicas, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con una quimiocina α (CxC) seleccionada del grupo que consiste en la proteína 10 inducible de interferón gamma (γ IP-10), interleucina-8 (IL-8), factor 4 de las plaquetas (PF4), proteína activadora de neutrófilos (NAP-2), GRO- α , GRO- β , GRO- γ , péptido activador de neutrófilos (ENA-78), proteína 2 quimioatrayente de granulocitos (GCP-2), y factor 1 derivado de células estromales (SDF-1 o factor 1 estimulador de los pre-linfocitos B (PBSF)) y/o quimiocina β (CC) seleccionados del grupo que consiste en: RANTES (regulada en la activación, linfocitos T normales expresados y secretados), proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α), proteína 1 beta inflamatoria de macrófagos (MIP-1 β), proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), proteína 2 quimiotáctica de monocitos (MCP-2), proteína 3 quimiotáctica de monocitos (MCP-3), proteína 4 quimiotáctica de monocitos (MCP-4), proteína 1 gamma inflamatoria de macrófagos (MIP-1 γ), proteína 3 alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-3 α), proteína 3 beta inflamatoria de macrófagos (MIP-3 β), proteína 4 inflamatoria de macrófagos (MIP-4/DC-CK-1/PARC), eotaxina, Exodus, y 1-309; y/o la quimiocina γ (C), linfotactina.

- 30 En otra realización, el anticuerpo y composiciones de anticuerpo de la invención se administran con la quimiocina beta-8, la quimiocina beta-1 y/o la proteína 4 inflamatoria de macrófagos. En una realización preferida, el anticuerpo y composiciones de anticuerpo de la invención se administran con la quimiocina beta-8.

En una realización adicional, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con un antagonista de IL-4. Los antagonistas de IL-4 que se pueden administrar con los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención incluyen, entre otros: Polipéptidos del receptor soluble de IL-4, formas multiméricas de los polipéptidos receptores solubles de IL-4; anticuerpos del receptor anti-IL-4 que se unen al receptor de IL-4 sin transducir la señal biológica producida por IL-4, anticuerpos anti-IL4 que bloquean la unión de IL-4 a uno o más receptores de IL-4 y muteínas de IL-4 que se unen a los receptores de IL-4 pero no transducen la señal biológica producida por IL-4. Preferentemente, los anticuerpos usados de acuerdo con este procedimiento son anticuerpos monoclonales (incluidos los fragmentos de anticuerpos, tales como, por ejemplo, los descritos en el presente documento).

En una realización adicional, los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la invención se administran en combinación con factores de crecimiento de fibroblatos. Los factores de crecimiento de fibroblastos que se pueden administrar con el anticuerpo y composiciones de anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9, FGF-10, FGF-11, FGF-12, FGF-13, FGF-14 y FGF-15.

Demostración de la utilidad terapéutica o profiláctica de una composición

Los compuestos de la invención se analizan, preferentemente, *in vitro* y, después, *in vivo*, para determinar la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes del uso en seres humanos. Por ejemplo, ensayos *in vitro* que se pueden usar para determinar si está indicada la administración de un anticuerpo o composición específicos de la presente invención incluyen ensayos *in vitro* de cultivos celulares en los que una muestra de tejido del paciente se cultiva y se expone a, o, de otro modo se administra, un anticuerpo o composición de la presente invención, y se observa el efecto de dicho anticuerpo o composición de la presente invención sobre la muestra de tejido. En varias realizaciones específicas, los ensayos *in vitro* se pueden llevar a cabo con células representativas de tipos celulares implicados en un trastorno de un paciente para determinar si un anticuerpo o composición de la presente invención tiene un efecto deseado sobre dichos tipos celulares. Preferentemente, los anticuerpos o composiciones de la invención también se analizan en ensayos *in vitro* y sistemas de modelos animales antes de administrar a seres humanos.

Los anticuerpos o composiciones de la presente invención para uso en terapia se pueden analizar según su

toxicidad en sistemas de modelos animales adecuados, incluidos, entre otros, ratas, ratones, pollos, vacas, monos y conejos. Para análisis *in vivo* de la toxicidad de un anticuerpo o composición se puede usar cualquier sistema de modelo animal conocido en la técnica.

5 Se puede analizar la capacidad de los anticuerpos o composiciones de la invención para reducir la formación del tumor en ensayos *in vitro*, *ex vivo* y *in vivo*. También se puede analizar la capacidad de los anticuerpos o composiciones de la invención para inhibir la replicación viral o reducir la carga viral en ensayos *in vitro*, e *in vivo*. También se puede analizar la capacidad de Los anticuerpos o composiciones de la invención para reducir el número de bacterias en ensayos *in vitro*, e *in vivo* conocidos en la técnica. También se puede analizar la capacidad de los anticuerpos o composiciones de la invención para aliviar uno o más síntomas asociados con cáncer, un trastorno inmunitario (p. ej., una enfermedad inflamatoria), un trastorno neurológico o una enfermedad infecciosa. También se puede analizar la capacidad de los anticuerpos o composiciones de la invención para disminuir el curso del tiempo de la enfermedad infecciosa. Además, también se puede analizar la capacidad de los anticuerpos o composiciones de la invención para aumentar el periodo de supervivencia de los animales que sufren una enfermedad o trastorno, incluidos cáncer, un trastorno inmunitario o una enfermedad infecciosa. Se pueden usar técnicas conocidas por los expertos en lamateria para analizar la función de los anticuerpos o composiciones de la invención *in vivo*.

La eficacia en el tratamiento o prevención de la infección viral se puede demostrar detectando la capacidad de un anticuerpo o composición de la invención para inhibir la replicación del virus, para inhibir la transmisión o prevenir que el virus se establezca en su huésped o para prevenir, mejorar o aliviar los síntomas de progresión de la enfermedad. El tratamiento se considera terapéutico si existe, por ejemplo, una reducción de la carga viral, mejora de uno o más síntomas o disminución de la mortalidad y/o la morbilidad tras la administración de un anticuerpo o composición de la invención.

Se puede analizar la capacidad de los anticuerpos o composiciones de la invención para modular la actividad biológica de las células inmunitarias poniendo en contacto las células inmunitarias, preferentemente las las células inmunitarias humanas (p. j., linfocitos T, linfocitos B y células asesinas naturales) con un anticuerpo o composición de la invención o un compuesto control y determinar la capacidad del anticuerpo o composición de la invención para modular (es decir, incrementar o disminuir) la actividad biológica de las células inmunitarias. La capacidad del anticuerpo o composición de la invención para modular la actividad biológica de las células inmunitarias se puede evaluar detectando la expresión de antígenos, detectando la proliferación de las células inmunitarias (es decir, la proliferación de los linfocitos B), detectando la activación de moléculas de señalización, detectando la función efectora de las células inmunitarias o detectando la diferenciación de las células inmunitarias. Se pueden usar técnicas conocidas por los expertos en la técnica para medir estas actividades. Por ejemplo, la proliferación celular se puede analizar mediante ensayos de incorporación de timidina-³H y recuentos celulares con azul tripán. La expresión del antígeno se puede analizar mediante, por ejemplo, inmunoensayos, incluyendo, entre otros, sistemas de ensayo competitivo y no competitivo usando técnicas tales como transferencias de tipo western, inmunohistoquímica, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunosorción ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A y análisis FACS. La activación de las moléculas de señalización se puede analizar mediante, por ejemplo, ensayos de quinasas y ensayos de desplazamiento electroforético (EMSA). En una realización preferida, se mide la capacidad de un anticuerpo o composición de la invención para inducir la proliferación de linfocitos B. En otra realización preferida, se mide la capacidad de un anticuerpo o composición de la invención para modular la expresión de inmunoglobulinas.

Paneles/Mezclas

En el presente documento también se describen mezclas de anticuerpos (incluidos scFv y otras moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos o variantes de los mismos) que se unen inmuno-específicamente a TR4 o a un fragmento o variante del mismo, en las que la mezcla tiene al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o más anticuerpos diferentes de la invención. En ejemplos específicos, en el presente documento se describen mezclas de al menos 2, preferentemente al menos 4, al menos 6, al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 20, o al menos 25 anticuerpos diferentes se unen inmuno-específicamente a TR4 o fragmentos o variantes de los mismos, en las que al menos 1, al menos 2, al menos 4, al menos 6, o al menos 10 anticuerpos de la mezcla es un anticuerpo de la invención. En un ejemplo específico, cada anticuerpo de la mezcla es un anticuerpo de la invención.

En el presente documento también se describen paneles de anticuerpos (incluidos scFv y otras moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos o variantes de los mismos) que se unen inmuno-específicamente a TR4 o a un fragmento o variante del mismo, en las que el panel tiene al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o más anticuerpos diferentes de la invención. En ejemplos específicos, en el presente documento se describen anticuerpos que tienen diferentes afinidades por el receptor de TRAIL, diferentes especificidades por el receptor de TRAIL o diferentes velocidades de asociación. En el presente documento también se describen paneles de al menos 10, preferentemente al menos 25, al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 125, al menos 150, al menos 175, al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 350, al menos 400, al menos 450, al menos 500, al menos 550, al menos 600, al menos 650, al menos 700, al menos 750, al menos

800, al menos 850, al menos 900, al menos 950, o al menos 1000 anticuerpos. Los paneles de anticuerpos se pueden usar, por ejemplo, en placas de 96 pocillos para ensayos tales como ELISA.

En el presente documento también se describen composiciones que comprenden uno o más anticuerpos (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos de la invención). En un ejemplo, una composición descrita en el presente documento comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o más anticuerpos que comprenden, o como alternativa que consisten en, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera o más de los dominios VH de uno o más de los scFv indicados en la Tabla 1, o una variante de los mismos. En otro ejemplo, una composición descrita en el presente documento comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o más anticuerpos que comprenden, o como alternativa que consisten en, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera o más de las CDR1 de un dominio de VH de uno o más de los scFv indicados en la Tabla 1, o una variante de los mismos. En otro ejemplo, una composición descrita en el presente documento comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o más anticuerpos que comprenden, o como alternativa que consisten en, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera o más de las CDR2 de un dominio de VH de uno o más de los scFv indicados en la Tabla 1, o una variante de los mismos. En un ejemplo preferido, una composición descrita en el presente documento comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o más anticuerpos que comprenden, o como alternativa que consisten en, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera o más de las CDR3 de un dominio de VH de uno o más de los scFv indicados en la Tabla 1, o una variante de los mismos.

En el presente documento también se describen composiciones que comprenden uno o más anticuerpos (incluidas las moléculas que comprenden, o como alternativa que consisten en, fragmentos de anticuerpos de la invención) que se enumeran más adelante. En el presente documento también se describe una composición que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o más anticuerpos que comprenden, o como alternativa que consisten en, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera o más de los dominios VL de uno o más de los scFv indicados en la Tabla 1, o una variante de los mismos; una composición de la invención que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o más anticuerpos que comprenden, o como alternativa que consisten en, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera o más de los dominios de las CDR1 de VL de uno o más de los scFv indicados en la Tabla 1, o una variante de los mismos; una composición que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o más anticuerpos que comprenden, o como alternativa que consisten en, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera o más de los dominios de las CDR2 de VL de uno o más de los scFv indicados en la Tabla 1, o una variante de los mismos; y una composición que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o más anticuerpos que comprenden, o como alternativa que consisten en, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera o más de los dominios de las CDR3 de VL de uno o más de los scFv indicados en la Tabla 1, o una variante de los mismos.

Kits

La invención proporciona también un kit que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención. En el presente documento también se describe un paquete o kit farmacéutico que comprenden uno o más contenedores cargados con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Asociados opcionalmente con dicho(s) envase(s) puede adjuntarse una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, en la que se refleja la aprobación de la agencia de la fabricación, uso o venta del producto para administración en seres humano.

La presente invención proporciona kit que se pueden usar en los procedimientos anteriores. En una realización, un kit comprende un anticuerpo de la invención, preferentemente un anticuerpo purificado, en uno o más contenedores. En una realización alternativa, un kit comprende un fragmento de anticuerpo que se une inmuno-específicamente a TR4. En otra realización específica, los kits de la presente invención contienen un polipéptido de TR4 sustancialmente aislado o un fragmento o variante del mismo como control. Preferentemente, los kits de la presente invención comprenden además un anticuerpo control que no reacciona con ninguno, algunos o todos los receptores de TRAIL. En otra realización específica, los kits de la presente invención contienen un medio para detectar la unión de un anticuerpo a polipéptidos de TR4 (p. ej., el anticuerpo se puede conjugar a un sustrato detectable tal como un compuesto fluorescente, un sustrato enzimático, un compuesto radiactivo o un compuesto luminiscente, o un segundo anticuerpo que reconoce el primer anticuerpo se puede conjugar a un sustrato detectable). En realizaciones específicas, el kit puede incluir un receptor de TRAIL producido de forma recombinante o sintetizado químicamente. Ek TR4 proporcionado en el kit también puede estar fijado a un soporte sólido. En una realización más específica, el medio de detección del kit descrito en lo que antecede incluye un soporte sólido al que se fija el TR4. Dicho kit puede incluir también un anticuerpo anti-humano marcado con un indicador y no fijado. En esta realización, la unión del anticuerpo a TR4 se puede detectar mediante la unión de dicho anticuerpo marcado con un indicador.

En el presente documento también se describe un kit diagnóstico para uso en la detección selectiva de suero que contiene antígenos del polipéptido de la invención. El kit diagnóstico incluye un anticuerpo sustancialmente aislado específicamente inmunorreactivo con un receptor de TRAIL y medios para detectar la unión de los polipéptidos de TR4 al anticuerpo. En un ejemplo, el anticuerpo está fijado a un soporte sólido. En un ejemplo específico, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. El medio de detección del kit puede incluir un segundo anticuerpo

monoclonal marcado. Como alternativa, o además de, el medio de detección puede incluir un antígeno competidor marcado.

En una configuración diagnóstica, el suero de ensayo se hace reaccionar con un reactivo de fase sólida que tiene receptores de TRAIL unidos a la superficie obtenidos mediante los procedimientos descritos en el presente documento. Después de la unión de los polipéptidos de TR4 a un anticuerpo específico, los componentes séricos no unidos se eliminan mediante lavado, se añade anticuerpo anti-humano marcado con indicador, se elimina el anticuerpo anti-humano no unido mediante lavado y un reactivo se hace reaccionar con el anticuerpo anti-humano marcado con indicador para unir el indicador al reactivo en proporción a la cantidad de anticuerpo anti-TR4 unido sobre el soporte sólido. Normalmente, el indicador es una enzima que se detecta incubando la fase sólida en presencia de un sustrato fluorométrico, luminiscente o colorimétrico adecuado.

El reactivo de superficie sólida en el ensayo anterior se prepara mediante técnicas conocidas para fijar el material proteico al material del soporte sólido, tal como perlas poliméricas, tiras de inmersión, placas de 96 pocillos o material de filtro. Estos procedimientos de fijación en general incluyen adsorción inespecífica de la proteína al soporte o fijación covalente de la proteína, normalmente a través de un grupo amino, a un grupo químicamente reactivo sobre el soporte sólido, tal como un grupo carboxilo, hidroxilo o aldehído activado. Como alternativa, las placas revestidas con estreptavidina se pueden usar conjuntamente con el o los antígenos biotinilados.

Por tanto, en el presente documento se describe un sistema de ensayo o kit para realizar este procedimiento diagnóstico. El kit en general incluye un soporte con receptor de TRAIL recombinante unido a la superficie y un anticuerpo anti-humano marcado con indicador para detectar el anticuerpo anti-TR4 unido a la superficie.

