643

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No 72 35
BOGOTA B COLOMBIA

WEB SITE www.cavelier.com
E MAIL cavelier@cavelier.com

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 02108186 00000001 Folios 301
Fecha (MM) 2003-02-18 17:06:25
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 329 COMPLEMEN
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E S D

Trámite 011
Evento 379
Actuacion 329

Referencia **Expediente No 02 108 186**

Solicitante **UAB RESEARCH FOUNDATION**

Asunto **Solicitud de patente para UN ANTICUERPO SELECTIVO PARA UN RECEPTOR DE LIGANDO QUE INDUCE APOPTOSIS RELACIONADA CON EL FACTOR DE NECROSIS DE TUMOR Y USOS DE ESTE**

Fecha de Solicitud **28 de noviembre de 2002**

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado de la solicitante en el asunto antes identificado, atentamente presento la traduccion al español de la solicitud internacional, en sustitución de la originalmente presentada ya que dicha traduccion estaba incompleta

Bogotá, 18 FEB 2003

Señora Jefe,

EMILIO FERRERO
T P A No 31 929

COLO 13529 841 001 4
MRE/MRM/
ID 000003/WPC13529

UN ANTICUERPO SELECTIVO PARA UN RECEPTOR DE LIGANDO QUE INDUCE APOPTOSIS RELACIONADA CON EL FACTOR DE NECROSIS DE TUMOR Y USOS DE ESTE

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con un anticuerpo capaz de ligar específicamente a un tipo simple de receptor de ligando que induce apoptosis relacionada (en lo sucesivo denominado como "TRAIL" con el factor de necrosis de tumor (en lo sucesivo denominado como "TNF"), mas particularmente, con un anticuerpo monoclonal que incluye apoptosis en celulas in vivo e in vitro que expresan el receptor tipo simple y las terapias basadas en este

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El TRAIL es un miembro de la familia TNF de proteínas, que tambien incluye ligando (1) TNF-α y Fas Estas proteínas son potentes inductores de apoptosis A la fecha, se han identificado cinco receptores de TRAIL,

dos de los cuales, DR4 (TRAIL-R1) y DR5 (TRAIL-R2) (2-7), son capaces de transducir la señal de apoptosis mientras que los otros tres de DcR1 (TRAIL-R3), DcR2 (TRAIL-R4), y la osteoprotegerina (OPG) no transduce la señal de apoptosis (8-12) Todos los cinco receptores para TRAIL comparten homología significativa en sus dominios de unión de ligando extracelular Similar al receptor I Fas y TNF (en lo sucesivo denominado como "TNFRI"), los segmentos intracelulares tanto del DR4 como del DR5 contienen un dominio muerto, y transducen una señal de apoptosis a través de una senda que involucra la proteína de dominio muerta asociada con Fas (en lo sucesivo denominada como "FADD") y caspasa 8 (6, 7) Ademas de transducir la señal de apoptosis, los receptores DR4 y DR5 también pueden activar una senda que involucra NFkb (6, 7)

Las funciones biologicas del TRAIL que han sido demostradas incluyen la capacidad del TRAIL a inducir selectivamente apoptosis de células de tumor transformadas, con células normales que son relativamente resistentes a la apoptosis mediada por TRAIL (13-15) Esta selectividad sugiere que, en contraste con el ligando Fas, la administración del TRAIL está asociada

con muy bajos niveles de toxicidad como se demostró mediante la administración sistémica de TRAIL en un modelo animal sin inducir toxicidad significativa (13) De esta manera, el TRAIL se ha propuesto como un agente que induce apoptosis potente que sería un agente terapéutico adecuado para el tratamiento de cancer y otros desórdenes asociados con proliferación anormal de celulas El TRAIL también se ha propuesto por ser un agente potente que induce apoptosis que seria adecuado para el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias Se ha demostrado que la apoptosis mediada por TRAIL se involucra en la muerte celular inducida por activacion de células T, sirviendo de esta manera como un mecanismo alternativo al ligado Fas (16, 17) La apoptosis mediada por TRAIL también puede funcionar en la inducción de apoptosis de células T y otras células inflamatorias (18), y juega un papel en la actividad de muerte de las células NK (19-21), y en la función inmunomodulatoria de células dendríticas (22, 23) De esta manera, la apoptosis mediada por TRAIL también puede funcionar en inmunoprivilegio e inmunosupervisión

El sistema receptor TRAIL es complejo, e incluye al menos dos receptores de muerte, DR4 y DR5, y al menos dos

receptores no apoptósicios DcR1 y DcR2 Todos estos receptores no solo comparten una homología alta de secuencia aminoacido, sino también exhiben una afinidad de unión similar al TRAIL (2-12) La capacidad de los receptores DcR1 y DcR2 para competir por la unión del TRAIL sin inducir apoptosis sugiere que ellos pueden actuar como receptores señuelo que bloquean o modulan la actividad del ligando TRAIL Más aún, se ha reportado que célula no transformadas expresan niveles más altos de receptores señuelo que lo que lo hacen las células transformadas Así, se ha propuesto que la modulación diferencial de la expresión de la muerte y los receptores señuelo pueden representar un mecanismo regulatorio clave que determina la susceptibilidad de las células a la apoptosis mediada por TRAIL, pero debido a la falta de los anticuerpos especificos a los receptores (2) Aunque la expresion y función del DR4 y DR5 ha sido estudiada intensamente, se ha impedido el progreso por la falta de anticuerpos monoclonales especificos ae los receptores La expresion de superficie celular del DR5 no se ha documentado Se ha reportado que un panel de anticuerpos de receptor anti-TRAIL se han generado que son capaces de inducir apoptosis de células de melanoma in vitro pero solo a la inmovilizacion de los anticuerpos, para

promover reticulación, y, en algunos casos, las células requieren cultivo con actinomicina D (24) Varios anticuerpos anti-DR5 se han generado (24) Sin embargo, estos anticuerpos monoclonales anti-DR5 previamente generados tienen una actividad que induce baja apoptosis in vitro, aún bajo las condiciones de reticulación No se ha reportado actividad in vivo Estos anticuerpos no han sido utilizados para examinar la expresión de la superficie celular de los receptores TRAIL (24) De esta manera, existe necesidad de un anticuerpo monoclonal selectivo para cada receptor TRAIL específico que no es solo capaz de unirse al receptor en la superficie celular sino también de inducir fuertemente apoptosis de varios tipos de célula anormales, que incluyen células de tumor, tanto in vivo como in vitro sin el requisito de reticulación o inmovilizacion Tal anticuerpo no solo suministraría un agente terapeutico potencial sino también una herramienta de diagnostico para análisis funcional del receptor TRAIL Existe necesidad particular de un anticuerpo específico contra cada uno de los receptores que inducen muerte DR4 y DR5

En el desarrollo, o progresión de muchas enfermedades es a menudo el caso que las células no sean

suprimidas En muchas enfermedades autoinmunes y condiciones inflamatorias, las celulas sobrevivientes activadas atacan los tejidos o celulas normales Además, la progresión y tumorigénesis y la formación de panus proliferativo de la artritis reumatoide son caracteristicas de la proliferación no revisada de celulas Así, la apoptosis insuficiente conduce al desarrollo de la enfermedad, y el uso de un ligando que induce apoptosis o anticuerpo monoclonal agonístico para mejora la apoptosis se considera como una estrategia potencial terapéutica para eliminar aquellas células no requeridas

Por ejemplo, la artritis reumatoide (en lo sucesivo denominada como "RA") es una enfermedad autoinmune común en los humanos El entendimiento habitual de la patofisiología del RA es que las células T autoinmunes y las células B inician una respuesta inflamatoria en las articulaciones que conduce a la hiperproliferacion de sinoviocitos Como consecuencia de la hiperproliferación de células sinoviales, las metanoproteinasas (en lo sucesivo denominadas como "MMPS") son sobreproducidas lo cual ademas conduce a la destrucción erusiva del cartílago y el hueso que es característica de RA (25)

Así, el control de hiperproliferación de las células sinoviales inflamatorias es una etapa clave en el tratamiento de RA El mecanismo molecular que conduce a la hiperproliferación de células sinoviales es aun desconocido Aunque las células sinoviales hiperproliferativas son no malignas y no transformadas, muchos estudios han sugerido que ellas comparten algunas características comunes con las células transformadas (46) Estas células, las así llamadas "sinoviocitos que parecen transformados", se caracterizan por un reticulo endoplasmatico aproximadamente tenso, numerosos núcleos irregulares, y cambios en el esqueleto normal de las celulas en forma de huso Se ha propuesto que la incorporación de los oncogenes y los genes derivados de virus podrían ser los disparadores primarios para la apariencia transformada de la célula sinovial RA (46)

Al menos dos aspectos de RA sugieren que la apoptosis desregulada podía contribuir al proceso de la enfermedad y que la elicitación terapeutica de la apoptosis podría ser un tratamiento efectivo La falla de la supresión de las celulas T activadas sugiere que hay una muerte defectuosa de las celulas inducidas por activacion de estas células T, lo cual es un proceso que

involucra apoptosis mediada por Fas y apoptosis mediada por TRAIL, y la naturaleza hiperproliferativa de la célula sinovial RA es un factor que contribuye a la etapa posterior de la patofisiología RA De hecho, se ha mostrado que la administracion de anticuerpo antifaz en las articulaciones inflamatorias inhibe el desarrollo de artritis crónica en ratones transgénicos tax, que son modelos animales para RA humano (26) Más aún, la transducción localizada del gen de ligando Fas mediante un vector adenoviral es efectiva en la prevención de artritis inducida por colágeno (27) La inhibición de la proliferación de células sinoviales inflamatorias mediante el mejoramiento de apoptosis mediada por Fas se observa en ambos casos Aunque el ligando Fas es un inductor de apoptosis fuerte en las celulas sinoviales RA, la aplicacion de una apoptosis mediada por ligando Fas como una terapia para humanos se ha limitado por su toxicidad letal al hígado De esta manera, la apoptosis inducida por el receptor TRAIL representa una terapia más segura y más efectiva para el tratamiento de RA que la apoptosis inducida por ligando Fas

La apoptosis inducida por receptor TRAIL tambien representa una terapia mas segura y más efectiva para el

tratamiento de cáncer que la apoptosis inducida por ligando Fas La apoptosis mediada por TRAIL es conocida por inducir específicamente apoptosis de celulas de tumor transformadas sin afectar las células normales Se ha mostrado que la administración sistémica de TRAIL soluble trimerizado no causa toxicidad en animales experimentales siendo aún capaces de inducir regresión de tumores implantados (13, 28) Su potencial como una terapia adjunta para tratamientos tradicionales fue infracalificada por el hallazgo reciente de que la expresión del DR5 y la susceptibilidad de la apoptosis inducida por TRAIL de las células de cancer de mama se mejora mediante la radiacion sugiriendo que combinada con la radiación, la eficiencia del TRAIL se incrementaría en terapia de cáncer (29)

Además, el gen que codifica el receptor TRAIL DR5 se ha mapeado en el cromosoma 8p21-22,- un loci con una alta frecuencia de mutacion en algunas células cancerosas (30) Se ha reportado que al menos dos clases de celulas tumorales, cáncer pequeño de pulmon (31) y cancer de cabeza y cuello (32) exhiben mutaciones en el dominio de muerte del gen DR5 Así, existe necesidad de un anticuerpo anti-DR5 en la investigación de cáncer para

determinar el efecto de la variación del epítopo receptor sobre el desarrollo de la progresión de los cánceres Además, la funcionalidad de las mutaciones del receptor TRAIL probarían una herramienta de diagnóstico clínica util cuando se utiliza en conjunto con otros biomarcadores en la detección temprana de cánceres y como un predictor de agresividad de tumor

RESUMEN DE LA INVENCION

Se describe un anticuerpo que reconoce un receptor TRAIL DR5 y que induce apoptosis en las células que expresan DR5 in vivo Ademas describe un anticuerpo que reconoce DR5 pero no DR4, DcR1, no DcR2 Se detalla esoecíficamente un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma

El método suministrado por la invención permite la inhibición de proliferacion de células al exponer una célula o una cantidad terapéutica de un anticuerpo capaz ce unirse al DR5 También se describe una composición farmacológica que incluya una cantidad terapeutica de anticuerpo monoclonal activo contra un DR5, un portador farmacéuticamente aceptable y un recipiente que incluye

el anticuerpo y el portador Además se suministra por la invención el uso de un anticuerpo que reconoce el DR5 para preparar una terapia para apoptosis selectiva de células anormales o desreguladas

Un anticuerpo de la presente invención interactúa con un receptor de ligando de factor de necrosis tumoral tal como DR4, DR5, DcR1, DcR2 y OPG, que induce apoptosis en una célula que expresa tal receptor Se describe un anticuerpo de la invención capaz de unir selectivamente un epítopo receptor de ligando de factor de necrosis tumoral agonista o antagonista

La presente invención suministra un tratamiento para una enfermedad relacionada con apoptosis mediante un método que incluye exponer un tejido objetivo que tiene una enfermedad relacionada con apoptosis a una cantidad terapeutica de un anticuerpo de la invención

Además describe una proteína de fusion que incluye una secuencia de aminoácido receptora de TRAIL antigénico que tiene al menos 10 bases, acopladas a una proteína de inmunoglobulina o un fragmento de esta capaz de elicitar una respuesta inmune en un sujeto

La presente invención suministra un método de terapia génica en la cual una célula objetivo se transfecta con una secuencia de ácido nucleico de receptor TRAIL en un vector de expresion de tal forma que el receptor TRAIL se expresa sobre la célula objetivo La célula objetivo se expone entonces a un anticuerpo que se une selectivamente al receptor TRAIL

Se suministran secuencias de ácido nucleico y secuencias de aminoacido que codifican las cadenas de inmunoglobulinas pesada y ligera del anticuerpo selectivo para DR5 Tambien se detallan vectores que incluyen una secuencia de ácido nucleico de la invencion y celulas hospederas transformadas con un vector de la invención

La presente invencion suministra una célula hospedera que produce un TRA-8 humanizado

Se describe un proceso para la produccion de un anticuerpo DR5 humanizado en el cual el huésped se transforma con secuencias de acido nucleico que codifican una cadena liviana de inmunoglobulina humanizada y una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada después de lo

cual el huésped transformado se incuba durante un periodo predeterminado de tiempo

También se describe un proceso para inhibir la proliferación de celulas que incluye poner en contacto una célula objetivo con una cantidad farmaceuticamente efectiva de un anticuerpo DR5 humanizado

Se suministra un kit comercial para inducir la muerte de celulas que incluye un anticuerpo TRA-8 humanizado selectivo para DR5, empacado en un recipiente adecuado junto con instrucciones de uso

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La figura 1, caracterización de TRA-8 (a) Uniendo especificidad de un análisis Western blot TRA-8 (panel superior) proteinas de fusión recombinante de la familia TNFR probada con TRA-8 o IgG antihumano Carril 1 proteína de fusión DR5/hIgG1 (inmunógeno), carril 2 DR4/ hIgG1 (TRAIL-R1), carril 3 DR5/hIgG1, carril 4 TRAIL-R3 (DcR1)/hIgG1, carril 5 TRAIL-R4 (DcR2)/hIgG1, carril 6, CD95/hIgG1, carril 7 TNFRI soluble Análisis ELISA (panel inferior) los numeros de los pozos hacen pareja

con aquellos del Western blot exceptuando el pozo 8 que es una proteína de fusión DR5/hIgG1 de ratón (b) Actividad de unión del TRAIL soluble y TRA-8 a DR5 y DR4 los platos ELISA fueron recubiertos DR5/ hIgG1 (panel izquierdo) o DR4/ hIgG1 (panel medio) y luego incubado con TRAIL o TRA-8 (c) El análisis de citometría de flujo de la expresión de superficie del DR5 Las células Cos-7 transfectadas con vector de expresion pcDNA 3 que contienen el cADN del DR5 de longitud total (histograma sólido), cADN de DR4 (histograma abierto, linea sólida) o vector vacío (histograma abierto, línea punteada) 48 horas despues de la transfección, las células fueron teñidas con TRA-8 seguido por hIgG1 anti raton conjugada con PE (d) La reactividad inmunohistoquímica in situ para DR5 placas de citospina de celulas Cos-7 transfectadas con expresión DR5 o vector de control fueron teñidas con TRA-8 48 horas después de la transfección, (e) Actividad de muerte del TRA-8 las celulas Jurkat fueron incubadas con las concentraciones indicadas de TRA-8 La viabilidad de las celulas determinó mediante ensayos de exclusión del ATPLite, MTT, y PI después de cultivo durante toda la noche Los resultados de los ensayos ATPLite y MTT se presentan como porcentaje del control medio, y el ensayo PI se presenta

como porcentaje de las células negativas PI (f) El analisis de Western blot de activacion de caspasa las celulas jurkat se incubaron con 500 ng/ml de TRA-8 durante el tiempo indicado Los lisados de celulas se separaron con 15% de SDS-PAGE, manchada y probada con anticuerpos anticaspasa Las flechas indican las subunidades divididas de cada caspasa(g) Ensayo de inhibición de caspasa las células Jurkat fueron incubadas con 50 ng/ml de TRA-8 durante toda la noche en la presencia de varias concentraciones de inhibidores de caspasa indicados La viabilidad de las células se determinó mediante el ensayo ATPLite

Figura 2 Expresión de superficie celular de DR5 y susceptibilidad a la apoptosis mediada por DR5 Las células normales T y B, aisladas recientemente de sangre periférica, celula T (a y a'), glioma (b y b') célula de cáncer de próstata (c) y célula B (d) las líneas celulares fueron incubadas con TRA-8 o anticuerpo de control isotipo IgG1 de raton seguido por IgG1 anti raton cabra conjugado con PE Los histogramas abiertos representan el control de anticuerpo isotipo mientras que los histogramas solidos representan manchado TRA-8 La apoptosis se determinó mediante el ensayo ATPLite despues

de incubación durante toda la noche con TRAIL soluble (círculos abiertos) o TRA-8 (círculo cerrado) como se muestra en a, b' y d

La figura 3a' la línea de células T U937 se incubó con TRA-8 o anticuerpo de control de isotipo IgG1 de raton La apoptosis se determinó mediante el ensayo ATPLite después de incubación durante toda la noche contra el soluble (círculos abiertos) o TRA-8 (círculo cerrado)

La figura 3 filas de células de glioma (b) y cancer de prostata (c) se incubaron con TRA-8 o anticuerpo de control de isotipo IgG1 de ratón La apoptosis se determinó mediante el ensayo ATPLite despues de incubación durante toda la noche con un TRAIL soluble (círculos abiertos) o TRA-8 (círculos cerrados)

La figura 4 es una serie de graficos que muestran la viabilidad de las células para células Jurkat humanas después de exposición a las concentraciones indicadas de (a) sepas de anticuerpo TRA-1, -8 y -10 y (b) TRAIL en la presencia de concentración fija de las sepas de anticuerpo de la invención descritas en la figura 4A,

La figura 5 La expresión de DR5 en tejidos normales y de cancer los homogenados de tejido normal y de cancer se probaron con TR-8 y se desarrollaron mediante quicio luminiscencia (a) El análisis Western blot de la proteína DR5 en tejidos normales carril 1 hígado, carril 2 cerebro, carril 3 pulmon, carril 4 riñon, carril 5 vaso, carril 6 testículos Carril 7 ovario, carril 8 corazon, carril 9 páncreas b El análisis Western blot de la proteína DR5 en tejidos de cáncer La mancha del tejido de cancer que contiene cánceres del ovarios (carril 1), pulmón (carril 2), hígado (carril 3), recto (carril 4), cervix (carril 5), piel (carril 6), testiculos (carril 7), tiroide (carril 8), utero (carril 10), estomago (carril 11), laringofaringe (carril 12), y páncreas (carril 13) se probaron La inmuno histoquímica in situ de tejidos humanos normales (C) y tejidos de cancer (a) Secciones congeladas se inmunomancharon con TRA-8

Figura 6 Actividad tumoricida de TRA-8 el ratón SCID se inoculo subcutaneamente con celulas 1321N1 Los ratones fueron inyectados intravenosamente con una dosis

simple de 100 µg de TRA-8 en el segundo dia después de la inoculación del tumor (a), o con tres dosis de 100 µg de TA-8 iniciando siete días después de la inoculación del tumor (b) el crecimiento del tumor se determinó mediante el peso y examinado histológicamente con manchado H&E Las fotografías muestran el crecimiento viable del tumor en ratones de control pero no en ratones tratados con TRA-8 (c , panel superior), y manchado H&E de tumor (c , panel inferior) Los ratones SCID fueron inyectados intravenosamente con 10^6 células Jurkat y tratados con una dosis simple de TA-8 en el segundo día después de la inyeccion Siete días más tarde, las células de vaso fueron cosechadas, manchaoas con anticuerpo CD3 antitumor y analizadas mediante citometría de flujo (d), o mediante inmunohistoquímica (e)

La figura 7 muestra la expresión de la superficie celular DR5 en RA (A) y OA (B) células sinoviales 1 x 10^5 células sinoviales cultivadas primarias se mancharon con TRA-8 purificado con afinidad y seguida por anticuerpo IgG1 antiratón cabra conjugada con PE 10 000 células viables se analizaron mediante FACSventaja

La figura 8 es una serie de gráficos que muestran la viabilidad de las celulas como una funcion de la apoptosis inducida por concentración TRAIL y TRA-8 de sepas representativas RA (A) y OA (B) células sinoviales con varias concentraciones del TRAIL soluble recombinante (el círculo abierto) o TRA-8 purificado de afinidad (los círculos cerrados) La viabilidad de las celulas es el porcentaje del cpm de células tratadas contra el cpm de celulas no tratadas

La figura 9 es una serie de gráficos que muestran la independencia de caspasa de la apoptosis mediada con DR5 de celular sinoviales RA las celulas sinoviales RA (RA 512) se incuban con 50 ng/ml de liganco de Fas soluble (cuadrados abiertos), anticuerpo anti-Fas (CH-11) (cuadrado cerrado), TRAIl soluble (circulos abiertos), o anticuerpo anti DR-5 (TRA-8) (circulo cerrado) en la presencia de concentraciones variables de inhibidores de caspasa Después de cultivo durante toda la noche, la viabilidad de las celulas se determinó mediante ATPLite

La figura 10A es un ensayo de cambio de gel electroforetico que indica la activación NFkb Las células RA1016 se incubaron con 20 ng/ml de TRAIL soluble

o 50 ng/mg de TRA-8 durante los puntos de tiempo indicados antes de ser sometidos a electroforesis La figura 10B y C son graficos que muestran la producción de MMP-1 y MMP-3 1 x 10^6/ml de células sinoviales RA indicadas se incubaron con las concentraciones indicadas de TNF-a (los circulos abiertos), TRAIL (los triángulos abiertos) o TRA-8 (el círculo cerrado) Después de cultivo durante toda la noche, los supernadantes del cultivo se recolectaron Los niveles de MMP en supernadantes de cultivo se determinan mediante ELISA

Figura 11 E TRA-8 no induce toxicidad hepatocelular (a) tejidos de hígado normal no expresan DR5 Las secciones de parafina de dos tejidos de hígado normales, un tejido de carcinoma hepatocelular, y la preparacion de citospina de las células HepG2 se prepararon para teñido H&E, y las correspondientes secciones congeladas se tiñeron con TRA-8 (b) El analisis de citometría de flujo de la expresión de al superficie celular de DR5 Hepatocitos, aislados de dos tejidos de hígado normal y de un caso de tejido de carcinoma hepatocelular, y células HepG2 se tiñeron con TRA-8, anticuerpo anti Fas (DX2) o un anticuerpo de control isotipo Los histogramas sólidos indican manchado

con TRA-8 o DX2, y los histogramas abiertos son los controles de isotipo correspondiente

Figura 12 TRAIL pero no el TRA-8 induce toxicidad hepatocelular Los hepatocitos humanos normales frescos se mantuvieron en un medio de cultivo de hepatocito (a) La apoptosis de los hepatocitos se indujo con 1 µg/ml de TRAIL soluble más reticulador o TRA-8 para los puntos de tiempo indicados La viabilidad celular se determinó mediante ATPLite Los resultados se presentaron como porcentaje de células viables comparadas con el medio de control Las barras sombreadas indicaron TRAIL y las barras negras indicaron TRA-8 (b) Los núcleos condensados de hepatocitos se tiñeron con Hoechst 33352 y se analizaron mediante citometria de flujo (c) Efecto de cicloheximida sobre apoptosis de hepatocitos Los hepatocitos fueron cultivados en un medio de control o con 1 µg/ml de TRAIL o TRA-8 en la presencia (barra cerrada) o ausencia (barras abiertas) de 1 µg/ml de cicloheximida durante 8 horas La viabilidad de las células se determinó mediante ATPLite Los resultados se presentan como media±SEM de cultivos triplicados de dos experimentos d Una comparación de susceptibilidad de

hepatocitos normales a apoptosis mediada por DR5 y Fas Los hepatocitos aislados frescos se incubaron con las concentraciones indicadas de TRAIL soluble, TRA-8, Fas soluble, o el anti-Fas mAb CH11 durante 6 horas La viabilidad de las células se determino mediante el ensayo de ATPLite Los resultados se presentaron como porcentaje de las células viables comparadas con el medio de control Para los hepatocitos normales, se presenta la media±SEM de 4 individuos normales Los resultados de las celulas de carcinoma hepatocelular provenientes de un paciente y de las células HepG2 se presentan como el promedio de los cultivos triplicados

Figura 13 TRAIL induce hepatitis Los ratones B6 fueron inoculados intravenosamente con 10^9 pfu de un vector adenoviral que codifica la longitud completa del TRAIL humano bajo el control del elemento transcripcional "tet-on" La expresion del TRAIL se indujo mediante la dosis indicada de tetraciclina (a) el análisis Northern blot de la expresión TRAIL de humano en le hígado 24 horas despues de la inoculación del vector y la inducción con tetraciclina, en ARN total se aisló de los hígados se sondeó con cADN TRAIL o β-actina (b) Los niveles de

suero de AST 24 después de las transducción del TRAIL, los niveles de suero de AST se determinaron (c) la muerte celular mediada por TRAIL del vector adenoviral infectado con hepatocitos los ratones B6 se inocularon intravenosamente con un vector adenoviral inducible con tetraciclina 48 horas después de la inoculación, los hepatocitos de ratones control inoculados y no inoculados se aislaron y se incubaron con las concentraciones indicadas de TRAIL durante 8 horas (panel izquierdo) La viabilidad de las células de los hepatocitos se determino mediante el ensayo ATPLite Los ratones, inoculados con vector adenoviral como se hizo anteriormente, fueron inyectados intravenosamente con 10 µg de TRAIL humano soluble 48 horas después los niveles de suero de AST se midieron 24 horas después de la inyección TRAIL (panel derecho) (d) y (e)el analisis histológico del daño en el hígado inducido por TRAIL Los hígados fueron recolectados a las 24 horas (d) o a los 7 dias (e) después de las transducción con TRAIL Las secciones de parafina fueron teñidas con H&E, y fotografiadas a 100 x (panel superior) y 400X (panel inferior)

La figura 14 es una serie de graficos que muestran unas células T activadas y unas células T purificadas de PBMC humano que expresan niveles crecientes de DR5 según se determinó mediante la densitometría de flujo para células en descanso (no llenadas) y activadas (sombreadas)

La figura 15 es una gráfica de viabilidad como una función de la concentración de TRA-8 para las células T y B purificadas descritas en la figura 14 que se han estimulado durante 48 horas con anti-CD3 o anti-μ, con celulas activadas y apagadas recolectadas con diferente densidad de Ficoll-Paque La viabilidad se determina mediante el ensayo ATPLite

La figura 16 es un histograma y una gráfica de densitometría de flujo que muestra la expresión CD3 una poblacion de linfocitos de puerta para ratones NOD/SCID vaciados de celulas NK inyectados con PBMC humano y TRA-8 o IgG (control)

La figura 17 muestra microfotografías celulares teñidas CD3 y TUNEL para tejido de vaso de raton segun se detalla en el ejemplo 13

La figura 18 muestra gráficas de citotoxicidad para leucemia linfolítica crónica (CCL) y para células humanas B en la presencia de TRA-8, BISVIII, y combinación de estas

DESCRIPCION DETALLA DE LA INVENCION

La falla para suprimir células se debe a los efectos en el sistema de induccion de apoptosis que esta asociado con defectos que ilustrativamente incluyen la expresión o la funcion del ligando, el receptor, o las moléculas regulatorias o efectoras intracelulares La presente invención logra un metodo para corregir un sistema de inducción de apoptosis deficiente así como también elucidar los defectos específicos inherentes en un sistema de inducción de apoptosis deficiente dado

La presente invención se relaciona con una nueva clase de anticuerpos monoclonales que tienen actividad de induccion de apoptosis in vivo e in vitro contra

receptores TRAIL especificos que incluyen DR5, DR4, DcR1, y DcR2 La presente invención tiene utilidad como un reactivo para la investigacion que señala la apoptosis asi como también una terapia efectiva contra la expresión de células Los receptores TRAIL incluyen de manera ilustrativa clases amplias de celulas cancerosas, desregulación del sistema de apoptosis y células sinoviales que proliferan anormalmente de enfermedades autoinmunes Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención son especificos en los tipos particulares de unión de los receptores TRAIL a pesar de la homología entre ellos Los anticuerpos de la invención logran la apoptosis objetivo de solo aquellas células que expresan un receptor TRAIL objetivo o alternativamente, bloquean la apoptosis TRAIL de las células que expresan un receptor objetivo

Un anticuerpo monoclonal DR5 de la presente invención sirve como un inductor potente de apoptosis en células que expresan DR5 in vitro y como un potente inductor de apoptosis in vivo La secuencia CDR fragmentarias humanizadas implantadas soore esqueletos de anticuerpos humanizados y anticuerpos anti-DR5 de

proteína de fusión de la presente invencion exhiben similares propiedades apoptósicas

A la fecha, ningun anticuerpo monoclonal se encuentra disponible que se una al DR5 de la superficie celular e induzca apoptosis de las células que expresan DR5 tanto in vitro como in vivo en la ausencia de un reticulador La presente invención incluye un anticuerpo anti-DR5 operativo como un agente terapéutico en modelos animales de enfermedades, tal como animales semi-injertados, o in vivo Aunque el TRAIL soluble ha mostrado ser efectivo en la inducción de apoptosis de células tumorales in vivo, la actividad de muerte parece ser muy baja con dosis grandes y repetidas que a menudo se requieren (13) El TRA-8, uno de una serie de anticuerpos anti-DR5 de acuerdo con la presente invencion, es farmaceuticamente efectivo en animales que llevan un transgen DR5 humano y tambien tiene la utilidad de establecer un modelo para la investigación del papel DR5 y TRAIL

Un anticuerpo de acuerdo con la presente invencion levantado contra un receptor TRAIL se cosecha de acuerdo con la presente invención de un animal experimental al

humanizar el anticuerpo de acuerdo con la presente invencion para mantener la actividad de unión del receptor el cual elicita una respuesta inmune disminuida y terapeuticamente tolerable dentro de un sujeto humano, un anticuerpo receptor anti-TRAIL humanizado o antagonistas para un receptor TRAIL dado La presente invencion es operativa como una terapia in vivo en razon de que no se requiere la segunda reticulación del anticuerpo receptor anti-TRAIL

La presente invención se extiende mas allá de un simple anticuerpo receptor anti-TRAIL que tiene efectos apoptosis agonistas o antagonistas En lugar de esto, dos o mas anticuerpos receptores anti-TRAIL se ponen en contacto con el cultivo de celulas in vitro o un tejido de cuerpo de sujeto in vivo para crear un tratamiento sinérgico Por ejemplo, la línea celular glioma U87 y las líneas celulares nematopoyeticas U937 y Molt-4 responden la exposición de una exposición sinérgica a un anti-DR4 agonista y anticuerpos anti-DR5 mientras que la exposicion a anticuerpos anticuerpo-DR5 agonistas solos muestran solo un éxito limitado en la inducción de apoptosis

Adicionalmente, los anticuerpos o receptores anti-TRAIL antagonistas tienen utilidad particular en la presente invención cuando un anticuerpo es específico para ligar uno de los receptores señuelo DcR1, DcR2 o OPG El bloqueo selectivo de un receptor señuelo con un anticuerpo de acuerdo con la presente invencion tiene el efecto en los tipos de celulas que expresan receptores señuelo de cambio del equilibrio de unión del TRAIL hacia aquellos receptores TRAIL capaces de transducir la señal de apoptosis De esta manera, en otra terapia combinada de acuerdo con la presente invención, un receptor señuelo que se une a un anticuerpo sintetiza una célula de expresión hacia la señal de apoptosis agonista que transduce la unión del receptor TRAIL

En otra modalidad, la presente invencion logra un metodo de elusitar epítopos agonistas y antagosistas de un receptor TRAIL dado Ademas, los polimorfismos entre individuos asociados con un receptor TRAIL dado son elucidados de acuerdo con la presente invención a traves del uso de un panel de anticuerpos monoclonales que tiene cada uno una variable diferente o region CDR Un panel caracterizado de anticuerpos monoclonales suministra la capacidad de definir epítopos y polimorfismos agonistas y

antagonistas De esta manera, un panel de anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención tiene utilidad en el descubrimiento de drogas y/o determinar sujetos con proclinidad a enfermedades

Aún otra modalidad de la presente invencion involucra proteínas de fusión que incluyen un fragmento antigenico de un receptor TRAIL acoplado a una proteína de inmunoglobulina, polipéptido o fragmento de este Un fragmento receptor TRAIL se define por contener un número suficiente de bases para elicitar una respuesta inmunogénica a un receptor TRAIL nativo expresado en la superficie de la célula de un sujeto Un fragmento de fusion receptor TRAIL que incluye al menos 10 aminoácidos Una proteína de fusión de inmunoglobulina o fragmento de esta se define aquí por incluir una proteína nativa o sintetica o segmento de polipeptido que tiene un número suficiente de bases de aminoácido para activar una respuesta encascada inmunogenica en un sujeto Un inmunógeno de la presente invencion que incluye una fusion de un fragmento receptor TRAIL acoplado a un fragmento de inmunoglobulina tiene utilidad como una terapia in vivo para elicitar un anticuerpo receptor anti-TRAIL in situ en un sujeto

En aún una modalidad adicional, la presente invención es operativa como terapia génica En un aspecto de la terapia génica de la presente invención, las células objetivo se transfectan con un vector que lleva una secuencia expresable que corresponde a un receptor TRAIL El vector es convencional y escogido sobre la base de la susceptibilidad de la célula objetivo al vector Los vectores de terapia génica incluyen de manera ilustrativa adenovirus, pAdCMV5 Sobre las células o tejido objetivo que expresan el receptor TRAIL transfectado, las células o tejidos se exponen a un anticuerpo de acuerdo con la presente invención específico para unir el receptor TRAIL transfectado Se aprecia que el anticuerpo receptor anti-TRAIL es agonista o antagonista a este consistente con el resutlado terapéutico deseado

Los anticuerpos de la presente invención también son operativos en conjunto con un sensibilizador Un sensibilizador como se utiliza aquí se define por incluir cualquier estímulo que induce apoptosis que incluye luz ultravioleta, moléculas orgánicas incluyen

específicamente la clase de bisindolmaleimidas, metales pesados y especies radicales libres