Expresión en la placenta de receptores de TRAIL

La expresión de los receptores de la familia de factor de necrosis tumoral y los ligandos en placenta entera y en líneas celulares de macrófagos y trofoblastos placentarios se ha estudiado cuidadosamente. Se ha demostrado que los trofoblastos expresan TR7 y TR5 pero no TR10 y son completamente resistentes a la muerte por el TRAIL recombinante, mientras que los macrófagos, que expresan TR4, TR7 y TR10 pero no TR5, son sensibles (Phillips y col., J. Immunol 15:6053-9 (1999)) Por tanto, los procedimientos para usar los anticuerpos anti-TR4 descritos en el presente documento también se pueden usar en la placenta y en tipos de células placentarias (p. ej., macrófagos y trofoblastos) para prevenir, tratar, diagnosticar, mejorar o vigilar enfermedades y trastornos de la placenta y tipos celulares placentarios.

Terapia génica

En una realización específica, los ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican anticuerpos o derivados funcionales de los mismos se administran para tratar, inhibir o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o la actividad aberrante de los receptores de TRAIL y/o sus ligandos (p. ej., TRAIL) mediante terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su proteína codificada que media un efecto terapéutico.

Cualquiera de los procedimientos para terapia génica disponibles en la técnica se pueden usar de acuerdo con la presente invención. Ejemplos de procedimientos se describen a continuación.

Para recapitulaciones generales de los procedimientos de terapia génica, véase Goldspiel y col., Clinical Pharmacy 12:488-505 (1993); Wu y Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); May, TIBTECH 11(5):155-215 (1993). Los procedimientos conocidos habitualmente en la técnica de tecnología de ADN recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel y col., (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990).

En un aspecto preferido, una composición de la invención comprende, o como alternativa consiste en, ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo, siendo dichos ácidos nucleicos parte de un vector de expresión que expresa el anticuerpo o fragmentos o proteínas quiméricas o cadenas pesadas o ligeras de los mismos en un huésped adecuado. En particular, dichos ácidos nucleicos tienen promotores, preferentemente promotores heterólogos, unidos operablemente a la región de codificación del anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico del tejido. En otra realización concreta, se usan moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias de codificación del anticuerpo y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que estimulan la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, de modo que se proporciona la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstra y col., Nature 342:435-438 (1989). En realizaciones específicas, la molécula de anticuerpo expresada es un scFv, como alternativa, las secuencias de ácido nucleico incluyen secuencias que codifican las cadenas pesadas y ligeras, o fragmentos de las mismas, de un anticuerpo.

La administración de los ácidos nucleicos en un paciente puede ser directa, en cuyo caso el paciente se expone

directamente al ácido nucleico o vectores portadores de ácido nucleico, o indirecta, en cuyo caso se transforman primero con los ácidos nucleicos *in vitro*, después se transplantan al paciente. Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

5 En una realización específica, las secuencias de ácido nucleico se administran directamente *in vivo*, donde se expresan para producir el producto codificado. Esto se puede conseguir mediante cualquiera de los numerosos procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo construyéndolos como parte de un vector de expresión de ácidos nucleicos adecuado ya administrarlo de modo que esté intracelular, por ejemplo mediante infección usando vectores retrovirales defectivos o atenuados u otros virales (véase la patente de EE.UU. N° 4,980,286), o mediante inyección directa de ADN desnudo o mediante el uso de bombardeo con micropartículas (p. ej., pistola génica, Biolistic, Dupont) o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o administrándolos en unión con un péptido que se sabe que entra en el núcleo, administrándolos en unión con un ligando sujeto a endocitosis mediada por el receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)) (que se pueden usar para apuntar a tipos celulares que expresan de forma específica los receptores) etc. En otra realización, se pueden formar complejos de ácido nucleico-ligando en los que el ligando comprende un péptido viral fusogénico para romper endosomas, lo que permite que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica. En otra realización más, se puede apuntar al ácido nucleico *in vivo* para la captación y expresión celular específica, dirigiendo a un receptor específico (véase, por ejemplo, las publicaciones de PCT WO 92/06 180; WO 92/22715; W092/203 16; W093/14188, WO 93/20221). Como alternativa, el ácido nucleico se puede introducir intracelularmente e incorporar dentro del ADN de una célula huésped para expresión mediante recombinación homóloga (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); y col., Nature 342:435-438 (1989)).

En una realización específica, se usan vectores virales que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo de la invención o fragmentos del mismo. Por ejemplo, se puede usar un vector retroviral (véase, Miller y col., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el empaquetamiento correcto del genoma viral y la integración en el ADN de la célula huésped. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo que se va a usar en terapia génica se clonan en uno o más vectores, lo que facilita la liberación del gen en un paciente. Más detalles sobre los vectores retrovirales se pueden encontrar en Boesen y col., Biotherapy 6:29 1-302 (1994), que describen el uso de un vector retroviral para liberar el gen *mdr 1* en células madre hematopoyéticas con el fin de hacer que las células madre sean más resistentes a quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: Clowes y col., J. Clin. Invest. 93:644-651(1994); Klein y col., Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons y Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); y Grossman y Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993).

Los adenovirus son otros vectores virales que se pueden usar en terapia génica. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para liberar genes en el epitelio respiratorio. Los adenovirus infectan de forma natural los epitelios respiratorios en los que producen una enfermedad leve. Otras dianas para los sistemas de liberación basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y el músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de poder infectar las células que no están en división. Kozarsky y Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 (1993) presentan una recapitulación de la terapia génica a base de adenovirus. Bout y col., Human Gene Therapy 5:3-10 (1994) demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes al epitelio respiratorio de monos rhesus. Otros casos del uso de adenovirus en terapia génica se pueden encontrar en Rosenfeld y col., Science 252:431-434 (1991); Rosenfeld y col., Cell 68:143- 155 (1992); Mastrangeli y col., J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993); publicación PCT W094/12649; y Wang, y col., Gene Therapy 2:775-783 (1995) En una realización preferida, se usan vectores de adenovirus.

También se ha propuesto el uso en terapia génica de virus adenoasociados (VAA) (Walsh y col., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); patente de EE.UU. N° 5.436.146).

Otro enfoque a la terapia génica implica transferir un gen a las células en cultivo tisular mediante procedimientos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato cálcico o infección viral. Normalmente, el procedimiento de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Después, las células se introducen en selección para aislar las células captadas y que expresan el gen transferido. Después, las células se liberan a un paciente.

En esta realización, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Dicha introducción se puede llevar a cabo mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, entre otros, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago que contienen las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos etc. En la materia se conocen numerosas técnicas para la introducción de genes extraños en las células (véase, por ejemplo, Loeffler y Behr, Meth. Enzymol. 217:599-718 (1993); Cohen y col., Meth. Enzymol. 217:718-644 (1993); Clin. Pharma. Ther. 29:69-92m (1985)) y se pueden usar de acuerdo con la presente invención, siempre que no se alteren las necesarias funciones de desarrollo y fisiológicas de las células receptoras. La técnica deberá proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que el ácido nucleico se expresa en la célula y es, preferentemente, heredable y expresable por su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes se pueden liberar a un paciente mediante varios procedimientos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (p. ej., las células progenitoras o madre hematopoyéticas) se administran, preferentemente, por vía intravenosa. La cantidad de células previstas para su uso depende del efecto deseado, el estado del paciente etc. y la puede determinar un experto en la técnica.

- 5 Las células en las que se puede introducir un ácido nucleico para los fines de terapia génica abarcan cualquier tipo celular disponible deseado e incluyen, entre otros, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos, células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos, varias células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo las obtenidas de médula ósea, de sangre de cordón umbilical, de sangre periférica, de hígado fetal, etc.

En una realización preferida, la célula usada para terapia génica es autóloga para el paciente.

- 15 En una realización en la que las células recombinantes se usan en terapia génica, las secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo o fragmento del mismo se introducen en las células e modo que se puedan expresar en las células o su progenie, y las células recombinantes se administran después *in vivo* para un efecto terapéutico. En una realización específica se usan células madre o progenitoras. Cualquier célula madre y/o progenitora que se puede aislar y mantener *in vitro* potencialmente se puede usar de acuerdo con esta realización de la presente invención (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 94/08598; Stemple and Anderson, Cell 7 1:973-985 (1992); Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A:229 (1980); y Pittelkow and Scott, Mayo Clinic Proc. 71:771 (1986)).

- 20 En una realización específica, el ácido nucleico que se va a introducir para fines de terapia génica comprende un promotor inducible unido operablemente a la región de codificación, de modo que la expresión del ácido nucleico sea controlable mediante el control de la presencia o ausencia del inductor de la transcripción adecuado.

Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento y caracterización de scFv indicados en la Tabla 1.

Rescate de bibliotecas grandes de scFv

- 25 Se usó una biblioteca de scFv de hasta 1×10^{11} clones, que es una versión expandida de la biblioteca de $1,38 \times 10^{10}$ descrita (Vaughan y col., (1996) Nature Biotechnology 14: 309-314), para seleccionar anticuerpos específicos de TR4. Se rescataron fagos extrayendo 3×10^{10} células de un cultivo madre de glicerol y cultivando en 2YTAG (medio 2YT suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 2% de glucosa (peso/peso) a 37°C durante 2 horas con agitación. Al cultivo se añadió el fago colaborador M13K07 (Stratagene) a una multiplicidad de infección (MOI) de aproximadamente 10. El cultivo se incubó en equilibrio a 37 °C durante 15 minutos, seguidos de 45 minutos, con aireación ligera (200 rpm) a la misma temperatura. El cultivo se centrifugó y las células se resuspendieron en 500 ml de 2YTAG (medio 2YT suplementado con 100 µg/ml de kanamicina) y el cultivo se incubó durante la noche a 30°C con buena aireación (300 rpm). Las partículas del fago se purificaron y concentraron mediante tres ciclos de precipitación en polietilenglicol (PEG) (20% de PEG 6000, NaCl 2,5M) en hielo, después se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 10^{12} unidades de transducción (ut)/ml titulados como clones resistentes a ampicilina.

Adsorción de las bibliotecas de scFv en TR4

- 40 La proteína de fusión de TR4 soluble purificada se produjo mediante HGS. Primero, se eliminó la selección de los fagemidos purificados en una proteína de fusión irrelevante para eliminar todos los aglutinantes irrelevantes. Para ello, 500 µl de una proteína de fusión irrelevante se inmovilizaron (10µg/ml in PBS) en inmunotubo de 75 mm x 12 mm (Nunc; Maxisorp) durante la noche a 4 °C. Después de lavar 3 veces con PBS, el tubo se cargó con 3% de MPBS (3% de polvo de leche desgrasada "Marvel" en PBS) y se bloquearon durante 2 horas a 37°C. El lavado se repitió y se añadieron partículas de fagemidos (10^{13} ut) en 500 µl de MPBS al 3% que contiene 100 µg/ml de la proteína de fusión irrelevante y el tubo se incubó en equilibrio a 37°C durante 1 hora. Después, las partículas de fagemido se transfirieron a un inmunotubo que se había revestido con TR4 (10 µg/ml en PBS) durante la noche a 4 °C y se bloqueó durante 2 horas a 37°C con 3% de MPBS. El tubo se incubó en equilibrio a 37°C durante 1 hora y después se lavó 10 veces con PBST (PBS que contiene 0,1% (v/v) de Tween 20) y 10 veces con PBS. Las partículas de fagemido unidas se eluyeron con 1 ml de trietilamina 100 mM durante 10 min a temperatura ambiente, después se neutralizaron inmediatamente con 0,5 ml de Tris.HCl 1M (pH 7,4). El fago eluido se usaron para infectar 10 ml de *E.coli* TG1 en crecimiento exponencial. Las células infectadas se cultivaron en caldo 2YT durante 1 hora a 37 °C con ligera aireación, después se sembraron en placas de agar 2YTAG (243mm x 243mm; Nunc) y se incubaron durante la noche a 30 °C. Las colonias se rasparon de las placas a 10 ml de caldo 2YT y se añadió un 15% (v/v) de glicerol para almacenar a -70°C.

- 55 Después, los cultivos madre de glicerol de la primera ronda de adsorción en la proteína de fusión de TR4 se superinfectaron con el fago colaborador y se rescataron para dar partículas de fagemido para la segunda ronda de adsorción. En 25 ml de caldo 2TYAG se inocularon 25 µl del glicerol madre y se incubaron a 37 °C con buena aireación hasta que la DO_{600nm} alcanzó 0,7. El fago colaborador M13K07 (moi= 10) se añadió al cultivo, que después

se incubó en equilibrio durante 15 minutos a 37°C, después con agitación durante 45 minutos a la misma temperatura. El cultivo se centrifugó, las células se resuspendieron en 50 ml de 2YTAK precalentado y se realizó el rescate durante la noche a 30°C como antes. Las partículas de fagemido se purificaron y se concentraron como antes y se resuspendieron en PBS a 10^{13} ut/ml. Los repertorios recogidos en las sucesivas rondas de selección se superinfectaron y rescataron del mismo modo.

Se realizaron cuatro rondas de selección por adsorción y las colonias individuales se sometieron a ELISA del fago para determinar la unión a TR4.

Elisa de fagos:

Para determinar la especificidad de cada uno de los anticuerpos se realizó un ELISA de fagos para cada anticuerpo contra la proteína de fusión de TR4 y una proteína de fusión irrelevante.

Colonias individuales de *E. coli* que contenían el fagemido se inocularon en placas de 96 pocillos que contenían 100 µl de medio 2TYAG por pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 4 horas con agitación. A cada pocillo se añadió el fago colaborador M13K07 con un moi de 10 y las placas se incubaron 1 hora más a 37°C. Las placas se centrifugaron en una centrífuga de mesa a 2.000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y los sedimentos celulares se resuspendieron en 100 µl de 2TYAK y se incubaron a 30°C durante la noche con agitación. Al día siguiente, las placas se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 minutos y 100 µl del sobrenadante que contenía el fago de cada pocillo se transfirieron cuidadosamente a una placa de 96 pocillos fresca. A cada pocillo se añadieron veinte µl de 6xMPBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora para bloquear el fago antes del ELISA.

Placas flexibles de 96 pocillos (Falcon) se recubrieron durante la noche a 4 °C con TR4 humano (1 µg/ml) o una proteína de fusión irrelevante (1 µg/ml). Ambos antígenos se revistieron en PBS. Después de recubrir, las soluciones se retiraron de los pocillos y las placas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en MPBS. Las placas se lavaron 3 veces con PBS y después, a cada pocillo, se añadieron 50 µl del fago prebloqueado. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y después se lavaron con 3 cambios de PBST, seguidos de 3 cambios con PBS.

A cada pocillo se añadieron 50 µl de un conjugado anti-M13-HRP (Pharmacia) a una dilución de 1 en 5.000 en MPBS y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó 3 veces con PBST, seguido de 3 veces con PBS.

Después, a cada pocillo se añadieron cincuenta µl de sustrato TMB y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos o hasta el desarrollo de color. La reacción se detuvo mediante la adición de 25 µl de H₂SO₄ 0,5 M. La señal generada se midió leyendo la absorbancia a 450 nm (A_{450}) usando un lector de placas de microtitulación (Bio-Rad 3550).

De un panel de 1500 clones que se sometieron a ELISA se identificaron 250 anticuerpos unidos a la proteína de fusión de TR4 pero no a una proteína de fusión irrelevante. Los resultados de una placa típica de clones se muestran en la Figura 1. El noventa y cinco por ciento de los anticuerpos aislados reconoció la proteína de fusión de TR4 pero no una proteína de fusión irrelevante.

Especificidad del ELISA del fago

Para determinar la especificidad de los anticuerpos unidos a TR4 se realizó un ELISA en fagos contra la proteína de fusión de TR4 y un panel de antígenos humanos relacionados y no relacionados TR7, TR5, TR10, BlyS (descritos en la publicación de patente internacional nº WO98/18921 y WO00/50597),

En 5 ml de 2YTAK se inocularon colonias individuales de *E. coli* que contenían el fagemido y se incubaron a 37°C durante 4 horas con agitación. A cada tubo se añadió el fago colaborador M13K07 (Pharmacia) con un moi de 10 y se incubaron durante 30 minutos a 37°C durante 1 hora, los primeros 30 minutos estáticos y los últimos 30 minutos con agitación suave. Las células se sedimentaron mediante centrifugación a 3.500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante que contenía el fago (5 ml) se transfirió cuidadosamente a un tubo fresco, se añadió 1 ml de 6MPBS y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora para prebloquear el fago antes del ELISA.