En el contexto de la terapia de malignidad, TRA-8, es capaz de inducir apoptosis en la mayoría de las células tumorales sensibles a TRAIL en una forma dependiente de caspasa en la ausencia de una reticulación secundaria El TRA-8 exhibe una actividad tumoral fuerte in vivo La capacidad del TRA-8 de inducir apoptosis de la mayoría de células sensibles TRAIL confirma que el DR5 es suficiente para dispara la apoptosis La mayoría de las células tumorales detalladas aqui expresan DR5 en la superficie celular y su susceptibilidad al TRA-8 indujeron muerte celular paralela a susceptibilidad al TRAIL lo que indica que el DR5 es un receptor de muerte primario para la apoptosis mediada por TRAIL en la mayoría de las células tumorales De esta manera, la expresión diferencial del DR5 mediante celulas normales y cancerosas es operativa en la selectividad de la apoptosis mediada por TRAIL Los puentes TRA-8 de los receptores señuelo para inducir la apoptosis mediada por TRAIL Solo una minoría de las células tumorales resistentes a TRAIL son sensibles al TRA-8, sin embargo, indicando que los receptores señuelo no parecen jugar un

papel importante en la resistencia de las celulas tumorales de la apoptosis mediada por TRAIL

Aunque estudios previos han indicado que la administracion sistemica de la forma soluble de TRAIL en animales induce regresión tumoral sin causar toxicidad [3,4,22], la forma de unión de membrana de TRAIL humano induce daño en el hígado en ratones como se muestra aquí Sin embargo, la toxicidad hepática del TRAIL es mucho menos potente que aquella del ligado Fas como se demostró por la menor susceptibilidad de los hepatocitos normales al daño inducido por TRAIL comparado con el ligando Fas y mediante la falta de letalidad del TRAIL in vivo De esta manera, la titulación del TRAIL tiene utilidad en terapia de cáncer

Como se detalló aquí, se muestra la ausencia de niveles significativos de expresión de proteína DR5 mediante hepatocitos normales y se asocia con resistencia de hepatocitos a apoptosis inducida con TRA-8 La reticualción de DR5 con anticuerpo monoclonal es suficiente para organizar las formas homopolimericas del receptor de muerte capaz de disparar la apoptosis Los experimentos en titis no indican evidencia de toxicidad

hepática de la administración de TRA-8 De esta forma, un anticuerpo anti-DR5 monoclonal agonista es probablemente más selectivo y mas seguro que el TRAIL soluble como agente terapéutico

Como un ensayo de tamizado, la presente invencion es adecuada para detectar clusters pequeños de células malignas que pueden aún exhibir morfologías de células normales La seccion de células in situ que se tiñe de células cancerosas humanas incluyen pulmón, prostata y cánceres de hígado con anticuerpos etiquetados de acuerdo con la presente invención fácilmente identifican células cancerosas Estas celulas cancerosas se observan por expresar muy altos niveles de DR5 comparados con las células normales del mismo tipo De esta forma, la presente invención tiene utilidad como metodo de tamizado sensible para malignidades en etapa temprana dentro del tejido que incluye al menos pulmon, prostata e hígado Un proceso terapéutico se detalla aquí para la inhibición de proliferación de células anormales asociadas con enfermedades de manera ilustrativa cánceres malignos y leucemias linfáticas

La presente invención se detalla aquí con particularidad a un anticuerpo monoclonal DR5 antihumano designado como TRA-8, que tiene un numero de acceso ATCC PTA-1428 Se aprecia que las técnicas y resultados detallados con relación al anticuerpo monoclonal DR5 antihumano agonistra TRA-8 son completamente extendibles y aplicables a anticuerpos DR5 antagonistas, así como también anticuerpos elevados contra DR4, DcR1, y DcR2, que actúan tanto de manera agonista como antagonista

Los niveles de expresión de un receptor de apoptosis, tal como el Fas no necesariamente se correlacionan con la susceptibilidad de las células a la apoptosis Para la apoptosis mediada por TRAIL, se ha sugerido que la expresion de los receptores señuelo para TRAIL influencia la susceptibilidad de las células Mas aun, se ha sugerido que el DR5 se debe asociar con el DR4 para transducción efectiva de la señal de apoptosis a traves del FADD y la senda de la caspasa 8 La disponibilidad del anticuerpo anti-DR5 monoclonal agonista permitió la evaluacion de la regulación de la señalización DR5 y su papel relativo en la apoptosis mediada por TRAIL La comparación de la susceptibilidad de las células a la apoptosis mediada por TRA-8 con su

susceptibilidad a la apoptosis mediada por TRAIL ofrece penetración en el papel del DR5 en la apoptosis mediada por TRAIL y el mecanismo puede afectar la susceptibilidad

Esta ventaja se extiende generalmente a los anticuerpos anti DR5 humanizados de la presente invencion Un clón molecular de un anticuerpo a dr-5 se prepara mediante técnicas conocidas como se detalla con respecto a los siguientes ejemplos La metodología del ADN recombinante (33) es operativa aquí para construir secuencias de ácidos nucleicos que codifican una molecula de un anticuerpo monoclonal o una región que se une a una antigeno de este

La presente invención permite la construccion de anticuerpos receptores anti-TRAIL humanizados que es poco probablemente induciran una respuesta de anticuerpo antiraton humano (en lo sucesivo denominado como "HAMA") (34), mientras que aún tenga un función efectora anticuerpo efectiva Como se utiliza aqui, en los términos "humano" y "humanizado", en relacion con los anticuerpos, relacionan a cualquier anticuerpo que se

espera para elicitar una respuesta inmunogenica debil terapéuticamente tolerable en un sujeto humano

La presente invención proporciona un anticuerpo anti-DR5, un anticuerpo anti-DR5 humanizado, inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera TRA-8 e inmunoglobulinas de cadena pesada ligera y humanizada Ciertos truncamientos de estas proteínas o genes desarrollan las funciones regulatorias o enzimáticas de la proteína o el gen de secuencia completa Por ejemplo, la codificación de la secuencia de ácido nucleico pueden por lo tanto ser alterados mediante sustitución, adiciones, supresiones o expresión multimérica que prcporcionan las proteínas o genes de funcionalidad equivalente Debido a la degeneración de las secuencias que codifican los ácidos nucleicos, otras secuencias que codifican sustancialmente las mismas secuencias de aminoácidos que aquellas proteínas de ocurrencia natural se pueden utilizar en la práctica de la presente invencion Estas incluyen, pero no estan limitadas a, secuencias de ácido nucleico que incluyen todas o porciones de las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipeptidos anteriores, que se alteran mediante la sustitución de diferentes codones que

codifican un residuo de aminoacido funcionalmente equivalente dentro de la secuencia produciendo así el cambio silente Se aprecia que la secuencia de nucleótidos de una inmunoglobulina de acuerdo con la presente invencion tolera las variaciones de homología de la secuencia de hasta el 25% calculada mediante métodos estándar ("Current Methods in Sequence Comparison and Analysis", Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp 127-149, 198, Alan R Liss, Inc) en tanto que tal variante forma un anticuerpo operativo que reconoce un receptor TRAIL DR5 Por ejemplo, uno o más residuos de aminoacido con una secuencia de polipéptido se pueden sustituir mediante otro aminoácido de polaridad similar que actúa como una función equivalente, dando como resultado una alteración silente Los sustitutos para un aminoácido dentro de una secuencia se pueden seleccionar de otros miembros de la clase a los cuales pertenece al aminoácido Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triftano y metionina Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, cerina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina Los aminoácidos cargados positivoamente (básico) incluyen arginina, licina e

histidina Los aminoacidos cargados negativamenmte (ácido) incluyen acido aspártico y ácido glutámico También se incluyen dentro del alcance de la presente invención proteínas o fragmentos o derivados de estos que son diferencialmente modificados durante o después de la traducción, por ejemplo mediante glicosolación, división protolítica, unión a una molecula de anticuerpo u otros ligadnos celulares, etc ademas, el vector recombinante que codifica secuencias de ácidos nucleicos anti-DR5 de la presente invención podrían ser trabajos por ingeniería con el fin de modificar el procesamiento o la expresión de un vector

De acuerdo con esto, un inhibidor que codifica la secuencia de ácido nucleico se puede mutar in vitro o in vivo para crear y/o destruir las secuencias de traducción, iniciación, y/o determinación para crear variaciones en las regiones codificantes y/o formar nuevos sitios donde nucleasas de restriccion o destruir la preexistentes, para facilitar adicionalmente la modificación in vitro Cualquier tecnica conocida para mutagénesis en el arte se puede utilizar incluyendo pero no estando limitados a mutagénesis dirigida a sitio in

vitro, J Biol Chem 253 6651, el uso de ligadores Tab (Pharmacia), y similares

Los datos de cristalografía de rayos X indican que el doblés de la inmunoglobulina del anticuerpo forma generalmente una estructura cilíndrica larga que comprende dos capas de láminas V antiparalelas, que consisten cada una de tres o cuatro cadenas V En una region variable, tres aros de cada uno de los dominios V de los clúster de las cadenas H y L forman juntos un sitio de union de antígeno Cada uno de los aros es denominado como región de determinación de complementariedad (DCR) Los CDR tienen la más alta variabilidad en las secuencias de aminoácidos con el anticuerpo Las porciones de la region variable que no son parte de un CDR son llamadas "regiones marco" (regiones "FR") y generalmente juegan un papel en el mantenimiento de la estructura CDR Preferiblemente, todos los CDR de un anticuerpo dado son injertados en un anticuerpo aceptador, con el fin de preservar la region de unión para la region epítopo del receptor TRAIL Se aprecia que el injerto de una porción de la cantidad total de CDR en un donador es operativa aquí Se entiende que el injerto vincula el reemplazo, residuo por residuo,

de un aminoácido o región, por otro Sin embargo, ocasionalmente, especialmente con la transferencia de una región, uno o más residuos se pueden agregar u omitir o sustituir para este, según se desee, y que tales supresiones o inserciones, así como también los reemplazos adecuados e inversiones, están dentro del conocimiento de aquellos de la técnica

Un anticuerpo de la presente invención se obtiene, por ejemplo, injertar cada CDR de la subunidad de la cadena H de un anticuerpo monoclonal receptor anti-TRAIL en una región correspondiente CDR de un anticuerpo humano, humanizando de esta manera, un anticuerpo monoclonal de ratón efectivo contra un receptor TRAIL

Los fragmentos de anticuerpo que contienen un idiotipo de las moléculas tambien son generados y operativos aquí utilizando dos técnicas Por ejemplo, tales fragmentos incluyen ilustrativamente el fragmento (AB')2 del receptor anti-TRAIL que se puede producir mediante digestión de pepsina de la molécula del anticuerpo, los fragmentos AB' del anticuerpo receptor TRAIL geenrados a través de la reducción de los puentes de disulfuro del fragmento (AB')2 del receptor TRAIL y el

fragmento del anticuerpo que es generado al tratar la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor

En particular, el anticuerpo monoclonal anti-DR5 DRA-8 se puede obtener al cultivar un hibridoma que, a su vez, se pude obtener al inmunizar un ratón con DR5 humano y subsecuentemente fusionar las células de base o las células de nodo de linfa de un ratón con celulas de mieloma de ratón

Preparación de un anticuerpo monoclonal involucra ilustrativamente las siguientes etapas

a) purificación de biomacromoléculas para uso como un antígeno,
b) preparación de células que producen anticuerpos, despues de inmunizar primero un animal utilizando inyecciones del angtígeo, sangrando el animal y ensayando el titulo del anticuerpo con el fin de determinar cuando remover el vaso,
c) preparación de células de mieloma,
d) fusionar el anticuerpo que produce células y celulas de mieloma,

e) seleccionar un hibridoma que produce un anticuerpo deseado,

f) preparar un clon de células simple (clonación),

g) opcionalmente cultivar las células hibridoma, o hacer crecer animales en los cuales las células hibridoma han sido transplantadas, para preparación a gran escala del anticuerpo monoclonal, y

h) ensayar las actividades biológicas y la especificidad, o ensayar las propiedades del agente marcador, del anticuerpo monoclonal así preparado

El procedimiento para la preparación del anticuerpo monoclonal anti-DR5 se detalla adelante con referencia a las etapas anteriormente descritas Este método para la preparación de un anticuerpo de la presente invención se pretende solo como ilustración de los métodos de preparación y no esta limitado a este Otros procedimientos conocidos pueden ser seguidos, o el método siguiente modificado, por ejemplo mediante el uso de células que producen anticuerpos diferentes de las celula de vaso y mieloma

(a) preparción de antígeno

Una proteına recombınante (en los sucesıvo denomınada como una "DR5 humano recombınante") efectıva como el antígeno, se obtıene mediante la transfección de celulas QBI-293A con el vector de expresion pAdDR5-IgI para una proteína de fusión que comprende el dominıo extracelular del DR5 humano y la regıon Fc del anticuerpo IgG1 humano (en lo sucesıvo denomınado como "IgG") (cf PTA-1428) para expresarlo al utılızar el kıt ADENO-Quest (Quantum Bıotechnologıes Inc , Canadá), y recolectar y purıfıcar parcıalmente el producto de expresión El plásmıdo pAdDR5-IgG se construye al ınsertar ADN que codıfica un DR5 humano y una proteína de fusión IgC humana en pAdCMV5, que es un vector de expresión para celulas anımales Otros materıales, tales como el ADN que codıfica DR5, el vector, y el hospedero son operatıvos aquı

La proteína de fusión DR5 e IgG numanas producıdas en el cultıvo supernadante de las células QBI-293ª transfectadas con el vector pAdDR5-IgG pueden ser parcıalmente purıfıcadas mediante cromatografıa de afınidad de proteína A-sefarosa o cromatografía de

afinidad de proteína G-sefarosa, o cromatografía de intercambio de iones utilizando una columna Resource Q (nombre comercial Pharmacia)

Alternativamente, el DR5 purificado obtenido de las membranas de líneas de células humanas se utilizan como el antígeno Además, en razon a que la estructura primaria del DR5 es conocida (cf PTA-1428), un péptido que comprende las secuencias de aminoácidos del SEC ID No 1, pueden ser químicamente sintetizadas mediante un método conocido tal como el método Sanger, y utilizadas como el antígeno

(b) Preparción de las células productoras de anticuerpo

Se inmuniza un ratón con el inmunogeno producido en la etapa (a), mezclada con un adyuvante, tales como el adyuvante o alumbre completo o incompleto Freund Otros animales experimentales adecuados ilustrativamente incluyen ratas, cerdos de guinea, conejos, perros, pollos, caballos, cerdos, y ovejas

Las rutas de administracion adecuadas para inmunizar un animal experimental incluyen las rutas de inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intradermal, e intramuscular, cuyas inyecciones subcutáneas e intraperitoneal son preferidas

Las inmunizaciones son opcionalmente desarrolladas mediante una dosis simple o, mediante varias dosis repetidas a intervalos apropiados (preferiblemente 1 a 5 semanas) Los animales inmunizados se monitorean para titular el anticuerpo en su suero, y un animal con un título de anticuerpo suficientemente alto se selecciona como la fuente de células que producen anticuerpos Seleccionar un animal con un título alto hace el subsecuente proceso más eficiente Las celulas para la fusión subsecuente son generalmente cosechadas del animal tres a cinco días después de la inmunización final

Los métodos para ensayar el título del anticuerpo incluyen varias técnicas bien conocidas tales como radioinmunoensayo (en lo sucesivo, denominado como "RIA"), inmunoensayo de enzima de fase sólida (en lo sucesivo denominado como "ELISA"), ensayo de anticuerpo fluorescente y ensayo de hemaglutinación, siendo el RIA y

el ELISA preferidos por razones de sensibilidad, rapidez, precisión y potencial de detección de manera automática

La determinación del título del anticuerpo se puede desarrollar, por ejemplo, mediante ELISA como sigue Primero, el DR5 purificado o parcialmente purificado se adsorbe sobre la superficie de la fase sólida, tal como un plato ELISA de 96 pozos, seguido por el bloqueo de cualquier superficie restante, a la cual el DR5 no se ha unido, con un proteina no relacionada con el antígeno, tal como seroalbúmina de bovino (BSA) Después de lavado, la superficie de los pozos son puestas en contacto con muestras serialmente diluidas de suero de ratón para posibilitar la union del anticuerpo anti-DR5 en las muestras al antigeno Un anticuerpo anti-ratón etiquetado con enzima, como el anticuerpo secundario, se agrega por estar unido al anticuerpo del ratón Después de lavado, el sustrato de enzima se agrega y en el título el anticuerpo se estima al determina el cambio de absorbancia debido al desarrollo del color causado por la alteración del sustrato o similar

(c) Preparación de células de mieloma

Las células de líneas de célula de ratón establecido sirven como la fuente de celulas de mieloma que incluyen por ejemplo ratón resistente 8-azaguanina, derivado de las sepas de mieloma BALB/c P3X62Ag8U 1 (P3-U1)(35), P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1)(36) Sp2/0-Ag14(SP-2)(37), P3X63Ag8 653(653)(38) y P3X63 Ag8(X63)(39) La línea de celulas seleccionada es transferida serialmente a un medio apropiado, tal como un medio 8-azaguanina El medio 8-azaguanina incluye un medio de Dulbeco modificado de Iscove (en lo sucesivo denominado como "IMDM") o medio Eagle modificado de Dulbeco (en lo sucesivo denominado como "DMEM") El medio RPMI-1640 suplementado con glutamina 2-mercaptoetano, gentamicina, suero de ternero fetal (en lo sucesivo denominado como "FCS"), y 8-azaguanina Las células son entonces transferidas a un medio normal, tal como un medio ASF 104 (Ajinomoto, K K) que contiene 10% de FCS, tres a cuatro días antes de la fusión, con el fin de asegurar que al menos $2x10^{-}$ celulas estén disponibles en el día de la fusión

(d) fusion de células

Los linfocitos y las células de plasma obtenidsa de cualquier parte adecuada del animal son células

precurosras para producir el anticuerpo Las fuentes de células de linfocitos o plasma incluyen de manera ilustrativa el vaso, los nodos linfáticos, la sangreperiférica o cualquier combinación apropiada de estos, siendo las células del vaso la fuente más común

Después de la última inyección propulsora, el tejido en el cual las células que producen anticuerpo están presentes se remueve de un ratón que tienen un título de anticuerpo predeterminado La tecnica habitualmente favorecida por la fusión de células de vaso con células de mieloma preparadas en la etapa (c), emplea polietilenglicol

La técnica de fusión incluye lavado de células de vaso y mieloma con 0 libre (tal como RPMI 1640) o solución salina amortiguada con fosfato (en lo sucesivo denominada como "PBS") de tal forma que la proporcion de número de células de vaso a celulas de mieloma está aproximadamente entre 5 1 a 10 1, y luego centrifugada Después el supernadante se ha descartado y las células peletizadas suficientemente sueltas, se agrega 1 ml de medio libre de suero que contiene 50% (p/v) de polietilneglicol (p m 1 000 a 4 000) gota a gota con

mezclador Subsecuentemente, 10 ml de medio libre de suero se agrega lentamente y luego se centrifuga El supernadante se descarta de nuevo, y las células peletizadas se suspenden en una cantidad apropiada de medio HAT que contiene una solución de hipoxantina, aminopterina y timidina (en lo sucesivo denominada como "HAT") e interleucina-2 de ratón en lo sucesivo denominada como "IL-2") La suspensión es entonces dispensada dentro de los pozos de los platos de cultivo (aquí denominados simplemente como "plato") e incubados en la presencia de 5% v/v de CO_2 a 37° C durante dos semanas con una adición suplementaria de medio HAT según sea apropiado

(e) Selección de hibridomas

Cuando la sepa mieloma utilizada es resistente a la 8-azaguanina, es decir es deficiente en la enzima hipoxantina y guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), cualquier célula de mieloma no fusionada y cualquier fusión mieloma-mieloma es incapaz de sobrevivir en un medio HAT De otra parte las fusiones ce las células que producen anticuerpo una con la otra, así como también los hibridomas de celulas que producen anticuerpo con celulas

de mieloma pueden sobrevivir, la ultima solo teniendo una vida limitada De acuerdo con esto, la incubacion continuada en un medio HAT da como resultado la selección de solo los hibridomas deseados

Los hibridomas resultantes crecen en colonias que son luego transferidas en un medio HAT al que le falta aminopterina (medio HAT) Luego de esto, alicuotas del cultivo supernadante se remueven para determinar el titulo del anticuerpo anti-Fas mediante, por ejemplo, ELISA Cuando la proteína difusión anteriormente mencionada se utiliza como el antigeno ELISA, es también necesario eliminar clones que producen un anticuerpo que se une específicamente a la región Fc del IgG1 humano La presencia o ausencia de tales clones puede ser verificada, por ejemplo, mediante ELISA utilizando Fas-IgG1 o IgG1, como el antígeno

(f) Clonacion

Los hibridomas que han mostrado que producen anticuerpos específicos, utilizando un metodo similar al de la etapa b) para determinar el título del anticuerpo, son entonces transferidos a otro plato para clonación

Los métodos de clonación adecuados incluyen el método de dilusión limitada, en el cual los hibridomas son diluidos por contener una celula por pozo de un plato y luego cultivados, el método de agar suave en el cual las colonias son recubiertas después de cultivar el medio agar suave, un metodo de usar un micro manipulador para separar una celula simple para el cultivo, y "clasificar un clón", en el cual las células simples se separan mediante un clasificador de células

El procedimiento de clonacion de acuerdo con, por ejemplo, el metodo de dilusión limitada se repite de dos a cuatro veces por cada pozo que demuestra un título de anticuerpo, y los clones que tienen títulos de anticuerpo estables se recolectan como hibridomas que producen anticuerpos monoclonales anti-DR5 Los hibridomas que producen un anticuerpo DR5 anti-ratón se seleccionan mediante un método similar para obtener un anticuerpo monoclonal anti-DR5 que produce la linea de celulas

El hibridoma ratón-ratón TRA-8 que es una base para los anticuerpos de la presente invencion se depositó con la American Type Culture Collection en marzo 1, 2000, y tiene el numero de acceso PTA-1428 De acuerdo con esto,

cuando se prepara un anticuerpo que utiliza el hibridoma raton-ratón TRA-8 o cualquier otro hibridoma establecido, la preparación se puede desarrollar al seguir un procedimiento de partida de la etapa (g) adelante, con las etapas (a) a (f) omitidas

(g) Cultivo de hibridoma para prepara anticuerpo monoclonal

El hibridoma obtenido mediante la clonacion es luego cultivado en un medio normal, no en un medio HT El cultivo a gran escala se desarrolla mediante un cultivo en botella rodillo, utilizando grandes botellas de cultivo o mediante un cultivo hilador El supernadante proveniente del cultivo a gran escala es entonces cosechado y purificado mediante un metodo adecuado, tal como filtracior de gel, el cual es bier conocido por aquellos expertos en la técnica, para obtener un anticuerpo monoclonal anti-DR5 que es una base para anticuerpos de la presente invención El hibridoma también puede crecer intraperitonealmente en un raton singeneico, tal como el ratón BALB/c o un ra ton un/un, para obtener acitos que contienen un anticuerpo monoclonal anti-DR5 en grandes cantidades Los kits de

purificación de anticuerpos monoclonales comercialmente disponibles (por ejemplo, el kit MabTrap GII, de Pharmacia) se utiliza convencionalmente para purificar los anticuerpos cosechados

Los anticuerpos monoclonales preparados como anteriormente tienen una alta especificidad para el DR5 humano

(h) Ensayo de anticuerpo monoclonal

Los métodos de identificación adecuados del isotipo y las subclases del anticuerpo no clonal incluyen el método Ouchterlony, ELISA y RIA Preferiblemente, se utiliza un kit comercial para la identificación, tal como un kit Mouse Typer (nombre comercial, BioRad)

La cunatificación de la proteína se puede desarrollar mediante el método Folin-Lowry, o mediante el calculo basado en la absorbancia a 280 nm (1,4 (OD280) = inmonuglobulina 1 mg/ml)

La identificación del epítopo que el anticuerpo monoclonal reconoce se desarrolla como sigue Primero,

varias estructuras parciales de la molécula que reconoce el anticuerpo monoclonal se preparan Las estructuras parciales se preparan mediante el método en donde varios péptidos parciales de la molécula se preparan sintéticamente mediante técnica de síntesis de oligopéptidos conocida, o el método en donde el ADN que codifica el polipéptido parcial deseado se incorpora en un plásmido de expresión adecuada y se expresa en un hospedero adecuado, tal como E Coli, para producir los peptidos Generalmente, ambos métodos son frecuentemente utilizados en combinación para el objeto anterior Por ejemplo, una serie de polipéptido que tienen longitudes apropiadamente reducidas, trabajan desde el terminal C- o N- de la proteína de antígeno, se pueden preparar mediante técnicas de ingeniería genética establecidas Al estableces cuales fragmentos reaccionan con el anticuerpo, se obtiene una idea aproximada del epítopo

El epítopo esta más cercanamente identificado al sintetizar una variedad de oligopéptidos más pequeños que corresponden a este mutantes del péptido que utilizan las tecnicas de síntesis de oligopeptidos establecidas para determinar una propiedad de union de los péptidos al anticuerpo monoclonal anti-DR5 que es una base para la

preparación del anticuerpo de la presente invención y una inhibición competitiva de la unión del péptido a un antígeno con el anticuerpo monoclonal Los kits comercialmente disponibles, tales como el kit SPOTs (Genosys Biotechnologies, Inc) y una serie de kits de síntesis de péptido multipasador basados en el metodo de síntesis multipasador (Chiron Corp) pueden ser convenientemente utilizados para obtener una gran variedad de péptidos

Un anticuerpo de la presente invención tiene las varias propiedades funcionales a) a f) descritas adelante, cada una de las cuales se verifica mediante, por ejemplo, un método descrito en lo sucesivo

a) Unión específica del TRA-8 a las células que expresan en DR5 humano

Una característica única de la presente invención es la capacidad de unir superficies de célula DR5 Esto se demuestra mediante análisis de citometría de flujo de las celulas que expresan DR5 Primero, la superficie de células específicas que unen el DR5 se confirman mediante las células transfectadas COS-7 con el DR5 humano que

codifica el cADN de longitud completa Específicamente, el TRA-8 reconoce solo las células COS-7 transfectadas con DR5 pero no el vector de control vacío o el vector que codifica DR4 Segundo, tres orígenes diferentes se ensayan en hematopoyético, el glioma, y las células de tumor maligno de cáncer de próstata de humano La mayoría de las células de tumor transformadas expresaron niveles significativos de superficie celular DR5, aunque los niveles de expresión varían grandemente Tercero, se examinaron dos paneles de células de fibroblasto sinovial primario de humano provenientes de paciente RA y OA Todas las células sinoviales RA expresaron niveles significativamente altos de DR5 comparados con las celulas OA

b) Inducción de apoptosis de células de tumor maligno de humano in vitro en la ausencia de reticulación

La capacidad de un anticuerpo levantado de acuerdo con la presente invención para reconocer el receptor TRAIL y para inducir directamente apoptosis de las células de tumor humano maligno se determinaron mediante ensayo de viabilidad (ATPLite) durante el cultivo in

vitro de celulas con varias concentraciones de un anticuerpo, especificamente TRA-8 La mayoria de células de tumor con susceptibles de apoptosis inducida por TRA-8 Para algunas células, el TRA-8 exhibió una actividad que induce fuerte apoptosis, por ejemplo, el TRA-8 es capaz de inducir apoptosis de células Jurkat de humano con niveles pg/ml De manera importante, la apoptosis inducida por TRA-8 no requirió reticulación, y en la mayoría de las células, el TRA-8 exhibió una actividad que induce apoptosis mas fuerte que el TRAIL soluble recombinante en la presencia del mejorador

c) Actividad tumoricida del TRA-8 in vivo

La actividad tumoricida del TRA-8 se evalua en dos modelos de celulas de tumor SCID/humano Primero, los ratones SCID son intravenosamente inoculados con células Jurkat de leucemia de humanos, y tratadas con una dosis simple (100 µg) de TRA-8 Los resultados muestran que la mayoría de las celulas Jurkat implantadas se eliminan de la sangre periferica del vaso mediante el tratamiento con TRA-8, como se determinó mediante el análisis de

densitometría de flujo y tamizado inmunohistoquímico in situ de células Jurkat

Segundo, las células astrocitoma de humano, 1321N1, son inoculadas subcutáneamente en ratones SCID, y los ratones que llevan el tumor son tratados con una dosis simple de TRA-8 El crecimiento de las celulas 1321N1 implantadas es significativamente inhibido en los ratones tratados con TRA-8 como se determinó mediante los tamaños de tumor y el análisis histológico

d) Identificación de células sinoviales RA mediante TRA-8

Las celulas sinoviales primarias aisladas provenientes de ocho pacientes RA y cuatro pacientes OA son ensayadas para expresión de superficie de célula de DR5 El TRA-8 es capaz de tamizar positivamente todas las celulas RA pero teñir negativamente todas las celulas OA De esta forma, el RA es diferenciado del OA mediante la expresion de superficie del DR5 como se detecto mediante TRA-8

e) Inducción de apoptosis en células de fibroblastos sinovial RA mediante TRA-8

La capacidad del TRA-8 de inducir apoptosis de las células sinoviales RA se determina mediante el ensayo de viabilidad celular durante el cultivo in vitro en la presencia de varias concentraciones de TRA-8 Todas las células RA exhibieron niveles alto a intermedio de susceptibilidad a 100 mg/ml de TRA-8 En contraste, todas las células OA son esencialmente resistentes a la apoptosis inducida TRA-8 De manera importante, las TRA-8 exhibieron una mejor actividad inductora de apoptosis a las células sinoviales RA que el TRAIL soluble con el mejorador Más aun, comparado con el anticuerpo anti-Fas (CH-11), el TRA-8 exhibió una mejor selectividad a las células sinoviales RA

f) El TRA-8 no indujo la producción de MMP en células sinoviales RA en razón a que el TRA-8 es capaz de inducir la activación NF-kb en células sinoviales RA como TNF-a, el efecto del TRA-8 sobre la producción de MMP1 y MMP3 de células sinoviales se determinó Mientras que el TNF-a indujo un incremento dependiente de dosis de MMP, el TRA-8 es incapaz de inducir cualquier producción de

MMP, y en algunas concentraciones, el TRA-8 disminuye ligeramente la producción de MMP en las células sinoviales RA

g) El TRA-8 induce activacion de caspasa múltiple

En razón a que las capasas juegan un papel crucial en la inducción de apoptosis La capacidad del TRA-8 para inducir activación de caspasa se determina en célula Jurkat de humano Cuando las celulas Jurkat se incuban con una dosis baja (50 mg/ml) de TRA-8, la actividad de caspasa 8, caspasa 9, y caspasa 3 se observa tan tempranamente como 15 minutos después de la incubación como se demostró mediante el análisis Western blot y el análisis de separación de caspasa En terminos de tiempo, número y resistencia de activacion de la caspasa, los anticuerpos de la presente invencion incluyen el anticuerpo demostrativo TRA-8 exhiben una mucho mejor actividad que cualquier otros anticuerpos que inducen apoptosis conocidos tales como el anticuerpo Fas anti-humano (CH-11)

De esta forma, el anticuerpo de la presente invención es una sustancia que tiene una propiedad para

inducir selectivamente apoptosis en células patogénicas como se meustra en efecto (a) y (g) De acuerdo con esto, es útil como un agente profiláctico y terapéutico para enfermedades asociadas con supervivencia inadecuada de células o proliferacion inadecuada de células, tales como aquellas atribuíbles a la desregulación de sistemas de apoptosis que incluyen el sistema ligando Fas/Fas

La capacidad de un anticuerpo de la presente invención a inducir apoptosis se confirma medainte el cultivo de células tales como el Jurkat de línea de celulas de leucemia de humano (American Type Culture No TIB-152) y la linea celular de astrocitoma 1321N1 en un medio en el cual la muestra de ensayo se ha agregado, y determinar la proporción de supervivencia mediante, por ejemplo, un ensayo ATPLite

El anticuerpo de la presente invencion, especialmente los anticuerpos anti-DR5 que tienen casi la misma inmunogenicidad a un humano como auqel de los anticuerpos humnaos, se utiliza como un agente para profilaxis o tratamietno de enfermedaoes asociadas con sobrevivencia inadecuada o proliferación de celulas que incluye aquellos atribuibles a la desregulación de

sistemas de apoptosis en enfermedades autoinmunes que incluyen de manera ilustrativa lupus eritematoso sistemico, enfermedad de Hashimoto, artritis reumatoide, enfermedad de injerto versus huésped, síndrome de Sjögren, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, esclerodermа, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Crohn, anemia hemolítica autoinmune, esterilidad, miastenia gravis, esclerosis múltiple, enfermedad de Basedow, trombopenia púrpura, diabetes mellitus insulinodependiente, alergia, enfermedad atópica, arterioesclerosis, miocarditis, cardiomaiopatía, nefritis glomerular, anemia hipoplástica, rechazo después del transplante de órganos y numerosas malignidades de pulmón, prostata, hígado, ovario, tejido linfático y pecho

Tal agente profiláctico y terapéutico se puede administrar en varias formas Los modelos adecuados de administracion incluyen administracion oral, tal como mediante tabletas, cápsulas, gránulos, polvos y melazas, o administracion parenteral, tal como mediante inyeccion, inyección por goteo y supositorios

El anticuerpo o el agente terapeutico se puede administrar oralmente, por el recto, intrasisternalmente, intraventricular, intracraneal, intratecal, intravaginal, parenteralmente, (intravenosamente, intramuscularmente, o subcutáneamente), localmente (polvos, ungüentos, o gotas), mediante inyección intraperitoneal, transdérmicamente, mediante inhalación o como un rociado bucal o nasal La cantidad exacta del anticuerpo o agente terapéutico requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la edad, peso y condición general del sujeto, la severidad de la enfermedad que está siendo tratada, el sitio y el tamaño del tumor, los compuestos particulares utilizados, el modo de administración, y similar Una cantidad apropiada se puede determinar mediante un experto en la técnica utilizando experimentacion de rutina dada las enseñanzas de aquí Las dosis típicas simples de rango de anticuerpo de 0,1-10 000 µg, preferiblemente entre 1 a 100 µg las concentraciones de anticuerpo típicas en un portador varian desde 0,2 a 2 000 nanogramos por mililitro suministrado

Dependiendo del modo pretendido de administración, el anticuerpo o agente terapéutico puede estar en composiciones farmacéuticas en la forma de formas semisólidas o formas de dosis líquidas, tales como, por ejemplo, tabletas, supositorios, píldoras, cápsulas, polvos, líquidos, o suspensiones, preferiblemente en forma de dosis unitaria adecuada para la administración simple de una dosis precisa La composición incluirá una cantidad efectiva del sustrato seleccionado en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable y, en adición, puede incluir otro agentes medicinales, agentes farmacéuticos, portadores, o diluyentes Por "farmaceuticamente aceptables" se entiende un material que no es biológicamente o de otra manera indeseable, el cual se puede administrar a un individuo junto con el sustrato seleccionado sin causar efectos biológicos significativamente indeseables o interactuar de una manera deletérea con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la cual está contenida

Las composiciones adecuadas para inyección parenteral pueden comprender soluciones acuosas estériles o soluciones no acuosas fisiológicamente aceptables, dispersiones,

suspensiones o emulsiones, y polvos estériles para reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles Ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados, diluyentes, solventes o vehículos, incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol, y similares), mezclas adecuadas de estos, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como etiloleato La fluidez adecuada puede ser mantenida, por ejemplo, al utilizar un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensoactivos

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como preservativos, humectantes, emulsificantes, y agentes dispersantes La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar mediante varios agentes antibacteriales y antifungosos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio, y similares La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser traída mediante el uso

de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina

Las formas de dosis sólidas para administración oral incluyen cápsulas, tabletas, píldoras, polvos y gránulos En tales formas de dosis sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente de inerte de costumbre (o portador) tal como citrato de sodio o fosfato de calcio (a) llenadores o extendedores, como por ejemplo, almidón, lactosa, sucrosa, o glucosa, manitol, y ácido silícico (b) ligantes, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alienatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sucrosa, y acacia (c) humectantes, como por ejemplo, glicerol, (d) agentes desintegrantes como por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos complejos y carbonato de sodio, (e) retardantes en solución como por ejemplo, parafina, (f) aceleradores de absorción, como por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes, por ejemplo, cetilalcohol, y monoestearato de glicerol, (absorbentes, como por ejemplo, caolín y bentonita, y lubricantes, como por ejemplo, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio,

polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio o mezclas de estos

En el caso de cápsulas, las tabletas y las píldoras, las formas de dosis también pueden comprender agentes amortiguantes

La composición sólida de un tipo similar también se puede emplear como llenadores en cápsulas de gelatina suaves o duras rellenas utilizando tales excipientes como lactosa o azúcar de leche así como también polietilenglicoles de alto peso molecular y similares

Las formas de dosis sólida tales como tabletas, grageas, cápsulas píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos y otros bien conocidos en la técnica Ellos pueden contener agentes opacificantes, y también pueden ser de tal composición que ellos liberen el compuesto activo o los compuestos en una cierta parte del gastro intestinal de una manera demorada Ejemplos de composiciones en bebidas que se pueden utilizar son sustancias poliméricas y ceras Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada, si es

adecuado, con uno o mas de los excipientes anteriormente mencionados

Las formas de dosis sólidas para administración oral incluyen emulsiones farmacéuticamente aceptables, soluciones, suspensiones melazas y elíxires En adición a los compuestos activos, las formas de dosis sólida pueden contener diluyentes inertes comúnmente utilizados en la tecnica, tales como agua, u otros solventes, agente solubilizantes, y emulsificadores, por ejemplo, etilalcoho, isopropilalcohol, etilcarbonato, atilacetato, benzilalcohol, benzilalcohol, decilbenzoato, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites, en particular, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de Castor, y aceite de sésamo, glicerol y tetrahidrofurfuril alcohol, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán o mezclas de estas sustancias y similares

Además de tales diluyentes inertes, la composición también puede incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, emulsificantes y agentes de suspensión, endulzantes, saborizantes, y agentes perfumantes

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión, como por ejemplo, alcohol de isoestearilo etoxilado, polioxietilen sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, o mezclas de estas sustancias y similares

Las composiciones para administración rectal son preferiblemente supositorios que se pueden preparar al mezclar los compuestos de la presente invención con excipientes adecuados no irritantes o portadores tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera supositorio, que son sólidos a temperaturas ordinarias per líquidos a temperaturas del cuerpo y por lo tanto, se funden en el recto o la cavidad vaginal y liberan el componente activo

Las formas de dosis para administración tópica de un compuesto de esta invención incluyen ungüentos, polvos, rociados e inhalantes El componente activo se mezcla bajo condiciones estériles con un portador fisiológicamente aceptable y cualquier preservativo, amortiguador, o propulsante según se requiera Las

formulaciones oftálmicas, ungüentos para ojo, polvos, y soluciones también se contemplan como dentro del alcance de la invención

El término "sales, ésteres, amidas, y prodrogas farmacéuticamente aceptables" como se utiliza aqui se refiere a aquellas sales de carboxilato, sales de adición de aminoácido, ésteres, amidas y prodrogas de los compuestos de la presente invención que son, dentro del alcance del sonido del juzgamiento médico, adecuadas para el uso en contacto con los tejidos de pacientes sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, medida con una proporción razonable de beneficio/riesgo, y efectiva para su uso pretendido, así como también formas suiteriónicas, donde es posible, de los compuestos de la invención El término "sales" se refiere a sales de adición ácida inorgánica y orgánica relativamente no tóxicas de los compuestos de la presente invención Estas sales se pueden prepara in situ durante el aislamiento final y la purificación de los compuestos o al hacer reaccionar de manera separada el compuesto purificado en su forma de base libre con un acido orgánico o inorgánico adecuado y aislar la sal así formada Las sales representativas incluyen el

hidrobromuro, hidrocloruro, sulfato, bisulafato, nitrato, acetato, oxalato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, toxilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptanoato, lactobionato, metanosulfonato y sales de laurilsulfonato, y similares Estas pueden incluir cationes basados en metales alcalinos y alcalinoterreos, tales como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y similares, así como también amonio no tóxico, amonio cuaternario y cationes de amina que incluyen pero no están limitados a amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina, y similares (ver, por ejemplo, S M Barge et al , "Pharmaceuticals Salts", J Pharm Sci , 1977, 66 1-19 que se incorporan aquí como referencia)

El término "prodroga" se refiere a compuestos que son rápidamente transformados in vivo para producir los compuestos padre de la fórmula anterior, por ejemplo, mediante hidrólisis en la sangre Una discusión completa se suministra en T Higuchi y V Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol 14 del A C S Symposium Series, y en Bioreversible Carriers in Drug Design, ed

Edward B Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987

Una célula objetivo es una célula de un animal que incluye ilustrativamente humano, primate no humano, rata, ratón, cerdo de guinea, conejo, cabra, oveja, vaca, caballo, pollo, cerdo, marmota y hurón

Además, el anticuerpo o el agente terapéutico de la presente invención puede existir en formas no solvatadas así como también solvatadas con solventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol y similares En general, las formas solvatadas son consideradas equivalentes a las formas no solvatadas para propósitos de la presente invención

Las moleculas de anticuerpo son purificadas mediante técnicas conocidas que incluyen ilustrativamente cromatografía de aminoabsorción o aminoafinidad, técnicas cromatográficas tales como cromatografía líquida de alta presión, o combinación de estas

Otro aspecto de la presente invención incluye un producto farmacéutico para uso en suministro

biológicamente activo anticuerpo receptor anti-TRAIL o anticuerpo receptor anti-TRAIL humanizado a un vertebrado El producto farmacéutico incluye una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo receptor anticuerpo-TRAIL o fragmento de este, un portador farmacéuticamente aceptable, y un recipiente que incluye un portador y el anticuerpo en una forma estéril

En una modalidad preferida de la invención, una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-DR5 inhibe la proliferación de las células al ponerse en contacto con una célula objetivo Una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo reconoce el DR5 o un anticuerpo humanizado que reconoce el DR5 en una cantidad administrada a un individuo suficiente para originar un efecto deseado Los efectos deseados de la administración de una cantidad farmacéuticamente efectiva de DR5 que reconoce anticuerpos incluye la muerte de una célula objetivo, inhibición de crecimiento de una célula objetivo, estimulacion de DR5, unión a DR5, y niveles NFkB incrementados o actividad en la célula objetivo Una celula objetivo es una célula que expresa DR5 e ilustrativamente incluye células de crecimiento anormal y tumores tales como papilomas y verrugas, cáncer de seno,

cáncer de colon, hepatomas, leucemias, cáncer de pulmón, melanoma, mielomas, osteosarcomas, cánceres e ovario, cáncer pancreatico, cáncer de próstata, cáncer de la cabeza y el cuello, cáncer de la tiroides, cáncer uterino y tumores del cerebro, tales como astrofitomas, in vivo, la célula objetivo es la célula de un individuo con una condición patológica, que incluye aquellos donde la proliferación de las células es anormal o desregulada como en cáncer maligno o benigno y artritis reumatoide

En otra modalidad preferida, la célula objetivo es también puesta en contacto con un agente terapéutico

Un agente terapéutico es un compuesto o composición efectiva para mejorar una condición patológica Un ejemplo ilustrativo del agente terapéutico incluye un compuesto anticáncer

Un compuesto anticancer es un compuesto o composición efectiva para inhibir o disminuir el crecimiento de una célula que crece anormalmente Una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto anticáncer es una cantidad administrada a un individuo suficiente para mejorar la inhibición o disminución del

crecimiento de una célula de crecimiento anormal Los ejemplos ilustrativos de los compuestos anticáncer incluyen bleomicina, carboplatina, clorambucil, cisplatina, colchicina, ciclofosfamida, daunorobicina, dactinomicina, dietiletilbestrol, doxorubicina, etopoxida, 5-fluorouracilo, floxuridina, melfalán, metotrexato, mitomicina, 6-mercaptopurina, teniposida, 6-tioguanina, vincristina y vinblastina Ejemplos adicionales de compuestos antoicancerosos y agentes terapéuticos se encuentran en el manual Merck de Diagnosis y terapia, 15ta Ed , Berkow et al , eds , 1987, Rahway, N J y Sladek et al Metabolism and Action of Anti-Cancer Drugs, 1987, Powis et al Eds , Taylor and Francis, New York, N Y

El anticuerpo de la presente invención puede ser adicionalmente combinado con otras terapias tales como quimioterapia y radioterapia en el tratamiento de malignidades y la eficacia terapéutica se puede mejorar mediante compuestos que inducen la apoptosis tales como bisindolilmaleimida VIII

Comparada con el anticuerpo anti-DR5 publicado previamente (24), la actividad que induce apoptosis del

anticuerpo TRA-8 demostrativo de la presente invención es muy fuerte, y es capaz de inducir apoptosis de las células Jurkat con unos niveles pg/ml in vitro que demuestran actividad tumoricida in vivo superior comparada con el TRAIL soluble previamente reportada La administración intravenosa de la dosis simple de TRA-8 es suficiente para inhibir el crecimiento tanto del tumor sólido como de las celulas de tumor hematopoyético, mientras que la inducción de tumor in vivo con un TRAIL soluble requiere una dosis mucho más alta (500 ug cada día durante 10 días) Los anticuerpos del receptor anti-TRAIL de la presente invención parecen ser tan seguras como el TRAIL soluble en razón a que el TRA-8 de ejemplo no induce apoptosis de células de fibroblastos no transformadas

Los vectores de la presente invención incluyen secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada o ligera de hemoglobina de un anticuerpo anti-DR5 operablemente ligado a un elemento regulatorio tal como un promotor o mejorador "operablemente ligado" se refiere a una exposición de secuencias de nucleótidos configuradas para desarrollar su funcion usual De esta forma, un elemento regulatorio operablemente ligado a una

secuencia de nucleotidos que codifica un polipéptido es capaz de dirigir la transcripción, replicación y/o traducción del polipéptido Se reconocera por aquellos expertos en la técnica que un vector simple opcionalmente incluye secuencias de codificación tanto para hemoglobulina de cadena pesada como ligera de un anticuerpo anti-DR5

Los siguientes ejemplos se establecen adelante para ilustrar los métodos y los resultados de acuerdo con la presente invención, estos ejemplos no pretenden incluir todos los aspectos de la presente invención sino ilustrar los métodos representativos y los resultados Estos ejemplos no pretenden excluir equivalentes y variaciones de la presente invención los cuales son aparentes para un experto en la técnica

Ejemplo 1 Preparacion de antígeno DR5

1 1 Clonación de cADN DR5

La codificación de ADN de la proteína DR5 humana se clonó mediante el siguiente método RT-PCR utilizando

a) Plantilla

El ARN total de células HeLa se extrajo mediante la utilización de reagente TRIzol (GIBCO BRL) La plantilla para la reacción PCR utilizó cADN que se obtuvo utilizando el kit de síntesis de cADN de primer hilo (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con el manual de instrucciones suministrado con el kit

b) cebadores PCR

los siguientes cebadores de oligonucleótido son sintetizados para el PCR

5'gacgatgcccgatctactttaaggg-3' (DR5p1,SEC ID No 1)

5'ccactgggtgatgttggatggg-3' (DR5p1,SEC ID No 2)

A menos que se especifique lo contrario, todos los oligonucleótidos en estos ejemplos son sintetizados por tecnologías de vida Todos los oligonucleótidos son almacenados a -20° despues de haber sido disueltos en agua destilada

c) Reacción PCR

Composición de la solución de reacción PCR

Plantillas cADN 5 µl del total de 33 µl de la reacción
Cebador DR5p1, 10 pmoles,
Cebador DR5p2, 10 pmoles,
Amortiguador PCR concentrado (suministrado con el kit), 10 µl,
DNTPS (cada uno 2,5 mM), 4 µl, y
Polimerasa taq (Promega), 5 unidades

Agua destilada estéril es agregada a la solución hasta un volumen total de 100 µl A menos que se especifique de otra forma, los dNTP son mezclas equimolares de dATP, dCTP, dGTP y dTTP (2,5 mm cada una)

La reacción PCR es conducida como sigue

La solución primero se caliente a 94° C durante dos minutos después de lo cual un ciclo de calentamiento a 94° C durante 30 segundos, 52° C durante un minuto y 72°

C durante tres minutos, es repetido cuarenta veces Después de completar el procedimiento, la solución de reacción es calentada a 72° C durante 10 minutos

Los fragmentos de ADN amplificados, así obtenidos son separados sobre un gel de agarosa al 1% que contiene 0,25 µg/ml de bromuro de etidio Las bandas determinaron el contenido de los fragmentos ADN deseados que son cortados usando una cuchilla de afeitar y el ADN es recuperado de allí usando el kit Gene Clean (BIO101) El fragmento de ADN es clonado usando el kit TA de clonación (in vitrogen, CA) Esto se lleva a cabo como sigue

El fragmento de ADN recuperado de la solución de reacción PCR junto con 50 ng del vector pCR2 1 que es suministrado con el kit TA Cloning, es mezclado con 1 µl de un amortiguador de reacción de ligasa 10 X (6 mM Tris-HCl (pH 7,5), 6 mM de cloruro de magnesio (5 mM de cloruro de sodio, 7 mM de β-mercaptoetanol, 0,1 mM de ATP, 2 mM de DTT, 1, mM de espermidina, y 0,1 mg/ml de albumina de suero bovino), para lo cual 4 unidades de ADN T4 de ligasa (1 µl) se agregaron El volumen total de la mezcla se ajustó a 10 µl con agua desionizada estéril, y

la solución de ligaza resultantes es incubada a 14° C durante 15 horas Después de este tiempo, 2 µl de la solución de reacción de ligasa es agregado a 50 µl de la sepa TOP10F' del E coli competente, que es suministrado con el kit de clonación TA y traído a competencia de acuerdo con el manual de instrucción al cual se agregaron 2 µl de 0,5 m de β-mercaptoetanol, y la mezcla resultante se mantuvo sobre hielo durante 30 minutos, luego a 42° C durante 30 segundos, y nuevamente sobre hielo durante 5 minutos Luego, se agregaron 500 µl de medio que contenía 2% v/v de triptona, 0,5 % p/v de extracto de levadura, 0,05% p/v de cloruro de sodio, 2,5 mM de cloruro de potasio, 1 mM de cloruro de magnesio, y 20 mM de glucosa (de aquí en adelante refiriendose como al medio "SOC") al cultivo y, la mezcla es incubada durante una hora 37° C con agitación Después de este tiempo el cultivo es esparcido sobre una placa de agar L-broth (1% v/v de triptona, 0,5% p/v de extracto de levadura, 0,5% p/v de cloruro de sodio, 0,1% p/v de glucosa, y 0,6% de p/v bacto-agar (Difco)), que contiene 100 µg/ml Las colonias resistentes a la ampicilina que aparecen sobre la placa son seleccionadas y raspadas con un lazo de transferencia de platino, y cultivadas en el medio L-broth que contiene

100 µg/ml de ampicilina a 37° C, durante la noche con agitación a 200 rpm Después de la incubación, las células son cosechadas por centrifugación, a partir de lo cual el plásmido de ADN es preparado por el método álcali Fragmentos de EcoRI-EcoRI DRcADN del plásmido así obtenido es subclonado en el plásmido pcAADN (invitrogen CA) La longitud completa del gen DR5 en pcDAN3 es secuenciado y casado con la secuencia publicada El plásmido así obtenido es designado como el plásmido pcADN 3-DR5

1 2 construcción del vector de expresión DR5-IgG

Para poder obtener una forma soluble del DR5 humano que carece del dominio de transmembrana, un vector de plásmido de expresión es construido Este vector está diseñado para codificar una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular DR5 humano fusionado al ADN IgG 1 Fc humano (41) El ADN que codifica el DR5 humano que carece del dominio de transmembrana es obtenido por la siguiente reacción PCR

a) plantilla

La plantilla para la reacción PCR usada usó el PCR ADN 3-DR5

b) cebadores PCR

los siguientes cebadores de oligonucleotidos son sintetizados por el PCR

5'gacgatgcccgatctactttaaggg-3' (dr5p1 SEC ID No 1),
5'ggatccgtggacacattcgatgtc-3' (DR5p3 SEC ID No 3),

A menos que se especifique lo contrario, todos los oligonucleótidos en estos ejemplos son sintetizados por tecnologías de vida Todos los oligonucleótidos son almacenados a -20° C después de haber sido disueltos en agua destilada

c) Reacción PCR

La reaccion PCR es conducida y el ADN amplificado es aislado como en el ejemplo 1 1(c)

El plásmido así obtenido es designado como el plásmido pCR-ΔDR5 El fragmento MamHI-EcoRI que codifica el fragmento Fc humano que es recuperado del pmFas-hIgG1Fc es subclonado en los sitios de multiclonación BamHI y EcoRI del pcADN3 El plásmido así obtenido es designado pcADNFc Más aún, el fragmento BamHI-BaamHI que codifica la región DR5 soluble humano que es recuperado del pCR-ΔDR5 es subclonado en el sitio BamHI del plásmido pcADNFc El plásmido así obtenido es designado o nombrado como el plásmido pcADNΔDR5-Fc El fragmento EcoRI que codifica la región IgG Fc humana del DR5 soluble humano que es recuperado del plásmido pcADNΔDR5-Fc es despuntada en el extremo usando el fragmento Klenow de polimerasa de ADN (GIBCO BRL) y luego subclonado en el vector de lanzamiento pAdCMV5 (Quantum Biotechnologies Inc , Canada) que es despuntado en ele extremo después de ser cortado por el BamHI El plásmido así obtenido es nombrado pAdΔDR5-Fc

1 3 Expresion y purificación de la proteína de fusión DR5-IgG1 humana

Las células QBI-293A (provistas con el kit adenoquest son co-transfectadas con el ADN pAdΔDR5-Fc y QBI-viral (suministrado con el kit ADENOQUEST) usando el kit ADENOQUEST (Quantum Biotechnologies Inc , Canadá) de acuerdo con el manual de instrucción Las placas de virus recombinante son cultivadas y tamziadas para la expresión de la proteína de fusion DR5-IgG por el análisis ELISA del sobrenadante Las placas positivas son amplificadas en células QBI-293A y almacenadas a -80° C como material de partida de virus 50 platos (150 mm) de células QBI-293A son transfectadas con el virus recombinante pAΔDR5-Fc en 10 m o i (multiplicidad de infección) El medio de cultivo es cosechado después de la transfección durante 48 horas

Las células transfectadas que tienen el gen DR5-IgG se hacen crecer a una densidad de célula de 1 X 10^6 células/ml por medio de incubación en 500 ml del medio DMEM (GIBCO), que contiene 10% v/v FCS a 37° C en una atmósfera de 5% v/v de CO_2 durante dos días El cultivo es entonces centrifugado (1 000 rpm, 5 minutos) y el sobrenadante recolectado La purificación del DR5-IgG a partir del sobrenadante se logra usando la cromatografía

de afinidad de proteína A-Sefarosa CL-4B (Pharmacia) bajo las condiciones siguientes

Columna proteína A-Sefarosa columna CL-4B (tamaño de columna 2 ml, Pharmacia),

Amortiguador de elusión 0,1 de glicina (pH 2,4) 0,15 M de NaCl,

Amortiguador de neutralización 1M de Tris-HCl (pH 8,5)

Después de que todo el sobrenadante es aplicado a la columna, este es lavado tres veces con 20 ml de PBS y luego 1 ml de amortiguador de elusión es agregado 10 veces La densidad óptica de cada fracción eluida (1 ml) se mide La segunda fracción hasta la fracción 50 (con $OD_{280} \geq 0,1$) son recolectadas y después de la adicion de 100 µl del amortiguador de neutralización, los eluatos son colocados separadamente en tuberías de diálisis, y los eluatos dialisados contra un litro de PBS (pH 7,5) a 4° C el amortiguador de diálisis es cambiado dos veces

Los eluatos son entonces ensayados en cuando a la expresión del producto de gen DR5-IgG por ELISA Lo primero, 100 µl de cada fracción son colocados separadamente en pozos de una microplaca de 96 pozos (Costar) e incubada a 37° C durante una hora Después de este tiempo, la solución en los pozos es removida, y la placa es lavada tres veces con 100 µl/por pozo de PBS que contiene 0,1% v/v de Tween 20 (nombrado de aquí en adelante como PBS-Tween) Después de lavado, el PBS que contiene 2% de p/v de albúmina de suero de bovino (nombrado de aquí en adelante como "BSA") es agregado en cantidades de 100 µl/pozo, y la placa es entonces incubada a 37° C durante una hora Después de este tiempo, los pozos son lavados tres veces adicionales con 100 µl/pozo de PBS-Tween, después de lo cual 100 µl/pozo de una solución de anticuerpo monoclonal IgG1 antihumano diluido 1000 veces con PBS-Tween es agregado a pozo, y la placa es nuevamente incubada 37° C durante una hora Los pozos son entonces lavados tres veces con 100 µl/pozo de PBS-Tween 3,3', 5,5'-tetrametil-bencidina (nombrada de aquí en delante como "TMB") un sistema de sustrato líquido (Sigma) es entonces agregado en una cantidad de 100 µl/pozo y la placa se le permite permanecer a

temperatura ambiente durante 65 minutos y luego la reacción es detenida agregado 100 µl/pozo de 0,2 N de H_2SO_1 La absorbancia de cada pozo es leída a 450 nm para estimar la concentración del anticuerpo de frontera, usando la absorbancia en 650 nm como la lectura de control La absorbancia es medida usando el lector de microplaca (Molecular Devices) La producción de DR5-IgG1 es confirmada usando este método ELISA El peso molecular de la proteína de fusión DR5-IgG1 expresada es determinada usando el análisis Western bBlotting en el cual el IgG1 mAb antihumano (Sigma) es usado para detectar el anticuerpo sobre el gel El peso molecular de la proteína de fusión DR5-IgG1 expresada tiene un peso molecular aproximado de 50 kDa La pureza lograda es mayor al 90% como se evaluó por el analisis sobre SDS-PAGE y la detección de la proteína por el manchado azul Coomasie

EJEMPLO 2 Generación de anticuerpos monoclonales el DR5 humano

2 1 Inmunizacion

Un ratón balb/c hembra (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) de 6 a 8 semanas de edad son inmunizados con la proteína de fusión DR5/hIgG1 humana purificada por afinidad Para la inmunización inicial de la almohadilla del pie, la proteína de fusión (50 µg es emulsificada en el adyuvante completo Freund (Difco, Detroit, MI) Los ratones son entonces estimulados con cuatro inyecciones de 50 µg de la proteína de fusión administrada sin adyuvante cada día de por medio Tres días después de la última inyección, los linfocitos a partir de los nodos del linfo local son fusionados con células de mieloma NS-1, y los hibridomas son cultivados en el medio F104 suplementado con 10% de suero de becerro fetal Los hibridomas positivos son seleccionados pro ELISA en el cual las placas son recubiertas sea con 1 µg/ml de DR5/hIgG/1 o la misma cantidad de Fas/hIgG1 como un control El isotipo de los hibridomas es determinado por ELISA usando un panel de anticuerpos de cabra de isotipo específico Ig de ratón (Southern Biotechnology, Birmingham, Al) Los anticuerpos monoclonales son purificados por cromatografía de afinidad usando el IgG1 de ratón antiráton inmovilizado o la proteína G (Sigma)

2 2 Fusión de Célula

Al tercer días después de la inyección de estímulo, los nodos del linfo local son removidos del ratón y colocados en 10 ml de RPMI libre de suero en medio 1640 (GIBCO BRL) que contiene 50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, y 300 µg/ml de ácido L-glutámico, y rotos por medio de pasar el órgano a traves de la malla (Cell Strainer, Falcon) usando una espátula La suspensión de celulas resultantes centrifugada hasta que se forman pepitas de las células de nodo de linfo local que luego son lavadas dos veces con el medio RPMI libre de suero Las células lavadas son entonces resuspendidas en el medio RPMI libre de suero y contadas

En el intermedio, células NS1 de mieloma (American Type Culture Collectio TIB-18) que se han hechos crecer a una densidad de célula que no excede de 1 x 10^8 células/ml en el medio ASF104 (Ajinomoto, K K) que contiene 10% v/v de FCS (Gibco BRL) ("medio con suero ASF") a 37° C bajo 5% v/V de CO_2, y estos son rotos similarmente, lavados, resuspendidos y contados

Una cantidad de la suspensión de célula NS1 calculada para contener 3 X 107 células es mezclada con una cantidad de la suspensión de célula de vaso calculada para contener 3 X 10^8 células La mezcla resultante centrifugada y el sobrenadante es descartado Las siguientes etapas de la fusión de célula se llevan a cabo manteniendo en todo tiempo el tubo plástico que contiene las pepitas a 37° C en un beaker de agua caliente

Un ml de 50% (p/v) de polietilen glicol 1500 (Boehringer Maanheim) es agregado lentamente al tubo, todas las pepitas mientras se agitan usando la punta de una pipeta Subsecuentemente 1 ml del medio RPMI libre de suero, precalentado a 37° C, es agregado lentamente, en dos porciones, seguido por la adición de 7 ml adicionales del medio RPMI libre de suero La mezcla resultante es entonces centrifugada, el sobrenadante descargado y 10 ml del medio HAT que contiene 10% v/v de FCS son agregados mientras que se agita suavemente con la punta de una pipeta 20 ml adicionales del medio HAT que contiene 10% v/v de FCS es agregado, y la suspensión es dispensada dentro de las microplacas de cultivo de células de 96 pozos a 100 µl/pozo e incubadas a 37° C en un atmósfera

de 5% v/v de CO_2 Después de 7 u 8 días, 100 µl/pozo del medio fresco HAT son usados para reemplazar el medio en cualquiera de los pozos que exhiban un tono amarilloso Las celulas de fusión a partir de estos pozos son clonadas por dilusión limitante como se describe más abajo

2 3 Clonación por dilusión limitante

Timus tomado de ratones BALB/c hembras de 4 a 10 semanas (a partir del Japan SLC, Inc) son removidos y rotos en una malla (Cell Strainer, Falcon) como se describió anteriormente, y las células rotas son lavadas dos veces con un medio de HT que contiene un 10% de v/v de FCS Una cantidad de las células de los timos correspondientes a aquellas a partir de un ratón es suspendida en 30 ml de medio HT que contiene 10% v/v de FCS para producir una suspensión de célula alimentadora La preparación de célula de fusión obtenida anteriormente en el ejemplo 2 2 es diluida con la suspensión de célula alimentadora de 10 a 100 veces y diluida adicionalmente seriadamente con la suspensión de célula alimentadora para hacer suspensiones que tienen densidades de células

de fusión de 5,1 a 0,5 células/ml Las muestras así preparadas son dispensadas en pozos de una de las microplacas de cultivo de células de 96 pozos a 100 µl/pozo e incubadas durante 5 días a 37° C bajo 5% v/v de CO_2

2 4 Tamizado

Los sobrenadantes del cultivo a partir de los hibridomas de crecimiento son tamizados por ELISA usando placas recubiertas sea con 1 µg/ml de DR5/hJgG1 o la misma cantidad de Fas/hIgG1 (41) como control Los anticuerpos de frontera son detectados usando peroxidasa de rabano (inmunoglobulinas antiratón conjugadas (HRP) (Southern Biotechnology Birmingham, AL) con TMB (Sigma St Louis, MI) como sustrato El DR5-IgG1 purificado a una concentración de 1 µg/ml o la misma cantidad de Fas-hIgG1 son introducidas en un pozo de los 96 pozos de ELISA/RIA STRIP PLATE (Costar, MY) La placa es mantenida quieta a 4° C durante la noche para permitir la adsorción de la proteína en la superficie del pozo Después de este tiempo, la solución en los pozos es descartada y cada pozo es lavado 3 veces con PBS-Tween Entonces, 100 µl de

PBS que contiene 1% (p/v) de albúmina de suero bovino (A3803, Sigma Chemical Co) es agregada a cada pozo y la placa es incubada a 37° C durante una hora Los pozos son entonces lavados tres veces adicionales con PBS-Tween y luego 50 µl de cada uno de los sobrenadantes de cultivo a partir hibridomas de crecimiento es agregado a cada pozo La placa es entonces incubada a 37° C durante 1 hora, y los pozos son nuevamente lavados cuatro veces con PBS-Tween Después del lavado 50 µl de peroxidasa de rabano marcada con anticuerpo de inmunoglobulina antiratón de cabra (Southern Biotechnology Birmingham, AL), diluida mil veces con PBS, es agregada por pozo, y la placa es nuevamente incubada a 37° C durante 1 hora, despues de lo cual los pozos son lavados cuatro veces con PBS-Tween 3,3', 5,5'-tetrametil-benzidina (TMB) como sistema de sustrato liquido (Sigma) es entonces agregado en una cantidad de 100µl/pozo y la placa se le permite permanecer a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego la reacción es detenida agregando 100 µl/pozo de H_2SO al 0,2 N La absorbancia de cada pozo a 450 nm (control 650 nm) es medida usando un lector de microplaca (Molecular Devices) y las células de fusión son seleccionadas a partir de la muestra que tenía la

absorbancia (450 nm-650 nm, valores OD, >0,5) claramente mayor que aquellos a los cuales ningún sobrenadante de células de fusión había sido agregado (valores OD, aproximadamente 0,03) Adicionalmente, los sobrenadantes de cultivo a partir de hibridomas de cultivo a partir de hibridomas de crecimiento son también tamizados funcionalmente midiendo la actividad inductora de apoptosis usando las células Jurkat 50 µl del medio RPMI que contiene las células Jurkat (1000 células por pozo) y 5 uM de Bisindolilmaleimida VIII (BisVIII, Alexis, San Diego, CA) son agregadas a las placas de 96 pozos en la presencia de 50 µl de los sobrenadantes de cultivo a partir de los hibridomas de crecimiento Las células son cultivadas en una incubadora humidificada a 337° C durante la noche La apoptosis es determinada por la viabilidad de célula usando el kit ATPLite como se instruye por el fabricante (Packard Instruments), y las muestras son contadas usando el TopCounter (Packard Instruments)

2 5 aglomeración ELISA de TRAIL y TRA-8 a los receptores

Las placas ELISA son recubiertas con 2 µg/ml de la proteína de fusión drDR4-Ig o DR5-Ig durante la noche Después de un bloqueo con 3% de BSA, el TRAIL-FLAG soluble o el TRA-8 es agregado en concentraciones indicadas y se incubó a 37° C durante una hora La aglomeración TRAIL o TRA-8 es detectada por el anticuerpo anti-bandera conjugado HRP (Aalexis) o la antimurina IgG1 conjugada HRP (Southern Biotechnology) respectivamente Las reacciones son desarrolladas por el amortiguador de sustrato TMB y medidas por el lector de microplaca Benchmark (Biorad) Los valores Kd son estimados pro el modelo de aglomeración de un sitio de la regresión no lineal usando el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) Para el ELISA competitivo, 100 ng/ml de TRAIL-FLAG es agregado e incubado en la presencia de varias concentraciones de TRA-8 La aglomeración del TRAIL es determinada como se mencionó anteriormente

2 6 clonación

Las etapas descritas en los ejemplos 2 3 y 2 4 anteriores son repetidas cinco veces para las células seleccionadas en 2 4 permitiendo así la selección de varios clones de hibridoma cada uno de los cuales produjo un anticuerpo único que se ligó con el DR5-IgG pero que no se ligó con el Fas-IgG Como resultado de este procedimiento de selección, un hibridoma de ratón-ratón nombrado TRA-8 y que produce un anticuerpo que se liga al DR5-IgG, pero no al Fas-IgG, es obtenido Este hibridoma TRA-8 fue depositado con el American Type Culture Collection en marzo 1, 200, y se le ha asignado el número de acceso PTA-1428

La subclase del anticuerpo producido por el hibridoma ratón-ratón TRA-8 (nombrado de aquí en adelante para simplificar como "TRA-8") demostró ser IgG1, k, después de ensayo con un kit de isotipificación de anticuerpo monoclonal (Pierce)

Usando nuestra proteína de fusión DR5-IgG1 como inmunogen 7 clones de hibridoma son obtenidos por el tamizado ELISA inicial, todos de ellos son altamente

positivos para DR5-IgG pero no para la proteína de fusión Fas-IgG, indicando que los hibridomas obtenidos producen anticuerpos que reconocen la porción extracelular del DR5 pero no de la porción Fc del IgG1 (datos no mostrados)

2 7 Análisis Western Blot

Filtros para el análisis Western Blot de homogenatos de tejido humano normal y de cáncer son comprados en Geno Technology (St Louis, MO) Cada pista es cargada con una cnatidad igual de proteína como se determinó por un anticuerpo anti-β-actina Los coágulos son probados con 1 µg/ml TRA-8 durante al noche, seguido por el IgG1 antiratón de cabra conjugado con HRP (Southern Biotechnology) a temperatura ambiente durante una hora, y desarrollado por quimioluminiscencia

2 8 Inmunoestoquímica in situ

Los tejidos humanos son obtenidos a partir del Tissue Procurement Center de UAB Secciones congeladas son fijadas en 70% de etanol, bloqueadas con 10% de suero de caballo en PBS, y luego incubadas con 10 µg/ml de TRA-

8 purificado por afinidad a temperatura ambiente durante 60 minutos El kit ABC de IgG antiratón con diaminobenzidina (Vector, Burlingame, CA) como el sustrato calorimétrico es usado para visualizar la reactividad

2 9 Análisis de activación de caspasa

Las Células Jurkat (1 X 10^6/ml) son incubadas con 500 ng/ml de TRA-8 Alícuotas (30 µg de proteína del lisado de células son separadas en 15% de SDS-PAGE, secadas en una membrana de nylon, y los secados ason probados con anti-caspasa 8, 9, y 3 anticuerpos (BD Pharmingen, San Diego, CA) seguido por anticuerpo secundario conjugado con HRP y visualización de quimioluminiscencia de los productos segmentados El conjunto inhibidor de caspasa es comprado de R&D Systems (Minneapolis, MN) Cada inhibidor de caspasa es agregado al cultivo en concentraciones indicadas