Placas flexibles de 96 pocillos (Falcon) se recubrieron durante la noche a 4 °C con cada antígeno (1 µg/ml). Todos los antígenos se revistieron en PBS. Después de recubrir, las soluciones se retiraron de los pocillos y las placas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en MPBS. Las placas se lavaron 3 veces con PBS y después, a cada pocillo, se añadieron 50 µl del fago prebloqueado. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y después se lavaron con 3 cambios de PBST, seguidos de 3 cambios con PBS.

A cada pocillo se añadieron 50 µl de un conjugado anti-M13-HRP (Pharmacia) a una dilución de 1 en 5.000 en MPBS y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó 3 veces con PBST, seguido de 3 veces con PBS.

Después, a cada pocillo se añadieron cincuenta µl de sustrato TMB y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos o hasta el desarrollo de color. La reacción se detuvo mediante la adición de 25 µl de H₂SO₄ 0,5 M. La señal generada se midió leyendo la absorbancia a 450 nm (A₄₅₀) usando un lector de placas de microtitulación (Bio-Rad 3550).

- 5 Usando este ensayo se mostró que los scFV T1014F08, T1014G03, T1014A04, T1014G04, T1014B11, T1017D09 se unían a TR4 pero no a TR7, TR5, TR10, BLYS, ni a una proteína de fusión irrelevante, lo que indica que los anticuerpos reconocen específicamente el TR4.

Ejemplo 2:

Análisis Biacore de la afinidad de los polipéptidos de unión a TR4

10 Materiales

Instrumento BiAcCore 2000

Software de control BiAcCore 2000 versión 3.1.1

BIAevaluation, versión 3.1

BiAcCore CM5 Sensor Chip, Cat # BR-1000-14 nº de lote 0364 (BiAcCore)

15 Tampón HBS-EP

Kit de acoplamiento de aminas nº cat. BR-1000-50 (BiAcCore)

EDC, nº 1048-950345 (BiAcCore)

NHS, nº 1048-950345 (BiAcCore)

Etanolamina, nº 1048-950345 (BiAcCore)

20 Acetato 10 mM, pH 4,0, nº de cat. BR1003-50 nº lote 1821-9503844 (BiAcCore)

TRAIL-FLAG (Alexis Biochemicals nº de cat. 522-003-C010 #L04793/a)

La temperatura fue de 25 °C para todos los experimentos.

Procedimientos generales

- 25 TR4, TR5, TR7 y TR10 (en forma de proteínas de fusión de Fc) se inmovilizan en celdas de flujo individual en un circuito sensor BiAcCore). La proteína de fusión TR4-Fc comprende los residuos M1-140 de TR4 (SEC ID Nº 1). El procesamiento postraduccional de esta proteína de fusión en una proteína de fusión TR4-Fc que comprende los residuos A109-140 de TR4 (SEC ID Nº 1). La proteína de fusión TR4-Fc comprende los residuos R70-S282 de TR5 (SEC ID Nº 2). Esta proteína se expresa en un sistema de expresión en baculovirus que usa el péptido señal GP. Por tanto, el procesamiento postraduccional de esta proteína de fusión tiene como resultado una proteína de fusión TR5-Fc que comprende los últimos 3 residuos del péptido señal GP (Ala-Asp-Pro) condensado con R70-S282 de TR5 (SEC ID Nº 2) condensado en la región Fc. La proteína de fusión TR4-Fc comprende los residuos E52-G184 de TR7 (SEC ID Nº 3). Esta proteína se expresa en un sistema de expresión en baculovirus que usa el péptido señal GP. Por tanto, el procesamiento postraduccional de esta proteína de fusión tiene como resultado una proteína de fusión TR7-Fc que comprende los últimos 3 residuos del péptido señal GP (Ala-Asp-Pro) condensado con E52-G184 de TR5 (SEC ID Nº 3) condensado en la región Fc. La proteína de fusión TR10-Fc comprende los residuos M1-G204 de TR10 (SEC ID Nº 4). El procesamiento postraduccional de esta proteína de fusión en una proteína de fusión TR10-Fc que comprende los residuos A56-G204 de TR10 (SEC ID Nº 4).

- 40 Se usa acoplamiento de amina para unir covalentemente cada receptor (Fc) a la matriz de dextrano sobre el circuito sensor CM5. El pH óptimo para este acoplamiento se analiza usando experimentos de preconcentración que varía de pH 4-7 y se determina en base a la pendiente de la unión.

- 45 El acoplamiento real se realiza usando el modo de inyección manual. Un nivel diana de ~2.000 UR se fija como objetivo para todas las celdas de flujo. (Esto puede variar de 2.000-3.100 dependiendo del peso molecular del receptor). La concentración para todos los receptores para inmovilización fue de 10 µg/ml en acetato 10 mM a pH 4,0. Todo el experimento de inmovilización se realiza a 5 microlitros/min. El tiempo de contacto para la inyección de EDC/NHS es de 7 minutos. La etanolamina se inyecta durante 7 minutos.

La detección selectiva se puede realizar con los siguientes procedimientos. El caudal para todo el ciclo de unión es de 25 microlitros/minuto. Los anticuerpos correspondientes a los scFv se diluyen en HBS-EP y se pasan a través de las cuatro celdas con los receptores de TRAIL inmovilizados. Cada muestra está en contacto con los receptores durante 4 minutos. La regeneración se realiza usando 15 microlitros de NaOH 25 Mm. Se considera que

regeneración ha tenido éxito cuando no solo ha eliminado el anticuerpo sino también no ha desnaturalizado el receptor inmovilizado.

5 El control positivo para este experimento de detección selectiva es una inyección idéntica (en cuanto a flujo y duración) del ligando soluble TRAIL. La concentración es de 1 microgramo/ml. El control negativo es una dilución a 1:10 en HBS-EP del diluyente del anticuerpo. Los datos se pueden analizar usando el paquete de software de BIAevaluation.

Análisis Biacore de los anticuerpos anti-TR4

10 En el siguiente experimento basado en los procedimientos generales descritos anteriormente se determinaron las afinidades de determinados anticuerpos (correspondientes a los scFv descritos en el presente documento) para TR4 usando un procedimiento de "resta de referencia doble" usando el receptor TR4:Fc en la celda de flujo experimental y TR2:Fc (que comprende los aminoácidos 1 - 240 de TR2 como se divulga en el documento WO96/34095) como control negativo.

Inmovilización:

15 El pH óptimo para este acoplamiento se analizó usando experimentos de preconcentración que varían de pH 4-7 y se determinó que era pH 4,0 tanto para TR4 como para TR2. Se usó acoplamiento de amina para unir covalentemente cada receptor (fc) a la matriz de dextrano sobre el circuito sensor CM5. El experimento de inmovilización se realizó usando el modo de inyección manual. Todo el experimento de inmovilización se realizó a 5 µl/min. A cada celda de flujo se aplicó una inyección de 3 minutos de EDC/NHS (1:1) para activar los ésteres. Un nivel diana de ~2.000 UR se fijó como objetivo para todas las celdas de flujo. Los receptores de fusión-Fc, TR4 y TR2 a 5 µg/ml, se inmovilizaron sobre celdas de flujo individuales de un circuito sensor. La cantidad aplicada varió de 8 - 14 µl. Una inyección de 3 minutos de etanolamina completó el experimento de inmovilización mediante inactivación de los ésteres.

Cinética:

25 Los ciclos de cinética se realizaron del siguiente modo: El caudal para todo el ciclo fue de 25 µl/minuto con un recorrido del flujo que incluye las celdas control (TR2) y experimental (TR4) en todos los tiempos. Para estabilizar el basa se aplicó una inyección de tampón de 1 minuto. El anticuerpo purificado (anticuerpo IgG1 que comprende los dominios VH y VL de cada uno de los scFv T1014A04, T1014G03, T1014F08, and T14G04) se diluyó de 10 µg/ml (65 nM) a 0,115 µg/ml (0,75 nM) en tampón de carrera y se analizaron por duplicado. Cada concentración estuvo en contacto con la celda de flujo control (TR2) y experimental (TR4) durante una fase de asociación de 4 minutos y una fase de disociación de 10 minutos. La regeneración se realizó usando NaOH 25 mM de 5 - 12 µl en función de la concentración de la muestra.

Evaluación:

35 Se realizó una resta de referencia doble, que se refiere a la resta de la celda de flujo control para cada ciclo, además de una resta del ciclo de tampón. El modelo de 1:1 Langmuir se usó para todo el ajuste de evaluación. Los resultados de estos experimentos se muestran en la tabla 5 a continuación.

Tabla 5: Afinidad de los anticuerpos por TR4

Clon	ka	kd	K _D	Chi ²
T1014A04	5,67 x 10 ⁵	2,65 x 10 ⁻⁴	4,68 x 10 ⁻¹⁰	2
T1014G03	3,50 x 10 ⁵	1,94 x 10 ⁻⁴	5,54 x 10 ⁻¹⁰	0,76
T1014F08	1,23 x 10 ⁶	1,02 x 10 ⁻⁴	8,27 x 10 ⁻¹⁰	1,83
T1014G04	6,05 x 10 ⁵	1,18 x 10 ⁻⁴	1,94 x 10 ⁻¹⁰	1,14

Ejemplo 3:

Inhibición de la unión de TRAIL biotinilado a TR4

I. Materiales:

- 10X PBS (Quality Biological Cat 130-069-161, Lote 708712)
- 5 Microplaca Immulon 4 (Dynex Cat 3855, Lote ND540319)
- Fracción V de seroalbúmina bovina (Sigma, nº 58H0456)
- Trihidroximetilaminometano (BASE TRIS)
- Tween 20 (Sigma)
- Fc anti-humana de cabra (Sigma, I-2136, nº89H4871)
- 10 TR-4:Fc (como se ha descrito en lo que antecede)
- TRAIL biotinilado (AM100200-Peprotech)
- HRP-Estreptavidina (Vector, nºL0328)
- Sistema de sustrato TMB en micropocillos con peroxidasa (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.)
- H₂SO₄ (Fisher)
- 15 Placa de dilución de 96 pocillos (Costar)

II. Tampones:

- Tampón de recubrimiento (1X PBS)
- Tampón de bloqueo (3% de BSA en PBS)
- Diluyente para todos los fines (1% de BSA en PBST)
- 20 Tampón de lavado (0,1% de Tween 20 y 1x PBS)

III. Procedimientos

25 El Fc anti-humano de cabra se diluye a 0,1 microgramos/ml en tampón de recubrimiento. Una microplaca Immulon 4 se recubre con 100 microlitros por pocillo de solución de Fc anti-humano de cabra y se incuban durante la noche a 4 °C. La solución de recubrimiento se decanta de la placa y se dispensa solución de bloqueo a 200 microlitros por pocillo. La placa se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del periodo de incubación de 1 hora, se decanta la solución de bloqueo de la placa y se dispensan 1 microgramo/ml de TR4-Fc a 100 microlitros por pocillo y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de incubar, la placa se lava cinco veces manualmente usando un colector Wheaton.

30 Los anticuerpos correspondientes a los scFv descritos en el presente documento se preparan (previamente) en una placa de dilución de baja unión usando diluyente. Los anticuerpos se preparan por duplicado y se diluyen a partir de la concentración madre con diluciones 2,5 para los 7 pocillos siguientes. Si se dispone de una forma purificada del anticuerpo, la concentración de partida es de 5 microgramos/ml. El control positivo ((TR4-Fc) se diluye desde 5 microgramos/ml. Se transfieren 100 microlitros a la placa de ELISA y se preincuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 20 microlitros de TRAIL biotinilado a 5 microgramos/ml a los 100 µl del sobrenadante y se mezclan. Los 120 microlitros combinados se incuban durante 2 horas a TA.

35 Después de la incubación de dos horas se repite el ciclo de lavado y la placa se decanta y se transfiere. El HRP-estreptavidina se diluye 1:2000 y se dispensan 100 microlitros por pocillo. La incubación se realiza durante una hora a temperatura ambiente. Al mismo tiempo se extraen cantidades iguales del sustrato TMB peroxidasa y la solución de peroxidasa se extrae y las soluciones se equilibran hasta la temperatura ambiente.

40 Después de la incubación de un hora, la placa se decanta y se lava con PBST cinco veces y se transfiere. El sustrato de TMB peroxidasa y la solución de peroxidasa B se combinan y se dispensan 100 microlitros a cada pocillo. El color se desarrolló a temperatura ambiente durante 15 minutos. El desarrollo de color se detiene añadiendo 50 microlitros de H₂SO₄ 1M a cada pocillo. La placa se lee inmediatamente a 450 nm usando el espectrómetro de Molecular Devices.

La CI-50. es decir la concentración de anticuerpo purificado que tuvo como resultado una inhibición del 50% y se mide. Para fines comparativos, en este ensayo se usa un polipéptido de TR4 como muestra.

Ejemplo 4:

Ensayo de la capacidad de los anticuerpos anti-TRAIL-R1 (TR4) para inducir apoptosis. Procedimientos generales:

Se analiza la capacidad de los anticuerpos Anti-TR4 para inducir apoptosis de las células que expresan TR4, solos o en combinación con agentes quimioterapéuticos o de reticulación. En resumen, se analiza la actividad de los anticuerpos para inducir apoptosis mediada por TR4 de las líneas celulares expresan TR4, SW480 y HeLa. Como control negativo se usa la línea celular de fibrosarcoma HT1080, que no expresa TR4.

Para inducir apoptosis, las células HeLa o SW480 se incuban con la concentración indicada de anticuerpos monoclonales o un anticuerpo control de IgG2a humano. Un día antes del ensayo, las células ($0,3 \times 10^6$ células/ml; 100 ul/pocillo) se siembran en una placas de 96 pocillos y se dejan adherir durante la noche. A día siguiente, el anticuerpo de ensayo se añade en presencia o ausencia de 2,0 microgramos/ml de cicloheximida (Sigma R75010-7). En algunos experimentos se compara la potencia de un anticuerpo monoclonal anti-TR4 con la proteína rhuTRAIL-FLAG (Alexis Biochemicals). rhuTRAIL se usa a las concentraciones indicadas en presencia del anticuerpo potenciador anti-FLAG a 2 microgramos/ml. El efecto de la reticulación secundaria también se evalúa midiendo la capacidad de los anticuerpos monoclonales para matar las células solos o en presencia de un anticuerpo secundario específico de IgFc anti-humano de cabra (SIGMA). Este anticuerpo de reticulación secundaria se añade a las células a una concentración equivalente del anticuerpo monoclonal de ensayo. La capacidad de un agente quimioterapéutico para sensibilizar las células para la destrucción mediante el anticuerpo monoclonal se evalúa mediante tratamiento de las células HeLa o SW480 con el anticuerpo monoclonal en presencia de topotecán (Hycamtin, SmithKline Beecham NDC 0007-4201-01).

Los ensayos se realizan durante 16-18 horas a 37 °C, tras lo cual se revela la viabilidad usando el reactivo Alamar Blue (Biosource, cat. # DAL1100) usando las condiciones sugeridas por el fabricante. La fluorescencia Alamar Blue se detecta usando el lector de fluorescencia CytoFluor a una excitación de 530 nm y una emisión de 590. Los resultados se expresan en forma del porcentaje de viabilidad en comparación con las células sin tratar.