Ejemplo 3 Purificación del anticuerpo monoclonar TRA-8

El hibridoma ratón-ratón, TRA-8 se hace crecer a una densidad de células de 1 X 10^6 células/ml por incubación en 500 ml del medio ASF, que contiene 10% v/V de FCS, a 37° C bajo 5% de v/v de CO_2 durante 5 días El cultivo es entonces centrifugado (1000 rpm, 5 minutos) y el sobrenadante recolectado La purificación del TRA-8 a partir del sobrenadante es lograda usando la cromatografía de afinidad de proteína G-Sefarosa CL-4B (Pharmacia) bajo las siguientes condiciones

Columna columna de proteína G-Sefarosa CL-4B (tamaño de columna 2 ml, Pharmacia),

Amortiguador de elusión glicina al 0,1 M (pH 2,4), NaCl al 0,15 M,

Amortiguador de neutralización Tris-HCl al 1M (pH 8,5)

Después que todos los sobrenadantes son aplicados a la columna 20 ml de PBS es lavado tres veces y luego el

amortiguador de elusión es agregado en volúmenes de 1 ml durante 10 veces La densidad óptica de cada fracción eluida (1 ml) es medida Las fracciones de la número 12 a la número 5 ($>OD_{280}=0,1$) son recolectadas separadamente

Después de agregar 100 µl de carga de neutralización, los eluatos son colocados en tubería de diálisis separadamente, y los eluatos dializados contra un litro de PBS (pH 7,5) a 4° C El amortiguador de diálisis es cambiado dos veces Esta muestra es ensayada en cuanto a la actividad de anticuerpo anti-DR5 por ELISA usando la proteína de fusión humana DR5-IgG preparada anteriormente usando la técnica descrita anteriormente

Ejemplo 4 Preparación del antígeno DR4, el vector de expresión DR4-IgG y el anticuerpo monoclonal anti-DR4

Los procedimientos de los ejemplos 1 a 3 son repetidos con el cADN de plantilla del DR4 y los cebadores en lugar de aquellos detallados en el ejemplo 1 para obtener el antígeno DR4 que es util_zado como en lso ejemplos 1, 2-3 para obtener un anticuerpo monoclonal especifico contra el DR4

Ejemplo 5 Anticuerpos monoclonales contra DcR1 y DcR2

Los anticuerpos monoclonales son obtenidos contra receptores decoy DcR1 y DcR2 sustituyento el cADN correspondiente y los cebadores para crear los antígenos respectivos como en el ejemplo 1 Los vectores de expresión para DcR1 o las fusiones DcR2 con globulina G inmune que resulta en anticuerpos monoclonales purificados son creados como en el ejemplo 2 y 3

Ejemplo 6 La especificidad de un anticuerpo monoclonal

Como todos de los receptores para TRAIL y otras proteínas de la familia TNFRE comparten homología significativa, la especificidad del anticuerpo TRA-8 ejemplarizante o ilustrativa para el DR5 es determinada por el análisis Western Blot usando dos proteínas de fusión DR5 - IgG humanas diferentes y solubles, formas recombinantes de otras proteínas relacionadas Una primera proteína de fusión DR5-Ig es construida fusionando el cADN a partir de los residuos 1-180 de la

porción extracelular del DR5 y del cADN que codifica la región constante del IgG1 humano El cADN fusionado es clonado en un vector adenoviral recombinante (Quantum Biotechnologies, Inc , Montreal Canadá) La proteína de fusión expresada DR5/hIgG/1, que tenía un peso molecular relativo de 50 kDa es purificada usando una columna de afinidad IgG antihumana (Sigma, St Louis, MO) Para el análisis Western Blot de la especificidad, una segunda proteína de fusión DR5/IgG1 humana recombinante (aa 52-512), lo mismo que las proteínas de fusion TRAIL-R1, R3 y R4, son compradas de Alexis Las formas solubles del Fas humano y el TNFR1 son suministradas amablemente por el doctor Carl Edwards de Amgen Inc , Thousands Oaks, CA, USA Las moléculas DR4, DcR1, DcR2, TNFR1, R4 y Fas humanas recombinantes solubles usadas son proteínas de fusión IgG humanas 5 µg de cada proteína es separada por 10% de SDS-PAGE y secadas sobre membrana de nitrocelulosa Los secados son bloqueados con 5% de leche seca en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora y probados con 1 µg/ml de anticuerpo anti-DR5 monoclonal purificado (clon TRA-8) o 0,1 µg/ml de IgG antihumano de cabra conjugado con HRP a 4° C durante la noche Peroxidasa de rabano IgG anti-ratón de cabra conjugado

con HRP es usada como anticuerpo secundario para detectar los límites del TRA-8 Los secados son desarrollados por quimioluminiscencia

Células Cos-7 transfectadas con el vector pcADN3 (Clontech, Palo Alto, CA) que contiene la longitud completa de DR5 o DR4 o el vector vacío son usados para el análisis de densitometría de flujo El cADN con longitud completa que codifica el TRAIL humano o el ligando de murina Fas es clonado en el vector pTRE aguas abajo del promotor controlable de tetraciclina (Clontech) Los fragmentos XhoI-HindIII de pTRE-hTRAIL o pTRE-mFasL so clonados adicionalmente en el vector de lanzamiento adenoviral pAdBN (Quantum Biotechnologies, Inc) Las 293 celulas anfitrionas son cotransfectadas con el pAd-TRE-hTRAIL linealizado o pAd-TREmFasL y el fragmento grande de ADN de adenovirus La expresión del TRAIL humano funcional o el ligando de murina Fas a partir de las placas de virus recombinante son tamizadas usando un ensayo ^{51}Cr-liberación con Jurkat como objetivos

El TRA-8 reaccíono fuertemente con la proteína de fusión DR5-IgG (aproximadamente 50 kDa), la cual es usada

para la inmunización como se muestra en la figura 1a, DR5, #1, y débilmente con la segunda proteína de fusión DR5-IgG (aproximadamente 60 kD) como se muestra en la figura 1a, DR5, #2 No hay un ligado significativo de los TRA-8 a DR4, DcR1, DcR2, Fas (CD95) o TNFRI Estos resultados indican que el TRA-8 reconoce los epítopes que son específicos para el DR5 pero no compartidos por otros miembros de la familia

El TRA-8 no reacciona con otros miembros de la superfamilia del receptor tnf, tal como el Fas (CD95) y el receptor I del, TNF, tampoco el TRA-8 reacciona de manera cruzada con el homólogo de murina del DR5 como se muestra por las proporciones de absorbancia óptica para 450 nm y 650 nm, en donde los números de panel inferior 1 a 7 (figura 1a, la columna 8 del panel inferior) El TRAIL soluble y el TRA-8 se ligan comparablemente al DR5 inmovilizado (figura 1B, panel izquierdo) En contraste, el TRAIL se liga al DR4, pero el TRA-8 no exhibe ninguna actividad de ligado al DR4 (figura 1B, panel del medio) Los valores kd para el ligado del TRAIL y el TRA-8 al DR5 son estimados en 59 nm y 3 nm, respectivamente De manera importante, el TRA-8 compite eficientemente con el TRAIL en cuanto a ligar al DR5 pero no en cuanto a ligar el

DR4, como se muestra en el ELISA competitivo, (figura 1b, panel derecho) Estos resultados establecen la especificidad del TRA-8 para el DR5 humano

El TRA-8 es capaz de detectar la expresión de superficie de célula del DR5, con análisis citométrico de flujo indicando el ligado específico a la superficie de célula de la célula Cos-7 transfectadas con el DR5 humano de longitud completa, pero no las células de Cos-7 transfectadas con el DR4 o con un vector vacío (figura 1c) Similarmente, la inmunohistoquímica in situ con el TRA-8 demostró la reactividad con las células Cos-7 transfectadas con el ADN del DR5 de longitud completa pero no con aquellas transfectadas con el vector de control (figura 1d) El TRA-8 no induce apoptosis de células Cos-7 no transfectadas, y RT-PCR de ARN de las células Cos-7 usando cebadores variados que codifican el DR5 humano mostraron que no son productos específicos PCR El análisis funcional adicional usando células Jurkat humanas como objetivos mostró que, en la ausencia de reticulación el TRA-8 induce fuertemente la muerte celular demostró por tres diferentes ensayos para viabilidad de célula que incluye el ATPLite, MTT y la exclusión PI (figura 1e) Mayor a 50% de células Jurkat

son eliminadas muertas por niveles de nanogramo de TRA-8 como se muestra en el ensayo ATPLite La actividad de matar del TRA-8 es especifica para el DR5 a medida que este puede ser bloqueado por el DR5-Ig pero no por la proteina de fusión DR4 Ig (datos no mostrados) La segmentación de las capasas 8, 9, y 3 podrian ser detectadas por análisis Western Blot tan tempranamente como 30 minutos después del tratamiento con TRA-8 de las células Jurkat (figura 1f), y la muerte celular de las células Jurkat es completamente inhibida por el inhibidor de caspasa general (Z-VAD) (Figura 1g) Los inhibidores de caspasa individuales para la caspasa 8,3,9, y 10 inhiben parcialmente la muerte celular, indicando que la muerte celular mediada por TRA-8 se hace principalmente por medio de un mecanismo apotótico dependiente de caspasa

Ejemplo 7 Análisis citométrico de flujo de la expresión de la superficie de célula del DR5 un receptor de muerte mayor sobre muchas células tumorales pero no sobre células normales

La habilidad del TRA-8 para ligar el DR5 expresados sobre la superficie celular y la especificidad de esta

reacción es entonces accesada usando el Cos-7 (American Type Culture Collection No CRL-1651) células transfectadas con el vector de expresión que contiene el cADN del DR5 humano de longitud completa o del DR4 o un vector vacío como control El IgG1 anti-ratón conjugado con ficoeritrina (PE) (Pharmingen) es usado como segundo anticuerpo para detectar el ligado del TRA-8 La fluorescencia de 1 x 10^4 células es medida, usando un citómetro de flujo (FACSVantage) bajo las siguientes condiciones

Longitud de onda de excitación 488 nm,

Longitud de onda de detección 60 nm

El análisis citométrico de flujo mostró que el TRA-8 marcó aproximadamente 30% de las célula Cos-7 transfectadas con el vector DR5 como se muestra en el histograma sólido de la figura 1c este porcentaje es paralelo a la eficiencia de transfección como se determinó pro el análisis de transfección usando la proteína de fluorescencia verde (GFO) (datos no mostrados) El TRA-8 no marco significativamente las célula transfectadas ni con el DR4 (el histograma abierto) o el vector de control (histograma en línea

punteada), indicando que el TRA-8 es específico para el DR5 de superficie celular

Aunque la expresión del DR5 en células de tumor ha sido estudiado extensivamente en el nivel mRNA (Rieger J Et al 1 FEBS Lett 1998 Mayo 1, 427(1) 124-8, la expresión de superficie del DR5 no e bien entendida Gibson S B et al 1 Mol Cell Biol 200 enero, 20(1)205-12, Kim K Et al 1 Clin Cancer Res 2000 Feb, 6(2) 335-46 Así, la disponibilidad del anticuerpo anti DR5 monoclonal nos permite examinar los niveles de superficie del DR5, y correlacionar la expresión con la susceptibilidad de las células a la apoptosis mediada por TRAIL El panel siguiente de célula (1 x 10^6) es incubado con 10 µg/ml de TRA-8 purificado pro afinidad a temperatura ambiente durante 30 minutos, y entonces se marcó con el IgG1 anti-ratón conjugado con PE (Parmingen) durante otros 30 minutos 10 000 células viables son analizadas usando el citómetro de flujo FASCVantage bajo las siguientes condiciones

Longitud de onda de excitacion 488 nm,

Longitud de onda de detección 600 nm

Las cinco líneas de célula hematopoyéticas ensayadas son Jurkat, CEM-6, Molt-4, H-9 y U937 La expresión DR5 es detectable sobre la superficie de Jurkat, CEM-6, H-9 y U937 pero es casi indetectable sobre las células Molt-4 como se muestra en las figuras 2a y 2a' Aunque altos niveles de la expresión del ARN del DR5 han sido descritos previamente (43), el análisis Fas indicó que estas células no expresan altos niveles de la superficie DR5 Estos resultados indican que la expresión de superficie celular de DR5 no se correlaciona con la expresión transcripcional del DR5, lo que no es esperado para tal receptor El nivel de expresión de superficie celular del DR5 puede ser específico en la línea de células ya que la mayoría de las células de origen hematopoyético expresaron bajos niveles mientras que la mayoria de células de glioma y próstata expresaron altos niveles de DR5

El anticuerpo monoclonal TRA-8 es usado para determinar el papel del DR5 en la inducción de la apoptosis mediada con TRAIL examinando su expresión de superficie de célula entre un panel de diferentes tipos de célula de tumor humano lo mismo que la susceptibilidad

de estas células hacia tanto el TRAIL y la apoptosis mediada pro TRA-8 Las células T de sangre periferal primaria no expresaron niveles significativos de DR5 en superficie de célula y son resistentes tanto a la apoptosis mediada por TRAIL y TRA-8 (figuras 2a, 2a', y 3a') Aunque todas las cinco de las líneas de célula de leucemia T humana ensayadas expresaron niveles relativamente bajos de albeti detectable de superficie de células DR5, dos de ellos (Jurkat y CEM-6) son altamente susceptibles tanto a la apoptosis mediada por TRAIL y la mediada por TRA-8, indicando que el DR5 solo es suficiente para inducir la apoptosis de estas células Las celulas Molt-4 y U937 son parcialmente susceptibles a la apoptosis mediada por TRAIL pero son relativamente resistentes a la apoptosis mediada por TRA-8, sugiriendo que otros receptores TRAIL pueden estar involucrados en la transducción de una señal de apoptosis Las células H-9 son resistentes tanto a la apoptosis mediada por TRAIL como la mediada por TRA-8, implicando un bloque mediado por un trayecto intracelular anti apoptosis

El panel células incluidas las líneas de células de glioma maligno humano, Hs683, U251 MG, D37MG, D54MG, U373 MG, CH235 MG, U87 y los astrocitos humanos, que fueron

suministrados por el Doctor Ynacey Gillespie del departamento neuroquirúrgico de la universidad de Alabama en Birmingham Las líneas de células de cáncer de próstata humano, Du154, PC3 y LnCap, fueron suministradas por el doctor William Grizzle del departamento de patología de la universidad de Alabama en Birmingham quienes obtuvieron las líneas celulares del American Type Culture Collection Las líneas de células de leucemia T humana, linfoma de célula B, Jurkat HepG2 (American Type Culture Collection TIB-152) y CCRF-CEM CEM-6 (American Type Culture Collection CCL-119), líneas de celular de monocitos, U937 (American Type Culture Collection CRL-2367), fueron comparadas del American Type Culture Collection Todas las líneas de célula anteriores fueron cultivadas en RPMI 1640 suplementado con 10% de FCS La línea celular astrocitoma humana, 1321N1, fue suministrada amablemente por el Dr Richard Jope del departamento de siquiatría de la Universidad de Alabama en Birmingham, y cultivado en DMEM suplementado con 5% de FCS

El TRAIL humano recombinante soluble, comprado de Alexis Corporation (San Diego, CA), es una proteína de fusion que comprende el dominio extracelular del TRAIL

754

humano (residuos aa 95 a 281) fusionado en el terminal N de FLAG-tag y un péptido de enlace de 8 aminoácidos A diferencia de lo reportado previamente el TRAIL marcado con His, esta preparación de TRAIL sola no indujo una respuesta apoptótica fuerte en las células Jurkat y requiere un anticuerpo anti-FLAG como un reticulador para promover la apoptosis El anticuerpo anti-FLAG fue también comprado de Alexis

Todas de las diez células de glioma maligno humano ensayadas expresaron niveles detectables de DR5 en la superficie celular La mayoría expresó valores o niveles intermedios a altos del DR5 como se muestra en la figura 2b Tres líneas, D-54MG, U373MG y CH235MG expresaron niveles altos de DR5 mientras que seis líneas, Hs-683, U251-MG, D37-MG, U87, SMK1 y 1321N1, expresaron niveles intermedios de DR5 Solamente una línea de células, H-4665 expresó bajos niveles de DR5 Todas las tres líneas de células de cáncer de próstata expresaron altos niveles de DR5 como se muestra en la figura 2c

Similar a las células t primarias normales, las células B primarias no expresaron niveles significativos de DR5 y no surgió una apoptosis después del tratamiento

ni con TRAIL o con TRA-8 (figura 2d) Tres (SKW6 4, ETILBENZIL 3, y Raji) de 4 líneas de células de linfoma B ensayadas expresaron niveles relativamente altos de DR5 y son muy susceptibles tanto a la apoptosis mediada por TRAIL como TRA-8 La cuarta línea de celular Daudi, expresó niveles muy bajos de DR5 casi no susceptibles de la apoptosis mediada por TRAIL o TRA-8 Aunque los astrocitos primarios no expresaron niveles detectables de DR5 en la superficie de células (figura 2b'), todas las cuatro líneas de células de glioma ensayadas expresaron altos niveles de DR5 El nivel más alto de expresión del DR5 sobre células de glioma más que en las células T y B no está acompañado por una susceptibilidad significativamente mayor a la apoptosis mediada por TRAIL o DR5, sugiriendo que el nivel de expresion en superficie de célula del DR5 no necesariamente esta correlacionado con el nivel de apoptosis de células de tumor El RT-PCR, llevado a cabo para determinar los niveles de mensaje del DR4, DR5, y DcR2, detectó un mensaje en todas las celulas ensayadas (tabla 1) Sin embargo, en general, las células normales primarias expresaron niveles relativamente bajos de DR5 comparado con las células de tumor transformadas

Tabla 1 análisis RT-PCR de la expresión del receptor TRAIL*

Células	DR5	DR4	DcR2
Celulas primarias	<0,001	<0,001	0,015
Jurkat	0,10	<0,001	0,21
CEM-6	0,50	0,59	0,25
Molt-4	0,10	<0,001	0,05
H-9	0,73	0,61	0,07
Células primarias B	<0,001	<0,001	0,024
SKW6 4	0,95	0,66	0,45
EB3	0,40	<0,001	0,35
Raji	0,55	0,11	0,45
Daudi	0,73	0,36	0,63
Astrocitos normales	0,05	<0,001	0,12
SH683	0,56	0,96	0,14
U87	0,44	0,56	0,21
D54	1,15	0,46	0,12
1321N1	0,25	0,35	0,05

*ARN total fue aislado de células y el RT-PCR fue llevado a cabo como se describió en metodos Los productos PCR fueron separados en gel de agarosa al 3% y analizados por el sistema de Fluor-S MAX

MultiImager (BioRad) Los valores son presentados como una proporción relativa al β-actin

Ejemplo 8 Inducción de apoptosis in vitro en células malignas

Para determinar si el TRA-8 induce apoptosis en células transformadas in vitro, todas las células de tumor DR5 positivas son examinadas para susceptibilidad a la apoptosis inducida sea por el TRA-8 o el TRAIL

Las células objetivo (1 x 10^3 por pozo) son cultivadas en placas de 96 pozos en la presencia de concentraciones indicadas del TRAIL soluble más el reticulador (Alexis) o el TRA-8 a 37° C durante la noche La viabilidad de las células es determinada usando (1) el kit ATPLite de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Packard Instruments, Meriden, CT), (2) la proliferación de células MTT/kit de viabilidad (Sigma), o (3) el marcado PI de células muertas y analizado por citometría de flujo Al fin del cultivo, las celulas fueron marcadas con 10 µg/ml de PI y celulas negativas PI fueron disparadas como células viables Para el análisis

de núcleos condensados de hepatocitos, las células fueron marcadas con 10 ng/ml de Hoechst 33352 (Molecular Probes) y analizada por citometría de flujo

El anticuerpo TRA-8 es capaz de inducir apoptosis en la mayoría de las líneas de células de glioma humano malignas (9/10, en dos de las tres líneas de células de cáncer de próstata, y en dos de las cuatro líneas de celulas hematopoyéticas positivas DR5 Este no induce apoptosis en la linea de celulas Molt-4, el cual expresó niveles de superficie celular de DR5 casi indetectables Los niveles de susceptibilidad de las celulas para la apoptosis mediada por TRA-8 variaron considerablemente entre las líneas de células

La variabilidad de la susceptibilidad de las células hacia el anticuerpo TRA-8 que indujo apoptosis sugiere que aunque un nivel mínimo de expresión de superficie celular del DR5 es requerida, el nivel de expresión de superficie celular DR5 no es necesariamente determinante principal de la susceptibilidad y otros factores influencian este proceso Aunque todas las celulas de glioma generalmente expresaron niveles significativamente elevados de spf DR5 que hicieron que las células

hematopoyéticas, células de glioma fueran susceptibles a la apoptosis inducida por el TRA-8 no se incrementó proporcionalmente comparado con las células hematopoyéticas La susceptibilidad de cinco de las líneas de células de glioma, D-37MG, D54MG, U373-MG, CH235-MG y 1321N1 a la apoptosis inducida por TRA-8 es alta y es equivalente a su susceptibilidad a la apoptosis mediada por TRAIL como se muestra en la figura 3b Dos de las líneas de célula de glioma H-456 y SMK1 son mucho menos susceptibles a la apoptosis inducida por el TRA-8 En el caso de las células H-456, la expresión de superficie del DR5 es baja, sin embargo, la expresión de superficie del DR5 sobre SMK1 es similar a la mayoría de las líneas de células susceptibles, sugiriendo que otros mecanismos pueden jugar un papel en la determinación de la susceptibilidad a la apoptosis mediada por TRAIL Aunque todas las tres líneas de células de cáncer de próstata expresaron niveles altos de DR5, las células Du145 son las más sensibles a la apoptosis inducida por TRA-8, las células PC3 son parcialmente sensibles mientras que las células LnCAP son completamente resistentes como se muestra en la figura 3c entre las células hematopoyéticas, se encuentra que la Jurkat y ka CEM-6 son muy susceptibles a la apoptosis por TRA-8 como

se muestra en la figura 2a aunque ambas de estas líneas de células se encontró que expresan niveles bajos de DR5 Aunque el DR5 es detectable en células U937, estas células son resistentes a la apoptosis inducida por TRA-8 Similarmente, aunque las células H-9 expresaron niveles detectables de DR5, las células H-9 son resistentes a la apoptosis inducida por TRA-8 Estos resultados implicaron la existencia de mecanismos regulatorios que influencian la apoptosis mediada pro DR5

Los anticuerpos anti-DR5 que ligan la superficie adicionalmente son producidos por procedimientos como los de los ejemplos 1 a 3 Dos anticuerpos anti-DR5 adicionales nombrados TRA-1 y TRA-10 son estudiados junto con el TRA-8 para determinar la habilidad comparativa para inducir apoptosis y por lo tanto actuar como un agonista o contrariamente una apoptosis o consecuentemente una apoptosis mediada por el bloque TRAIL, actuando así como un antagonista Las células Jurkat son usadas como objetivo para determinar la actividad agonista y/o antagonista de los tres anticuerpos anti-DR5 nombrados TRA-1, TRA-8 y TRA-10 Como se muestra en la figura 4, la viabilidad de células

es de alrededor de 90%, 70% y 20% para TRA-10, TRA-1 y TRA-8, respectivamente durante la incubación en la noche con 2,5 µg por ml El TRA-8 indujo una fuerte respuesta apoptóptica en una dosis de manera dependiente mientras que el TRA-1 indujo solamente una respuesta apoptótica moderada y el TRA-10 solamente indujo una respuesta débil El TRA-8 es clasificado como un agonista de anticuerpo anti-DR5 En la figura 4, la viabilidad de las células Jurkat se muestra a medida que una dosis dependiente de la función de apoptosis inducida pro TRAIL El tra-10 bloqueó la apoptosis de las células Jurkat humanas hasta un grado significativo en un estudio de dosis baja de apoptosis inducida por TRAIL Así, el TRA-10 es clasificado como un antagonista del anticuerpo anti-DR5 El TRA-1 es un depósito en la American Type Culture Collection bajo el número de acceso PTA-1741 El TRA-10 similarmente está depositado con el American Type Culture Collection bajo el número de acceso PTA-1742

La susceptibilidad de cinco de las líneas de célula glioma, D-37MG, D54-MG, U373-MG, CH235-MG y 11321N1 a la apoptosis inducida por TRA-8 es equivalente a su susceptibilidad a la apoptosis mediada por TRAIL como se

muestra en la figura 3B, indicando que la apoptosis inducida por TRAIL en estas celulas es mediada principalmente por el DR5 Más aún, dos de las líneas de células de glioma, Hs683 y U251 mg, son resistentes a la apoptosis inducida por TRAIL pero parcialmente sensibles a la apoptosis inducida por TRA-8, indicando que la función de los receptores señuelo en estas células y que el uso del anticuerpo TRA-8 sobrepasó este mecanismo regulatorio En las líneas de células de cáncer de próstata, a pesar de la sensibilidad variante a la apoptosis inducida por el TRA-8, esto está en paralelo con la sensibilidad de las células a apoptosis inducida por TRAIL, nuevamente sugiere que el DR5 juega un papel principal de la apoptosis mediada por TRAIL en las células de cáncer de próstata Entre las células hematopoyéticas, se encuentra que Jurkat y CEM-6 son muy susceptibles a la apoptosis mediada por TRA-8 como a la apoptosis mediada por TRAIL El nivel de apoptosis inducida por el TRA-8 es comparable a aquella inducida por el TRAIL como se muestra en las figuras 2a y 3a' Solamente una de las líneas de células de glioma, U87, y dos líneas de células hematopoyéticas, U937, y Molt-4, exhibieron una sensibilidad a la apoptosis inducida por TRAIL pero fueron menos sensibles o resistentes a la

apoptosis inducida por TRA-8 Una línea de célula, la línea de célula, la línea de célula H-9, expresó niveles detectables de DR5 pero son resistentes a la apoptosis inducida tanto por el TRA-8 como el TRAIL Aunque niveles mínimos de expresión de DR5 son requeridos para la apoptosis inducida por TRA-8, el nivel de expresión DR5 no necesariamente predice la susceptibilidad de las células a la apoptosis mediada por TRA-8, los receptores señuelo juegan un papel en la modulación de la apoptosis mediada por TRAIL en algunas células pero no parece que juega un papel principal en la mayoria de las células ensayadas hasta la fecha, como se anticipó el anticuerpo TRA-8 sobrepasa los efectos de los receptores señuelo, las mutaciones funcionales del receptor DR5 pueden ocurrir en celulas transformadas, y, finalmente, los mecanismos regulatorios intracelulares pueden ser tan importantes o más importantes que los receptores señuelo en definir la susceptibilidad de las celulas a la apoptosis mediada por TRAIL y DR5

Estudios previos han mostrado que el ARN para el DR5 está distribuido ampliamente en tejidos normales Para evaluar la expresión de DR5 en el nivel de proteína, un panel de homogenatos de tejido humano normal (Geno

764

Technology, St Louis MO) es probado con el anticuerpo TRA-8 en el análisis Western Blot Entre 9 tejidos humanos normales, el tejido de cerebro fue débilmente positivo (figura 5A, pista 2) La proteína DR5 no es detectable por la reactividad del TRA-8 en el hígado (pista 1), pulmón (pista 3), riñon (pista 4), vaso (pista 5), testículos (pista 6), ovarios (pista 7), corazón (pista 8), o páncreas (pista 9) En contraste, todos los trece tejidos de cáncer humanos marcados positivamente con TRA-8 (figura 5b), que incluyen cánceres de ovarios (pista 1), pulmón (pista 2), hígado (pista 3), recto (pista 4), cerviz (pista 5), piel (pista 6), testículos (pista 7), tiroides (pista 8), útero (pista 10), estómago (pista 11), laringofaringe (pista 12), y páncreas (pista 13) Más aún, la inmunohistoquímica in situ de los tejidos normales y con cancer con el TRA-8 confirmaron que a parte de unas pocas células clasificadas positivas en el vaso, la expresión DR5 en el pecho normal, pulmones y tejidos de vaso no es detectable (figura 5c) los tejidos de cáncer correspondientes incluyen carcinoma ductal infiltrante de pecho, cáncer de pulmones de célula pequeña y linfoma que reaccionaron positivamente con el TRA-8 (figura 5d) Entre un total de 22 tejidos de cáncer examinados, cinco de seis canceres de pecho, dos e dos

cánceres de la cervız, cuatro de cınco cánceres de hígado, cınco de ocho lımfomas, dos de dos cánceres de pulmón, y dos cánceres de prostata reaccıonaron posıtıvamente con el TRA-8 Estos resultados son consıstentes con aquellos del análısıs de cıtometrıa de flujo e ındıcan que los tejıdos canceroso expresan nıveles altos de la proteína DR5 que la de los tejıdos normales

Ejemplo 9 Actıvıdad tumorıcıdal del TRA-8 ın vıvo

Por varıas razones, muchos agentes que muestran promesas en estudıos ın vıtro no muestran eficacias ın vıvo Por lo tanto es ımportante ensayar la eficacıa del TRA-8 en un modelo anımal ın vıvo Para llevar a cabo esto el anticuerpo DR5 antıhumano del TRA-8 es adminıstrado a ratones que llevan xenoınjertos humanos que expresan la molécula DR5 humana Los ratones usados eran de 6 a 8 semanas de nacıdos, ratones NOD/SCID (Jackson Laboratory), que son ınoculados subcutáneamente con astrocıtoma humano células 1321N1 ($1x10^7$), o ınoculados ıntravenosamente con las célula Jurkat de leucemıa humana (1×10^6) En el día 2 después de la ınoculacıon de tumores, los ratones son ınoculados

intravenosamente con el TRA-8 (100 µg) Cinco días después del tratamiento con TRA-8, el crecimiento del tumor 1321N1 es determinado por el taño y peso de la masa del tumor El crecimiento de las celula Jurkat es determinado por el peso del vaso y el porcentaje de células Jurkat positivas CD3 humanas en el vaso de los animales inoculados Las biopsias de los tejidos de tumor son tomadas y examinadas histológicamente

Tratamientos tempranos con una dosis intravenosa única de 100 µg de TRA-8 en un día después de la inoculación del tumor inhibieron completamente las células 1321N1 de formar un tumor sólido de la figura de (figura 6a) Tratamientos posteriores con tres dosis de 100 µg TRA-8 en una semana después de la inoculación del tumor redujo el peso del tumor cuatro veces o más (figura 6b) La formación de tumor no es visible en animales tratados con TRA-8 en puntos de tiempo tempranos (figura 6C, panel superior) El análisis histológico reveló que el tejido de tumor degeneró dramáticamente en animales tratados con TRA-8 (figura 6c, panel inferior) Similarmente, el tratamiento con TRA-8 inhibió la población del vaso por las células Jurkat como se

demostró por la escarcicidad de las células Jurkat positivas CD3 en el vaso (figura 6d, 6e) El análisis histológico del tumor implantado mostro unas pocas células de tumor detectadas en tejido suave en animales tratados con TRA-8 mientras que los controles mostraron la formación de un tumor sólido que se muestra en la figura 6C en el modelo de células Jurkat, el número de células Jurkat en los vasos de los animales tratado con TRA-8 es menor al 2% comparado con cerca del 10% en el vaso de los animales de control como se demostró por el analisis de citometría de flujo mostrado en la figura 6ª y en la figura 6c del marcado del CD3 in situ

Estos resultados confirman la reciente demostracion de que la administración sistémica de TRAIL recombinante reticulado inhibe el crecimiento de tumor in vivo (13) Estos resultados indican que una dosis única de TRA-8 es altamente efectiva en la eliminación de células de tumor in vivo

Como un anticuerpo antihumano es usado en el modelo de mulina, la toxicidad del tratamiento TRA-8 no pudo ser verificada Sin embargo, el estudio de la administración

del TRAIL in vivo indicó que no hay una toxicidad significativa asociada con este tratamiento (13)

Ejemplo 10 Células sinoviales RA son susceptibles al TRAIL y a la apoptosis inducida pro TRA-8 la mayoría de los estudios del estado de la tecnica de la apoptosis mediada por TRAIL se han enfocado en células malignas La apoptosis mediada por TRAIL de acuerdo con la presente invención es también terapéutica en condiciones autoinmune e inflamatorias tal como el RA

10 1 Análisis citométrico del flujo de la expresión del DR5 en superficie celular en células sinoviales RA

La expresión del DR5 en un panel de ocho células sinoviales cultivadas principalmente de pacientes con RA es comparado con aquellas ocho células sinoviales cultivadas principalmente de pacientes con osteoartritis (referida de aquí en adelante como "OA") Los ocho cultivos de células sinoviales RA primarios humanos (RA-1014, RA-1016, RA1021, RA512, RA-811, RA716, y RA-929 suministrados amablemente por el Dr M Ohtsuki (Saankyo Co Ltd , Tokyo, Japón) y cultivadas en DMEM suplementadas con 10% de FCS, penicilina, Streptomicina y

glutamina Los siete cultivos de células principales de células sinoviales OA son aisladas de los tejidos sinoviales de los pacientes con OA por un metodo de colagenasa estándar y cultivados bajo las mismas condiciones El número de pasaje de las células principales está por debajo de 10 La expresión del DR5 es determinado por el análisis FACs como se describió en el ejemplo 5

Todos los cultivos principales de células RA expresaron altos niveles de DR5 en superficie, y hubo una muy poca variación en los niveles de expresión entre estas células sinoviales aisladas de diferentes pacientes como se muestra en la figura 7a En contraste, la expresión del DR5 en la superficie de la célula sinoviales aisladas de los pacientes OA es muy baja o no detectable como se muestra en la figura 7b Las células sinoviales transformadas por SV-40 se encuentran que expresan altos niveles de DR5 en comparación con aquellas exhibidas por las células RA En contraste, las células de fribroblasto no transformado expresaron bajos niveles de DR5 comparable con aquellos exhibidos por las células OA en la figura 7b

10 2 Susceptibilidad de las células sinoviales RA a la apoptosis mediada por TRA-8 o TRAIL

En general, todas las células sinoviales aisladas de los pacientes RA son susceptibles tanto a la apoptosis inducida por el TRAIL y el anticuerpo anti DR5, y todas las células OA son resistentes a la apoptosis inducida por TRAIL y el anticuerpo anti DR5 como se muestra en las figuras 8a, b Estos estudios indican que los anticuerpos TRA-8 objetivos alteraron las células en referencia a las células normales Más aún, el patrón de susceptibilidad o resistencia a la apoptosis inducida por TRAIL es correlacionado con aquella inducida por el anticuerpo anti DR5 indicando que las células sinoviales principalmente utilizan el DR5 para disparar la apoptosis TRAIL

Como se describió para las células malignas, la susceptibilidad a la apoptosis inducida por el TRAIL o el anticuerpo anti-DR5 varía entre las células sinoviales RA aunque expresan niveles similares de DR5 El RA-512 y el RA-707 son los más susceptibles ya que el 80% de las células son matadas por concentraciones de TRAIL o TRA-8 que están pro debajo de 20 ng/ml Las RA-1014, RA-811,

RA-716 y RA929 están entre aquellas con susceptibilidad intermedia al TRAIL o TRA-8, con cerca de 100% de muerte celular que ocurre en la presencia de concentraciones altas (>50 ng/ml) de TRAIL o TRA-8 En las célula RA-1016 y RA-1021, aunque la mayoría (por encima de 60%) de las células fueron matadas por una dosis baja de TRAIL o TRA-8, una porción de células sobrevivió en la presencia de altas concentraciones de TRAIL o TRA-8 indicando que una subpoblación de células son resistentes a la apoptosis mediada por TRAIL En contraste, todas las células OA son mucho menos susceptibles a la apoptosis inducida por TRAIL y TRA-8 No más del 60% de células son matadas en el OA 52F y OA 69 F aunque en la presencia de altas concentraciones de TRAIL o TRA-8 Las células OA 72M son completamente resistentes a la apoptosis inducida por TRAIL o TRA-8 Las células sinoviales transformadas por SV40 son también susceptibles a la apoptosis inducida por TRAIL y TRA-8, (datos no mostrados) En contraste, las células de fibroblasto no transformado parecen ser resistentes al TRAIL y TRA-8

Se ha mostrado previamente que el DR5 utiliza un trayecto dependiente de FADD/caspasa 8 para dispara la

apoptosis (44) Para determinar la dependencia de caspasa de la apoptosis mediada por DR5 de las células sinoviales RA, las células RA son cultivadas con anticuerpo TRAIL o anti-DR5 en la presencia de inhibidores de caspasa específicos Entre 8 inhibidores de caspasa ensayados, caspasa 6, 8 y 10 son capaces de inhibir la apoptosis de las células sinoviales RA inducidas tanto por TRAIL y DR5 como se muestra en la figura 9, indicando que estas tres caspasas están involucradas en apoptosis mediada por DR5

10 3 TRA-8 o TRAIL inducen la activación NF-kb en las células sinoviales RA sin incrementar la liberación de MMPs

Existe evidencia considerable para soportar el concepto de que hay unos enlaces cercanos entre la señalización de la apoptosis y la señalización de la proliferación (45) Se ha establecido que el DR5 es capaz de activar un camino NF-kb en adición a la transducción de señalización de apoptosis, y que la activación NF-kb debe ser capaz de transducir una señal anti apoptosis Por lo tanto un ensayo de cambio de gel se lleva a cabo Las células son estimuladas con 50 ng/ml de TRAIL soluble recombinante, un ligando Fas en la presencia de 1 mg/ml

de promotor, o 50 ng/ml de TRA-8 durante el tiempo indicado Los extractos nucleares son preparados e incubados con la probeta de oligo ADN marcada por doble marcado [^{32}P] Los resultados son analizados usando el ciclón fosfa-imager (TopCount NXT, Packard Instrument Company, CT) Despues de que las células sinoviales RA son incubadas con TNF-α o TRAIL, el NF-kb es activado de una manera dependiente entre el tiempo El anticuerpo TRA-8 es capaz de activar fuertemente el NF-kb En contraste, el ligando Fas es incapaz de inducir la activación NF-kb como se muestra en la figura 10a

Así, aunque los anticuerpos TRAIL y TRA-8 inducen una fuerte respuesta de apoptosis en células sinoviales RA, ellos también activan el NF-kb y la activación del NF-kb se cree que contribuye al papel proinflamatorio de TNF-α en RA Así, es posible que el TRAIL, como el TNF-α puede servir como una citoquina proinflamatoria Para determinar si existe una consecuencia biológica similar de la activación NF-kb inducida por el TRAIL y TNF-α, la producción de MMPs es determinada pro ELISA Las células sinoviales son cultivadas en un medio solo o con 50 mg/ml de interleuquina 1b, 10 ng/ml de TNF-a, 50 ng/ml de

774

TRAIL o 50 ng/ml de TRA-8 durante la noche Los niveles del MMP-1 y MMP-3 en el cultivo de sobrenadante se determina por los kits ELISA

Cuando las células sinoviales RA son incubadas con la citoquina proinflamatoria, el TNF-α o IL-1b, la produccion de MMP-1, 3, y 13b se incrementa en comparación con el medio de control como se muestra en las figuras 10 b, c en contraste, el tratamiento con los anticuerpos TRAIL o anti-DR5 no está asociado con un incremento de liberación de estas MMP

Ejemplo 11 Falla para inducir la toxicidad hepatocelular

Para los ensayos de viabilidad de celulas durante 24 horas, hepatocitos humanos frescos normales en placas de 96 pozos fueron comprados de In Vitro Technology (Baltimore, MD) Los hepatocitos son cultivados en el medio de cultivo de hepatocitos que contiene 1 µg/ml sea de TRAIL o TRA-8 soluble Durante los ensayos de viabilidad de 6 horas, los hepatocitos normales o las células de cáncer hepatocelular son aislados a partir de

especímenes quirurgicos frescos recolectados del UAB Tissue Procurement Center Todos los reactivos para el aislamiento de hepatocitos humanos incluye los amortiguadores de perfusión de hepatocitos, medios de digestión, medios de lavado y medios de sujeción fueron comprados de Gibco Las placas de tejido son digeridas en el Hepatocyte Digest medium a 37° C con agitación (50 rpm) durante una hora Los hepatocitos aislados son recolectados por centrifugación a baja velocidad (50 g, 3 min), y lavados con el Hepatocyte Washing Medium seis veces La suspensión de células únicas de hepatocito son cultivados en el Attachment Medium que contiene 10% de FCS en placas Matrigel de 96 pozos (BD) durante 6 horas Ninguno de los hepatocitos utilizados son removidos por dos veces lavados con un medio de sujecion precalentado Los hepatocitos ligados son luego incubados adicionalmente con diversas concentraciones de TRAIL o FasL solubles en la presencia de reticuladores, o del TRA-8 o CH11 durante 6 horas

El TRAIL tiene por lo menos dos receptores (DR4 y DR5) que son capaces de inducir apoptosis El TRA-8 es usado para determinar si la reticulación del DR5 sola es suficiente para inducir apoptosis de hepatocitos

normales La expresión DR5 en el nivel de proteína es examinado en cinco tejidos de hígado humano normal y cinco tejidos de cáncer de hígado por la inmunohistoquimica in situ usando TRA-8 Secciones de los tejidos de hígado normal mostraron una arquietectura normal y una morfología de célula sobre el marcado H&E (figura 11a, paneles superiores izquierdos) en la ausencia de reactividad positiva con el TRA-8 para el DR5 (figura 11a, paneles inferiores izquierdos) en contraste, el tejido de carcinoma hepatocelular humano reaccionó positivamente con el TRA-8 en un patrón consistente con ambas la membrana celular y la presencia citoplasmica de DR5 sobre las células cancerosas La línea de células de carcinoma hepatocelular humano HepG2 es también positiva para el DR5 Estos resultados son consistentes entre cinco tejidos de hígado normales, y solamente 1 (adenoma de hígado) de los cinco tejidos de cáncer de hígado es un DR5-negativo Estos resultados son consistentes con los datos Western Blot, mostrados en la figura 5a, que, como con otros tejidos normales, el tejido de hígado humano normal no expresan niveles significativos de la proteína DR5 Más aún, el análisis Western Blot del hepatocito humano normal aislado probado con el TRA-8 no revela niveles detectables de DR5

La expresión en la superficie de la célula del DR5 sobre hepatocitos humanos por el análisis de citometría de flujo demostró que los hepatocitos normales preparados frescamente no expresan niveles detectables de DR5 en la superficie de célula (figura 11b, paneles izquierdos superiores) Ninguno es detectado sobre hepatocitos humanos normales que han sido criopreservados o colocados en cultivos a corto plazo En contraste, las células de carcinoma hepatocelular aisladas frescamente lo mismo que las célula HepG2 expresan DR5 en la superficie celular Usando Fas como una comparación, los hepatocitos normales, las células de carcinoma hepatocelular y las células HepG2 todas expresaron niveles equivalentes de Fas (figura 11b, paneles inferiores) Estos resultados son consistentes con aquellos usando la inmunohistoquímica in situ y el Western Blot indican que el DR5 en la superficie de célula es altamente expresado en células de hígado canceroso pero no en hepatocitos normales La presencia de niveles de mRNA para DR4, DR5, DcR1 y DcR2 en hepatocitos humanos, demostró por RT-PCR[23], y sugiere que los hepatocitos humanos pueden expresar muy bajos niveles de la proteina DR5 que están por debajo del umbral para la deteccion por el TRA-8

Para determinar si el TRA-8 induce toxicidad hepatocelular, la susceptibilidad de los hepatocitos humanos normales a la apoptosis inducida por TRA-8 y por el TRAIL soluble más reticulador es examinado Cuando los hepatocitos normales son cultivados en la presencia de una alta concentración de TRAIL, una disminución dependiente del tiempo en la viabilidad celular es observada por ATPLite (figura 12a) y el ensayo MTT La muerte celular mediada por TRAIL de hepatocitos normales puede ser vista tan tempranamente como cuatro horas después de la adición de TRAIL Al final de un cultivo de 24 horas, más del 80% de los hepatocitos son matados por el TRAIL En contraste, durante el mismo periodo de cultivo, el TRA-8 no indujo una muerte celular significativa en hepatocitos normales El núcleo condensado marcado con Hoechst, una característica de apoptosis, son incrementados en los hepatocitos tratados con TRAIL pero no con TRA-8 (figura 12b) El número de hepatocitos apoptóticos está bien correlacionado con la disminución de la viabilidad celular según se determinó por el ensayo ATPLite, sugiriendo que la muerte celular inducida por TRAIL de los hepatocitos es mediada por apoptosis Esto es confirmado por la habilidad del Z-VAD

para inhibir la toxicidad mediada por TRAIL de los hepatocitos Igual que la cicloheximida es un promotor de apoptosis potente, el efecto de este compuesto en el TRAIL y los hepatocitos tratados con TRA-8 es investigada Durante un cultivo de cuatro horas, la cicloheximida promovió significativamente la muerte celular de hepatocitos inducidos por el TRAIL con mayor de 70% de los hepatocitos muertos por el TRAIL en la presencia de cicloheximida (figura 12c) Sin embargo, el tratamiento con cicloheximida es incapaz de promover la muerte celular mediada por TRA-8 en los hepatocitos Para comparar las características de apoptosis inducida por TRA-8 con aquella inducida por TRAIL en hepatocitos, los hepatocitos normales lo mismo que las células de cancer son incubados con concentraciones variables de TRAIL soluble con reticulador o con TRA-8 Durante un periodo de cultivo de seis horas, el TRAIL indujo una respuesta apoptótica moderada en hepatocitos normales Más del 20% de los hepatocitos fueron muertos en la presencia de 500 ng/ml de TRAIL (figuras 12d, izquierdo superior) El tratamiento con TRA-8 de hepatocitos normales no elisito ninguna muerte celular significativa durante el mismo periodo de tiempo El contraste a los hepatocitos normales, las células de carcinoma hepatocelular

primarias (figura 12d, superior en el medio) y las celulas HepG2 (figura 12d, derecha superior) son altamente susceptibles a la apoptosis mediada tanto por el TRAIL o el TRA-8 Más del 80% de las células de carcinoma hepatocelular y cerca del 100% de las células HepG2 fueron muertas durante el periodo de cultivo de ocho oras Estos resultados indican que los hepatocitos normales son completamente resistentes a la apoptosis mediada por TRA-8 y son mucho menos susceptibles a la apoptosis mediada por TRAIL que lo que son las células de cáncer de hígado Usando el ligando Fas y el anticuerpo anti Fas (CH-11) no hay una diferencia significativa en la susceptibilidad a la apoptosis mediada por Fas entre hepatocitos normales, células de carcinoma hepatocelular, y celulas de HepG2 (figura 12d, paneles inferiores)

Ejemplo comparativo 11B Inducción de hepatitis in vivo por el TRAIL libado a la membrana humana

Ratones B6 hembras de 8 a 10 semanas de nacidas son inyectadas intravenosamente con 10^9 pfu de Ad/h TRAIL con el numero igual Ad/Tet-on Los ratones son alimentados con concentraciones diferentes de tetraciclina en sus bebidas de agua inmediatamente después de la inoculación

de los vectores adenovirales El daño en el hígado es determinado por los niveles de suero de AST usando un kit de diagnóstico AST (Sigma) La expresion del TRAIL se determina por el análisis Northern Blot

Para determinar si la frontera de la membrana del hígado inducido con TRAIL hay un daño in vivo, un vector adenoviral recombinante que codifica el TRAIL humano de longitud completa (Ad/hTRAIL) es construido, la expresión del cual está bajo el control del promotor inducible de tetraciclina 24 horas después de la inoculación intravenosa de ratones B6 con Ad/hTRAIL, la expresión inducida por tetraciclina del TRAIL humano es observada en el hígado en una manera dependiente de dosis según se demostro por el análisis Northern Blot (figura 13a) Los niveles de expresión del TRAIL correlacionaron bien con el daño de hígado según se muestra por un incremento dependiente de tetraciclina en los niveles de suero de transaminasas, nuevamente de una manera dependiente de dosis (figura 13b) A medida que la inoculación con el vector adenoviral per se puede incrementar la susceptibilidad de hepatocitos para la apoptosis mediada por TRAIL, los hepatocitos de los ratones inoculados con Ad/hTRAIL son aislados y ensayados para la muerte celular

mediada por TRAIL No hay un incremento significativo de muerte celular de los hepatocitos infectados con Ad/hTRAIL comparado con aquellos de los ratones de control (figura 13C, panel izquierdo) Más aún, los ratones inoculados con Ad/hTRAIL no exhibieron un incremento en daño de hígado después de la inyección intravenosa del TRAIL humano soluble Así, se sigue que la hepatitis inducida por el Ad/hTRAIL es mediada por niveles altos de expresión de TRAIL en su forma de membrana El análisis histológico de las secciones de hígado reveló que el daño a los hepatocitos es aparente tan tempranamente como 24 horas después de la inoculación del vector (figura 13d), y persistió por lo menos siete días (figura 13e) Estas alteraciones patológicas en el hígado también son dependientes de tetraciclina y ocurrieron de una manera dependiente de la dosis En la fase temprana, dentro de 24 del tratamiento, del daño en el higado inducido por TRAIL se ha caracterizado por 1 foco de necrosis La infiltración de células inflamatorias no es observada en esta etapa, pero ocurrio hemorragia Despues de siete días de inoculación, el daño en higado difuso es aparente con desarreglo lobular marcado, una degeneración severa de hepatocitos con citoplasma irregularmente y espacios claros grandes, y

apoptosis prominente y necrosis Un infiltrado extensivo de células mononucleares es una característica de esta etapa Estos resultados indican que el TRAIL humano en su forma límite de membrana es capaz de inducir daño en el hígado in vivo A pesar de la propensidad del TRAIL humano para causar severa hepatitis en los ratones, este no indujo una respuesta letal En contraste, los ratones inoculados con vectores controlados por tetraciclina similares que codifican el ligando Fas desarrollaron hepatitis fulminante con apoptosis masiva y necrosis de hepatocitos acompañado por una hemorragia severa y por una mortalidad que ocurrió en una dependencia de dosis de tetraciclina dentro de 72 horas de inoculación La velocidad de mortalidad alcanzó el 100% en 48 horas en aquellos subgrupos que recibieron 3 mg/ml o más de tetraciclina En contraste, todos los ratones que recibieron Ad/hTRAIL sin importar la dosis de tetraciclina todavía están vivos cuatro semanas después de la inoculación Así, sigue que, in vivo, la forma de frontera de membrana TRAIL es menos inductora potente de daño hepatocelular que el ligando Fas ellos sugieren adicionalmente que el TRAIL puede inducir daño en el hígado a través de un mecanismo que difiere del mecanismo que subyace en la toxicidad del ligando Fas

Ejemplo 12 Celulas T y b humanas activadas expresan niveles incrementados de DR5

Para determinar si el DR5 juega un papel en la apoptosis mediada por TRAIL de las células T activadas y las células b, la expresión de superficie del DR5 sobre celulas T y B en descanso y activadas usando TRA-8 se examinan Las células T humanas no estimuladas en PBMC no expresaron niveles significativos de DR5 (figura 14) 48 horas después cada anti CD3 o estimulación Con-A, la expresion de DR5 de la superficie celular se incrementó significativamente Similarmente, las células b no estimuladas expresaron muy bajos niveles de DR5 La estimulación anti-μ pero no LPS resultó en una expresión de superficie celular incrementada de DR5 Estos resultados indican que tanto las células T y B expresan niveles altos de DR5 en la superficie celular Las celulas son marcadas con 20 μg/ml de TRA-8 y de IgG1 anti-ratón PE

Ejemplo 13 Las celulas activadas T y B se vuelven susceptibles a la apoptosis mediada por TRA-8

Para determinar si las células T y B activadas son susceptibles a la apoptosis mediada por TRA-8, las células T y B del PBMC humano son estimuladas con anti-CD3 o anti-μ in vitro durante 48 horas, respectivamente Las células viables y las células bast proliferaron son recolectadas por centrifugación de gradiente, e incubadas con diversas concentraciones de TRA-8 Las células T y células B no estimuladas son no susceptibles a la apoptosis mediada por TRA-8 (figura 15) Las células t y las células B estimuladas totales mostraron una susceptibilidad incrementada moderadamente a la apoptosis mediada por TRA-8, con 20% de células muertas por el TRA-8 después de un cultivo durante la noche Las células T blasto que proliferan altamente son aún más susceptibles a la apoptosis mediada por TRA-8 Más del 70% de las células T blasto podrían ser muertas por el TRA-8 Las células B blasto son también más susceptibles a la apoptosis mediada por TRA-8 comparada con otras Estos resultados indican que las células B y T activadas son susceptibles a la apoptosis mediada por DR5

Ejemplo 14 TRA-8 agota las células T activadas en humanos/SCID de ratón

Para determinar la eficacia de la célula anti T in vivo del TRA-8, ratones NOD/SCID son inyectados intravenosamente con 1 x 10^8 de PBMC humano Normalmente, las células T humanas en ratones SCID son activadas rápidamente en respuesta a la estimulación xenogeneica Los ratones SCID/PBMC humano son inyectados intraperitonealmente con 100 µg de TRA-8 o con IgG1 de control a partir del día de transferencia, y se repite diariamente durante tres días Cinco días después de la transferencia, las células mononucleares son aisladas del vaso y marcadas con anticuerpo dCD3 antihumano, y la población de linfocitos es disparada por análisis citométrico de flujo, y las células T humanas positivas CD3 son analizadas Aproximadamente 30% de los linfocitos del vaso son células T humanas según se determinó por el marcado CD3 antihumano en los ratones tratados de control Sin embargo, solamente unas pocas células T humanas (menos del 3%) son observadas entre los linfocitos de vaso en los ratones tratados con TRA-8 (figura 16) El estudio histológico in situ reveló que en

787

el vaso del ratón de control, las células T humanas son repopuladas en el vaso con solamente unas pocas células apoptóticas observadas como se demostró por el marcado TUNEL En contraste, la repoblación con las células T humanas viables no se observa en el vaso del ratón tratado con TRA-8, en su lugar muchas células apoptóticas son observadas (figura 17) Estos resultados demuestran que el TRA-8 tiene una actividad anti célula T in vivo, e indica la utilidad de los anticuerpos de la invención para el tratamiento de enfermedades GVH

Ejemplo 15 Actividad terapéutica anticáncer del TRA-8

15 1 Expresión del DR5 y función en los tejidos de cáncer humano y líneas de células

1) expresión de DR5 en tejidos de cáncer humano por el marcado in situ con TRA-8 Para determinar si las células cancerosas y los tejidos cancerosos expresan diferencialmente niveles mayores de DR5, un panel de tejidos de cáncer humano que incluye cerca de 20 cánceres de pecho, seis cánceres de ovarios, cinco

cánceres de colon y cinco cánceres de próstata son marcados con TRA-8 para su inmunohistoquímica La mayoría de estos tejidos de cáncer expresados DR5 detectables Los niveles de expresión de DR5 en estos tejidos cancerosos varían En general, los tejidos de cáncer que expresan altos niveles de DR5 son tejidos que expresan niveles mayores de DR5 que los tejidos no involucrados En adición, la expresión de DR5 es aparentemente no correlacionada con la mutación de p53

ii) la expresión de DR5 y función en líneas de células de cáncer humano (tabla 2) Nueve líneas de célula de cáncer de pecho humano, tres líneas de cáncer de ovario, tres líneas de cancer de colon y tres líneas de cáncer de próstata son examinadas en cuanto a la expresión en la superficie celular del DR5 y la susceptibilidad a la apoptosis inducida por TRA-8 in vitro Siete de las nueve líneas de cáncer de pecho, tres de las tres líneas de cáncer de ovario, tres de las tres líneas de cáncer de colon y tres de las tres líneas de

cáncer de próstata expresaron niveles variables de DR5 en la superficie de la célula De las nueve líneas de cáncer de pecho, tres son muy susceptibles, tres son intermedias y tres son resistentes a la apoptosis mediada por TRA-8 Todas las tres líneas de cancer de ovario son muy susceptibles Una de las tres líneas de cáncer de colon es muy susceptible, mientras que las otras dos tienen una sensibilidad intermedia Dos de las tres líneas de cáncer de próstata tienen sensibilidad intermedia y una es resistente

Tabla 2 Expresión y funsion del DR5 en células de cáncer del ser humano

Línea de célula	Origen	Expresión[1]	Susceptibilidad[2]
2LMP	Pecho	+	++++
LCC6	Pecho	+++	++++
MB468	Pecho	+++	+++
MB231	Pecho	++	+++
ZR-75-1	Pecho	+++	++
SKBR3	Pecho	+	++
MB453	Pecho	++	+
BT474	Pecho	+	-
DY36T2	Pecho	-	-
Caov-3	Ovario	+	++++
OVCAR-3	Ovario	++	++++
Skov-3	Ovario	+	+++
WiDR	Colon	+++	++++
HST29	Colon	++	+++
T84	Colon	+	++
PC3	Próstata	+++	++
LnCap	Próstata	+++	+
Du-145	Próstata	+++	+

Nota [1] determinado por citometria de flujo, las celulas son marcadas con 20 µg/ml de TRA-8 y comparadas con el anticuerpo de control [2] determinado por el ensayo

ATPLite ++++ por encima de 80% de muerte, +++ muerte entre 60 a 80%, ++ muertes entre 40 y 60%, + muerte entre do y 40%, - ninguna muerte

iii) citotoxicidad combinada dl TRA-8 con adriamicina En diversas líneas de cáncer de pecho, el efecto de la adriamicina sobre la apoptosis inducida por TRA-8 es examinada Las altas dosis de adriamicina exhibieron un efecto aditivo Sin embargo, en algunas de las líneas resistentes al TRA-8 bajas dosis de adriamicina mejoró de manera sinérgica la apoptosis inducida por el TRA-8

iv) actividad de ligado o de aglomerado in vitro e in vivo del TRA-8 a las células de cáncer humano Usando el radio isótopo marcado TRA-8 La actividad de aglomerado del TRA-8 a la línea de cáncer de pecho es examinada in vitro e in vivo en ratones SCID implantados con un tumor La actividad de aglomeración in vitro a las células de cáncer es estimada como un valor kd de tres nm, que es constante con nuestra destinación anterior usando ELISA, y por lo

menos cincuenta veces mayor que el TRAIL soluble In vivo, el TRA-8 localizó para la implantación de tejidos de tumor

15 2 Terapia de leucemia linfolítica crónica en ratones NOD/SCID con TRA-8

La leucemia linfolítica crónica (CLL) es una forma común de malignidad de células B La mayoría de las células malignas B en CLL son del fenotipo maduro y son resistentes a muchos estímulos de apoptosis La expresión de DR5 y la función en las células B de 5 pacientes con CLL es examinada Todos los pacientes tenían cuentas altas de celulas B periféricas como se muestra por más del 95% de CD19+ células B en PBMC Comparado con las células B primarias normales, las células B CLL de todos los pacientes tenian niveles mayores DR5 en la superficie de la célula y eran más susceptibles a la apoptosis inducida por TRA-8 in vitro De manera muy interesante, las células B CLL tambien eran sensibles a la bisindolemaleimida VIII (BisVIII) y la citotoxicidad inducida Siguiendo con tratamiento combinado con TRA-8 y BisVIII, cerca del 50% de las celulas B CLL son matadas

mientras que las células B normales permanecen sin respuesta (figura 18) La transferencia de las células B CLL en ratones NOD/SCID resultó en cerca de 25% a 30% de célula CD19+B repobladas en el paso del ratón receptor a cinco días después de la transferencia Sin embargo, tres dosis de 100 µg de tratamiento con TRA-8 eliminó completamente las células B CLL de 4 de los cinco pacientes en el vaso del ratón receptor SCID Así, el TRA-8 solo o en concierto con otros sustancia es activo como un agente terapéutico para la leucemia linfolítica crónica

Ejemplo 16 Clonación de cADN

(1) Determinación de las secuencias de aminoácido de terminal N de las cadenas pesadas y livianas del TRA-8

Para poder obtener cADN de las cadenas pesadas y liviana del TRA-8 las secuencias de aminoacido de termina N de las cadenas livianas y pesadas del TRA-8 y los genes clonados TRA-8 son determinados por técnicas conocidas

Diez µg de la solución que contiene el TRA-8 del anticuerpo del DR5 antihumano es sometido a una electroforesis de SDS-poliacrilamida ("SDS-PAGE"), usando una concentración de gel de 12% p/v, 100 V de voltaje constante, durante 120 minutos Despues de la electroforesis, el gel es sumergido en un amortiguador de transferencia de 25 mm tris-HCl (pH 9,5), 20% de metanol, 0,02% v/v de SDS durante cinco minutos Después de este tiempo, el contenido de proteína del gel es transferido a una membrana de difluoruro de polivilideno ("PVDF membrana"), tamaño de poro 0,45 µm, Millipore, Japón), prehumedecido en el amortiguador de transferencia usando un aparato de secado (KS-8451, Marysol) bajo condiciones de un voltaje constante de 10 V, 4° C, durante 14 horas

Después de este tiempo, la membrana de PVDF es lavada con el amortiguador de lavado al 25 mM de NaCl, 10 mM de amortiguador de borato de sodio (pH 8,0), luego se marcó en una solución de marcado (50% v/v de metanol, 20% v/v de ácido acético y 0,05% p/v de azul brillante Coomassie) durante cinco minutos para localizar las bandas de proteína La membrana de PDVF es entonces desmanchada con 90% de v/v de metanol acuoso, y las

bandas correspondientes a la cadena pesada, la banda con la menor movilidad y la cadena liviana, la banda con la mayor movilidad previamente localizada sobre la membrana PDVF son cortadas y lavadas con agua desionizada

La secuencia de aminoácido de terminal N de las cadenas pesada uy liviana se determinan por el método automatizado Edman (Edman, P , et al , (1967), Eur J Biochem , 1, 80) usando un secuenciador de proteínas de secuencia de gas (PPSQ-10, Shimadzu Seisakusyo, K K)

La secuencia de aminoácido de terminal N de la banda correspondiente a la cadena pesada se determinó que era

Glu-Val-Met-Leu-Val-Glu-Ser-Gly-Gly-Gly-Leu-Val-Lys-Pro-Gly-Gly-Ser-Leu-Lys-Leu (SEC ID No 4 de la sita de secuencias),

Y aquella de la banda correspondiente a la cadena liviana se determinó que era Asp-Ile-Val-Met-Thr-Gln-Ser-His-Lys-Phe-Met-Ser-Thr-Ser-Val-Glylasp-Arg-Val-Ser (SEC ID No 5 de la lista de secuencias)

La comparación de estas secuencias de aminoácidos con las bases de datos de secuencias de aminoácidos de anticuerpos producidos por Kabat et al (Kabat E A , et al , (1991), en "Sequences of Proteins of Immunological Interest Vol II", departamento de salud y servicios humanos de los Estados Unidos) reveló que la cadena pesada (cadena γ1 y la cadena liviana (cadena K) del TRA-8 pertenecían a los subtipos 3d y 1, respectivamente

(2) clonación del cADN

Con base en los hallazgos anteriores, los cebadores de oligonucleótido son sintetizados los cuales se esperaría que hibridizan con porciones de las regiones no traducidas 5' y los muy extremos de las regiones traducidas 3' de los genes que pertenecen a estos subtipos de ratón Entonces, los cADN que codifican las cadenas pesada y liviana del TRA-8 son clonados por la siguiente combinacion de transcripción inversa y PCR (RT-PCR)

a) plantilla

El hibridoma de TRA-8 del ARN total (ATCC No PTA-1428) es extraído por medio de usar un reactivo de TRIzol (GIBCO BRL) La plantilla para la reaccion PCR usó cADN que es obtenido usando el kit de síntesis del primer hilo de cADN (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con el manual de instruccion suministrado con el kit

b) cebadores PCR

Los siguientes cebadores de oligonucleótido son sintetizados por el PCR

5'-cagcactgaa cacggacccc-3' (H5NCS1 SEC ID No 6 de la lista de secuencias),

5'-aaaggtaatt tattgagaag-3' (H5NCS2 SEC ID No 7 de la lista de secuencias),

5'-cctcaccatg aacttcgggc-3' (H5SS2 SEC ID No 8 de la lista de secuencias),

5'-ctgttgtatg cacatgagac-3' (H5SS2 SEC ID No 9 de la lista de secuencias),

5'-gaagtgatgc tggtggagtc-3' (H5CS1 SEC ID No 10 de la lista de secuencias),

5'-agtgtgaagt gatgctggtg-3' (H5CS2 SEC ID No 11 de la lista de secuencias),

5'-tttaccagga gagtgggagag-3' (H3VR SEC ID No 12 de la lista de secuencias),

5'-tgcagagaca gtgacccagag -3' (H3VR SEC ID No 13 de la lista de secuencias),

5'-tgttcaggac cagcatgggc-3' (L5NCS1 SEC ID No 14 de la lista de secuencias),

5'-aagacattt ggattctaac-3' (L5NCS2 SEC ID No 15 de la lista de secuencias),

5'-tatcatgaag tctttgtatg-3' (L5SS1 SEC ID No 16 de la lista de secuencias),

5'-gatggagaca cattctcagg-3' (L5SS2 SEC ID No 17 de la lista de secuencias),

5'-gacattgtga tgacccagtc-3' (L5CS SEC ID No 18 de la lista de secuencias),

5'-ttaacactca ttcctgttga-3' (L3CR SEC ID No 19 de la lista de secuencias),

5'-gactgggtca tcacaatgtc-3' (LCSR SEC ID No 20 de la lista de secuencias),

A menos que se especifique lo contrario todos los oligonucleótidos en estos ejemplos son sintetizados por Pharmacia Biotech Todos los oligonucleótidos son almacenados a -20° C y luego son disueltos en agua destilada

c) reacción PCR

composicion de la solución de reacción PCR

plantilla cADN, 5 µl del total de 33 µl de la reacción

cebador 1, 10 pmoles,

cebador 2, 10 pmoles,

amortiguador PCR concentrado diez veces (suministrado con el kit), 10 µl,

dNTPS (cada 2,5 mM9, 4µl, y

polimerasa Taq (Promega) 5 unidades

El agua destilada estéril es agregada a la solución a un volumen total de 100 µl A menos que se especifique lo contrario, los dNTP son una mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP (2,5 mM cada uno)

La reacción PCR es conducida como sigue La solución primero es calentada a 94° C durante dos minutos, después de lo cual un ciclo de calentamiento a 94° C durante 30 segundos, 52° durante un minuto y 72° C durante tres minutos, se retpite cuarenta veces Después de completar este procedimiento la solucion de reaccion es calentada a 72° C durante 10 minutos

Los fragmentos de ADN amplificados, así obtenidos son separados en una gel de agarosa al 1% que contiene 0,25 µg/ml de bromuro de etidio Las bandas determinadas para contener los fragmentos de ADN deseados son cortadas usando cuchillas de afeitar y el ADN es recuperado de allí usando el kit Gene Clean (BIO101) El fragmento de ADN es clonado usando el vector pGE,-T Easy (Promega) Esto se lleva a cabo como sigue

El fragmento de ADN recuperado de la solucion de reacción PCR, junto con 50 mg del vector pGEM-T Easy (suministrado con el kit), se mezclan con un µg de un amortiguador de reacción de ligasa por 10 (6 mM Tris-nucleótido pH7,5), 6 mM de cloruro de magnesio, 5 mM de cloruro de sodio, 7 mM de β-mercaptoetanol, 0,1 mM de ATP, 2 mM de DTT, 1 mM de espermidina, y 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino), a lo cual se agregan cuatro unidades de ligasa de ADN T4 (1 µl) El volumen total de la mezcla es ajustado a 10 µl con agua desionizada estéril, y la solución de ligasa resultante es incubada a 14° C durante 15 horas Después de este tiempo, 2 µl de la solución de reacción de ligasa es agregada a 50 µl de la sepa JM109 E coli competente (suministrada con el kit

y traída a la competencia de acuerdo con el manual de instrucción) para lo cual se agregaron 2 µl de 0,5 M de β-mercaptoetanol y la mezcla resultante es mantenida sobre hielo durante 30 minutos, y luego a 42° C durante 30 segundos y nuevamente sobre hielo por cinco minutos Luego, se agregaron 500 µl de medio que contiene 2% v/v de triptona, 0,5% p/v de extracto de levadura, 0,05% de p/v de cloruro de sodio, 2,5 mM de cloruro de potasio, 1 mM de cloruro de magnesio, y 20 mM de glucosa (nombrada de aquí en adelante como medio "SOC" al cultivo, y la mezcla es incubada durante una hora a 37° C con agitación Después de este tiempo el cultivo es rociado sobre una placa de agar l-broth (1% v/v de triptona 0,5% v/v de extracto de levadura, 0,5% p/v de cloruro de sodio, 0,1% p/v de glucosa, y 0,6% p/v de bacto-agar (Difco)), que contiene 100 µg/ml La s colonias resistentes a la ampicilina que aparecieron sobre la placa son seleccionadas y raspadas con aro de transferencia de platino, y cultivadas en el medio L-broth que contiene 100 µg/ml de amp_cilina a 37° C, durante la noche, con agitación a 200 rpm Después de la incubacion, las células son cosechadas por centrifugación recolectadas por centrifugación, a partir de lo cual el

plásmido de ADN es preparado por el método álcalı El método obtenido es designado como plásmido pH62 para la cadena pesada del TRA-8 o pL28 para la cadena lıvıana del TRA-8 Las cepas de E colı transformante que generan este plásmido designadas como E colı, JM109/pH62 y E colı JM109/pL28 fueron depositadas con el depósito de organismos de patentes ınternacional, Natıonal Institute of Advance Industrıal Scıence and Technology, 1-1 Hıgashı 1-chome Tsukuba-Shı Ibarakı-ken, 305-5456, Japón en abrıl 20 2001 de acuerdo con el tratado de Budapest para el depósito de mıcroorganismos y se acordó darle los números de acceso FERM BR-7560 y FERM BP7561, respectıvamente Las secuencıas de nucleótıdos de estos ADN que codıfıcan las cadenas pesada y la cadena lıvıana del TRA-8 son confırmados pro el método dıdeoxı (Sanger, F S , et al , (1977), Proc Natl Acad Sci USA, 74 5463-5467) usando el analızador 3700 de ADN (ABI PRISM, Perkın Elmer Applıed Bıosystems, Jpaón)