Otros quimioterapéuticos que se pueden analizar en este ensayo (y usar en regímenes de tratamiento junto con los anticuerpos de la presente invención) incluyen, por ejemplo, 5-fluorouracilo, etopósido, Taxol, Cisplatino, citabarina (Cytosar), IFN gamma, camptotecina, irinotecán (camptosar, CPT-11), adrimicina (doxorubicina), metotrexato, paraplatinino, interferón-alfa, paclitaxel, docetaxel, el inhibidor de NF-kappa-B SN50 y gemcitabina (Gemzar™). Otras líneas celulares que se pueden analizar en este ensayo incluyen, por ejemplo, la línea celular del linfoma de Burkitt humano ST486, línea celular de carcinoma de mama humana MDA-MB-231, línea celular de carcinoma de útero humano RL-95, la línea celular de carcinoma de pulmón humano SK-MES-1, las líneas celulares de cáncer de colon humano, LS 174T, HT29, y HCT116, las líneas celulares de cáncer pancreático su.86.86 y CFPAC, la línea celular de cáncer de ovarios humana TOV21G y la línea celular de cáncer hepatocelular humano SNU449. Los cánceres de los tejidos correspondientes a los tejidos de los que derivaron estas líneas celulares de cáncer se pueden tratar con las composiciones terapéuticas de acuerdo con la invención.

Análisis de los anticuerpos anti-TR4

Usando el ensayo anterior, se analizó la capacidad de varios scFv descritos en el presente documento que se habían convertido en moléculas de IgG1 enteras para inducir apoptosis de las células que expresan TR4 1 (TR4). El formato IgG1 de T1014A04 induce apoptosis de las células SW480 en presencia de un agente de reticulación, pero en ausencia de cicloheximida. En presencia de cicloheximida, pero con o sin un agente de reticulación, el formato IgG1 de T1014A04 induce apoptosis de las células SW480 y HeLa. La destrucción de las células SW480 y HeLa con el formato IgG1 de T1014A04 en presencia de cicloheximida es mayor cuando también se usa el reactivo de reticulación. De hecho, en presencia de un reactivo de reticulación y cicloheximida, el formato IgG1 de T1014A04 puede inducir más apoptosis que una concentración igual (en ng/ml) de TRAIL soluble. El formato IgG1 de T1015A02 no induce muerte en ausencia del agente de sensibilización cicloheximida. En presencia de cicloheximida, con o sin un agente de reticulación, el formato IgG1 de T1015A02 induce apoptosis de las células SW480 pero no de las células HeLa. La destrucción de SW480 mediante tratamiento con el formato IgG1 de T1015A02 es mayor en presencia de un reactivo de reticulación.

Además, el ensayo descrito en este ejemplo también se puede usar para analizar el efecto de más de un anticuerpo anti-TR4 sobre las células que expresan TR4. Por ejemplo, las células se pueden tratar con un anticuerpo que se une específicamente a TR4 y un anticuerpo que se une específicamente a TR7. Como anteriormente, este experimento se puede realizar en presencia o ausencia de uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes de reticulación. En otra variación del presente experimento, los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden analizar para determinar su efecto inductor de apoptosis cuando se usan en presencia de TRAIL. La cantidad de apoptosis inducida mediante tratamiento dual con anti-TR4 y anti-TR7 puede ser sinérgica en comparación con el tratamiento con anti-TR4 o anti-TR7 por separado. Dicho efecto puede ser más pronunciado

cuando el experimento se realiza en presencia de agentes quimioterapéuticos y/o de reticulación.

Ejemplo 5:

Identificación y clonación de los dominios VH y VL

5 Un procedimiento para identificar y clonar los dominios VH y VL de las líneas celulares que expresan un anticuerpo concreto es realizar una PCR con cebadores específicos de VH y VL en ADNc preparado a partir de las líneas celulares que expresan el anticuerpo. En resumen, se aísla el ARN de las líneas celulares y se usa como molde para la RT-PCR diseñada para amplificar los dominios VH y VL de los anticuerpos expresados por las líneas celulares de EBV. Las células se pueden lisar en el reactivo TRIzol® (Life Technologies, Rockville MD) y se extrajo con un quinto del volumen del cloroformo. Tras la adición de cloroformo, la solución se deja incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C en una centrífuga de mesa. El sobrenadante se recoge y el ARN se precipita usando un volumen igual de isopropanol. El ARN precipitado se sedimenta mediante centrifugación a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C en una centrífuga de mesa. Tras la centrifugación se desecha el sobrenadante y se lava con etanol al 75%. Tras el lavado, el ARN se centrifuga de nuevo a 800 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se desecha el sobrenadante y el sedimento se deja secar al aire. El ARN se disuelve en agua DEPC y se calienta hasta 60°C durante 10 minutos. Las cantidades de ARN se pueden determinar usando mediciones de la densidad óptica.

El ADNc se puede sintetizar de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica, de 1,5-2,5 microgramos de ARN usando transcriptasa inversa y cebadores hexaméricos aleatorios. Después, el ADNc se usa como molde para la amplificación por PCR de los dominios VH y VL. Los cebadores usados para amplificar los genes VH y VL se muestran en la Tabla 6. Normalmente, una reacción de PCR usa un único cebador en 5' y un único cebador en 3'. En ocasiones, cuando la cantidad de molde de ARN disponible es limitante, o para mayor eficiencia, se pueden usar grupos de cebadores 5' y 3'. Por ejemplo, en ocasiones los cinco cebadores para VH-5' y los cebadores JH3' se usan en una única reacción de PCR. La reacción de PCR se lleva a cabo en un volumen de 50 microlitros que contiene 1X tampón de PCR, 2 mM de cada dNTP, 0,7 unidades de polimerasa Taq High Fidelity, mezcla de cebadores en 5', mezcla de cebadores en 3' y 7,5 microlitros de ADNc. La mezcla de cebadores en 5' y 3' de VH y VL se puede realizar combinando juntos 22 pmol y 28 pmol, respectivamente, de cada uno de los cebadores individuales. Las condiciones de PCR son: 96°C durante 5 minutos; seguido de 25 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 50 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto, seguido de un ciclo de extensión de 72 °C durante 10 minutos. Una vez completada la reacción, los tubos de muestras se almacenaron a 4 °C.

30 **Tabla 6: Secuencias de los cebadores usados para amplificar los dominios VH y VL**

Nombre del cebador	SEC ID Nº	Secuencia del cebador (5'-3')
Cebadores para VH		
Hu VH1-5'	6	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
Hu VH2-5'	7	CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGG
Hu VH3-5'	8	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
Hu VH4-5'	9	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG
Hu VH5-5'	10	GAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGC
Hu VH6-5'	11	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG
Hu JH1,2-5'	12	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC
Hu JH3-5'	13	TGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC
Hu JH4,5-5'	14	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC
Hu JH6-5'	15	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC
Cebadores para VL		
Hu V kappa1-5'	16	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC

Nombre del cebador	SEC ID N°	Secuencia del cebador (5'-3')
Hu Vkappa2a-5'	17	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCC
Hu Vkappa2b-5'	18	GATATTGTGATGACTCAGTCTCC
Hu Vkappa3-5'	19	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCC
Hu Vkappa4-5'	20	GACATCGTGATGACCCAGTCTCC
Hu Vkappa5-5'	21	GAAACGACACTCACGCAGTCTCC
Hu Vkappa6-5'	22	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC
Hu Vlambdal-5'	23	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC
Hu Vlambda2-5'	24	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC
Cebadores para VL		
Hu Vlambda3-5'	25	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC
Hu Vlambda3b-5'	26	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC
Hu Vlambda4-5'	27	CACGTTATACTGACTCAACCGCC
Hu Vlambda5-5'	28	CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC
Hu Vlambda6-5'	29	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA
Hu Jkappa1-3'	30	ACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCC
Hu Jkappa2-3'	31	ACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
Hu Jkappa3-3'	32	ACGTTTGATATCCACTTTGGTCCC
Hu Jkappa4-3'	33	ACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC
Hu Jkappa5-3'	34	ACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCC
Hu Jlambdal-3'	35	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC
Hu Jlambda2-3'	36	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC
Hu Jlambda3--3'	37	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC
Hu Jlambda3b-3'	38	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC
Hu Jlambda4-3'	39	CACGTTATACTGACTCAACCGCC
Hu Jlambda5-3'	40	CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC
Hu Jlambda6-3'	41	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA

Después, las muestras para la PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,3 %. Las bandas de ADN de los tamaños previstos (~506 pares de bases para los dominios VH y 344 pares de bases para los dominios VL) se pueden escindir del gel y purificar usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Los productos de la PCR purificados se pueden ligar en un vector de clonación para PCR (vector TA de Invitrogen Inc. , Carlsbad, CA). Los productos de la PCR clonados individuales se pueden aislar tras la transfección de *E. coli* y selección del color azul/blanco. Después, los productos de la PCR clonados se pueden secuenciar usando procedimientos conocidos en la técnica.

5

Ejemplo 6: Los anticuerpos anti-TR4 retrasan el crecimiento de las células tumorales en ratones atímicos.

La línea de células tumorales SW480 (adenocarcinoma colorrectal) se mantuvo *in vitro* en medio L-15 de Leibovitz suplementado con suero bovino fetal, glutamina y antibióticos según las instrucciones recibidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo. Las células del pase 3-10 se usaron para los estudios *in vivo*. Las células tumorales se recogieron de los matraces R-150, se aclararon con PBS estéril y después se resuspendieron en solución salina estéril a una densidad de $5(10^4)$ células/ul. Las células tumorales se implantaron subcutáneamente en la parte superior del dorso o en los flancos de ratones Swiss atímicos a una densidad de 10^7 células por lugar, 2 lugares por animal. En modelos de tumor preventivo (de novo), los agentes quimioterapéuticos y los tratamientos con anticuerpos se iniciaron 24 horas después de la inoculación de las células tumorales.

El tratamiento con anticuerpo, con un anticuerpo que comprende el dominio VH y VL de T1014A04 o T1014G03 (en este ejemplo en lo sucesivo "T1014A04" o "T1014G03"), fue el siguiente: dosis de carga: 20 mg/kg, por vía intravenosa, 24 horas después de la inyección de células tumorales con dosis de mantenimiento de 20 mg/kg, por vía intraperitoneal. Las dosis de mantenimiento de T1014A04 se administraron los días cuatro, siete, diez, trece y dieciséis. Las dosis de mantenimiento de T1014G03 se administraron los días cuatro, siete, diez, catorce, veintidós y veinticinco. En este experimento el agente quimioterapéutico usado fue topotecán. En el experimento con T1014A04, la dosis y la frecuencia de la dosis de topotecán fueron las siguientes: 0,3 o 0,6 mg/kg, por vía intraperitoneal el primero, segundo, tercero, cuarto, séptimo, décimo, decimocuarto, decimosexto, vigésimo segundo y vigésimo quinto días del experimento. En el experimento con T1014G03, la dosis y la frecuencia de la dosis de topotecán fueron las siguientes: 0,3 o 0,6 mg/kg, por vía intraperitoneal el primero, segundo, tercero, cuarto, séptimo, décimo, decimotercero y decimosexto días del experimento.

Cuando T1014A04 o T1014G03 se administraron con topotecán se observó una reducción significativa del tamaño del tumor. El tratamiento con el anticuerpo solo puede reducir el crecimiento del tumor en puntos de tiempo más tardíos. (Véanse las Figuras 1 - 3).

El ensayo descrito anteriormente también se puede usar para analizar el efecto del tratamiento con más de un anticuerpo anti-TR4 sobre el crecimiento de las células tumorales *in vivo*. Por ejemplo, los animales en los que se han inyectado las células tumorales se pueden tratar con un anticuerpo que se une específicamente a TR4 y un anticuerpo que se une específicamente a TR7. Como anteriormente, este experimento se puede realizar en presencia o ausente de uno o más agentes quimioterapéuticos. En otra variación del presente experimento, los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden administrar en combinación con TRAIL. La capacidad de dicha terapia de combinación para inhibir el crecimiento de las células tumorales en comparación con el tratamiento con un anticuerpo solo se puede analizar usando los procedimientos detallados anteriormente y comparando los resultados obtenidos entre la terapia de combinación con los resultados obtenidos del tratamiento con anti-TR4 y anti-TR7 por separado.

Ejemplo 7: Efecto de los anticuerpos anti-TR4 sobre hepatocitos humanos

El efecto de T1014G03 (lote AB22125-M2) en los hepatocitos primarios humanos se determinó midiendo la activación de la caspasa o la viabilidad celular. Los hepatocitos humanos se trataron con 15,6, 62,5, 250 o 1000 ng/ml de TRAIL (residuos de aminoácidos 114-281, Biomol Research Laboratories Inc, Plymouth Meeting, PA), 62,5, 125, 250, o 1000 ng/ml del AcMo control isotipo (hlgG₁, CAT002) o 62,5, 125, 250, o 1000 ng/ml de T1014G03. La activación de la caspasa se determinó a las 6 horas tras el tratamiento, mientras que la viabilidad se determinó a las 24 h tras el tratamiento.

La actividad de la caspasa se midió usando un ensayo fluorimétrico usando el sustrato de la caspasa rodamina conjugada con DEVD (p. ej., ensayo fluorimétrico de caspasa homogéneo disponible en Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, IN)). La viabilidad celular se determinó mediante un ensayo ALAMAR Blue™ (Biosource International, Camarillo, CA). TRAIL redujo la viabilidad celular a todas las concentraciones analizadas e indujo actividad de la caspasa a la concentración más alta analizada. En contraste con TRAIL, se encontró que el tratamiento con T1014G03 no efectuaba ni actividad de caspasa ni viabilidad celular en los hepatocitos humanos.

Ejemplo 8: Modelo de xenoinjerto en carcinoma de útero RL95-2

El objetivo de este experimento era examinar si T1014G03 podía alterar el patrón de crecimiento del tumor RL95-2 en ratones atímicos cuando se usa T1014G03 como único agente.

RL95-2 es una línea celular de adenocarcinoma uterino que forma tumores sólidos cuando se inyecta por vía subcutánea en ratones atímicos. Las células RL95-2 han mostrado que expresan TRAIL-R1 y son sensibles *in vitro* a la apoptosis inducida por T1014G03 en ausencia de cualquier agente sensibilizante. Según estos hallazgos, el modelo de RL95-2 en ratones atímicos se seleccionó para analizar la eficacia *in vivo* de T1014G03 sobre la reducción de tumores preexistentes. En estos experimentos, T1014F08 sirvió como control negativo (hulgA). T1014F08 se une a TRAIL-R1 pero no se observó que tuviera actividad agonista.

Las células RL95-2 en fase log se inyectaron SC (10 millones de células/ratón) en ratones atímicos. Después de 3 días, se determinó el tamaño del tumor y los animales se segregaron en varios grupos de tratamiento (6

- animales/grupo de tratamiento) de modo que todos los grupos de tratamiento tenían un tumor de tamaño 5 x 5 mm. En los ratones se inyectó (IP) los anticuerpos T1014G03 o T1014F08 a dosis de 0,2, 2.0, and 20 mg/Kg los días 4,8, 12 y 16. El tamaño del tumor se monitorizó dos veces a la semana desde el día 3 al día 43. Los ratones que recibieron la inyección de vehículo (solución salina) sirvieron como control. Los datos se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney y se expresaron como el incremento del tamaño del tumor respecto al tamaño del tumor a los 3 días. El crecimiento del tumor se retrasó significativamente en los ratones tratados con el anticuerpo T1014G03 a 20 mg/Kg en comparación con el control y los animales tratados con T1014F08. El efecto del anticuerpo T1014G03 a 0,2 and 2,0 mg/Kg no fue significativamente diferente del control. Los datos demuestran la capacidad de T1014G03 para inhibir el crecimiento de células tumorales preestablecidas.
- El ensayo descrito anteriormente también se puede usar para analizar el efecto del tratamiento con más de un anticuerpo anti-TR4 sobre el crecimiento de tumores preestablecidos *in vivo*. Por ejemplo, los animales en los que se han inyectado las células tumorales se pueden tratar con un anticuerpo que se une específicamente a TR4 y un anticuerpo que se une específicamente a TR7. Como anteriormente, este experimento se puede realizar en presencia o ausente de uno o más agentes quimioterapéuticos. En otra variación del presente experimento, los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden administrar en combinación con TRAIL. La capacidad de dicha terapia de combinación para inhibir el crecimiento de tumores o incluso eliminar los tumores en comparación con el tratamiento con un anticuerpo solo se puede analizar usando los procedimientos detallados anteriormente y comparando los resultados obtenidos entre la terapia de combinación con los resultados obtenidos del tratamiento con anti-TR4 y anti-TR7 por separado.