Las secuencıas de nucleótıdo de las cadenas pesada y lıvıana del TRA-8 se les da la SEC ID No 21 y la No 22 del lıstado de secuencıas, respectıvamente Las secuencıas de aminoácıdos de las cadenas pesada y lıvıana del TRA-8 se les da la SEC ID No 23 y No 24 del lıstado

804

de secuencias, respectivamente Las secuencias de aminoacido del terminal N de las cadenas pesada y liviana del TRA-8 establecieron en lo anterior un case perfecto Más aún, cuando las secuencias de aminoácido de las cadenas pesada y liviana son comparadas con la base de datos de la secuencias de aminoácido de anticuerpos se establece que para la cadena pesada, nucleótidos No 58 a 414 en la SEC ID No 21 constituyen la región variable mientras que los nucleótidos Nos 415 a 1392 en la SEC ID No 21 constituyen la region constante Para la cadena liviana, los nucleótidos No 64 a 387 en la SEC ID No 22 constituye la región variable, mientras que los nucleótidos No 388 a 702 en la SEC ID No 22 constituyen la región constante Las localizaciones y secuencias de los CDR también son elusidados por comparación de las homologías con la base de datos Las secuencias de aminoácidos del CDR_1, CDR_2 y CDR_3 de la cadena pesada del TRA-8 se muestran en la SEC ID No 25, No 26 y No 27, respectivamente Las secuencias de aminoácido del CDR , CDR_2, CDR_3 de la cadena liviana del TRA-8 se muestran en la SEC ID No 28, No 29 y No 30, respectivamente

Ejemplo 17 Diseñado de una versión humanizada del anticuerpo TRA-8

(1) modelado molecular de una region variable del TRA-8

El modelado molecular de la región variable del TRA-8 se lleva a cabo por un método generalmente conocido como modelado por homología (Methods en Enzimology, 203, 121-153, (1991)) Las secuencias primarias de las regiones variables de la inmuoglobulina humana registrada en el Protein Data Bank (Nuc Acid Res 28, 235-242 (2000)), para lo cual las estructuras tridimensionales derivadas de la cristalografía de rayos X está disponible, son comparadas con las regiones de marco de trabajo del TRA-8 determinado anteriormente Como resultado, NCD y 1HIL son seleccionados como que tienen las homologías de secuencia más altas a las regiones de marco de trabajo para las cadenas liviana y pesada del TRA-8, respectivamente Las estructura tridimensionales de las regiones de marco de trabajo son generadas combinando las coordenadas de 1NCD y 1 HIL que corresponden a las cadenas liviana y pesada del TRA-8 para obtener, el "modelo de marco de trabajo" Usando la clasificación definida por Chothia et al , los CDR del TRA-8 son clasificados como sigue, $CDRL_1$, $CDRL_2$, $CDRH_1$ y

$CDRH_2$ que pertenecen a las clases canonicas 2,1,1,3, respectivamente, mientras que el $CDRL_3$ no pertenece a ninguna de las clases canónicas específicas Los lazos del $CDRL_1$, $CDRL_2$, $CDRH_1$ y $CDRH_2$ a las conformaciones inherentes a sus respectivas clases canónicas, y son integradas dentro del modelo de marco de trabajo El $CDRL_3$ se le asigna el cluster de conformación 8A, de acuerdo con la clasificación de Thornton et al, (J Mol Biol , 263,800-815, (1996)), y el $CDRH_3$ es clasificado dentro del k(8)C usando la regla H3 (FEBS letter 455,188-197(1999)) Luego las conformaciones representativas para el $CDRL_3$ y $CDRH_3$ son integradas dentro del modelo de marco de trabajo

Finalmente, el cálculo de energías se lleva a cabo para eliminar los contactos no favorables interatómicos, para poder obtener un modelo molecular probable de los TRA-8

Región variable en terminos de energía El procedimiento anterior se lleva a cabo usando un sistema de modelado molecular común disponible comercialmente ABM (Oxford Molecular Limited, Inc) Para el modelo molecular obtenido, la precisión de la estructura es evaluada adicionalmente usando el programa PROCHECK (J Appl Cryst 1993), 26, 283-291)

(2) diseñando las secuencias de aminoácido para el TRA-8 humanizado

La construccion de anticuerpos TRA-8 humanizado se lleva a cabo por el método generalmente conocido como injertación CDR (Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033 (1989)) El anticuerpo aceptor es escogido con base en la homología del aminoácido en la región de la estructura Las secuencias de la region de estructura en el TRA-8 son comparadas con todas las secuencias de estructura humana en la base de datos Kabat de secuencias de aminoácido de anticuerpos (Nuc Acid Res 29, 205-206 (2001)) Como resultado, el anticuerpo mAB58'CL es seleccionado como un aceptor debido a la homología de

secuencia mas alta del 80% para la región de trabajo Los residuos de aminoácido en la region de estructura para el mAB58' CL son alineados con aquella para el TRA-8 y las porciones en donde diferentes aminoacidos son usados se identifican La localización de aquellos residuos son analizados usando el modelo tridimensional del TRA-8 construido anteriormente y los residuos donor que deben ser injertados en el aceptor son escogidos por los criterios dados por Queen et al (Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10022 (1989)) Las secuencias TRA-8 humanizadas son construidas como se describió en el siguiente ejemplo por medio de transferir diversos residuos donores en los anticuerpos aceptores, mAB58'CL

Ejemplo 18 Construcción de un vector de expresion para la cadena pesada del anticuerpo humanizado

(1) construcción del plásmido que lleva la variable de la región de ADN de cadena pesada del TRA-8 humanizado

Para poder determinar la actividad del TRA-8 humanizado, el plásmido que lleva la cadena pesada del TRA-8 humanizado es construido como sigue Sin embargo,

podrá apreciarse que la humanización del TRA-8 no está limitada a estos ejemplos

Como se muestra en la SEC ID No 31 de la lista de secuencias, la humanización de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo DR5 antihumano de ratón TRA-8 reemplazo ocasionado al 13ª aminoácido (glicina), el 19ª aminoácido (glicina), el 40ª aminoácido (treonina), el 42^{avo} aminoacido (ácido glutamico), el 44^{avo} aminoácido (arginina), el 84ª aminoácido (cerina), el 88^{avo} aminoácido (cerina), el 93ª aminoácido (metionina), el 114ª aminoácido (treonina), el 115^{avo} aminoacido (leucina), con glutamina, arginina, alanina, glicina, asparagina, alanina, valina, leucina y valina, respectivamente

El plásmido lleva ADN que codifica la región variable de la cadena pesada del TRA-8 humanizado (SEC ID No 31 de la lista de secuencias) y construido como sigue

El PCR se utiliza para construir las siguientes secuencias de ADN, cada una de las cuales comprende los descritos anteriormente

Los siguientes 12 oligonucleótidos se sintetizan

5'- ttggataagc ttggcttgac ctcaccatgg gatggagctg tatcatcctc ttcttggtag caacagctac aggtgtccac -3' (A SEQ ID No 32)

5 - tctgaagtaa tgctggtgga gtctgggggg ggcttagtac agcctggagg gtccctgaga ctctcctgtg cagcctctgg -3' (B, SEQ ID No 33),

5'- attcactttc agtagttatg taatgtcttg ggttcggcag gcaccaggga agggtctgga gtgggttgca accattagta -3 (C, SEQ ID No 34),

5'- gtggtggtag ttacacctac tatccagaca gtgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaatgccaa gaacaccctg -3' (D, SEQ ID No 35),

5'- tatctgcaaa tgaacagtct gagagcagag gacacggctg ttattactg tgcaagaagg ggtgactcta tgattacgac -3' (E, SEQ ID No 36)

5'- ggactactgg ggccaaggga ccctggtcac agtctcctca gcctc cacc aagggcccat cggtc -3 (F, SEQ ID No 37),

5'- ctaccaagaa gaggatgata cagctccatc ccatggtgag gtcaagccaa gcttatccaa -3' (G, SEQ ID No 38),

5 - tctcagggac cctccaggct gtactaagcc tcccccagac tccaccagca ttacttcaga gtggacacct gtagctgttg -3' (H, SEQ ID No 39)

5 tccagaccct tccctggtgc ctgccgaacc caagacatta catanctact gaaagtgaat ccagaggctg cacaggagag -3' (I SEQ ID No 40)

5'- ctctggagat ggtgaatcgg cccttcacac tgtctggata gtaggtgtaa ctaccaccac tactaatggt tgcaacccac -3' (J, SEQ ID No 41),

5 - ccttcttgca cagtaataaa cagccgtgtc ctctgctctc agactgttca tttgcagata cagggtgttc ttggcattgt -3' (K, SEQ ID No 42) and

5'- gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtgacc agggtccctt ggccccagta gtccgtcgta atcatagagt cacc -3 (L, SEQ ID No 43)

Los siguientes dos iniciadores PCR se sintetizaron como se describió anteriormente

5 - ttggataagc ttggcttgac -3' (P1, SEQ ID No 44), y

5 - gaccgatggg cccttggtgg a -3 (P2, SEQ ID No 45)

La síntesis de ADN que codifica una cadena de polipéptido que comprende una secuencia de señal de secreción, una región variable de la cadena pesada de TRA-8 humanizada y los ocho residuos de aminoácido en el N-terminal de la región IgG-CH1 se desarrolla utilizando una combinación de PCR respectivamente

El fragmento de ADN se prepara como sigue

Composición de la solución de reaccion PCR

Oligonucleótido A, 10 pmol,

Oligonucleótido B, 10 pmol,

Oligonucleótido C, 10 pmol,

Oligonucleótido D, 10 pmol,

Oligonucleótido E, 10 pmol,

Oligonucleotido F, 10 pmol,

Oligonucleótido G, 10 pmol,

Oligonucleotido H, 10 pmol,

Oligonucleotido I, 10 pmol,

Oligonucleótido J, 10 pmol,

Oligonucleótido K, 10 pmol,

Oligonucleótido L, 10 pmol,

Iniciador de Oligonucleótido P1, 2µM,

Iniciador de Oligonucleotido P2, 2µM,

Solución pirobest II, 10 µl,

Mezcla dNTP, 8 µl,

Polimerasa de ADN pirobeeet, 0,5 µl, y

Agua redestilada hasta un volumen final de 50 µl

La reacción PCR se conduce como sigue Las soluciones se calientan primero a 94° C durante cinco minutos, despues de lo cual se repite siete veces un ciclo de calentar a 98° durante 10 segundos, 55° durante 30 segundos y 72° durante un minuto Despues de completar este procedimiento, la solución de reacción se calienta a 72° C durante 15 minutos

Un volumen igual que fenol-cloroformo (50% v/v de fenol saturado con agua, 48% v/v de cloroformo, 2% v/v isoamil alcohol) se agrega a 200 µl de cada uno de los

productos PCR, y se mezcla vigorosamente durante un minuto Después de este tiempo, la mezcla se centrifuga a10 000 X g, y la capa acuosa se recupera y se mezcla con un volumen igual de alcohol cloroformo-isoamilo (96% v/v de cloroformo y 44% v/v de alcohol isoamino), que es de nuevo vigoroso a 10 000 X g y se recubera la capa acuosa Las series de etapas citadas en este párrafo se refieren a en lo sucesivo, como "extracción de fenol")

La precipitación de etanol es entonces desarrollada sobre la capa acuosa recuperada Como se utiliza y se refieree aquí, "precipitación de etanol" consiste en agregar, a una mezcla, un décimo del volumen de acetato de sodio 3M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes ce 100% de etanol a la solución a ser tratada, y congelar la mezcla utilizando hielo seco La mezcla resultante se centrifuga entonces a 10 000 X g para recubrar el ADN como precipitado

Después de la extracción de fenol la precipitacion de etanol el precipitado de ADN resultante se seca por vacio, se disuelve en un mínimo de agua redestilada, y se separa mediante electroforesis de gel de agarosa al 3%

Después de la electroforesis, el gel se tiñe con 1 µg /ml de solución acuosa de bromuro de etidio para permitir la detección de ADN bajo luz UV La banda de ADN que corresponde al ADN del TRA-8 humanizado es cortada utilizando una cuchilla y eluida del gel que utiliza el kit Geneclean Spin (BIO 101, CA, USA) Después de la estación de fenol, el ADN eluido es entonces concentrado mediante centrifugación a 7 500 X g, seguido mediante precipitación de etanol, y finalmente disuelto en 5 µl de agua destilada

El resultante, cada ADN extraído es clonado utilizando un vector Easy pGEM-T (Promega) como sigue

El fragmento recuperado de la reaccion de PCR, 5 µl,

Solución de polimerasa Taq 10 X, 1 µl,

Mezcla dNTP, 1 µl,

Polimerasa Taq (5 unidades/ml), 1 µl, y

Agua redestilada hasta un volumen final de 10 µl

Después de lo anterior cada solución reacciona a 70° C durante 30 minutos, cada solución de ADN y de vector Easy pGEM-T son ligados utilizando un kit de ligado de

ADN versión 2 0 (Takara Shuzo Co , Ltd) utilizando el protocolo del fabricante

Después de 4 horas de incubación a 15° C, se mezclan dos µl de solución de reacción incubada con 100 µl de sepa de E Coli competente JM109 a una densidad de célula de 1-2 x 10^9 células/ml (Takara Shuzo Co , Ltd), y la mezcla se mantiene en hielo durante 30 minutos, luego a 42° C durante 30 segundos y de nuevo sobre hielo durante 1 minuto Luego, 500 µl de medio SOC (triptona 2% v/v, 0,5% p/v de extracto de levadura, 0,05% p/v de cloruro de sodio, 2,5 mM p/v de cloruro de potasio, 1 mM de cloruro de magnesio, y 20 mM de glucosa) se agrega a la mezcla, la cual se incuba durante una hora adicional, con agitado Las sepas transformantes son entonces aisladas, y el ADN de plásmido se prepara de las sepas como se describe en "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Las secuencias de nucleotido de estos ADN que codifican la cadena pesada del TRA-8 humanizado son confirmadas mediante el metodo dideoxi (Sanger, F S , et al , (1977), Proc Natl Acad Sci USA, 74 5463-5467) utilizando un analizador de ADN 3700 (ABI PRISM, Perkin Elmer Applied Biosystems, Japón)

Los plásmidos resultantes son designados pHB14 (el plásmido lleva un cADN que codifica la cadena pesada del TRA-8 humanizado) La sepa de E Coli transformante que conserva estos plásmidos, designada como E Coli JM109/pHB14 se depositó con el deposito de organismos para patentes internacionales, Ntional Institue of advance Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japon el 20 de abril, 2001, de acuerdo con el tratado de Budapest para el depósito de microorganismos, y se acordo el número de acceso FERM BP-7556

(2) Construcción de plásmidos de expresión que llevan el ADN de región variable de cadena pesada del TRA-8 humanizado

Los vectores de expresión recombinante para las celulas animales son construidos mediante la inserción del ADN que codifica la cadena pesada del TRA-8 humanizado (clonado anteriormente) como sigue

Un µg de plásmido pSRHHH3 (solicitud de patente europea EP 0-909-816 A1) que lleva la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-Fas humanizado HFE7A y el ADN genómico de región constante IgG1 humano, un vector de expresión para celulas de mamifero, es digerido con las enzimas de restricción HindIII y ApaI, y separado mediante electroforesis de gel de agarosa al 3% Despues de la electroforesis, el gel se tiñe con una solución acuosa de 1 µg/ml de bromuro de etidio para permitir la detección de ADN bajo luz UV Las bandas de ADN del ADN vector que contienen el ADN genomico de región constante IgG1 humano sin la región variable de cadena pesada del HFE7A humanizado se corta utilizando una cuchilla y se eluye del gel utilizando un kit Geneclean Spin (BIO 101, CA, USA) Despues de la estación de fenol, el ADN eluido es entonces concentrado mediante centrifugación a 7 500 X g, seguido mediante precipitación de etanol, y finalmente disuelto en 5 µl de agua destilada y luego se desfosforiliza utilizando CIP El plásmido desfosforilizado digerido resultante (100 ng) se liga con 1 µg de un fragmente de ADN pHB14 que contiene el ADN que codifica la region variable de cadena pesada del TRA-8 humanizado, el cual se había tambien

digerido con un HindIII y ApaI, utilizando un kit de ligado de ADN versión 2 0 (Takara Shuzo Co , Ltd) la mezcla de ligado se utiliza entonces para transformar el E Coli JM109, el cual es entonces plateado sobre platos de agar LB que contienen 50 µg/ml de ampicilina

Los transformantes obtenidos mediante este metodo son cultivados en 2 ml de medio LB líquido que contienen 50 µg/ml de ampicilina a 37° C durante toda la noche y el ADN de plásmido se extrae subsecuentemente del cultivo resultante mediante el metodo alcalino-SDS

El ADN del plásmido extraído se digiere con HindIII y ApaI, y se somete a electroforesis de gel de agarosa al 3% p/v para confirmar la presencia o ausencia del inserto de ADN que codifica la región variable de cadena pesada del TRA-8 humanizado La inserción y orientacion del fragmento de ADN deseado en el vector se confirma mediante la secuenciación de ADN utilizando un analizador de secuencia de gen (analizador de ADN ABI Prism 3700, Applied Biosystems) El plásmido de expresion resultante que lleva el cADN que codifica la cadena pesada del TRA-8 humanizado se designa como pHB14-1

Ejemplo 19 Construcción de un vector de expresion para la cadena liviana del anticuerpo humanizado

(1) Construcción de vectores para la cadena liviana de las versiones humanizadas del anticuerpo TRA-8

Como se muestra en la SEC ID No 46 de la lista de secuencia, al humanizar la secuencia de aminoácido de la cadena liviana del anticuerpo DR5 antihumano de rator TRA-8, 8vo aminoácido (histidina), 9no aminoácido (glicina), 10mo aminoácido (fenilalanina), 11^{a} - aminoácido (metionina), 13^{avo} aminoacido (treonina), 20ª aminoacido (cerina), el 42^{avo} aminoácido (glutamina), 43ª aminoácido (cerina), 60ª aminoácido (ácido aspártico), 63^{a} - aminoácido (treonina), 77^{avo} aminoacido (asparagina), 78^{a} - aminoacido (valina), 80ª aminoacido (cerina), 83ª aminoácido (leucina), 85ª aminoácido (acido aspartico), 87ª aminoácido (fenilalanina), y 99^{avo} aminoácido (glicina), 103^{avo} aminoácido (leucina), y 108ª aminoácido (alanina), proveniente del N-terminal de la secuencia de aminoácido de la cadena liviana de TRA-8 so reemplazados con prolina, serina, serina, serina, leucina, alanina,

treonina, lisina, alanina, serina, leucina, prolina, fenilalanina, treonina, tirosina, glutamina, valina y treonina, respectivamente La secuencia resultante se designa LM2

Los plásmidos de expresión que llevan este tipo de secuencias de aminoácido de cadena liviana humanizada del anticuerpo DR5 antihumano TRA-8 se construyen como sigue

1) Síntesis de los iniciadores para la preparación de las regiones variable y constante de la cadena liviana de TRA-8 humanizado

La codificación del ADN para la cadena de polipéptido LM2 (secuencia ID No 46 de la lista de secuencias), cada uno de los cuales es una fusión de al región variable de la cadena liviana TRA-8 del anticuerpo anti-DR5 humanizado y la región constante de la cadena liviana Ig (cadena k), son respectivamente sintetizados al utilizar combinaciones de PCR

Adicionalmente al 7AL1P (SEC ID No 47) y 7ALCN (SEC ID No 48), se sintetizan los siguientes oligonucleótidos para PCR

5 - ccaagttctt tgtctgcatc agtaggagac agggtcacca tcacctgc -3' (HKCDF11, SEQ ID No 50),

5'- agtgtgccgg gtggatgccc agtaaatcag tagtttagga gctttccctg gtttctg -3 (HKCDR12, SEQ ID No 51),

5'- tgggcatcca cccggcacac tggggtccca agcaggttta gtggcagt -3' (HKCDF22, SEQ ID No 52),

5'- ataactacta tattgctgac agtaataggt tgcaaaatcc tccggctgca gactagagat ggt -3' (HKCDR22, SEQ ID No 53), y

5'- cagcaatata gcagctatcg gacgttcggt caaggcacca aggtggaaat caaacggact gtg -3' (HKCF12, SEQ ID No 54)

2) Construcción del plásmido pCR3 1/M2-1 (clonación de la cadena liviana TRA-8 humanizada)

El fragmento LM2-F1-ADN como se definió en la SEC ID No 55 de la lista de secuencias codifica para la secuencia de aminoácido como se define en la SEC ID No 46 de la misma que es preparada mediante el desarrollo del PCR de segunda etapa, insertado dentro de un vector plasmido y clonado en E Coli

a) PCR de primera etapa

El fragmento LM2-F1-ADN que codifica para una secuencia de señal de secreción y una porción de la

región FRL_1 con un sitio de escisión de la enzima de restricción HindIII agregada al extremo 5' se prepara bajo las siguientes condiciones Los plásmidos de plantilla, pHSGHM17 y pSRPDHH, se obtienen al seguir la descripción en una solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1

Composición de la solución de reacción

ADN pHSGHM17 de plásmido (solicitud de patente europea EP 0 090 816 A1), 25 ng

Iniciador de un oligonucleótido 7AL1P, 50 pmol

Iniciador de un oligonucleótidoHKSPR11, 50 pmol

Cóctel dNTPs, 5 µl

Solucion 10xPCR, 5 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq (Perkin Elmer), 2,5 unidades

La solucion de reaccion que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl al agregar agua redestilada y utilizarla en el PCR

Las condiciones térmicas del PCR calentamiento 94° C durante dos minutos, después de los cual se repite un ciclo térmico de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 77° C durante dos minutos, seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos

En el fragmento de LM2-F2-ADN que codifica para una porción del FRL_1, $CDRL_1$, FRL_2, y $CDRL_2$ y se prepara bajo las siguientes condiciones

Composición de la solucion de reacción

ADN pL28 de plásmido, 25 ng
Iniciador de oligonucleotido HKCDF11, 50 pmol
Iniciador de oligonucleótido HKCDR12, 50 pmol
Cóctel dNTP, 5 µl
Solución 10 X PCR, 5 µl
Polimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composicion anterior se ajusta al volumen final de 50 µl al agregar agua redestilada y utilizarla en PCR

Condiciones térmicas PCR calentamiento a 94° C durante dos minutos, después de lo cual se repite un ciclo térmico 30 veces de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, seguido por el calentamiento a 72° C durante 10 minutos

El fragmento de LM2-FR-ADN que codifica para el $CDRL_2$, y FRL_3, y una porción del $CDRL_3$ se preparan bajo las siguientes condiciones

Composición de la solución de reacción

ADN pSRPDHH de plásmido (solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1), 25 ng

Iniciador de oligonucleotido HKCDF22, 50 pmol

Iniciador de oligonucleótido HKCDR22, 50 pmol

Cóctel dNTPs, 5 µl

Solución 10 X PCR, 5 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl al agregar agua redestilada y usarla en PCR

Condiciones térmicas PCR calentamiento a 94° C durante dos minutos, despues de lo cual se repite un ciclo térmico 30 veces de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, seguido por el calentamiento a 72° C durante 10 minutos

El fragmento de LM2-F4-ADN que codifica para el $CDRL_3$, y FRL_4, y la región constante con un sitio de escición de enzima de restriccion EcoR I agregada al extremo 3' se prepara bajo las siguientes condiciones

Composición de la solución de reaccion

ADN pSRPD-I de plásmido, 25 ng

Iniciador de oligonucleótido HKCF12, 50 pmol

Iniciador de oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol

Cóctel dNTPs, 5 µl

Solución 10 X PCR, 5 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl al agregar agua redestilada y usarla en PCR

Condiciones térmicas PCR calentamiento a 94° C durante dos minutos, despues de lo cual se repite un ciclo térmico de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, seguido por el calentamiento a 72° C durante 10 minutos

Los fragmentos de ADN amplificados después de PCR se separan mediante electroforesis de gel de poliacrilamida al 5% El gel después de la electroforesis se tiñe con 1 µg/ml de bromuro de etidio para detectar el ADN producido bajo luz UV Las bandas de ADN respectivas se detectan así y son escisionadas con una cuchilla

b) PCR de segunda etapa

LM2-ADN en el cual los fragmentos anteriormente descritos de LM2-F1-ADN, LM2-F2-ADN, LM2-F3-ADN y LM2-F4-ADN se fusionan se preparan bajo las siguientes condiciones

Composición de la solución de reacción

Fragmento de gel de LM2-F1-ADN preparado en el PCR de primera etapa,

Fragmento de gel de LM2-F2-ADN preparado en el PCR de primera etapa,

Fragmento de gel de LM2-F3-ADN preparado en el PCR de primera etapa,

Fragmento de gel de LM2-F4-ADN preparado en el PCR de primera etapa,

Iniciador de oligonucleótido 7AL1P, 50 pmol

Iniciador de oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol

Cóctel dNTPs, 5,0 µl

Solución 10 X PCR, 5,0 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl al agregar agua redestilada y utilizarla en PCR

Condiciones térmicas PCR calentamiento a 94° C durante dos minutos, después de lo cual se repite un

ciclo térmico 30 veces de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, seguido por el calentamiento a 72° C durante 10 minutos

El fragmento LM2-ADN preparado así se inserta en el PCR 3,1 ADN de plásmido usando un kit de clonación Eukariotic TA (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante e introducido en el E Coli TOP10F' competente contenido en el kit Las secuencias de nucleótido de estos ADN que codifican la cadena de luz del TRA-8 humanizado se confirman mediante el método dideoxi (Sanger, F S , et al , (1977), Proc Natl Acad Sci USA, 74 5463-5467) utilizando un analizador de ADN 3700 (ABI PRISM, Perkin Elmer Applied Biosystems, Japon)

Los plásmidos resultantes se designan pCR3,1/M2-1 (el plásmido que lleva el cADN que codifica la región variable de cadena liviana del TRA-8 humanizado y una región constante de cadena liviana Ig humano)

El plásmido obtenido PCR3 1/M2-1 que contiene el fragmento LM2-ADN es digerido con las enzimas de restricción HindIII y EcoR I

Un µg de ADN pHSG399 de plásmido de clonación se digiere con las enzimas de restricción HindIII y EcoR I, y luego desfosforilizada con CIP El ADN pHSG399 desfosforilizado resultante y el fragmento LM2-ADN, que se ha digerido con las enzimas de restriccion HindIII y EcoR I, son ligadsa utilziando el kit de ligación de ADN versión 2 0 (Takara Shyuzo, Col Ltd) Luego la E Coli DH5α se transforma con el ADN ligado y esparcido sobre el medio de agar que contiene 0,1 mm de IPTG, 0,1% de X-Gal y 50 µg/ml de cloramfenicol (concentraciones finales) Los transformantes blancos obtenidos se cultivan en medio LB liquido que contiene 50 µg/ml de cloramfenicol, y ADN de plásmido se extrae del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS El ADN de plásmido extraído se digiere con HindIII y EcoR I, y luego un clon que lleva el fragmento LM2-ADN se selecciona mediante electroforesis de gel de agarosa al 1%

Como resultado del procedimiento anterior, el plasmido pHSG/M2-1-4 que lleva un fragmento de fusión de la región variable de la cadena liviana del TRA-8 LM2 humanizado y la region constante de la cadena Igk humana se obtiene La sepa E coli transformante que guarda

estos plásmidos, designada como E coli DH5α/pHSG/M2-2-4 se depositó con el depósito de organismos para patentes internacionales, National Institue of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japón en abril 20, 2001, de acuerdo con el tratado de Budapest para el depósito de microorganismos, y se acordó el número de acceso FERM BP-7563

3) Construcción del plasmido pSR/M2-1 (plasmido de expresión para la cadena liviana del TRA-8 LM2 humanizado)

El plásmido obtenido pHSG/M2-1-4 que lleva un fragmento de la fusion de la región variable de la cadena liviana TRA-8 LM2 humanizada y la región constante de la cadena Igk numana se digiere con las enzimas de restriccion HindIII y EcoR I

Un µg del ADN pSRPD-H del plasmido clonado (solicitud de patente europea 0-909-816-A1) se digiere con las enzimas de restriccion HindIII , EcoR I, luego se desfosforiliza con CIP El ADN pSRPDH- desfosforilizado

resultante y el fragmento de ADN HindIII-EcoR I, obtenido del pHSG/M2-1-4 se ligan utilizando un kit de ligado de ADN version 2 0 (Takara Syuzo, Co Ltd) Entonces, el E coli DH5α se transforma con el ADN ligado y se esparce sobre el agar LB Los transformantes obtenidos se cultivan en un medio LB líquido que contiene 100 µg/ml de ampicilina, y de ADN de plásmido y se extraen del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS La inserción y orientación del fragmento de ADN deseado en el vector pSRPDHH se confirma mediante la secuenciacion de ADN utilizando un analizador de secuencia de gen (analizador de ADN ABI Prism 3700, Applied Biosystems)

El plásmido de expresión resultante que lleva el cADN que codifica la cadena liviana del TRA-8 humanizado se designó pSR/M2-1

Ejemplo 20 Producción de anticuerpo humanizado

La transfección de las celulas COS-7, es decir, una linea de células derivada de un riñón de mono, con los plasmidos de expresión para la cadena pesada del TRA-8 humanizado y la cadena liviana del TRA-8 humanizado

obtenidos anteriormente se condujeron mediante métodos de reactivo de transfeccion FUGENE6 (Boehringer Mannheim Biochemica) de acuerdo con el manual de instruccion suministrado con el kit

Las células COS-7 (American Type Culture Collection No CRL-1651) crecen a semiconfluente (3 x 10^5 celulas/plato) en un plato de cultivo (área de cultivo 57 cm^2, Sumitomo Bakelite) que contiene un medio Eagle modificado Dulbecco (en lo sucesivo denominado como "D-MEM", Gibco BRL) suplementado con suero de ternero fetal al 10% (en lo sucesivo abreviado como "FCS", Moregate)

En el entretanto, 10 µg/plato (total cinco platos) se el ADN de plásmido de expresion de cadena pesada DR5 humanizado (pHA15-1) y 10 µg/plato del ADN de plásmido de expresion de cadena liviana DR5 humanizado preparado mediante el metodo alcalino-SDS y la centrifugacion de gradiente de densidad de cloruro de cesio se mezclan, y luego se precipitan con etanol, seguido mediante suspension en 5 µl/plato de H_2O

Después de 15 µl/plato de reactivo de transfección FUGENE6 se mezcla con 180 µl/plato de D-MEM sin FCS, esta solución FUGENE (185 µl/plato) se mezcla con 5 µl/plato de una solución de ADN que contiene 10 µg/plato de el ADN de plasmido de expresión de cadena pesada DR5 humanizado y 10 µg/plato del ADN del plásmido de expresión de cadena liviana DR5 humanizado Despues de 15 minutos de incubacion a temperatura ambiente, la suspension de plasmido obtenida (200 µl) se agrega a los platos COS-7 preparados previamente Después de incubar en CO_2 al 5% a 37° C durante 24 horas, el medio de cultivo se cambia con D-MEM sin FCS Despues de incubación en CO_2 al 5% a 37° C durante 72 horas, el supernadante del cultivo se recupera para purificar los productos de expresión en los fluidos supernadantes Mediante el método como se describio anteriormente, las células COS-7 se transfectan con cada una de las siguientes combinaciones de plásmido

(A) sin ADN de plásmido

(B) cotransfeccion de pHB14-1 y pSR/M2-1

Se centrifuga entonces el cultivo (1 000 r p m , 15 minutos) y se recolecta el supernadante El supernadante

se centrifuga de nuevo (9800 r p m , 15 minutos) y se filtra con un filtro de 0,45 µm (ADVANTEC TOYO DISMIC-25CS, Cat # 25CS045 AS) La purificacion del IgG proveniente de los filtrados se logra utilizando cromatografía de afinidad de Protein G-POROS (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones

HPLC BioCAD 700E (Applied Biosystems)

Columna cartucho sensor ProteinG-ID (tamaño columna 2 1 mmID x 30 mm LD, volumen de lecho 0,1 ml, Cat # 2-1002-00, Applied Biosystems)

Solución de elusión glicina-HCl 0,1 M (pH 2,5)

Solución de neutralizacion Tris-hCl 1M (pH 8,5)

Detección 280 nm

Proporcion de flujo 1 ml/min

Tamaño de fracción 0,5 ml/0,5 min

Tubo de fracción 1,5 ml de microtubo de polipropileno

Temperatura 4° C

Después que todos los filtrados aplicados a la columna, 30 ml de PBS (Sigma, Cat # 1000-3) se utiliza para lavar la columna Cuando se aplica la Solución de

elusión, se inicia el recolector de fracción Cada microtubo de fracción previamente contenía 55 µl de NaCl 1 M, 110 µl de Solución de neutralización y 74 µl de 2 mg/ml de albúmina de suero de bovino (Sigma, Cat # A-7030) en PBS Las fracciones del numero 8 hasta el número 10 se recolectan y se dializan contra un litro de PBS (pH 7,5) a 4° C durante un día utilizando un lizador Slide-A (Pierce, Cat #66450) La solución de diálisis se cambia dos veces

La verificación de la expresion de los anticuerpos humanizados y el ensayo cuantitativo de los productos de expresión en los fluidos de cultivo supernadantes preparados se desarrollan mediante ELISA con un anticuerpo contra IgG antihumano

A cada pozo de un plato de 96 pozos (MaxiSorp, Nunc), se agregaron 100 µl de anticuerpo policlonal especifico IgG Fc antihumano de cabra (Cappel) disuelto a la concentración final de 0,5 µg/ml en solucion de adsorción (hidrogencarbonato de sodio 0,05 M, azida de sodio 0,02% Ph 9,6) y el plato se incubó a 37° C durante dos horas para originar la adsorcion del anticuerpo

Luego, el plato se lavo con 350 µl de PBS(-) que contiene 0,05% de Tween-20 (BioRad) (en lo sucesivo denominado como "PBS-T") cinco veces A los pozos después de lavados, se agregó el cultivo supernadante diluido con D-MEM que contenia 10% de FCS y se incubó a 37° C durante dos horas Después de lavar de nuevo con PBS-T, 100 µl de anticuerpo monoclonal específico IgG Fc antihumano de cabra etiquetado alcalino fosfatasa (Jakson Inmuno Research Lab) diluido 10 000 veces con PBS-T se agregó a cada pozo y se incubó a 37° C durante dos horas Después de lavar de nuevo con PBS-T, se agregó una solucion de sustrato de p-nitrofenilfosfato obtenido del kit Alkalin Phosohatase Substrate (Bio Rad) de acuerdo con el manual de instrucción suministrado con el kit Después de incubar a 37° C durante 0,5 a una hora, se midió la observancia a 405 nm En los presentes experimentos, inmunoglobulina G de plasma de humano subclase 1 (IgG1) (Biopure AG) diluido con D-MEM que contenía 10% de FCS a ciertas concentraciones se utilizo como muestras de referencias de concentración de los anticuerpos D85 humanizados contenidos en los fluidos supernadantes del cultivo

Como resultado, los productos de expresión y purificados en el cultivo supernadante se detectaron específicamente con anticuerpo IgG antihumano La cantidad de anticuerpo IgG humano es 8,96 µg (800 µl)

Ejemplo 21 Actividad que induce apoptosis de anticuerpo humanizado

Las células Jurkat (ATCC No TIB-152), se utilizaron para examinar la actividad que inducía apoptosis del anticuerpo TRA-8 humanizado purificado

Las célula Jurkat cultivadas en medio RPMI1640 con 10% FCS (Gibco BRL) a 37° C durante tres días en la presencia de CO_2 al 5% son suministradas en cada pozo de un microplato de 96 pozos (Sumitomo Bakelite) a 50 µl por pozo El TRA-8 humanizado preparado en el ejemplo 20 se ajustó para que tuviera la concentración del producto final de interés de 100 ng/ml con un medio RPMII1640 que contiene 10% de FCS para estimar sus concentraciones en los fluidos de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 20 Cada una de las soluciones de los productos de expresión así ajustada a 100 ng/ml se utilizó para

producir dilusiones seriales al repetir la dilusión serial dos veces con RPMI1640 que contiene 10% de FCS Cada una de las soluciones de TRA-8 humanizadas eluidas se agregó a cada pozo a 50 µl por pozo Después de reaccionar a 37° C durante 12 horas, se agregaron 50 µl de 25 µM de PMS (fenizina metosiulfato, Sigma Chemical Co) que contiene 1 mg/ml XTT sal interior de (2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfenil]-2H-tetrazolio-5-carboxianirida, Sigma Chemical Co) (concentraciones finales de 250 µg/ml para XTT y 5 µM para PMS), después de incubar durante tres horas, la absorbancia a 450 ml de cada pozo se midio para calcular la viabilidad de las célula al utilizar la capacidad de reducción de las mitocondrias como el índice

La viabilidad de las células en cada pozo se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula

$$\text{Viabilidad (\%)} = 100 \times (a-b)/(c-b)$$

En donde "a" se mide como un pozo de ensayo, "b" es la medicion de un pozo sin celulas, y "c" es la medición de un pozo sin agregar anticuerpo

Como resultado, el producto de expresión preparado en el ejemplo 20 (TRA-8 humanizado) se demostró que inducia la apoptosis en las células de la línea celular del linfoma T que expresa el antígeno DR5 humano

Ejemplo 22 Reactividad de las TRA-8 con varias moléculas DR5

Con el fin de determinar la reactividad de las TRA-8 a varias moléculas DR5 la reactividad del TRA-8 se examinó utilizando linfocitos activados como sigue

Primero, muestras de sangre periferica se toman de un humano (3 ml), titi (2 ml), y mono cinomolgus (20 ml) Las muestras de sangre tenían 1 ml de heparina (Novoheparin, Novo) agregada a ellas y las muestras son entonces puestas en capas lentamente sobre un volumen igual de solucion de Ficoll-Paque plus (Amershma Pnarmacia Biotech) gravedad especifica 1,077 para todos con excepción del mono cinomolgus, que tuvo una gravedad especifica de 1,072) y se centrifugo a 1700 rpm durante 30 minutos con el fin de obtener una fracción de las celulas mononucleares de sangre periférica Esta fraccion

de celulas mononucleares se lavo dos veces con solución salina balanceada Hanks y luego se suspendió en un medio RMPI1640 con FCS al 10% v/v a una densidad celular de 1 x 10^6 células/ml Se agregó fitohemaglutinina-p (PHA-P Sigma Chemicals, Co) a la suspensión resultante a una concentración final de 5 µg/ml y la muestra se encubó a 37° C bajo CO_2 al 5% v/v durante 24 horas Despues de este tiempo, las células se recubrieron mediante centrifugación, se lavaron y se resuspendieron en un medio RPMI 1640 que contiene FCS al 10% de v/v Luego, para activar las celulas recuperadas se agregó interleucina-2 (Amershman Pharmacia Biotech) a la suspensión a una concentración final de 10 unidades/ml, y esta se incubó a 37° C bajo CO_2 al 5% v/v durante 72 horas

En la cantidad de la preparación activada calculada por contener 1 x 10^6 células de linfocitos activados se ubico en el tubo de ensayo y se suspendió en 50 µl de 0,5, 1, 5, 10 µg/ml de TRA-8 en PBS o 50 µl de PBS solo La suspensión resultante se le permitió permanecer en hielo durante una hora, después de lo cual las celulas se lavaro tres veces con alícuotas de 500 µl de PBS y luego

se suspendieron en 50 µl de 20 µg/ml de anticuerpo IgG antihumano etiquetado FITC (Bioresource) en PBS Utilizando las células suspendidas en 500 µl de PBS como controles, las intensidades de fluorescencia se midieron, utilizando un citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson)

Las distribuciones de los números de celulas mediante intensidad de fluorescencia se obtuvieron y las proporciones de los números de las células teñidas a aquellas de las células totales se calcularon Adicionalmente, cada valor Kd se calcula utilizando la concentración del TRA-8 y las proporciones de los numeros de las células teñidas a aquellas de las celulas totales Cada frecuencia de reactividad a linfocitos activados de humano, titi, y monocinomologus es casi la misma De acuerdo con esto, el TRA-8 es capaz de unir un amplio rango de DR5 de primate que incluye un humano contra el cual se prepara originalmente el TRA-8

Ejemplo 23 Estudio de dosis escalada de TRA-8 en titis

Un estudio de toxicidad preliminar de dosis escalada de TRA-8 se desarrolló utilizando un titi macho y un tití hembra Tres conjuntos de dosis intravenosas sencillas las cuales se separaron por un periodo de retiro de siete días, se llevaron a cabo La dosis de TRA-8 se establecio en 50 250, y 1250 µg/cuerpo 48 horas después de cada tratamiento, se recolectó sangre de la vena femoral y se preparó el plasma Se midieron las actividades de aspartato de transferasa y alanina aminotransferasa del plasma utilizando un analizador (FUJI DRI-CHEM Fuji Film Medical Co , Ltd) Toda la sangre se tomó sin ninguna anestesia Como resultado, no se notó evidencia que indicara daño hepático en el ensayo bioquimico del plasma despues de cada tratamiento

Ejemplo 24 Estudios farmacológicos in vitro e in vivo de TRA-8 contra celulas de cáncer

Con el fin de determinar si el TRA-8 tenía la eficacia terapeutica en terapia anticáncer, se examinó la actividad de muerte in vitro de TRA-8 utilizando varias lineas de celula de cáncer

Varias células de cáncer (2 - 8 x 103 células/50 µl) cultivadas en un medio RPMI 1640 (para Jurkat), medio DMEM (para HCT-116), MEM-R (para WiDr), o DMEM-F12 (para COL2-Jck) obtenida de Gibco BRL con 10% de FCS (Gibco BRL) a 37° C en la presencia de CO2 al 5% se suministraron en cada pozo de un microplato de 96 pozos (Sumitomo Bakelite) El TRA-8 se ajustó para tener una concentración del producto final de interés de 100 ng/ml con un medio que contenía FCS al 10% La solución TRA-8 (100 ng/ml) se utilizo para producir dilusiones seriales a repetir dilusion serial dos veces con un medio que contenía FCS al 10% Cada una de las soluciones de TRA-8 diluidas se agregó a cada pozo a 50 µl por pozo y se incubó a 37° C Despues de reaccionar a 97° C durante 72 horas, se agregaron 50 µl de PMS 25 µM (metanosulfato de fenacina, Sigma Chemical Co) que contenía 1 ng/ml de XTT (concentraciones finales de 250 µg/ml para XTT y 50 µM para PMS) Después de incubar durante tres horas, la absorbancia de 450 nm de cada pozo se midio para calcular la viabilidad celular al utilizar la capacidad de reducción de las mitocondrias como el índice

La viabilidad de las celulas en cada pozo se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula

$$\text{Viabilidad (\%)} = 100 \times (a-b)/(c-b)$$

En donde "a" es la medición como un pozo de ensayo, "b" es la medicion de un pozo sin células, y "c" es la medicion de un pozo sin agregar anticuerpo

Los resultados se muestran en la tabla 3, siguiente

Tabla 3

Células	ED50 (µg/ml)
Jurkat	0,001 - 0,01
HCT-116	0,004 - 0,02
WiDr	0,007 - 0,03
COL2-Jck	2,28

Varias lineas de celula de cancer son fuertemente inducidas a apoptosis mediante el TRA-8 bajo condiciones in vitro

Adicionalmente, se determinó el efecto antitumoral in vivo de TRA-8 en ratones desnudos, transplantados con

celulas WiDr, en razón a que TRA-8 no es reactivo en cruce con el DR5 de murino

Se administró anticuerpo DR5 anti-humano TRA-8 a ratones desnudos que llevanan xenoinjertos humanos que expresaban la molécula DR5 humana Los ratones utilizados eran ratones desnudos/desnudos BALb/c de seis semanas (hembra, de Clea Japan Inc), que se transplantaron con líneas celulares de cáncer de colon de humano WiDr (5 mm^3) Un día despues del transplante del tumor, estos ratones transplantados son tratados diariamente con la inyección intraarticular de TRA-8 (5 µg/cuerpo) a 14 veces El crecimiento del tumor WiDr se determinó diariamente mediante el tamaño de la masa del tumor Los resultados se muestran en la tabla 4, siguiente

Tabla 4

	8 días	11 días	15 días	18 días	22 días	25 días
Control (BS)	196	259	469	584	833	1193
SD	±55	±77	±149	±230	±274	±419
TRA-8	158	97	155	195	365	530
SD	±78	±30	±60	±58	±91	±135

En este modelo, mientras que todos los animales tratados exhibieron un crecimiento de tumor visible, el crecimiento del tumor en animales tratados con TRA-8 se inhibió como se demostró mediante el tamaño del tumor Este resultado indicó que el TRA-8 es efectivo en la eliminación de células tumorales in vivo

Ejemplo 25 Estudio de combinación de TRA-8

La línea celular de cáncer de prostata de humano PC-3 se obtuvo de American Tissue Culture Collection (ATCC) y se mantuvo en una mezcla de nutrientes F-121K (21127-022, Gibco BRL) que contenía 10% de suero bovino fetal (FBS, Hyclone), 1% de L-glutamina-200 mM (25030-149, Gibco BRL) y solución de penicilina Streptomicina 0,5% (P-7539, Sigma) El medio RPMI1640 (MED-008, IWAKI) suplementado con FBS al 10 % y solución de penicilina estreptomisina 0,5% se utilizó en el siguiente experimento Celulas PC-3 con crecimiento exponencial se recolectaron mediante tripsinización y se lavaron dos veces con medio fresco Las celulas son entonces contadas, resuspendidas en un medio fresco, a una densidad de 5 * 10^5 celulas/ml y distribuidas en triplicado en platos de 96 pozos de fondo plano (3598,

Corning-Coster) en un volumen total de 100 µl/pozo un día antes de iniciar el experimento Una droga anticáncer representativa, Paclitaxel (169-18611, Wako) disuelta en dimetilsulfóxido (10 mg/ml) se diluyo en un medio fresco y luego se agregó a platos de 96 pozos que contenían células a 50 µl/pozo Las concentraciones finales del dimetilsulfóxido son menores de 0,1% Después de la incubación durante 24 hr a 37° C en una atmosfera de CO_2 al 5%, el TRA-8 diluido en medio fresco se agregó a los pozos Después de la incubación por 24 horas adicionales se agrearon 50 µl de Minimum Essential Medium (11095-098, Gibco BRL) que contenia 1 mg/ml de XTT y 25 mM de PMS a los pozos y los platos son incubados durante 16 h el OD450 es entonces medido mediante SPECTRA MAX 250 (Molecular Devices) y la viabilidad celular se calculó como sigue

Viabilidad celular (%) = (OD450 para el pozo que contenía células tratadas con Taxol y/o TRA-8 (agente (s))-OD450 para el pozo que no contenía ni células ni agentes) x 100 / (OD450 para el pozo que contenía células sin agente - OD450 para el pozo que no contenía ni células ni agentes)

El resultado del ensayo anterior para TRA-8 combinado con una droga anticancer representativa, Pacitaxel es el que sigue El Paclitaxel redujo la viabilidad de las células PC-3 pero mas del 40% de las señales indicó que las células de cancer viables aun permanecían a concentraciones de hasta 200 nm Notablemente, la adición de 0,1 ng/ml donde TRA-8 disminuyó grandemente la viabilidad de las células de cáncer, hasta el 10%, aún que no se ve reducción en la viabilidad de las células después de una aplicación simple de TRA-8 a esta concentración Este resultado claramente indica que el TRA-8 exhibio actividad anticáncer sinérgicamente cuando se combinó con otras drogas anticáncer

Ejemplo 26 Análisis de otros tipos de anticuerpos humanizados de TRA-8

(1) Designar anticuerpos humanizados

La construcción de una versión humanizada del TRA-8 se desarrolló mediante el metodo generalmente conocido de injerto CDR Se utilizo anticuerpo mAB58'CL como un

aceptador como se describio en el ejemplo de referencia 2 en las regiones CDR del anticuerpo TRA-8 se injertaron sobre el aceptador En la región marco, algunos aminoácidos se injertan sobre el aceptador del TRA-8 o de las secuencias de consenso humano mediante los criterios dados por Queen et al (Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033, (1989)) y las secuencias TRA-8 humanizadas se construyen como se describió a continuacion

(2) Construcción del plásmido que lleva ADN de la región variable de cadena pesada de otros tipos de TRA-8 humanizado o de raton

Como se muestra en la SEC ID No 56 de la lista de secuencias, la humanización tipo H1 de las secuencias de aminoacidos de la cadena pesada del anticuerpo DR5 antihumano de ratón PR-8 ocasionaron reemplazo del tercer aminoácido (metionina), el 13^{avo} aminoacido (licina), el 19^{a} ° aminoácido (glicina), el 40^{avo} aminoácido (treonina), el 42^{avo} aminoacido (acido glutámico), el 44^{avo} aminoácido (arginina), el 84^{avo} aminoácido (serina), el 88ª aminoacido (serina), el 93^{avo} aminoácido (metionina), el 114^{avo} aminoácido (trionina), el 115ª aminoácido (leucina), con, glutamina, glutamina, arginina, alanina,

glicina, glicina, asparagina, alanina, valina, leucina, y valina, respectivamente

Como se muestra en la SEC ID No 69 de la lista de secuencia, humanizacion del H3 de las secuencias de aminoácido de la cadena pesada del anticuerpo DR5 antihumano de ratón TRA-8 ocasionó reemplazo del 13^{avo} aminoácido (licina), el 19^{avo} aminoácido (glicina), el 40^{avo} aminoacido (treonina), el 42^{avo} aminoacido (acido glutámico), el 44^{avo} aminoácido (arginina), el 88^{avo} aminoacido (serina), el 93^{avo} aminoacido (metionina), el 114^{avo} aminoácido (trionina), el 115^{avo} aminoacido (leucina), con, glutamina, arginina, alanina, glicina, glicina, alanina, valina, leucina, y valina, respectivamente

Como se muestra en la SEC ID No 60 de la lista de secuencias, la humanización tipo H4 de las secuencias de aminoacido de la cadena pesada del anticuerpo DR5 antihumano de ratón TRA-8 ocasiono reemplazo del 13^{avo} aminoacido (licina), el 19^{avo} aminoacido (glicina), el 88^{avo} aminoácido (serina), el 93^{avo} aminoácido (metionina), el 114^{avo} aminoácido (trionina), el 115^{avo} aminoacido

(leucina), con, glutamina, arginina, alanina, valina, leucina, y valina, respectivamente

Como se mostró en el SEC ID No 61 de la lista de secuencias, el plásmido que lleva el ADN de región variable de cadena pesada del TRA-8 quimerico se designó como "tipo M" Además, el TRA-8 humanizado descrito en el ejemplo 17 y 18 se designo como "tipo H2"

Los plásmidos que llevan ADN que codifica la región variable de cadena pesada del TRA-8 humanizado o quimérico se construye como sigue

Se utiliza PCR para construir las siguientes secuencias de ADN, cada una de las cuales comprendidas descritas anteriormente

Los siguientes 24 oligonucleotidos se sintetizaron

5'- ttggataagc ttggcttgac ctcaccatgg gatggagctg tatcatcctc ttcttggtag caacagctac aggtgtccac -3' (A, SEQ ID No 32),

5 - tctgaagtaa tgctggtgga gtctgggggg ggcttagtac agcctggagg gtccctgaga ctctcctgtg cagcctctgg -3' (B, SEQ ID No 33),

5 - tctgaagtac agctggtgga gtctgggggg ggcttagtac agcctggagg gtccctgaga ctctcctgtg cagcctctgg -3' (B2, SEQ ID No 57),

5 - tctgaagtaa tgctggtgga gtctgggggg ggcttagtaa agcctggagg gtccctgaaa ctctcctgtg cagcctctgg -3' (B3, SEQ ID No 66),

5 - attcactttc agtagttatg taatgtcttg ggttcggcag gcaccaggga agggtctgga gtgggttgca accattagta -3' (C, SEQ ID No 34),

5 - attcactttc agtagttatg taatgtcttg ggttcggcag actccagaga agaggctgga gtgggttgca accattagta -3' (C2, SEQ ID No 64)

5'- gtggtggtag ttacacctac tatccagaca gtgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaatgccaa gaacaccctg -3 (D, SEQ ID No 35)

5'- tatctgcaaa tgaacagtct gagagcagag gacacggctg tttattactg tgcaagaagg ggtgactcta tgattacgac -3 (E SEQ ID No 36),

5'- tatctgcaaa tgagcagtct gagagcagag gacacggctg tttattactg tgcaagaagg ggtgactcta tgattacgac -3' (E2, SEQ ID No 62),

5 - tatctgcaaa tgagcagtct gagatctgag gacacggcta tgtattactg tgcaagaagg ggtgactcta tgattacgac -3 (E3, SEQ ID No 67),

5 - ggactactgg ggccaaggga ccctggtcac agtctcctca gcctccacc aagggcccat cggtc -3' (F, SEQ ID No 37),

5' ggactactgg ggccaaggga ccactctcac agtctcctca gcctccacc aagggcccat cggtc -3' (F2, SEQ ID No 68),

5 - ctaccaagaa gaggatgata cagctccatc ccatggtgag gtcaagccaa gcttatccaa -3' (G, SEQ ID No 38),

5'- tctcagggac cctccaggct gtactaagcc tcccccagac tccaccagca ttacttcaga gtggacacct gtagctgttg -3' (H, SEQ ID No 39),

5 - tctcagggac cctccaggct gtactaagcc tcccccagac tccaccagct gtacttcaga gtggacacct gtagctgttg -3' (H2, SEQ ID No 58),

5'- tttcagggac cctccaggct ttactaagcc tcccccagac tccaccagca ttacttcaga gtggacacct gtagctgttg -3' (H3, SEQ ID No 69),

5 - tccagaccct tccctggtgc ctgccgaacc caagacatta cataactact gaaagtgaat ccagaggctg cacaggagag -3' (I, SEQ ID No 40),

5'- tccagcctct tctctggagt ctgccgaacc caagacatta cataactact gaaagtgaat ccagaggctg cacaggagag -3' (I2, SEQ ID No 65),

5'- ctctggagat ggtgaatcgg cccttcacac tgtctggata gtaggtgtaa ctaccaccac tactaatggt tgcaacccac -3' (J, SEQ ID No 41),

5'- ccttcttgca cagtaataaa cagccgtgtc ctctgctctc agactgttca tttgcagata cagggtgttc ttggcattgt -3' (K, SEQ ID No 42),

5 - ccttcttgca cagtaataaa cagccgtgtc ctctgctctc agactgttca tttgcagata cagggtgttc ttggcattgt -3' (K2, SEQ ID No 63),

5'- ccttcttgca cagtaataca tagccgtgtc ctcagatctc agactgctca tttgcagata cagggtgttc ttggcattgt -3' (K3, SEQ ID No 70)

5'- gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtgacc agggtccctt ggccccagta
gtccgtcgta atcatagagt cacc 3 (L SEQ ID No 43) y
5 - gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtgaga gtggtccctt ggccccagta
gtccgtcgta atcatagagt cacc -3 (L2 SEQ ID No 71)

Los siguientes dos iniciadores se sintetizaron como se describió anteriormente

5'- ttggataagc ttggcttgac -3 (P1, SEQ ID No 44), y
5 - gaccgatggg cccttggtgg a -3' (P2, SEQ ID No 45)

La síntesis del ADN tipo H1 que codifica la cadena de polipéptidos que comprende una secuencia de señal de secreción, una región variable de cadena pesada TRA-8 humanizada y los residuos de 8 aminoácido en el n terminal de la región IgG-CH1 se desarrolló utilizando una combinación de PCR respectivamente

El fragmento de ADN tipo H1 se preparo como sigue

Composicion de solucion de reacción PCR

Oligonucleótido A, 10 pmol,

Oligonucleótido B2, 10 pmol,

Oligonucleótido C, 10 pmol,

Oligonucleotido D, 10 pmol,

Oligonucleótido E, 10 pmol,

Oligonucleótido F, 10 pmol,

Oligonucleótido G, 10 pmol,

Oligonucleótido H2, 10 pmol,

Oligonucleótido I, 10 pmol,

Oligonucleótido J, 10 pmol,

Oligonucleótido K, 10 pmol,

Oligonucleotido L, 10 pmol,

Iniciador Oligonucleotido P1, 2 µM

Iniciador Oligonucleótido P2, 2 µM

10 X solucion Pyrobest II, 10 µl,

Mezcla dNTP, 8 µl,

Polimerasa ADN pirobest, 0,5 µl, y

Agua redestilada a un volumen final de 50 µl

La reaccion PCR es conducida como sigue La solucion se caliente primero a 94° C durante 5 minutos, después de lo cual se repitió un ciclo de calentamiento siete veces a 98° C durante 10 segundos, 55° C durante 30 segundos y 72° C durante 1 minuto Después de completar este procedimiento, la solución de reacción es calentada a 72° C durante 15 minutos

Después de extracción de fenol y precipitación de etanol, el precipitado ADN resultante es secado en vacío, disuelto en un mínimo de agua redestilada, y separado por electroforesis de gel de agarosa al 3% Luego de la electroforesis, el gel es marcado con una solución acuosa de 1 µg/ml de bromuro de etidio para permitir la deteccion del ADN bajo luz ultravioleta Las bandas de ADN correspondientes al tipo H1-ADN se cortan usando una cuchilla de afeitar y eluyendo a partir del gel usando el kit Geneclean Spin (BIO 101, CA, USA) Después de la extracción con fenol, el ADN eluido es entonces concentrado por centrifugación a 7500 x g, seguido por la precipitación con etanol, y finalmente disuelto con 5 µl de agua destilada

La sintesis de ADN tipo H3 que codifica una cadena de polipeptido comprende una secuencia de señal de secrecion, una región variable de la cadena pesada TRA-8 humanizada y los residuos de aminoácido 8 en el terminal N de la región IgG-Ch1 se lleva a cabo usando una combinación de PCR respectivamente

El fragmento de ADN tipo H3 es preparado como sigue

Composición de la solución de reacción PCR

Oligonucleótido A, 10 pmol,

Oligonucleótido B, 10 pmol,

Oligonucleótido C, 10 pmol,

Oligonucleótido D, 10 pmol,

Oligonucleótido E2, 10 pmol,

Oligonucleótido F, 10 pmol,

Oligonucleótido G, 10 pmol,

Oligonucleótido H, 10 pmol,

Oligonucleótido I, 10 pmol,

Oligonucleótido J, 10 pmol,

Oligonucleotido K2, 10 pmol,

Oligonucleótido L, 10 pmol,

Oligonucleótido Iniciador P1, 2 µM

Oligonucleótido Iniciador P2, 2 µM

10 X solución Pyrobest II, 10 µl,

Mezcla dNTP, 8 µl,

Polimerasa ADN pirobest, 0,5 µl, y

Agua redestilada a un volumen final de 10 µl

La reacción PCR es conducida como sigue La solución se caliente primero a 94° C durante 5 minutos, después de lo cual un ciclo de calentamiento a 98° durante 10 segundos, 55° C durante 30 segundos, y 72° C durante 1 minuto, se repite siete veces Después de completar este procedimiento, la solución de reacción es calentada a 72° C durante 15 minutos

Despues de extraccion de fenol y precipitación de etanol, el precipitado ADN resultante es secado en vacío, disuelto en un mínimo de agua redestilada, y separado por electroforesis de gel de agarosa al 3% Luego de la electroforesis, el gel es marcado con una solucion acuosa de 1 µg/ml de bromuro de etidio para permitir la detección del ADN bajo luz ultravioleta Las bandas de ADN correspondientes a ADN tipo H3 se cortan usando una cuchilla de afeitar y eluyendo a partir del gel usando el kit Geneclean Spin Despues de la extracción con fenol, el ADN eluido es entonces concentrado por centrifugación a 7500 x g, seguido por la precipitación con etanol, y finalmente disuelto con 5 µl de agua destilada

La síntesis de ADN tipo H4 que codifica una cadena de polipéptido comprende una secuencia de señal de secreción, una region variable de la cadena pesada TRA-8 humanizada y los residuos de aminoácido 8 en el terminal N de la region IgG-CH1 se lleva a cabo usando una combinación de PCR respectivamente

El fragmento de ADN tipo H4 es preparado como sigue

Composición de la solución de reacción PCR

Oligonucleótido A, 10 pmol,

Oligonucleotido B, 10 pmol,

Oligonucleótido C2, 10 pmol,

Oligonucleotido D, 10 pmol,

Oligonucleotido E2, 10 pmol,

Oligonucleotido F, 10 pmol,

Oligonucleótido G, 10 pmol,

Oligonucleótido H, 10 pmol,

Oligonucleotido I2, 10 pmol,

Oligonucleotido J, 10 pmol,

Oligonucleótido K, 10 pmol,

Oligonucleótido G2, 10 pmol,

Oligonucleótido L, 10 pmol,

Oligonucleótido imprimador P1, 2 µM

Oligonucleótido imprimador P2, 2 µM

10 X carga Pyrobest II, 10 µl,

Mezcla dNTP, 8 µl,

Polimerasa ADN pirobest, 0,5 µl, y

Agua redestilada a un volumen final de 50 µl

La reaccion PCR es conducida como sigue La solución se caliente primero a 94° C durante 5 minutos, después de lo cual un ciclo de calentamiento a 98° durante 10 segundos, 55° C durante 30 segundos y 72° C durante 1 minuto, se repite siete veces Despues de completar este procedimiento, la solución de reaccion es calentada a 72° C durante 15 minutos

Después de extraccion de fenol y precipitacion de etanol, el precipitado ADN resultante es secado en vacío, disuelto en un mínimo de agua redestilada, y separado por electroforesis de gel de agarosa al 3% Luego de la electroforesis, el gel es marcado con una solucion acuosa de 1 µg/ml de bromuro de etidio para permitir la deteccion del ADN bajo luz ultravioleta Las bandas de ADN correspondientes al tipo H4-ADN se cortan usando una

cuchilla de afeitar y eluyendo a partir del gel usando el kit Geneclean Spin Despues de la extracción con fenol, el ADN eluido es entonces concentrado por centrifugación a 7500 x g, seguido por la precipitación con etanol, y finalmente disuelto con 5 µl de agua destilada

La síntesis de ADN tipo M que codifica una cadena de polipéptido comprende una secuencia de señal de secreción, una región variable de la cadena pesada TRA-8 quimérica y los residuos de aminoácido 8 en el terminal N de la región IgG-CH1 se lleva a cabo usando una combinación de PCR respectivamente

El fragmento de ADN tipo M es preparado como sigue

Composición de la solucion de reacción PCR

Oligonucleótido A, 10 pmol,
Oligonucleótido B3, 10 pmol,
Oligonucleótido C2, 10 pmol,
Oligonucleótido D, 10 pmol,
Oligonucleotido E3, 10 pmol,
Oligonucleótido F2, 10 pmol,

Oligonucleótido G, 10 pmol,

Oligonucleotido H3, 10 pmol,

Oligonucleótido I2, 10 pmol,

Oligonucleótido J, 10 pmol,

Oligonucleótido K3, 10 pmol,

Oligonucleótido L2, 10 pmol,

Oligonucleótido Iniciador P1, 2 µM

Oligonucleótido Iniciador P2, 2 µM

10 X carga Pyrobest II, 10 µl,

Mezcla dNTP, 8 µl,

Polimerasa ADN pirobest, 0,5 µl, y

Agua redestilada a un volumen final de 50 µl

La reacción PCR es conducida como sigue La solución se caliente primero a 94° C durante 5 minutos, después de lo cual un ciclo de calentamiento a 98° durante 10 segundos, 55° C durante 30 segundos, y 72° C durante 1 minuto, se repite siete veces Después de completar este procedimiento, la solución de reacción es calentada a 72° C durante 15 minutos

Después de extracción de fenol y precipitacion de etanol, el precipitado ADN resultante es secado en vacío,

disuelto en un mínimo de agua redestilada, y separado por electroforesis de gel de agarosa al 3% Luego de la electroforesis, el gel es marcado con una solución acuosa de 1 µg/ml de bromuro de etidio para permitir la detección del ADN bajo luz ultravioleta Las bandas de ADN correspondientes al tipo M se cortan usando una cuchilla de afeitar y eluyendo a partir del gel usando el kit Geneclean Spin Despues de la extracción con fenol, el ADN eluido es entonces concentrado por centrifugación a 7500 x g, seguido por la precipitación con etanol, y finalmente disuelto con 5 µl de agua destilada

El resultado, cada ADN extraido tipo (H1, tipo H3, tipo H4 y tipo M) es clonado usando un vector pGEM-T fácil (Promega) somo sigue

El fragmento de ADN recuperado de la rescción PCR (H1, H3, H4 o M), 5 µl,

10 X carga de polimerasa Taq, 1 µl,

Mezcla dNTP, 1 µl,

Polimeraza Taq (5 unidades/ml), 1 µl, y

Agua redestilada hasta un volumen final de 10 µl

Después de lo anterior cada solucion se hace reaccionar a 70° C durante 30 minutos, cada solucion de ADN y del vector Easy pGEM-T se ligan usando un kit de ligación de ADN versión 2 0 (Takara Shuzo Co , Ltd), usando el protocolo del fabricante

Luego de cuatro horas de incubación a 15° C, 2 µl de la solución de reacción incubada se mezcla con 100 µl de la sepa E coli competente JM109 a una densidad de celulas de 1 a 2 x 10^8 celulas/ml (Takara Shuzo Co , Ltd), y la mezcla se mantiene sobre hielo durante treinta minutos, luego a 42° C durante 30 segundos y nuevamente sobre hielo durante un minuto Entonces, 500 µl de un medio SOC (2% v/v de triptona, 0,5% p/v de extracto de levadura, 0,05% p/v de cloruro de sodio, 2,5 mm p/v de cloruro de potasio, 1 mm de cloruro de magnesio, y 20 mm de glucosa) se agrega a la mezcla, la cual es incubada por una hora adicional, con agitación Las sepas transformantes son entonces aisladas, y el ADN del plásmido es preparado a partir de las sepas como se describió en "Molecular Cloning A Laboratory Manual" La secuencia de nucleótido de este ADN que codifica la

cadena pesada del TRA-8 humanizadoo de ratón es confirmado por le método de dideoxı, respectıvamente (Sanger, F S Eta al , (1977), Proc Natl Acad Scı USA, 74 5463 5467 usando el analızador de ADN 3700 ABI PRISM, Perkın Elmer Applied Biosystems, Japón)

El plásmıdo resultante es desıgnado como pHA15 (el plásmıdo que lleva el cADN que codıfıca la cadena pesada tıpo H1 del TRA-8 humanızado), el pHC10 (el plasmıdo que lleva el cADN que codıfıca en la cadena pesada tıpo H3 del TRA-8 humanızado), el pHD21 (el plasmıdo que lleva el cADN que codıfıca la cadena pesada tıpo H4 del TRA-8 humanızado), y el pM11 (el plasmıdo que lleva el cADN que codıfıca la cadena pesada del TRA-8 quımerıco) Las sepas de E coli transformantes que llevan estos plásmıdos, desıgnadas como JM109/pHA15, E coli, JM109/pHC10, E coli, JM109/pHD21, E coli y JM109/pM11 E coli fueron depositadas junto con el deposıtuto de organismos de patentes internacional, el Natıonal Institute of Advanced and Industrial Scıence and Technology, 1-1, Hıgashi 1 chome Tsukuba-shı, Ibarakı-ken, 305-5466, Japon en abrıl 20, 2001, de acuerdo con el tratado de Budapest para el depósıto de mıcroorganismos, y fue acordado darle el

número FERM BP-7555, FERM BP-7557, FERM BP-7558, y FERM BP-7559, respectivamente

(3) Construccion de plásmidos de expresión que llevan el ADN de la región variable de la cadena pesada de diversos tipos de TRA-8 humanizado o de ratón

El vector de expresión recombinante para células animales son construidos por la inserción del ADN que codifica el tipo H1 de la cadena pesada, tipo H3, y tipo H4 humanizado o tipo M quimérico del TRA-8 (clonado como se mencionó anteriormente,) como sigue

Un µg del ADN pSRαHH3 del plásmido clonado (solicitud de patente europea EP 0-909-816-A1) portaba la cadena pesada de la región variable del anticuerpo monoclonal anti-Fas HFE7A humanizado y la region constante IgG1 humana del ADN genómico, un vector de expresion para células de mamífero, es digerido con enzimas de restricción HindIII y ApaI, y separada por electroforesis de gel de agarosa al 3% Luego de la electroforesis, el gel es marcado con 1 µg/ml de una

solución acuosa de bromuro de etidio para permitir la detección de ADN bajo luz UV Las bandas del vector de ADN que contienen la región genómica de ADN constante IgG1 humana sin la región variable de la cadena pesada del HFE7A humanizada son cortadas usando cuchillas de afeitar y eluidas con gel usando el kit Geneclean Spin Después de la extracción por fenol, el ADN eluido es entonces concentrado por centrifugacion a 7500 x g, seguido por precipitación con etanol, y finalmente disuelto en 5 µl de agua destilada y luego desfosforilada usando CIP El plásmido desfosforilado y digerido resultante (100 ng) es ligado con 1 µg del fragmento de ADN del pHA15, pHC10, pHD21, o pM11 que contienen el ADN que codifica la región variable de la cadena pesada del TRA-8 humanizado o quimérico, que también había sido digerido con HindIII y ApaI, usando la versión 2 0 del kit de ligación de ADN (Takara Shuzo Co , Ltd) La mezcla de ligación es entonces usada para transformar el JM109 de E coli, el cual es plateado sobre placas de agar que contienen 50 µg/ml de ampicilina

Los transformantes obtenidos por este método son cultivados en 2 ml de medio LB líquido que contiene 5

μg/ml de ampicilina a 37° C durante la noche, y el ADN del plásmido es subsecuentemente extraído del cultivo resultante por el método alcalino-SDS