Ejemplo 9: Inmunohistoquímica de tejido tumoral primario para la expresión de TRAIL R1 (TR4)

Tejidos tumorales humanos primarios de la vejiga urinaria, mama, colon, hígado, pulmón, ovarios y páncreas se tiñeron con un anticuerpo policlonal frente a TRAIL-R1 antihumano de cabra (R&D Systems). Este anticuerpo tiñe las células transfectadas con construcciones de la expresión de TRAIL-R1 pero no las células transfectadas con el vector control. Los datos de la tinción se presentan a continuación en la tabla 7. Se observó tinción positiva en ciertos tejidos de carcinoma de mama, colon, pulmón y estómago. Por el contrario, las muestras de tejido humano normal de los mismos órganos no tenían una tinción específica. Además, no se observó tinción específica en muestras de bazo e hígado normales de mono y humanas.

Tabla 7: Tinción inmunohistoquímica de tejidos tumorales y normales humanos

Tejido tumoral	Nº evaluados	Positivos	+/-	Negativos
Vejiga urinaria	2	0	1	1
Mama	2	1	0	1
Colon	2	1	1	0
Hígado	2	0	1	1
Pulmón	2	2	0	1
Ovarios	1	0	0	1
Páncreas	2	0	0	2
Estómago	1	1	0	0
Total	14	5	3	6
Tejido normal				
Vejiga urinaria	1	0	0	1
Mama	0	0	0	0

Tejido tumoral	Nº evaluados	Positivos	+/-	Negativos
Colon	1	0	0	1
Hígado	1	0	1	0
Pulmón	1	0	0	1
Ovarios	1	0	0	1
Páncreas	1	0	0	1
Estómago	0	0	0	0
Total	6	0	1	5

Ejemplo 10: Producción y purificación del anticuerpo

El siguiente ejemplo describe procedimientos de producción y purificación de anticuerpos a gran escala que se pueden usar para fabricar anticuerpos de la presente invención. Un experto en la técnica conocerá las modificaciones de rutina del protocolo descrito a continuación, por ejemplo respecto a la elección de la columna, la columna, la carga, el lavado, y los tampones de elución y el pH.

Escalada del cultivo celular y producción de anticuerpos

Se usa un medio de crecimiento sin suero y sin fuente de animales (HGS-NS0SF) desde la descongelación de las células hasta la escalada al biorreactor de producción. El medio de crecimiento HGS-NS0SF se prepara añadiendo 20 ml/l de suplemento GS y 1 ml/l de colesterol (sintético) en concentrado lipídico en 1 l de medio de hibridoma CD son L-glutamina (Invitrogen/Life technologies). Los medios se almacenan a 2-8°C hasta su uso.

Descongelación de las células de los viales MCB

Aproximadamente 16×10^6 células se descongelan a 37 °C en un baño de agua. Las células se transfieren a matraces de cultivo T-225 para dar aproximadamente 50 ml de volumen de trabajo con una densidad de inoculación de aproximadamente $3,0 \times 10^5$ células/ml. Después, los matraces de cultivo se introducen en un incubador de CO₂ humidificado con 5% de CO₂ durante 4 días.

Primera expansión(es) del cultivo en matraces rotatorios

El cultivo se expande en asepsia a un matraz rotatorio de 500 ml para dar aproximadamente 300 ml de volumen de trabajo con una densidad celular de inoculación de aproximadamente $2,2 \times 10^5$ células/ml. Después, el matraz rotatorio se introduce en agitadores magnéticos en un incubador de CO₂ humidificado a 37 °C con 5% de CO₂ durante 4 días. La velocidad de agitación para el matraz rotatorio es de 80 rpm.

De nuevo, el cultivo se expande en asepsia a un matraz rotatorio de 3.000 ml para dar aproximadamente 1.500 ml de volumen de trabajo con una densidad celular de inoculación de aproximadamente $2,2 \times 10^5$ células/ml. Después, el matraz rotatorio se introduce en agitadores magnéticos en un incubador de CO₂ humidificado a 37 °C con 5% de CO₂ durante 4 días. La velocidad de agitación para los matraces rotatorios es de 80 rpm. Si se acumula suficiente cantidad de cultivo celular para inocular el biorreactor de siembra, proceder a la etapa 4. En caso contrario, el cultivo se expande en asepsia a múltiples matraces rotatorios de 3.000 ml para un total de 3 a 4 expansiones hasta que se acumula una cantidad suficiente de cultivo celular para inocular el biorreactor de siembra.

Cultivo de siembra

El biorreactor de siembra está equipado con 2 propulsores para mezclar, una sonda de oxígeno disuelto, una sonda de temperatura, una sonda de pH, un muestreador aséptico y sistemas adicionales. La primera etapa del cultivo celular es la adición del medio HGS-NS0SF al biorreactor. Una vez que la temperatura del medio HGS-NS0SF alcanza $37 \pm 0,5$ °C, el oxígeno disuelto (OD) y los niveles de pH se estabilizan mediante la adición de N₂ and CO₂ para disminuir la concentración de oxígeno a 30 ± 5 % de saturación de aire y obtener un pH de $7,20 \pm 0,10$. La agitación es de 80 rpm. El cultivo celular combinado se transfiere en asepsia a un biorreactor de siembra de 15 l que contiene medio de crecimiento HGS-NS0SF para dar un cultivo con una densidad celular de inoculación de aproximadamente $2,2 \times 10^5$ células/ml. Durante el proceso de cultivo, la temperatura se mantiene mediante una manta térmica y un dedo de refrigeración la concentración de oxígeno se mantiene mediante un aspersor y

aireación en superficie y el pH se controla mediante la adición de gas CO_2 para disminuir el pH. El periodo de cultivo es de 5-6 días. Los orificios de aireación del biorreactor están protegidos por filtros de ventilación hidrófobos de 0,2 μm .

Cultivo de producción

- 5 El biorreactor de producción está equipado con 2 propulsores para mezclar, dos sondas de oxígeno disuelto, una sonda de temperatura, dos sondas de pH, un muestreador aséptico y sistemas adicionales. 80 l de medio de crecimiento HGS-NS0SF se transfieren en asepsia al biorreactor de producción de 100 l. Una vez que la temperatura del medio de crecimiento HGS-NS0SF alcanza $37 \pm 0,5$ °C, el OD y los niveles de pH se estabilizan mediante la adición de N_2 and CO_2 para disminuir la concentración de oxígeno disuelto a 30 ± 5 % de saturación de aire y obtener un pH de $7,20 \pm 0,10$. La agitación es de 45 rpm. El cultivo de siembra de 15 l se transfiere en asepsia a un biorreactor de producción para dar un cultivo con una densidad celular de inoculación de aproximadamente $2,2 \times 10^5$ células/ml. Durante el proceso de cultivo, la temperatura se mantienen mediante un intercambiador de calor, la concentración de oxígeno se mantienen mediante un aspersor y aireación en superficie y el pH se controla mediante la adición de gas CO_2 para disminuir el pH. Al tercer día de la inoculación, cuando la densidad celular alcanza aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml se introdujeron en el biorreactor de producción medio HGS-NS0SF en alimentación discontinua. El cultivo de producción que contiene el anticuerpo se recogió el día 5 después de la alimentación.

Recuperación y purificación

Recolección del sobrenadante celular

- 20 El sobrenadante celular (p. ej., el sobrenadante del cultivo de células NSO que expresan anticuerpos descritos en el presente documento) se recoge el día 5 o 6 después de la última alimentación en el biorreactor de producción final usando un proceso de cultivo celular de alimentación discontinua. El procedimiento de recolección se inicia cuando se alcanza una concentración del anticuerpo de al menos 400 mg/ml. La temperatura del cultivo celular en el biorreactor de producción se enfría hasta 15 °C en el momento de la recolección y se mantiene a dicha temperatura durante la recuperación. Se usa un procedimiento de filtración profunda para la eliminación de las células y la recuperación del anticuerpo. El procedimiento de filtración consiste en filtros con un tamaño de poro de 4,5 μm , 0,45 μm y 0,2 μm conectados en serie. Se mantiene un caudal constante de 1,00 l/min durante la operación con un control de presión con filtro de hasta 102 kPa. El sobrenadante del cultivo filtrado por 0,2 μm se recoge en una bolsa de procesamiento y se transfiere para purificación.
- 30 El procedimiento de purificación se realiza a 22 a 26 °C.

Cromatografía en columna MEP HyperCEL HCIC

- El sobrenadante del cultivo se carga en una columna MEP HyperCEL™, una cromatografía de interacción de cargas hidrofóbicas, HCIC, disponible en Ciphergen Biosystems, o una columna equivalente que se equilibra en TRIS 50 mM, cloruro sódico 0,5M, pH 7,5. La columna MEP se lava con citrato sódico 25 mM, cloruro sódico 0,15M, pH 6,4 y se eluye con citrato sódico 25 mM, cloruro sódico 0,15M, pH 4,4. La elución se monitoriza mediante absorbancia en ultravioleta (UV) a 280 nm, Se recogen las fracciones de los picos, se analizan mediante A_{280} y SDS-PAGE. Las fracciones adecuadas se combinan.

Inactivación viral

- 40 El eluato de la columna MEP se ajusta con ácido cítrico 1M hasta un $3,4 \pm 0,2$ y se deja reposar durante 45-60 minutos para inactivación viral. Después, la solución se reajusta a un pH hasta 5,0 con base TRIS 1M.

Cromatografía en columna SP Sepharose FF

- El eluato inactivado de la columna MEP se diluye con agua para inyectables (WFI) hasta una conductividad de 5 mS/cm, y se carga en una columna SP Sepharose FF (cromatografía de intercambio de cationes, Amersham-Pharmacia) o una columna equivalente equilibrada con acetato sódico 65 mM, pH 5,0. El anticuerpo eluye de la columna SP con citrato sódico 20 mM, cloruro sódico 0,15 M, 1,9 % de glicina, pH 7,1. La elución se monitoriza mediante absorbancia en ultravioleta (UV) a 280 nm. Se recogen las fracciones de los picos y se analizan mediante A_{280} y SDS-PAGE. Las fracciones adecuadas se combinan.

Filtración, diafiltración y concentración para eliminación de virus

- 50 El eluato de la columna SP Sepharose FF se filtra mediante un filtro de 0,2 μm conectado secuencialmente y un filtro de eliminación viral Pall DV50. El filtrado del DV50 se introduce en un dispositivo de membrana con un PM de corte de 30 kD (Millipore Pellicon) para concentrar hasta una concentración diana de 35 - 40 mg/ml y se diafiltra frente a citrato sódico 10 mM, 1% de glicina, 0,5% de sacarosa, pH 6,5. El material diafiltrado se monitoriza mediante A_{280} . El volumen diafiltrado se filtra a través de un filtro de 0,2 μm y se almacena a 2-8 °C hasta 24 horas.

Cromatografía en columna Q Sepharose FF

La solución TRM-1 diafiltrada se pasa por una columna Q Sepharose FF (cromatografía de intercambio aniónico, Amersham-Pharmacia) o columna equivalente equilibrada con citrato sódico 10 mM , 1,9% de glicina, 0,5% de sacarosa, pH 6,5. El anticuerpo se recoge en el flujo continuo y se monitoriza mediante A₂₈₀. Las fracciones adecuadas se combinan y la concentración diana final es de 25 mg/ml.

5 Formulación a granel, filtración y carga de la sustancia farmacológica a granel

El polisorbato 80 (solución madre al 2%) se prefiltra a través de un filtro de 0,2 µm y se añade a la solución del anticuerpo de la etapa 7 hasta una concentración final de 0,02 %. El anticuerpo purificado se filtra en asepsia en una campana de flujo laminar a través de un filtro de 0,2 µm y se carga en contenedores de polipropileno.

Almacenamiento de la sustancia farmacológica a granel

- 10 La sustancia farmacológica a granel se almacena a 2-8 °C (almacenamiento a corto plazo) o a una temperatura igual o inferior a -65 °C (almacenamiento a largo plazo) antes de la liberación de producto. Se realizan análisis durante el procedimiento del cultivo en el biorreactor de producción sin procesar en el momento de la recolección de cada lote y análisis durante el procedimiento de purificación. Se toman muestras del biorreactor en asepsia y el cultivo se analiza a varios tiempos durante el cultivo para la densidad celular, la viabilidad y la determinación de nutrientes con el fin de garantizar la consistencia del material que se suministra para purificar. El procedimiento de purificación se monitoriza en cada etapa. El aspecto se comprueba mediante inspección visual. La concentración proteica se determina mediante la absorbancia a 280 nm. Se comprueba el pH del material. Se comprueba la pureza, por ejemplo mediante SDS-PAGE y cromatografía de exclusión por tamaño. Se puede realizar un ELISA para comprobar la capacidad del anticuerpo para unirse a su antígeno. La actividad biológica del anticuerpo también se monitoriza. El contenido en ARN residual, los niveles de endotoxina y la carga biológica (el número de organismos viables presentes en la preparación del anticuerpo) se monitorizan y mantienen en o por debajo de los niveles estándar aceptables. Adicionalmente se puede analizar el contenido en oligosacáridos; la secuencia peptídica de las cadenas del anticuerpo también se pueden analizar usando secuenciación en N-terminal y mapeo peptídico. También se pueden realizar estudios a largo y a corto plazo.

25 Listado de secuencias

<110> Human Genome Sciences, Inc.

<120> Anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a los receptores de TRAIL

30 <130> PF550PCT

<140> Pendiente de asignación

<141> 2002 - 05 - 07

35 <150> 60/369,860

<151> 2002 - 04 - 05

<150> 60/341,237

<151> 2001 - 12 - 20

40

<150> 60/331,310

<151> 2001 - 11 - 14

<150> 60/331,044

ES 2 437 992 T3

<151> 2001 - 11 - 07

<150> 60/327,364

<151> 2001 - 10 - 09

5

<150> 60/323,807

<151> 2001 - 09 - 21

<150> 60/309,176

10 <151> 2001 - 08 - 02

<150> 60/294,981

<151> 2001 - 06 - 04

15 <150> 60/293,473

<151> 2001 - 05 - 25

<160> 66

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 468

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

30

```

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

ES 2 437 992 T3

Ser Ala Arg Ala Arg Ala Gly Arg Ala Pro Gly Pro Arg Pro Ala Arg
65 70 75 80

Glu Ala Ser Pro Arg Leu Arg Val His Lys Thr Phe Lys Phe Val Val
85 90 95

Val Gly Val Leu Leu Gln Val Val Pro Ser Ser Ala Ala Thr Ile Lys
100 105 110

Leu His Asp Gln Ser Ile Gly Thr Gln Gln Trp Glu His Ser Pro Leu
115 120 125

Gly Glu Leu Cys Pro Pro Gly Ser His Arg Ser Glu Arg Pro Gly Ala
130 135 140

Cys Asn Arg Cys Thr Glu Gly Val Gly Tyr Thr Asn Ala Ser Asn Asn
145 150 155 160

Leu Phe Ala Cys Leu Pro Cys Thr Ala Cys Lys Ser Asp Glu Glu Glu
165 170 175

Arg Ser Pro Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Ala Cys Gln Cys Lys Pro
180 185 190

Gly Thr Phe Arg Asn Asp Asn Ser Ala Glu Met Cys Arg Lys Cys Ser
195 200 205

Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met Val Lys Val Lys Asp Cys Thr Pro Trp
210 215 220

Ser Asp Ile Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Asn Gly His Asn Ile
225 230 235 240

Trp Val Ile Leu Val Val Thr Leu Val Val Pro Leu Leu Leu Val Ala
245 250 255

Val Leu Ile Val Cys Cys Cys Ile Gly Ser Gly Cys Gly Gly Asp Pro
260 265 270

Lys Cys Met Asp Arg Val Cys Phe Trp Arg Leu Gly Leu Leu Arg Gly
275 280 285

Pro Gly Ala Glu Asp Asn Ala His Asn Glu Ile Leu Ser Asn Ala Asp
290 295 300

Ser Leu Ser Thr Phe Val Ser Glu Gln Gln Met Glu Ser Gln Glu Pro
305 310 315 320

Ala Asp Leu Thr Gly Val Thr Val Gln Ser Pro Gly Glu Ala Gln Cys
325 330 335

Leu Leu Gly Pro Ala Glu Ala Glu Gly Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu
340 345 350

Val Pro Ala Asn Gly Ala Asp Pro Thr Glu Thr Leu Met Leu Phe Phe
355 360 365

Asp Lys Phe Ala Asn Ile Val Pro Phe Asp Ser Trp Asp Gln Leu Met
370 375 380

ES 2 437 992 T3

Arg Gln Leu Asp Leu Thr Lys Asn Glu Ile Asp Val Val Arg Ala Gly
 385 390 395 400
 Thr Ala Gly Pro Gly Asp Ala Leu Tyr Ala Met Leu Met Lys Trp Val
 405 410 415
 Asn Lys Thr Gly Arg Asn Ala Ser Ile His Thr Leu Leu Asp Ala Leu
 420 425 430
 Glu Arg Met Glu Glu Arg His Ala Lys Glu Lys Ile Gln Asp Leu Leu
 435 440 445
 Val Asp Ser Gly Lys Phe Ile Tyr Leu Glu Asp Gly Thr Gly Ser Ala
 450 455 460
 Val Ser Leu Glu
 465

<210> 2

<211> 299

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gln Gly Val Lys Glu Arg Phe Leu Pro Leu Gly Asn Ser Gly Asp
 1 5 10 15
 Arg Ala Pro Arg Pro Pro Asp Gly Arg Gly Arg Val Arg Pro Arg Thr
 20 25 30
 Gln Asp Gly Val Gly Asn His Thr Met Ala Arg Ile Pro Lys Thr Leu
 35 40 45
 Lys Phe Val Val Val Ile Val Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Ala Tyr
 50 55 60
 Ser Ala Thr Thr Ala Arg Gln Glu Glu Val Pro Gln Gln Thr Val Ala
 65 70 75 80
 Pro Gln Gln Gln Arg His Ser Phe Lys Gly Glu Glu Cys Pro Ala Gly
 85 90 95
 Ser His Arg Ser Glu His Thr Gly Ala Cys Asn Pro Cys Thr Glu Gly
 100 105 110
 Val Asp Tyr Thr Asn Ala Ser Asn Asn Glu Pro Ser Cys Phe Pro Cys
 115 120 125
 Thr Val Cys Lys Ser Asp Gln Lys His Lys Ser Ser Cys Thr Met Thr
 130 135 140
 Arg Asp Thr Val Cys Gln Cys Lys Glu Gly Thr Phe Arg Asn Glu Asn
 145 150 155 160
 Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Ser Arg Cys Pro Ser Gly Glu Val
 165 170 175
 Gln Val Ser Asn Cys Thr Ser Trp Asp Asp Ile Gln Cys Val Glu Glu

10

ES 2 437 992 T3

Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile
 165 170 175

Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala
 180 185 190

Ala Val Val Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp
 195 200 205

Lys Lys Val Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220

Asp Pro Glu Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp
 225 230 235 240

Asn Val Leu Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val Pro
 245 250 255

Glu Gln Glu Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val Asn
 260 265 270

Met Leu Ser Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala Glu Ala
 275 280 285

Glu Arg Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn Glu Gly Asp
 290 295 300

Pro Thr Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val
 305 310 315 320

Pro Phe Asp Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp
 325 330 335

Asn Glu Ile Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr
 340 345 350

Leu Tyr Thr Met Leu Ile Lys Trp Val Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala
 355 360 365

Ser Val His Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu
 370 375 380

Ala Lys Gln Lys Ile Glu Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met
 385 390 395 400

Tyr Leu Glu Gly Asn Ala Asp Ser Ala Met Ser
 405 410

<210> 4

<211> 386

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Leu Trp Gly Gln Ser Val Pro Thr Ala Ser Ser Ala Arg Ala
 1 5 10 15

Gly Arg Tyr Pro Gly Ala Arg Thr Ala Ser Gly Thr Arg Pro Trp Leu
 20 25 30

ES 2 437 992 T3

Leu Asp Pro Lys Ile Leu Lys Phe Val Val Phe Ile Val Ala Val Leu
 35 40 45
 Leu Pro Val Arg Val Asp Ser Ala Thr Ile Pro Arg Gln Asp Glu Val
 50 55 60
 Pro Gln Gln Thr Val Ala Pro Gln Gln Gln Arg Arg Ser Leu Lys Glu
 65 70 75 80
 Glu Glu Cys Pro Ala Gly Ser His Arg Ser Glu Tyr Thr Gly Ala Cys
 85 90 95
 Asn Pro Cys Thr Glu Gly Val Asp Tyr Thr Ile Ala Ser Asn Asn Leu
 100 105 110
 Pro Ser Cys Leu Leu Cys Thr Val Cys Lys Ser Gly Gln Thr Asn Lys
 115 120 125
 Ser Ser Cys Thr Thr Thr Arg Asp Thr Val Cys Gln Cys Glu Lys Gly
 130 135 140
 Ser Phe Gln Asp Lys Asn Ser Pro Glu Met Cys Arg Thr Cys Arg Thr
 145 150 155 160
 Gly Cys Pro Arg Gly Met Val Lys Val Ser Asn Cys Thr Pro Arg Ser
 165 170 175
 Asp Ile Lys Cys Lys Asn Glu Ser Ala Ala Ser Ser Thr Gly Lys Thr
 180 185 190
 Pro Ala Ala Glu Glu Thr Val Thr Thr Ile Leu Gly Met Leu Ala Ser
 195 200 205
 Pro Tyr His Tyr Leu Ile Ile Ile Val Val Leu Val Ile Ile Leu Ala
 210 215 220
 Val Val Val Val Gly Phe Ser Cys Arg Lys Lys Phe Ile Ser Tyr Leu
 225 230 235 240
 Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly Gly Pro Glu Arg Val His Arg
 245 250 255
 Val Leu Phe Arg Arg Arg Ser Cys Pro Ser Arg Val Pro Gly Ala Glu
 260 265 270
 Asp Asn Ala Arg Asn Glu Thr Leu Ser Asn Arg Tyr Leu Gln Pro Thr
 275 280 285
 Gln Val Ser Glu Gln Glu Ile Gln Gly Gln Glu Leu Ala Glu Leu Thr
 290 295 300
 Gly Val Thr Val Glu Ser Pro Glu Glu Pro Gln Arg Leu Leu Glu Gln
 305 310 315 320
 Ala Glu Ala Glu Gly Cys Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Val Asn
 325 330 335
 Asp Ala Asp Ser Ala Asp Ile Ser Thr Leu Leu Asp Ala Ser Ala Thr
 340 345 350
 Leu Glu Glu Gly His Ala Lys Glu Thr Ile Gln Asp Gln Leu Val Gly
 355 360 365
 Ser Glu Lys Leu Phe Tyr Glu Glu Asp Glu Ala Gly Ser Ala Thr Ser
 370 375 380
 Cys Leu
 385

ES 2 437 992 T3

<210> 5

<211> 401

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 5

```

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

```


ES 2 437 992 T3

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 7

5 caggtcaact taaggagtc tgg 23

<210> 8

<211> 23

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

15 <400> 8

gaggtgcagc tggaggagtc tgg 23

<210> 9

20 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 9

caggtgcagc tgcaggagtc ggg 23

30

<210> 10

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 10

gaggtgcagc tgttcagtc tgc 23

5

<210> 11

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 11

15

caggtacagc tgcagcagtc agg 23

<210> 12

<211> 24

20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

25

<400> 12

tgaggagacg gtgaccaggg tgcc 24

30

<210> 13

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

ES 2 437 992 T3

<400> 13

tgaagagacg gtgaccattg tccc 24

5 <210> 14

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 14

15 tgaggagacg gtgaccaggg ttcc 24

<210> 15

<211> 24

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

25 <400> 15

tgaggagacg gtgaccgtgg tccc 24

<210> 16

30 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 16

gacatccaga tgaccagtc tcc 23

<210> 17

5 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 17

gatgttgga tgactcagtc tcc 23

15

<210> 18

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 18

25

gatattgga tgactcagtc tcc 23

<210> 19

<211> 23

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

35

<400> 19

ES 2 437 992 T3

gaaattgtgt tgaccgagtc tcc 23

<210> 20

<211> 23

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

10

<400> 20

gacatcgtga tgaccagtc tcc 23

15 <210> 21

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 21

25 gaaacgacac tcaccgagtc tcc 23

<210> 22

<211> 23

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

35 <400> 22

gaaattgtgc tgactcagtc tcc 23

<210> 23

<211> 23

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

10 <400> 23

cagtctgtgt tgacgcagcc gcc 23

<210> 24

15 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 24

cagtctgccc tgactcagcc tgc 23

25

<210> 25

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 25

35

tcctatgtgc tgactcagcc acc 23

<210> 26

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 26

10

tctctgagc tgactcagga ccc 23

<210> 27

<211> 23

15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

20

<400> 27

cacgttatac tgactcaacc gcc 23

25

<210> 28

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 28

35

caggctgtgc tcactcagcc gtc 23

<210> 29

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 29

10 aattttatgc tgactcagcc cca 23

<210> 30

<211> 24

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

20 <400> 30

acgttgatt tccacctgg tccc 24

<210> 31

25 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 31

acgttgatc tccagctgg tccc 24

35

<210> 32

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 32

acgttgata tccacttgg tccc 24

10

<210> 33

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 33

20

acgttgatc tccacctgg tccc 24

<210> 34

<211> 24

25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

30

<400> 34

acgtttaatc tccagtcgtg tccc 24

35

<210> 35

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

5

<400> 35

cagtctgtgt tgacgcagcc gcc 23

10 <210> 36

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 36

20 cagtctgccc tgactcagcc tgc 23

<210> 37

<211> 23

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

30 <400> 37

tcctatgtgc tgactcagcc acc 23

<210> 38

35 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 437 992 T3

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

5 <400> 38

tcttctgagc tgactcagga ccc 23

<210> 39

10 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 39

cacgttatac tgactcaacc gcc 23

20

<210> 40

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 40

30

caggctgtgc tcactcagcc gtc 23

<210> 41

<211> 23

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 437 992 T3

<220>

<223> Cebador para PCR útil para amplificar los dominios de VH y VL

<400> 41

5

aattttatgc tgactcagcc cca 23

<210> 42

<211> 245

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> T1014A04 scFv

15

<400> 42

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Asp	Val	Lys	Arg	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Phe	Asn	Ala	Tyr
			20					25					30		

ES 2 437 992 T3

Phe Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Phe Asn Pro Asp Ser Gly Thr Ala Asp Ser Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

His Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Phe
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Arg Gln His Arg Gly Asn Thr Phe Ala Pro Trp Gly Arg Gly Thr
 100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala
 130 135 140

Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Thr
 145 150 155 160

Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro
 165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Gly Val Asn Gln Arg Pro Ser
 180 185 190

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser
 195 200 205

Leu Thr Val Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 210 215 220

Ser Ser Tyr Ala Gly Ser Asn Asn Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240

Leu Thr Val Leu Gly
 245

<210> 43

<211> 245

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> T1014G03 scFv

10

<400> 43

ES 2 437 992 T3

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

<210> 44

5 <211> 244

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> scFv de T1014A02

<400> 44

ES 2 437 992 T3

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

<210> 45

5 <211> 245

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> scFv de T1014A12

<400> 45

ES 2 437 992 T3

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

<210> 46

5 <211> 245

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> scFv de T1014B01

<400> 46

ES 2 437 992 T3

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

<210> 47

5 <211> 245

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> scFv de T1014B11

<400> 47

ES 2 437 992 T3

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

<210> 48

5 <211> 245

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> scFv de T1014F11

<400> 48

ES 2 437 992 T3

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

<210> 49

5 <211> 245

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> scFv de T1014G04

<400> 49

ES 2 437 992 T3

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

<210> 50

5 <211> 250

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> scFv de T1015A02

<220>

<221> SITE

<222> (250)

ES 2 437 992 T3

<223> Xaa equivale a Gly o Ser

<400> 50

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

5

<210> 51

<211> 245

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> scFv de T1015A07

ES 2 437 992 T3

<400> 51

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

5

<210> 52

<211> 245

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> scFv de T1015E01

<220>

<221> SITE

<222> (4)

<223> Xaa equivale a Val o Leu

5

<220>

<221> SITE

<222> (5)

<223> Xaa equivale a Ala o Val

10

<220>

<221> SITE

<222> (7)

<223> Xaa equivale a Ala o Ser

15

<220>

<221> SITE

<222> (10)

<223> Xaa equivale a Asp o Glu

20

<220>

<221> SITE

<222> (12)

<223> Xaa equivale a Asn o Lys

25

<220>

<221> SITE

<222> (23)

<223> Xaa Met o Lys

30

<400> 52

ES 2 437 992 T3

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

<210> 53

<211> 249

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> scFv de T1006F07

10

<400> 53

ES 2 437 992 T3

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

<210> 54

5 <211> 735

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> ADN que codifica scFv de T1014A04

<400> 54

ES 2 437 992 T3

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgac gtgaagaggc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaaga tttctggaga cagcttcaac gcctacttta ttcactgggt gcgtcaggcc 120
cctggacagg ggcttgagtg gatgggatgg ttcaaccctg acagtggtag cgcagactct 180
gcacagaagt ttacggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccagcag tactgccttc 240

ttggagctga gcagactgag atctgacgac acagccgtgt attactgtgt gagacaacat 300
cgggtaaca cgttcgcccc ctggggccgg gggacaatgg tcaccgtctc gaggaggaggc 360
ggcggttcag gcggaggtgg ctctggcggg ggcggaagtg cacagtctgt gctgactcag 420
ccaccctccg cgtccgggtc tcctggacag tcagtccacca tctcctgcac tggaaaccacc 480
agtgacgttg gtggttataa ctatgtctcc tggtagcaac agcaccagg caaagcccc 540
aaactcatga tttatggggg caatcagcgg ccctcagggg tccctgatcg cttctctggc 600
tccaagtctg gcaacacggc ctccctgacc gtctctgggc tccaggctga ggatgaggct 660
gattattact gcagttcata tgcaggcagc aacaattggg tgttcggcgg agggaccaag 720
ctgaccgtcc taggt 735

```

<210> 55

5 <211> 735

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> ADN que codifica scFv de T1014G03

<400> 55

```

gaggtccagc tgggtacagtc tggagctgaa gtgaagatgc ctggggcctc agtcaagctc 60
tcctgcaggg tttctggaga caccttcacc gcctacttca ttcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ttcaacccta tcagtggcac cgcaggctct 180
gctgagaagt ttcgcggcag ggtcgccatg accagggaca cgtccatcag cactgcctac 240
atggaattga acaggctgac atttgacgac acggccgtct attattgtgc gagacaacat 300
cgggggaata cgtttgacc ctggggccag ggcaccctgg tcaccgtctc gaggaggaggc 360
ggcggttcag gcggaggtgg ctctggcggg ggcggaagtg cacagtctgc cctgactcag 420
cctgcctccg tgtctgggtc tcctggacag tcgatccacca tctcctgcac tggaaaccagc 480
agtgacattg gtgcttataa gtatgtctcc tggtagcaac aacaccagg caaagcccc 540
aaacttgtga tttatgaggt cagtaatcgg ccctcagggg tttccagtgc cttctctggc 600
tccaagtctg gccagacggc ctccctgacc atctctgggc tccaggctga cgacgaggct 660
gattattact gcaactcata tcaaggttac aacacgtggg tgttcggcgg agggaccaag 720
gtcaccgtcc taggt 735.

```

15

<210> 56

<211> 732

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> ADN que codifica scFv de T1014A02

<400> 56

25

ES 2 437 992 T3

```

cagggtgcagc tgcaggagtc cggcccagga ctggtgaagc cctcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtg ctccatcagt gattactact ggagttgggt ccggcagtc 120
cccgggaagg gactggagtg gattgggtct atcgattatg ccggcagcac caattacaac 180
ccgtccctca agagccgagt caccatgaca atagacaagt ccaagaagca attccccctg 240
aagatagatt ctgtgaccgc cgcagatagc gccatgtatt actgtgagag acaacttggg 300
cggatttctg actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcagatgg aggcggcggg 360
tcaggcggag gtggctctgg cgggtggcga agtgcacttt cctatgtgct gactcagcca 420
ccctcagcgt ctgggacccc cgggcagagg gtcaccatct ctgtgtgctg aagcagctcc 480
aacatcggag gaaataactgt aaactggtac cagcaactcc cagcaacggc ccccaaactc 540
ctcatctata gtaataatca gggccctca ggggtccctg accgattctc tggctccaag 600
tctggcacgt cagcctccct ggccatcagt gggctccagt ctgaggatga ggctgattat 660
tactgtgcaa catgggatga cagtcggggt ggttgggtgt tcggcggag gaccaagctg 720
accgtcctag gt 735

```

<210> 57

<211> 735

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica scFv de T1014A12

10

<400> 57

```

gaggtcacg tgggtgcagtc tggggctgac gtgaagaggc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaaga tttctggaga cagctcacc gcctacttta ttcactgggt gcgtcaggcc 120
cctggacagc ggcttgagtg gatgggatgg ttcaaccctg acagtggtag cgcagactct 180
gcacagaagt ttcacggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccagcag tactgccttc 240
ttggagctga gcagactgag atctgacgac accgcogtat attactgtgt gagacaacat 300
cgggtaaca cgttcgccc ctggggcgg gggacaatgg tcaccgtctc gagtggaggc 360
ggcggttcag gcgagggtg ctctggcgg ggcggaagt cacagtctgc cctgactcag 420
cctgcctccg tgtctggtcc tcctggacag tcgatcaca tctcctgcac tggatccagc 480
agtgacgttg gtggttataa gtatgtctcc tggtaacca aacaccagg caaagcccc 540
aaactcatta ttcattgatgt cagtaggcgg ccctcagagg tttctagtgc cttctctggc 600
tccaagtctg gcaacacggc ctccctgacc atctctgggc tcaggctga ggacgaggct 660
gagtactact gcagctcata ttcaagcacc aactcttggg tggtcggcgg agggaccaag 720
gtcaccgtcc taggt 735

```

15 <210> 58

<211> 735

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> ADN que codifica scFv de T1014B01

<400> 58

ES 2 437 992 T3

```

caggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaaga tttctggaga caccttcgcc gcctacttta ttcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctggagtg gatgggatgg ttcaacccta acagtgggtac cgcagactct 180
tcacagaagt ttcacggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cactgcctac 240
atggagttga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attattgtgc gagacaacat 300
cggctctaata cgttcgacct ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc gagtggaggc 360
ggcggttcag gcggagggtg ctctggcggg ggcggaagtg cacagtctgt cgtgacgcag 420
ccgcctcag tgtctgggtc tcctggacag tcagtcacca tctcctgcac tggaaaccagc 480
agtgacattg gtgcttataa ttatgtctcc tggttccagc agcaccagg taaagcccc 540
aaactcataa tttctgaggt cagtaagcgg cctcagggg tccctgatcg cctctctggc 600
tccaagtctg gcaacacggc ctccctgacc gtctccgggc tccaggctga ggatgaggct 660
gattattact gcggctcata tgcaggcagc aatatttggg tgttcggcgg agggaccaag 720
gtcaccgtcc taggt

```

<210> 59

<211> 735

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica scFv de T1014B11

10

<400> 59

```

gaggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtaaaggtc 60
tcctgcaaga tttctggaga cagcttcacc gcctatthta ttcactgggt gcgacaggcc 120
cctggagaag ggcttgagtg gatgggatgg ttcaatccta tcagcgggtac cgcgggctct 180
ccacagaagt ttcacggcag ggtcggcatg acccgtgaca cgtccatcag tactgcctac 240
atggagttga ccaggctggc atctgacgac acggccattt attattgtgc gagacaacat 300
cactctaata cgttcgacct ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtctc gagtggaggc 360
ggcggttcag gcggagggtg ctctggcggg ggcggaagtg cacaatctgc cctgactcag 420
cctgcctccg tgtctgggtc tcctggacag tcgatcacca tctcctgcac tggaaaccaac 480
agtgacgttg gtggttacia ctatgtctcc tggtaaccaac aacaccagg caaagcccc 540

aaactcatga tttatgaggt caataatcgg cctcagggg tttctaactg cttctctggc 600
tccaagtctg gcaacacggc ctccctgacc atctctgggc tccaggctga cgacgaggct 660
gattattact gcagctcata tacaaccagc aacacttggg tgttcggcgg agggaccaag 720
ctgaccgtcc taggt

```

15

<210> 60

<211> 735

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> ADN que codifica scFv de T1014F08

<400> 60

ES 2 437 992 T3

```

gaggtccagc tgggtgcagtc tggggctgaa gtgaagaagc ctggggcctc agtcaagctc 60
tcctgcaggg tttctggaga caccttcacc gcctacttca ttcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctgagtg gatgggatgg ttcaacccta tcagtggcac cgcaggctct 180
gctgcgaggt ttcgcggcag ggtcgccatg accagggaca cgtccatcag cactgcctac 240
atggaattga acaggctgac atttgacgac acggccgtct attattgtgc gagacaacat 300
cgggggaata cctttgacc ctggggcaaa ggaccctgg tcaccgtctc gagtggaggg 360
ggcggttcag gcggaggtgg ctctggcggg ggcggaagtg cactgcctgt gctgactcag 420
ccaccctccg cgtccgggtc tcctggacag tcagtcacca tctcctgcac tggaaaccagc 480
agtgacgttg gtggttataa gtatgtctcc tggtaacca acgaccagg caaagcccc 540
aaactcatga tttatgaggt cagtatgcgg ccgtcagggg tcccggatcg cttctctggc 600
tccaagtctg gcaacacggc ctccctgacc gtctctgggc tccaggctga ggatgaggct 660
gattattact gcgcctcata tgcaggcagc aacaattggg tgttcggcgg agggaccaag 720
ctgaccgtcc taggt 735

```

<210> 61

5 <211> 735

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> ADN que codifica scFv de T1014G04

<400> 61

```

gaagtgcagc tgggtgcagtc tggggctgac gtgaagaggg ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaaga tttctggaga cagcttcacc gcctacttta ttcactgggt gcgtcaggcc 120
cctggacagg ggcttgagtg gatgggatgg ttcaaccctg acagtggtag cgcagactct 180
gcacagaagt ttcacggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccagcag tactgccttc 240
ttggagctga gcagactgag atctgacgac accgccgtat attactgtgt gagacaacat 300
cgggtaaca cgttcgcccc ctggggcagg ggaaccctgg tcaccgtctc gagtggaggg 360
ggcggttcag gcggaggtgg ctctggcggg ggcggaagtg cacagcctgt gctgactcag 420
ccccctccg cgtccgggtc gcctggacag tcagtcacca tctcctgcac tggaaaccagc 480
agtgacgttg gtagttatga gtatgtctcc tggtaacca aacaccagg caaagcccc 540
agactcatga tttctgaggt caataagcgg ccctcagggg tccctaatac cttctctggc 600
tccaagtctg gcaacacggc ctccctgacc gtctctgggc tccaggctga cgatgaggct 660
gattactact gcagctcata tgcaggcagc aacaattggg tgttcggcgg agggaccaag 720
gtcaccgtcc taggt 735

```

15

<210> 62

<211> 750

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> ADN que codifica scFv de T1015A02

<400> 62

ES 2 437 992 T3

```

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
aaatgcaatg tctctgggtg ctccattggt actggtgatt actattggag ttggatccgc 120
cagccccag ggaagggcct ggagtggatt ggctacatcc atagcagtgg gagcacttat 180
tacaagccgt ccctcaggag tgcacttacc gtatcgatgg atacgtccag gaatcagttc 240
tcctgaagc tgacctctgt gactgccgca gacacggcac tgtattactg tgtcagagag 300
tgggccaatg gtgaccactg gagtgcaatt gacctctggg gccaaaggaac cctggtcacc 360
gtctcgagtg gagggcggcg ttcaggcgga ggtggctctg gcgggtggcgg aagtgcacag 420
gctgtgctga ctcagccgtc ctcagcgtct gggacccccg ggcagagggg cactatcccc 480
tgttctggaa gcagctccaa catcggaggt aatactgtta attggtacca acaactccca 540
ggaacggccc ccaaactcct catctatggt aatgatcagc ggccgtcagg ggtccctgac 600
cgattctctg gctccaagtc tggcacctca gcctccctgg ccatcactgg gctccagtct 660
gaggatgagg ctgattatta ctgtgcagca tgggatgaca gcctgattgg ttatgtcttc 720
ggaactggga cccagctcac cgttttargt                                     750

```

<210> 63

5 <211> 735

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> ADN que codifica scFv de T1015A07

<400> 63

```

gaagtgcagc tggcgcagtc tggcgctgag gtgaataagc ctggggcctc agtaaaggtc 60
tcctgcaaga tttctggaga cagcttcacc gcctatatta ttcactggct gcgacaggcc 120
cctggagaag ggcttgagtg gatgggatgg ttcaatccta tcagcggtac cgccgactct 180
ccacagaagt ttcacggcag ggtcgccatg acccgtgaca cgtccatcag tactgcctac 240
atggagtga ccaggctggc atctgacgac acggccattt attattgtgc gagacaacat 300
cactctaata cgttcgaccc ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtctc gagtggaggc 360
ggcggttcag gcgaggtgg ctctggcggg ggcggaagtg cacagtctgc cctgactcag 420
cctgcctcca tgtctgggtc tcctggacag tcgatcacca tctcctgcac tggaaccagc 480
agtgcagttg gtggttataa ctatgtctcc tggtaaccaac agcaccagg caaagcccc 540
aaactcatga tttatgctgt cactaatcgg cctcagggg tttctaactg cttctctgcc 600
tccaagtctg gcaacacggc ctccctgacc atctctgggc tccaggctga ggacgaggct 660
gattattact gcagctcata tacaagcagc aacacttggg tgttcggcgg agggaccaag 720
gtcaccgtcc taggt                                     735

```

15

<210> 64

<211> 735

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> ADN que codifica scFv de T1015E01

<400> 64

ES 2 437 992 T3

```

gaagtgcags tgggycagkc tggsgctgas gtgaakaagc ctggsgcctc agtaaaggtc 60
tcctgcawga tttctggaga cagcttcacc gcctatttta ttcactggct ggcacaggcc 120
cctggagaag ggcttgagtg gatgggatgg ttcaatccta tcagcggtac cgccgactct 180
ccacagaagt ttcacggcag ggtegccatg acccgtgaca cgtccatcag tactgcctac 240
atggagttga ccaggctggc atctgacgac acggccattt attattgtgc gagacaacat 300
cactctaata cgttcgacc ctagggcaca ggaaccctgg tcaccgtctc gagtggaggc 360
ggcggttcag gcgagggtgg ctctggcggg ggcggaagtg cacagtctgc cctgactcag 420
cctgcctcca tgtctgggtc tcctggacag tcgatcacca tctcctgcac tgggaaccagc 480
agtgacgttg gtggttataa ctatgtctcc tggtaacca acgaccaggc caaagcccc 540
aaactcatga tttatgcggt cactaatcgg ccctcagggg tttctaactg cttctctgcc 600
tccaagtctg gcaacacggc ctccctgacc atctctgggc tccaggctga ggacgaggct 660
gattattact gcagctcata tacaagcagc aaccttggg tggtcggcgg agggaccaag 720
gtcacctgcc taggt 735

```

<210> 65

5 <211> 747

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> ADN que codifica scFv de T1006F07

<400> 65

```

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaacca 300
tcctttcagc agtggggcca ctactcctac ggtatggacg tctggggcca ggggacaatg 360
gtcacctctc cgagtggagg cggcgggtca ggcggagggt gctctggcgg tggcggaggt 420
gcacagtctg tgctgactca gccaccgtca gtgtccgtgt cccaggaca ggcagccaga 480
atcacctgct ctggagataa gttgggggat aaatatgctt cgtggtatca acagaggcca 540
ggccagtccc ctgttttggt catctatcaa gataacaaaa ggcctcagg gatccctgag 600
cgattctctg gctccaattc tgggaacaca gccactctga aaatcagcgg gaccaggct 660
atggatgagg ctgactatta ctgtctggcg tgggacagca gcgctgattg ggtcttcggc 720
ggagggacca aggtcacctg cctaggt 747

```

15

<210> 66

<211> 281

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 66

ES 2 437 992 T3

Met Ala Met Met Glu Val Gln Gly Gly Pro Ser Leu Gly Gln Thr Cys
1 5 10 15

Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu Cys Val Ala
20 25 30

Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp Lys
35 40 45

Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser Tyr
50 55 60

Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln Val
65 70 75 80

Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr Ser
85 90 95

Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro
100 105 110

Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly
115 120 125

Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
130 135 140

Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
145 150 155 160

His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
165 170 175

His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe
180 185 190

Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
195 200 205

Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
210 215 220

Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
225 230 235 240

Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
245 250 255

Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
260 265 270

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
275 280

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende:
 - (a) la secuencia de aminoácidos del dominio VH de SEC ID N° 43 o la secuencia de aminoácidos del dominio VH expresado por el hibridoma de n° de depósito en la ATCC PTA-3570, y
 - 5 (b) la secuencia de aminoácidos del dominio VL de SEC ID N° 43 o la secuencia de aminoácidos del dominio VL expresado por el hibridoma de n° de depósito en la ATCC PTA-3570,
 en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une inmunoespecíficamente a TR4.
2. Un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende:
 - 10 (a) la secuencia de aminoácidos de las 3 CDR de VH de SEC ID N° 43 o la secuencia de aminoácidos de las 3 CDR de VH expresadas por el hibridoma de n° de depósito en la ATCC PTA-3570, y
 - (b) la secuencia de aminoácidos de las 3 CDR de VL de SEC ID N° 43 o la secuencia de aminoácidos de las 3 CDR de VL expresadas por el hibridoma de n° de depósito en la ATCC PTA-3570, y
 en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une inmunoespecíficamente a TR4.
3. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1 o 2, que se une a TR4 expresado sobre la superficie de una célula.
4. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo está seleccionado del grupo que consiste en:
 - (a) una molécula de inmunoglobulina entera,
 - (b) un scFv;
 - 20 (c) un anticuerpo monoclonal;
 - (d) un anticuerpo humano;
 - (e) un anticuerpo quimérico;
 - (f) un anticuerpo humanizado;
 - (g) un fragmento Fab;
 - 25 (h) un fragmento Fab';
 - (i) un F(ab')₂;
 - (j) un Fv; y
 - (k) un Fv unido por puentes disulfuro.
5. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en:
 - 30 (a) un dominio constante de IgM humana;
 - (b) un dominio constante de IgG humana; y
 - (c) un dominio constante de IgA humana.
6. El anticuerpo de la reivindicación 5, en el que el dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina es un dominio constante de IgG1, un dominio constante de IgG2, un dominio constante de IgG3 o un dominio constante de IgG4.
7. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende un dominio constante de la cadena ligera de la inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en:
 - 40 (a) un dominio constante kappa humano; y
 - (b) un dominio constante lambda humano.
8. Un anticuerpo expresado por la línea celular de la ATCC con depósito PTA-3570.

9. Una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 10, Un vector que comprende la molécula ácido nucleico de la reivindicación 9.
- 5 11. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 10 o la molécula ácido nucleico de la reivindicación 9.
12. Una línea celular modificada por ingeniería para expresar el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
13. La línea celular de la reivindicación 12, en la que las células son células NSO o células CHO.
14. Un anticuerpo que se puede obtener mediante expresión de la línea celular de la reivindicación 12 o 13.
- 10 15. Un procedimiento para fabricar un anticuerpo, que comprende:
- (a) expresar el anticuerpo codificado por la molécula ácido nucleico de la reivindicación 9; y
- (b) recuperar dicho anticuerpo.
16. Un anticuerpo obtenible mediante el procedimiento de la reivindicación 15.
- 15 17. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 14 y 16, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo tiene una constante de disociación (K_D) inferior o igual a 10^{-9} M.
18. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 14, 16 y 17 en el que el anticuerpo o fragmento del mismo está marcado.
19. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 18, que está marcado con un radiomarcador.
- 20 20. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 19, en el que el radiomarcador es ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{177}Lu , ^{166}Ho , o ^{153}Sm .
21. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 18, que está marcado con una enzima, un marcador fluorescente, un marcador luminiscente o un marcador bioluminiscente.
22. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 14, 16 y 17 en el que el anticuerpo o fragmento del mismo está biotinilado.
- 25 23. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 14, 16 y 17 en el que el anticuerpo o fragmento del mismo está conjugado con un agente terapéutico o citotóxico.
24. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 23, en el que el agente terapéutico o citotóxico está seleccionado del grupo que consiste en:
- (a) un antimetabolito;
- 30 (b) un agente alquilante;
- (c) un antibiótico;
- (d) un factor de crecimiento;
- (e) una citocina;
- (f) un agente antiangiogénico;
- 35 (g) un agente antimitótico;
- (h) una antraciclina;
- (i) toxina; y
- (j) un agente apoptótico.
25. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 14 y 16 a 24 en el que el anticuerpo o fragmento del mismo está unido a un soporte sólido.
- 40 26. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 14 y 16 a 25 en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se une inmunespecíficamente a TR4 en una transferencia Western o

en un ELISA.

27. Una célula que produce el anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 14, 16 y 17.
- 5 28. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 14 y 16 a 26 que inhibe la capacidad de TRAIL para unirse a TR4.
29. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 14, 16 a 26 y 28, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo es un agonista de TR4.
- 30, El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 14, 16 a 26 y 28 a 29, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo estimula la apoptosis de las células que expresan TR4.
- 10 31. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 30, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo estimula la apoptosis de las células que expresan TR4.
- (a) mejor que una concentración igual del polipéptido TRAIL estimula la apoptosis de las células que expresan TR4; o
- (b) igual de bien en presencia o ausencia de reactivos de reticulación del anticuerpo.
- 15 32. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 30 o 31, en el anticuerpo o fragmento del mismo no es hepatotóxico.
33. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 14, 16 a 26, 28 a 30 y 31, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo regula por aumento la expresión del receptor de TRAIL.
- 20 34. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 14, 16 a 26 y 28 a 33.
35. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 14, 16 a 26 y 28 a 29 y 30 a 33 para su uso en un procedimiento de tratamiento, prevención o mejora de un cáncer, en el que el procedimiento comprende administrar dicho anticuerpo o fragmento del mismo a un animal.
- 25 36. El anticuerpo de la reivindicación 35 o fragmento del mismo para el uso de la reivindicación 35 en el que el animal es un ser humano.
37. El anticuerpo de la reivindicación 35 o fragmento del mismo para el uso de la reivindicación 35 o 36, en el que el cáncer es cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, sarcoma de Kaposi o mieloma múltiple.
- 30 38. El anticuerpo de la reivindicación 35 o fragmento del mismo para el uso de la reivindicación 35 o 36, en el que el cáncer es un cáncer del sistema nervioso central.
39. El anticuerpo de la reivindicación 35 o fragmento del mismo para el uso de la reivindicación 38, en el que el cáncer del sistema nervioso central es un meduloblastoma, un neuroblastoma o un glioblastoma.
- 35 40. El anticuerpo de la reivindicación 35 o fragmento del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 39, en el que el procedimiento comprende administrar el anticuerpo o fragmento del mismo en combinación con un agente quimioterapéutico.
41. El anticuerpo de la reivindicación 35 o fragmento del mismo para el uso de la reivindicación 40, en el que el agente quimioterapéutico está seleccionado del grupo que consiste en:
- (a) irinotecán;
- (b) paclitaxel (TAXOL)®; y
- 40 (c) gemcitabina.
42. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 14, 16 a 26, 28 a 29 y 30 a 33 para su uso en un procedimiento de inhibición del crecimiento, o muerte, de las células que expresan TR4, en el que dicho procedimiento comprende administrar el anticuerpo o fragmento del mismo a un animal en el que se desee dicha inhibición del crecimiento o muerte de las células que expresan el receptor TR4..
- 45 43. Un procedimiento detectar la expresión de un polipéptido de TR4, que comprende:
- (a) analizar la expresión de un polipéptido de TR4 en una muestra biológica de un individuo que usa el

anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 14, 16 a 26 y 28 a 33; y

(b) comparar el nivel de un polipéptido de TR4 con un nivel estándar de un polipéptido del receptor de TRAIL.

5 44. Un procedimiento para detectar, diagnosticar, ofrecer un pronóstico o vigilar cánceres y otros trastornos hiperproliferativos, que comprende:

(a) analizar la expresión de un polipéptido de TR4 en una muestra biológica de un individuo que usa el anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 14, 16 a 26 y 28 a 33; y

10 (b) comparar el nivel de un polipéptido de TR4 con un nivel estándar de un polipéptido de TR4.

45. Un kit que comprende anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 14, 16 a 28 y 28 a 33.

46. El kit de la reivindicación 45, que comprende un anticuerpo control.

15 47. El kit de la reivindicación 45 o 46, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo está acoplado a, o conjugado con, un marcador detectable.

Efecto de T1014A04 sobre el crecimiento tumoral SW480 en ratones Swiss Nu/Nu

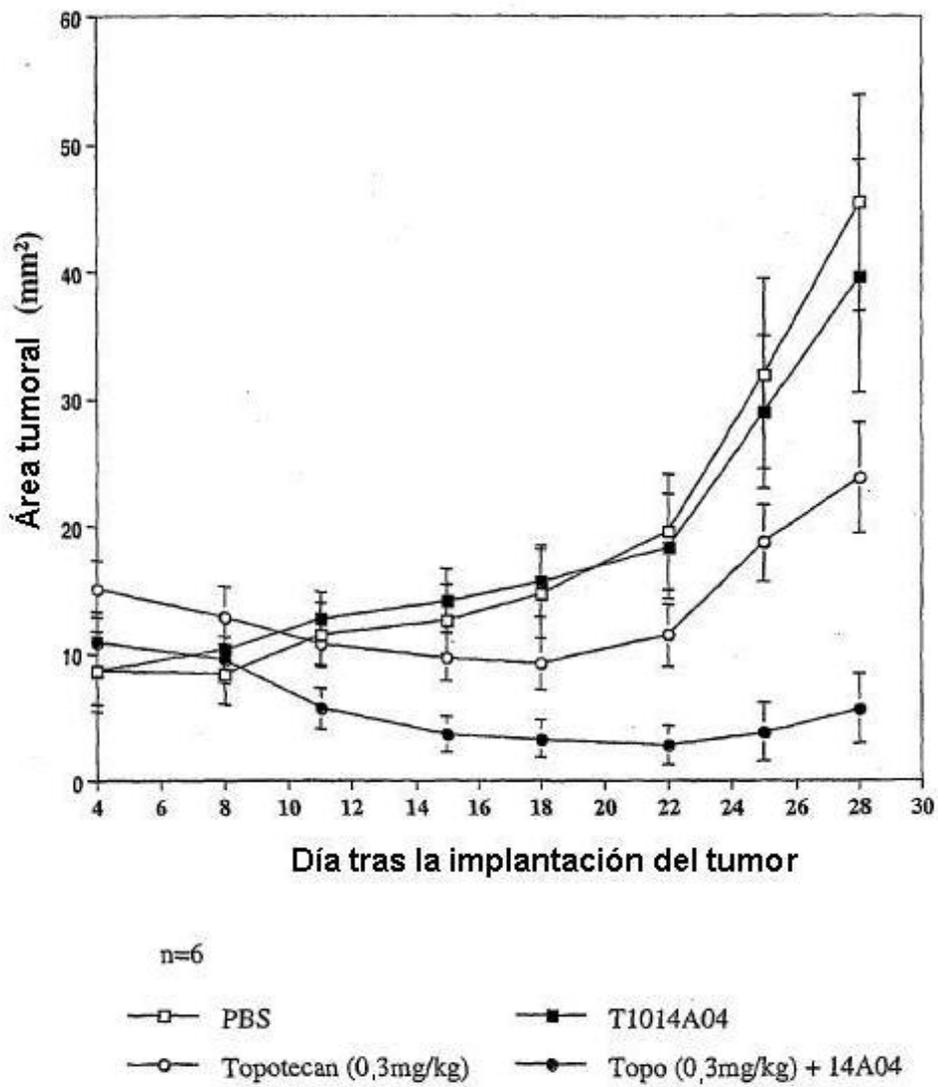


FIG. 1

Efecto de T1014A04 sobre el crecimiento tumoral SW480 en ratones Swiss Nu/Nu

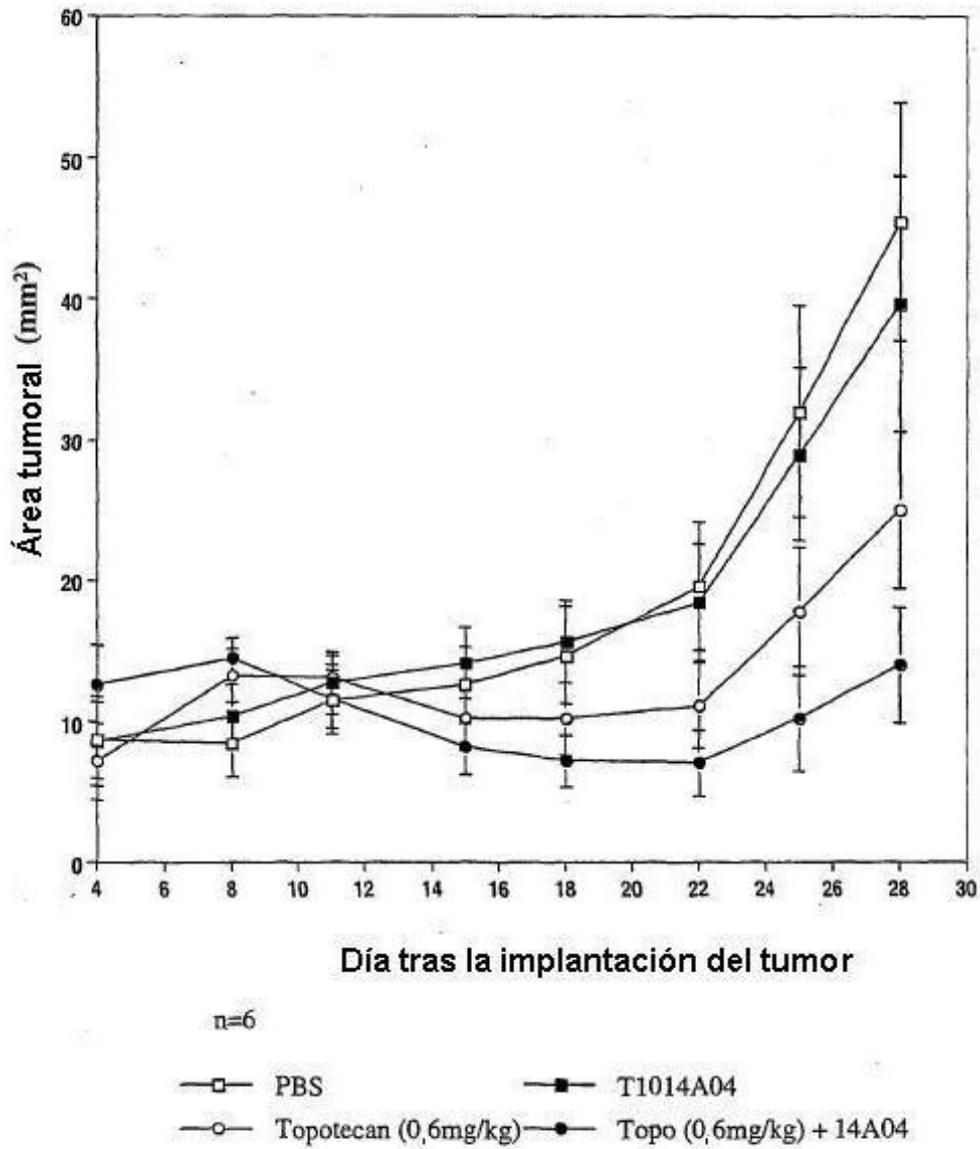


FIG. 2

Efecto del tratamiento con 14G03 sobre el crecimiento de tumores SW480 in vivo gras 28 días

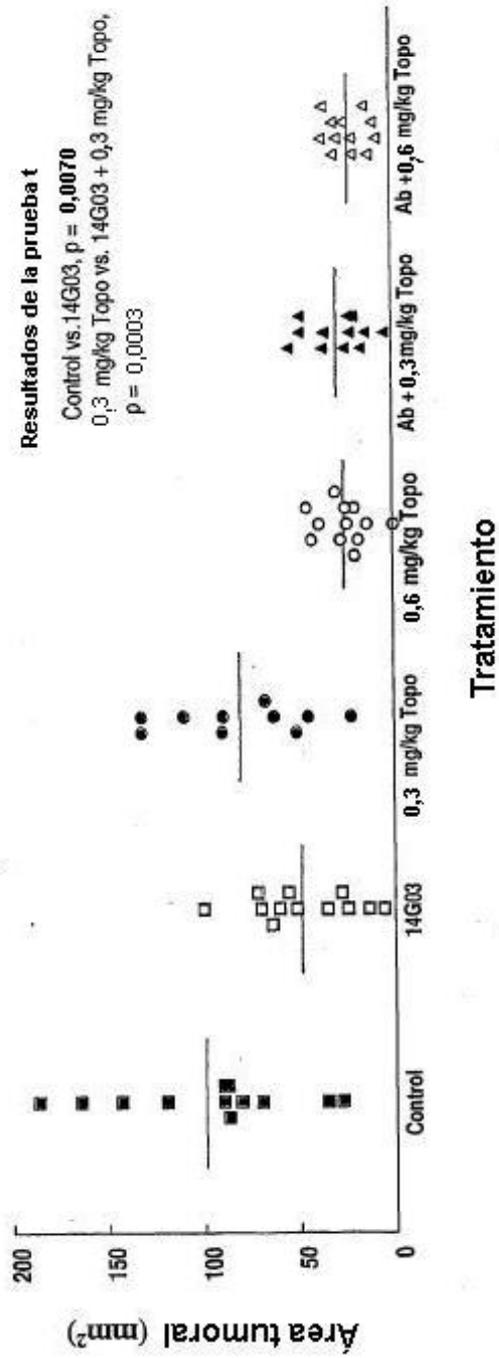


FIG. 3