El plásmido de ADN extraído es digerido con HindIII y ApaI, y sometido electroforesis de gel de agarosa al 3% p/v para confirmar la presencia o ausencia del inserto de ADN que codifica la región variable de la cadena pesada del TRA-8 humanizado o quimérico La inserción y orientación del fragmento de ADN deseado en el vector queda confirmado por el secuenciamiento de ADN usando un analizador de secuencia de genes (ABI Prism 3700 DNA Analizer, Applied Biosystems) Los plásmidos de expresión resultantes que llevan el cADN que codifica la cadena pesada del TRA-8 humanizado o quimérico fueron designados pHA15-1, pHC10-3, pHD21-1 y pM-11-1, respectivamente

(4) Construcción de vectores para las cadenas livianas humanizadas

(4 1) Construcción de un vector de expresion para la cadena liviana del anticuerpo humanizado (tipo LM1)

Como se muestra en la SEC ID No 72 de la lista de secuencias, otra humanización (tipo LM1) de las secuencias de aminoácido de la cadena liviana del anticuerpo DR5 antihumano TRA-8 del ratón conlleva el reemplazo del tercer aminoácido (valina), el 8vo aminoácido (histidina), el 9no aminoácido (licina), el 10mo aminoácido (fenilalanina), 11avo aminoacido (metionina), 13avo aminoácido (treonina), el 20avo aminoácido (cerina), el 42avo aminoácido (glutamina), el 43avo aminoácido (cerina), el 60avo aminoácido (ácido aspártico), el 63avo aminoácido (treonira), el 77avo aminoácido (asparagina), el 78avo aminoacido (valina), el 80avo aminoácido (cerina), el 83avo aminoácido (leucina), el 85avo aminoácido (ácido aspartico), el 87avo aminoacido (fenilalanina), y el 99avo aminoácido (glicina), el 103a aminoácido (leucina), y el 108avo aminoácido (alanina), proveniente del N-terminal de la secuencia de aminoácico de la cadena liviana de TRA-8 son reemplazados con glutamina, prolina, serina, serina, leucina, alanina, treonina, lisina, alanina, serina, serina, serina, leucina, prolina, fenilalanina, treonina, tirosina, glutamina, valina y treonina, respectivamente La secuencia resultante se designa LM1

Los plásmidos de expresión que llevan este tipo de secuencias de aminoácido de cadena liviana humanizada del anticuerpo DR5 antihumano del TRA-8 (tipo LM1, SEC ID No 72 de la lista de secuencias) se construyen como sigue

1) síntesis de cebadores para la preparación de las regiones variable y constante de la cadena liviana del TRA-8 humanizado (tipo LM1)

La codificación del ADN para la cadena de polipeptido LM1 (SEC ID No 72 de la lista de secuencias), cada una de las cuales es una fusion de la region variable del anticuerpo anti-DR5 humanizado del TRA-8 de cadena liviana (tipo LM1) y la región constante de la cadena liviana Ig humana (cadena K), son respectivamente sintetizados usando combinaciones de PCR

Adicionalmente a 7AL1P (SEC ID No 47), 7ALCN (SEC ID No 48), HKCDF11 (SEC ID No 50), HKCDR12 (SEC ID No 51), HKCDF22 (SEC ID No 52), HKCDR22 (SEC ID No 53), y HKCF12 (SEC ID No 54)

Los siguientes cebadores de oligonucleótido son sintetizados por PCR

5 - gtcccccaca gatgcagaca aagaacttgg agattgggtc atctgaatgt caccagtgga -3'

(HKSPR12, (SEC ID No 77)

2) Construcción del plásmido pCR3 1/LM1-2 (clonación de la cadena liviana del TRA-8 humanizado tipo LM1)

El fragmento LM1-ADN que codifica la secuencia de aminoácido como se dfinió en la SEC ID No 72 del mismo se preparó llevando a cabo 2 etapas PCR insertadas dentro de un vector plásmido y clonando en el E coli

a) primera etapa de PCR

El fragmento de ADN del LM1-F1 que codifica para una secuencia de señal de secreción y una porción de la región FRL_1 con una enzima de restricción HindIII en un sitio de escisión agregado al extremo 5' es preparado bajo las siguientes condiciones En los plásmidos de plantilla, pHSGHM17 y pSRPDHH, son obtenidos siguiendo la descripción en una solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1

Composicion de la solución de reaccion

ADN del Plasmido pHSGHM17, 25 ng

Iniciador oligonucleótido 7AL1P, 50 pmol

Iniciador oligonucleotido HKSPR12, 50 pmol

Cóctel dNTPs, 5 µl

Solucion 10xPCR, 5 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq (Perkin Elmer), 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la anterior composición es ajustada a un volumen final de 50 µl agregando agua redestilada y usada en PCR

Condiciones termicas del PCR calentamiento 94° C durarte dos minutos, despues de lo cual se repite un ciclo térmico de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, repetido 30 veces, seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos

El fragmento de LM1-F2-ADN que codifica para una porción del FRL_1, $CDRL_1$, FRL_2, y $CDRL_2$ se prepara bajo las siguientes condiciones

Composición de la solución de reacción

ADN pL28 de plásmido, 25 ng

Iniciador de oligonucleótido HKCDF11, 50 pmol

Iniciador de oligonucleótido HKCDR12, 50 pmol

Cóctel dNTPs, 5 µl

Solucion 10 X PCR, 5 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta al volumen final de 50 µl al agregar agua redestilada y utilizarla en PCR

Condiciones termicas PCR calentamiento a 94° C durante dos minutos, después de lo cual se repite un ciclo térmico 30 veces de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, seguido por el calentamiento a 72° C durante 10 minutos

El fragmento de LM2-FR-ADN que codifica para el $CDRL_2$, y FRL_3, y una porción del $CDRL_3$ se preparan bajo las siguientes condiciones

Composición de la solucion de reaccion

ADN pSRPDHH de plásmido 25 ng

Iniciador de oligonucleótido HKCDF22, 50 pmol

Iniciador de oligonucleótido HKCDR22, 50 pmol

Cóctel dNTPs, 5 µl

Solución 10 X PCR, 5 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solucion de reacción que tiene la anterior composición es ajustada a un volumen final de 50 µl agregando agua redestilada y usado en PCR

Condiciones térmicas del PCR calentamiento a 94° C durante dos minutos, después de los cual se repite un ciclo térmico de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, repetido treinta veces, seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos

El fragmento de LM2-F4-ADN que codifica para una porción del $CDRL_3$, FRL_4, y la región constante con un sitio de escisión de enzima de restriccion EcoR I agregado en el extremo 3' es preparado bajo las siguientes condiciones

Composición de la solución de reacción

ADN pSRPDHH de plasmido, 25 ng

Iniciador de oligonucleótido HKCDF12, 50 pmol

Iniciador de oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol

Coctel dNTPs, 5 µl

Solución 10 X PCR, 5 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta al volumen final de 50 µl al agregar agua redestilada y utilizarla en PCR

Condiciones térmicas PCR calentamiento a 94° C durante dos minutos, despues de lo cual se repite un ciclo térmico 30 veces de 94° C durante un minuto, 55° C

durante un minuto y 72° C durante dos minutos, seguido por el calentamiento a 72° C durante 10 minutos

Los fragmentos de ADN aplicado despues de PCR son separados por electroforesis de gel de acrilamida al 5% El gel después de la electroforesis es marcado con 1µl/ml de bromuro de etidio para detectar el ADN producido bajo luz UV Las bandas de ADN respectivas así detectadas son cortadas con una cuchilla

b) segunda etapa PCR

ADN-LM1 en los cuales se describe anteriromente los fragmentos de LM1-F1-ADN, LM1-F2-ADN, LM1-F3ADN y LM1-F4-ADN son fusionados se prepara bajo las siguientes condiciones

Composicion de la solución de reacción

Fragmento de gel de LM1-F1-ADN preparado en la primera etapa PCR,

Fragmento de gel de LM1-F2-ADN preparado en la primera etapa PCR,

Fragmento de gel de LM1-F3-ADN preparado en la primera etapa PCR,

Fragmento de gel de LM1-F4-ADN preparado en la primera etapa PCR,

Iniciador de oligonucleótido 7AL1P, 50 pmol

Iniciador de oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol

Cóctel dNTPs, 5,0 µl

Solución 10 X PCR, 5,0 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la anterior composición se ajusta a un volumen final de µl agregando agua redestilada y usada en PCR

Las condiciones térmicas del PCR calentamiento a 94° C durante dos minutos, después de lo cual se repite un ciclo térmico 30 veces de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, seguido por el calentamiento a 72° C durante 10 minutos

Los fragmentos de LM1-ADN así preparado insertado en el plasmido pCR3 1ADN usando el kit de clonación eucariótico TA (in vitro gen) siguiendo el protocolo del

fabricante e introducido en el TOP10F' del E coli competente contenido en el kit Las secuencias de nucleótido de estos ADN que codifican la cadena liviana del TRA-8 humanizado (tipo LM1) son confirmadas por el método dideoxi (Sanger, F S , et al , (1977), Proc Natl Acad Sci USA, 74 5463-5467) utilizando un analizador de ADN 3700 (ABI PRISM, Perkin Elmer Applied Biosystems, Japón)

Los plásmidos resultantes son designados pCR3 1/LM1-2 (el plasmido que lleva el cADN que codifica la cadena liviana de la región variable del TRA-8 humanizado (tipo LM1) y un Ig humano de región constante de cadena liviana)

El plásmido obtenido pCR3 1/LM1-2 contiene el fragmento de LM1-ADN es digerido con las enzimas de restriccion HindIII y EcoR I

Un µg del plásmido de clonacion del ADN pHSG399 es digerido con las enzimas de restricción HindIII y EcoR I, y luego desfosforilado con CIP EL ADN Phsg399 desfosforilizado resultante y el fragmento de LM1-ADN,

que han sido digeridos con las enzimas de restricción HindIII y EcoR I, son ligados bajo la versión 2 0 del kit de ligado de ADN (Takara Shyuzo Co , Ltd) Luego el DH5α del E coli es transformado con el ADN ligado y distribuido en un medio de agar LB que contiene 0,1 mM de IPTG, 0,1% de X-Gal y 50 µg/ml de cloramfenicol (concentraciones finales) Los transformantes blancos obtenidos son cultivados en un medio liquido de LB que contiene 50 µg/ml de cloramfenicol, y el ADN del plásmido es extraído del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS El ADN del plásmido es digerido con HindIII y EcoR I y luego un clon que lleva el fragmento de LM1-ADN se selecciona por electroforesis de gel de agarosa al 1%

Como resultado del procedimiento anterior, el plasmido pHSG/M1-2-2 lleva un fragmento de fusión de la región variable de la cadena liviana de TRA-8 LM1 humanizado y la región constante de la cadena Igk se obtiene La sepa E coli transformante que produce estos plásmidos, designada como E coli DH5α/pHSG/M1-2-2 fue depositada con el depositario de organismos de patente internacional, National Institue of Advanced Industrial

Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japón en abril 20, 2001, de acuerdo con el tratado de Budapest para el depósito de microorganismos, y se acordó el número de acceso FERM BP-7562

3) Construcción del plásmido pSR/LM1-2 (plásmido de expresión para la cadena liviana del TRA-8 LM2 humanizado)

El plásmido obtenido pHSG/M1-2-2 obtenido que lleva un fragmento de la fusión de la región variable de la cadena liviana TRA-8 LM1 humanizada y la región constante de la cadena Igk humana se digiere con las enzimas de restricción HindIII y EcoR I

Un µg del ADN pSRPDHH del plásmido clonado (solicitud de patente europea EP 0-909-816-A1) se digiere con las enzimas de restriccion HindIII y EcoR I, luego se desfosforiliza con CIP El ADN pSRPDHH desfosforilizado resultante y el fragmento de ADN HindIII-EcoR I, obtenido del pHSG/M1-2-2 se ligan utilizando un kit de ligado de ADN versión 2 0 (Takara Syuzo, Co Ltd) Entonces, el E

881

Coli DH5α se transforma con el ADN ligado y se esparce sobre el agar LB Los transformantes obtenidos se cultivan en un medio LB líquido que contiene 100 µg/ml de ampicilina, y de ADN de plasmido y se extraen del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS La inserción y orientacion del fragmento de ADN deseado en el vector pSRPDHH se confirma mediante la secuenciación de ADN utilizando un analizador de secuencia de genes

El plásmido de expresión resultante que lleva el cADN que codifica la cadena liviana del LM1 TRA-8 humanizado se designó pSR/LM1-2

(4 2) Construcción de un vector de expresión para la cadena liviana del anticuerpo humanizado (LM3)

Como se muestra en la SEC ID No 73 de la lista de secuencias, otras de las secuencias de aminoácido de humanización (tipo LM3) de la cadena liviana del anticuerpo DR5 antihumano de ratón TRA-8 ocasionaron reemplazo del 8vo aminoácido (histidina), 9no aminoácido (licina), el 10mo aminoácido (fenilalanina), el 11ª aminoácido (metionina), el 13$^{a/o}$ aminoácido (treonina), el

20^{avo} aminoácido (serina), el 42^{avo} aminoácido (glutamina), el 43^{avo} aminoácido (serina), el 77^{avo} aminoácido (asparagina), el 78^{avo} aminoacido (valina), el 80^{avo} aminoácido (serina), el 83^{avo} aminoacido (leucina), el 85^{avo} aminoacido (ácido aspártico), el 87^{avo} aminoácido (fenilalanina), el 99^{avo} aminoacido (glicina), el 103^{avo} aminoácido (leucina), y 108^{avo} aminoácido (alanina) a partir del terminal N de la secuencia de aminoácido de la cadena liviana del TRA-8 son reemplazados con prolina, serina, serina, leucina, alanina, trionina, licina, alanina, serina, leucina, prolina, fenilalanina, treonina, tirosina, glutamina, valina, y treonina, respectivamente Las secuencias resultantes se designa como LM3

Los plásmidos de expresión que llevan este tipo de secuencias de aminoácido de cadena liviana humanizada del anticuerpo antinumano DR5 del TRA-8 (tipo LM3, SEC ID No 73 del listado de secuencias) es construido como sigue

1) síntesis de los iniciadores para preparar las regiones variable y constante de la cadena liviana del LM3 humanizado del TRA-8

El ADN que codifica para la cadena de polipéptido LM3 (SEC ID No 73 del listado de secuencias), cada uno de los cuales es una fusión de la región variable del anticuerpo anti-DR5 humanizado del TRA-8 de cadena liviana y la región constante de la cadena liviana del Ig humano (cadena K), son sintetizados respectivamente usando combinaciones de PCR

Adicionalmente al 7AL1P (SEC ID No 47) y 7ALCN (SEC ID No 48), los siguientes iniciadores de oligonucleótido son sintetizados para PCR

5'- atctagttct cagagatgga gacagacaca atcctgctat gggtgctgct gctctgggtt ccagg

3' (MOD1F1, SEC ID No 78),

5 cagcacccat agcaggattg tgtctgtctc catctctgag aactagatga gaggatgctt cttaagctt 3 (MOD1R1, SEQ ID No 79)

5 ctccactggt gacattgtga tgacccaatc tccaagttct ttgtctgcat ctgtgggggg cagggtc 3' (MOD1F22, SEQ ID No 80)

5 acttggagat tgggtcatca caatgtcacc agtggagcct ggaacccaga gcag-3 (MOD1R22, SEQ ID No 81),

5'-accatcacct gcaaggccag tcaggatgtg ggtactgctg tagcctggta ccaacagaaa ccaggaa -3' (MOD1F3, SEQ ID No 82),

5 - tacagcagta cccacatcct gactggcctt gcaggtgatg gtgaccctgt ccccacaga tgcagacaaa ga -3' (MOD1R3 SEQ ID No 83),

5'- aagcacccaa actcctcatc tattgggcat ccacccggca cactggggtc ccagataggt ttacaggcag t -3 (MOD1F42, SEQ ID No 84)

5 cccagtgtgc cgggtggatg cccaatagat gaggagtttg ggtgcttttc ctggtttctg ttggtaccag gc -3' (MOD1R4, SEQ ID No 85),

5 - gggtctggga cagacttcac cctcaccatc tctagtctgc agccggagga ttttgcaacc tat -3'(MOD1F5, SEQ ID No 86),

5 actagagatg gtgagggtga agtctgtccc agacccactg cctgtaaacc tatctgggac -3' (MOD1R52, SEQ ID No 87),

5 tactgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttcggtcaag gcaccaaggt ggaaatc -3' (MOD1F6, SEQ ID No 88),

5 cgtccgatag ctgctatatt gctgacagta ataggttgca aaatcctccg gctgcac -3 (MOD1R6, SEQ ID No 89)

5 aaacggactg tggctgcacc atctgtcttc atcttcccgc catctgatga g -3' (MOD1F7 SEQ ID No 90),

5 - gaagatgaag acagatggtg cagccacagt ccgttttgatt tccaccttgg tgccttgacc gaa -3 (MOD1R7, SEQ ID No 91), and

5' agatttcaac tgctcatcag atggcgggaa (LR17, SEQ ID No 101)

2) Construcción de plásmido pCR3 1/LM3-3-44 (clonación del tipo LM3 de cadena liviana del TRA-8 humanizado)

El fragmento de ADN LM3 que codifica para la secuencia de aminoácido como se definio en la SEC ID No 73 del mismo se prepara llevando a cabo dos etapas PCR, insertado en un vector de plásmido y clonado en E Coli

a) Primera etapa PCR

El fragmento de LM3-F31B-ADN que codifica para una señal de secreción de la región de secuencia con un sitio de escision de enzima de restricción HindIII agregado en el extremo 5' FRL_1, $DCRL_1$, FRL_2, y $CDRL_2$, FRL_3, $CDRL_3$, y FRL_4 y una porción de la region constante se preparan bajo las siguientes conduciones

Composición de la solución de reacción

Iniciador de oligonucleótido MOD1F1,5 pmol
Iniciador de oligonucleótido MOD1R1,5 pmol
Iniciador de oligonucleótido MOD1F22,5 pmol
Iniciador de oligonucleótido MOD1R22,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1F3,5 pmol

Iniciador de oligonucleotido MOD1R3,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1F42,5 pmol

Iniciador de oligonucleotido MOD1R4,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1F5,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1R52,5 pmol

Iniciador de oligonucleotido MOD1F6,5 pmol

Iniciador de oligonucleotido MOD1R6,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1F7,50 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1R7,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido 7AL1P,50 pmol

Iniciador de oligonucleótido LR17,50 pmol

Coctel dNTPs, 5,0 µl

Solución 10 X PCR, 5,0 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la anterior composición es ajustada a un volumen final de 50 µl agregando agua redestilada y usada en PCR

Condiciones térmicas del PCR calentamiento 94° C durante dos minutos, después de lo cual se repite un ciclo termico de 94° C durante un minuto, 55° C durante

un minuto y 72° C durante dos minutos, repetido 30 veces, seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos

El fragmento de LM3-F31C-ADN que codifica para una porción de la región constante con un sitio de escision de enzima de restricción EcoR I agregado en el extremo 3' preparado bajo las siguientes condiciones

Los plásmidos de plantilla pSRPDHH, es obtenido siguiendo la descripción en una solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1

Composición de la solución de reacción

Plasmido pDRPDHH ADN, 25 ng

Iniciador de oligonucleótido MOD1F7,50 pmol

Iniciador de oligonucleotido 7ALCN,50 pmol

Coctel dNTPs, 5,0 µl

Solución 10 X PCR, 5,0 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl al agregar agua redestilada y utilizarla en el PCR

Las condiciones térmicas del PCR calentamiento 94° C durante dos minutos, después de lo cual se repite un ciclo térmico de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, repetido 30 veces seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos

Los fragmentos de ADN amplificados después del PCR son separados por electroforesis del gel de poliacrilamida al 5% El gel después de la electroforesis es marcado con 1 µg/ml de bromuro de etidio para detectar el ADN producido bajo luz UV Las bandas de ADN respectivas así detectadas son cortadas con una cuchilla

b) segunda etapa PCR

El LM3-ADN en el cual se escribio anteriormente los fragmentos LM3-F31B-ADN, y LM3-F31C-ADN son fusionados se preparan bajo las siguientes condiciones

Composición de la solución de reacción

Fragmento de gel de LM3-F31B-ADN preparado en el PCR de primera etapa,

Fragmento de gel de LM2-F31C-ADN preparado en el PCR de primera etapa,

Iniciador de oligonucleótido 7AL1P, 50 pmol

Iniciador de oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol

Cóctel dNTPs, 5,0 µl

Solución 10 X PCR, 5,0 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solucion de reaccion que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl al agregar agua redestilada y utilizarla en PCR

Condiciones termicas PCR calentamiento a 94° C durante dos minutos, después de lo cual se repite un ciclo térmico 30 veces de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, seguido por el calentamiento a 72° C durante 10 minutos

El fragmento LM3-ADN preparado así se inserta en el PCR 3,1 ADN de plásmido usando un kit de clonación Eukariotic TA (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante e introducido en el E Coli TOP10F' competente contenido en el kit Las secuencias de nucleótido de estos ADN que codifican la cadena liviana del TRA-8 humanizado se confirman mediante el método dideoxi (Sanger, F S , et al , (1977), Proc Natl Acad Sci USA, 74 5463-5467) utilizando un analizador de ADN 3700 (ABI PRISM, Perkin Elmer Applied Biosystems, Japon)

Los plásmidos resultantes se designan pCR3,1/LM3-3-44 (el plasmido que lleva el cADN que codifica la región variable de cadena liviana del LM3 TRA-8 humanizado y una región constante de cadena liviana Ig humano)

El plásmido obtenido PCR3 1/LM3-3-44 que contiene el fragmento LM3-ADN es digerido con las enzimas de restricción HindIII y EcoR I

Un µg de ADN pHSG399 de plásmido de clonación se digiere con las enzimas de restricción HindIII y EcoR I, y luego desfosforilizada con CIP El ADN pHSG399

desfosforilizado resultante y el fragmento LM3-ADN, que se ha digerido con las enzimas de restriccion HindIII y EcoR I, son ligadas utilizando el kit de ligación de ADN versión 2 0 (Takara Shyuzo, Co Ltd) Luego la E Coli DH5α se transforma con el ADN ligado y esparcido sobre el medio de agar LB que contiene 0,1 mm de IPTG, 0,1% de X-Gal y 50 µg/ml de cloramfenicol (concentraciones finales) Los transformantes blancos obtenidos se cultivan en medio LB líquido que contiene 50 µg/ml de cloramfenicol, y ADN de plasmido se extrae del cultivo resultante de acuerdo con el metodo alcalino-SDS El ADN de plásmido extraido se digiere con HindIII y EcoR I, y luego un clon que lleva el fragmento LM3-ADN se selecciona mediante electroforesis de gel de agarosa al 1%

Como resultado del procedimiento anterior, el plásmido pHSG/M3-3-22 que lleva un fragmento de fusion de la región variable de la cadena liviana del TRA-8 LM3 humanizado y la region constante de la cadena Igk humana se obtiene La sepa E coli transformante que guarda estos plásmidos, designada como E coli DH5α/pHSG/M3-3-22 se depositó con el depósito de organismos para patentes

internacionales, National Institue of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japón en abril 20, 2001, de acuerdo con el tratado de Budapest para el deposito de microorganismos, y se acordo el número de acceso FERM BP-7564

3) Construcción del plásmido pSR/LM3-3-44-10 (plásmido de expresion para la cadena liviana del TRA-8 LM3 humanizado)

El plásmido obtenido pHSG/M3-3-22 que lleva un fragmento de la fusion de la region variable de la cadena liviana TRA-8 LM3 humanizada y la region constante de la cadena Igκ humana se digiere con las enzimas de restricción HindIII y EcoR I

Un µg del ADN pSRPDHH del plásmido clonado (solicitud de patente europea EP 0-909-816-A1) se digiere con las enzimas de restricción HindIII y EcoR I, luego se desfosforiliza con CIP El ADN pSRPDHH desfosforilizado resultante y el fragmento de ADN HindIII-EcoR I, obtenido

del pHSG/M3-3-22 se ligan utilizando un kit de ligado de ADN versión 2 0 (Takara Shyuzo, Co Ltd) Entonces, el E Coli DH5α se transforma con el ADN ligado y se esparce sobre el agar LB Los transformantes obtenidos se cultivan en un medio LB líquido que contiene 100 µg/ml de ampicilina, y de ADN de plásmido se extrae del cultivo resultante de acuerdo con el metodo alcalino-SDS La inserción y orientación del fragmento de ADN deseado en el vector pSRPDHH se confirma mediante la secuenciacion de ADN utilizando un analizador de secuencia de gen (analizador de ADN ABI Prism 3700, Applied Biosystems)

El plásmido de expresion resultante que lleva el cADN que codifica la cadena liviana del LM3 TRA-8 humanizado se designó pSR/LM3-3-44-10

(4 3) Construcción de un vector de expresión para la cadena liviana del anticuerpo humanizado (tipo LM4)

Como se muestra en la SEC ID No 74 de la lista de secuencias, otras humanizacion de las secuencias de aminoácido (tipo LM4) de la cadena liviana del anticuerpo DR5 antihumano de ratón TRA-8 fabricado reemplaza el 8th

aminoácido (histidina), 9no aminoácido (glicina), 10mo aminoacido (fenilalanina), 11avo aminoacido (metionina), 13avo aminoácido (treonina), 20avo aminoacido (cerina), el 42avo aminoácido (glutamina), 43avo aminoácido (cerina), 77avo aminoácido (asparagina), 78avo aminoácido (valina), 80avo aminoacido (cerina), 83avo aminoácido (leucina), 85avo aminoacido (acido aspártico), 99avo aminoácido (glicina), 103avo aminoácido (leucina), y 108avo aminoácido (alanina), proveniente del N-terminal de la secuencia de aminoacido de la cadena liviana de TRA-8 son reemplazados con prolina, serina, serina, leucina, alanina, treonina, lisina, alanina, serina, leucina, prolina, fenilalanina, treonina, glutamina, valina y treonina, respectivamente La secuencia resultante se designa LM4

Los plásmidos de expresión que llevan este tipo de secuencias de aminoácido de cadena liviana humanizada del anticuerpo DR5 antihumano TRA-8 se construyen (tipo LM4) (SEC ID No 74 del listado de secuencias) como sigue

1) Síntesis de los iniciadores para la preparacion de las regiones variable y constante de la cadena liviana de LM4 TRA-8 humanizado

La codificación del ADN para la cadena de polipéptido LM4 (secuencia ID No 74 de la lista de secuencias), cada uno de los cuales es una fusión de la region variable de la cadena liviana TRA-8 del anticuerpo anti-DR5 humanizado y la región constante de la cadena liviana Ig humana (cadena k), son respectivamente sintetizados al utilizar combinaciones de PCR

Adicional a

7AL1P (SEQ ID No 47), 7ALCN (SEQ ID No 48), MOD1F1 (SEQ ID No 78), MOD1R1 (SEQ ID No 79) MOD1F22 (SEQ ID No 80) MOD1R22 (SEQ ID No 81), MOD1F3 (SEQ ID No 82) MOD1R3 (SEQ ID No 83), MOD1F42 (SEQ ID No 84), MOD1R4 (SEQ ID No 85), MOD1F5 (SEQ ID No 86), MOD1R52 (SEQ ID No 87), MOD1F7 (SEQ ID No 90), y MOD1R7 (SEQ ID No 91), LR17 (SEQ ID No 101),

Los siguientes iniciadores de oligonucleótido se sintetizaron para PCR

5 ttctgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttcggtcaag gcaccaaggt ggaaatc -3
(MOD1F62 SEQ ID No 92)

5 - cgtccgatag ctgctatatt gctgacagaa ataggttgca aaatcctccg gctgcag -3
(MOD1R62 SEQ ID No 93)

2) Construcción del plásmido pCR3 1/LM4-5-3 (clonación de la cadena liviana TRA-8 humanizada tipo LM4)

El fragmento ADN-LM4-F41B que codifica para la secuencia de aminoácido como se definió en la SEC ID No 74 del mismo es preparado llevando a cabo dos etapas PCR, insertado en un vector de plásmido y clonado en E coli

a) PCR de primera etapa

El fragmento LM4-F41B-ADN que codifica para una secuencia de señal de secrecion y una porcion de la región con un sitio de escision de la enzima de restriccion HindIII agregada al extremo 5', FRL_1, CDRL1, FRL_2, y $CDRL_2$, FRL_3, $CDRL_3$, FRL_4 y una porcion de la región constante es preparado bajo las siguientes condiciones

Composición de la solución de reaccion

Iniciador de oligonucleotido MOD1F1,5 pmol
Iniciador de oligonucleotido MOD1R1,5 pmol
Iniciador de oligonucleótido MOD1F22,5 pmol
Iniciador de oligonucleótido MOD1R22,5 pmol
Iniciador de oligonucleótido MOD1F3,5 pmol
Iniciador de oligonucleótido MOD1R3,5 pmol
Iniciador de oligonucleótido MOD1F42,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1R4,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1F5,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1R52,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1F62,5 pmol

Iniciador de oligonucleotido MOD1R62,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1F7,50 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1R7,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido 7AL1P,50 pmol

Iniciador de oligonucleótido LR17,50 pmol

Cóctel dNTPs, 5,0 µl

Solucion 10 X PCR, 5,0 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solucion de reacción cue tiene la anterior composicion es ajustada a un volumen final de 50 µl agregando agua redestilada y usada en PCR

Condiciones térmicas del PCR calentamiento 94° C durante dos minutos, después de lo cual se repite un ciclo térmico de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, repetido 30 veces, seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos

El fragmento de LM4-F41C-ADN que codifica para una porcion de la región constante con un sitio de escision de enzima de restricción EcoR I agregado en el extremo 3' es preparado bajo las siguientes condiciones

Los, plásmidos de plantilla pSRPDHH, es obtenido siguiendo la descripción en una solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1

Composición de la solución de reacción

Plásmido pSRPDHH ADN, 25 ng

Iniciador de oligonucleótido MOD1F7,50 pmol

Iniciador de oligonucleótido 7ALCN,50 pmol

Cóctel dNTPs, 5,0 µl

Solución 10 X PCR, 5,0 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl al agregar agua redestilada y utilizarla en el PCR

Las condiciones térmicas del PCR calentamiento 94° C durante dos minutos, después de lo cual se repite un ciclo térmico de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, repetido 30 veces seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos

Los fragmentos de ADN amplificados después del PCR son separados por electroforesis del gel de poliacrilamida al 5% El gel después de la electroforesis es marcado con 1 µg/ml de bromuro de etidio para detectar el ADN producido bajo luz UV Las bandas de ADN respectivas así detectadas son cortadas con una cuchilla de afietar

b) segunda etapa PCR

El LM4-ADN en el cual se escribió anteriormente los fragmentos LM4-F41B-ADN, y LM4-F41C-ADN son fusionados se preparan bajo las siguientes condiciones

Composición de la solucion de reacción

Fragmento de gel de LM4-F41B-ADN preparado en el PCR de primera etapa,

Fragmento de gel de LM4-F41C-ADN preparado en el PCR de primera etapa,

Iniciador de oligonucleótido 7AL1P, 50 pmol

Iniciador de oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol

Coctel dNTPs, 5,0 µl

Solución 10 X PCR, 5,0 µl

Pòlimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl al agregar agua redestilada y utilizarla en PCR

Condiciones térmicas PCR calentamiento a 94° C durante dos minutos, después de lo cual se repite un ciclo térmico 30 veces de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, seguido por el calentamiento a 72° C durante 10 minutos

El fragmento LM4-ADN preparado así se inserta en el PCR 3,1 ADN de plasmido usando un kit de clonacion Eukariotic TA (Invitrogen) siguiendo el protocolo del

fabricante e introducido en el E Coli TOP10F' competente contenido en el kit Las secuencias de nucleótido de estos ADN que codifican la cadena liviana del LM4 TRA-8 humanizado se confirman mediante el metodo dideoxi (Sanger, F S , et al , (1977), Proc Natl Acad Sci USA, 74 5463-5467) utilizando un analizador de ADN 3700 (ABI PRISM, Perkin Elmer Applied Biosystems, Japón)

Los plásmidos resultantes se designan pCR3,1/LM4-5-3 (el plásmido que lleva el cADN que codifica la region variable de cadena liviana del LM4 TRA-8 humanizado y una region constante de cadena liviana Ig humano)

El plásmido obtenido PCR3 1/LM4-5-3 que contiene el fragmento LM4-ADN es digerido con las enzimas de restricción HindIII y EcoR I

Un µg de ADN pHSG399 de plasmido de clonación se digiere con las enzimas de restricción HindIII y EcoR I, y luego desfosforilizada con CIP El ADN pHSG399 desfosforilizado resultante y el fragmento LM4-ADN, que se ha digerido con las enzimas de restricción HindIII y EcoR I, son ligadas utilizando el kit de ligacion de ADN

versión 2 0 (Takara Shyuzo, Co Ltd) Luego la E Coli DH5α se transforma con el ADN ligado y esparcido sobre el medio de agar LB que contiene 0,1 mm de IPTG, 0,1% de X-Gal y 50 µg/ml de cloramfenicol (concentraciones finales) Los transformantes blancos obtenidos se cultivan en medio LB líquido que contiene 50 µg/ml de cloramfenicol, y ADN de plásmido se extrae del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS El ADN de plasmido extraído se digiere con HindIII y EcoR I, y luego un clon que lleva el fragmento LM4-ADN se selecciona mediante electroforesis de gel de agarosa al 1%

Como resultado del procedimiento anterior, el plásmido pHSG/M4-5-3-1 que lleva un fragmento de fusión de la región variable de la cadena liviana del TRA-8 LM4 humanizado y la región constante de la cadena Igk humana se obtiene La sepa E coli transformante que guarda estos plasmidos, designada como E coli DH5α/pHSG/M4-5-3-1 se depositó con el depósito de organismos para patentes internacionales, National Institue of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japón en abril 20, 2001, de

acuerdo con el tratado de Budapest para el depósito de microorganismos, y se acordo el número de acceso FERM BP-7565

3) Construcción del plasmido pSR/LM4-5-3-3 (plasmido de expresión para la cadena liviana del TRA-8 LM4 humanizado)

El plásmido obtenido pHSG/M4-5-3-1 que lleva un fragmento de la fusión de la región variable de la cadena liviana TRA-8 LM4 humanizada y la región constante de la cadena Igk humana se digiere con las enzimas de restricción HindIII y EcoR I

Un µg del ADN pSRPDHH del plásmido clonado (solicitud de patente europea EP 0-909-816-A1) se digiere con las enzimas de restriccion HindIII y EcoR I, luego se desfosforiliza con CIP El ADN pSRPDHH desfosforilizado resultante y el fragmento de ADN HindIII-EcoR I, obtenido del pHSG/M4-5-3-1 se ligan utilizando un kit de ligado de ADN versión 2 0 (Takara Shyuzo, Co Ltd) Entonces, el E Coli DH5α se transforma con el ADN ligado y se esparce sobre el agar LB Los transformantes obtenidos se

cultivan en un medio LB liquido que contiene 100 µg/ml de ampicilina, y el ADN de plásmido se extrae del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS La inserción y orientación del fragmento de ADN deseado en el vector pSRPDHH se confirma mediante la secuenciación de ADN utilizando un analizador de secuencia de gen (analizador de ADN ABI Prism 3700, Applied Biosystems)

El plasmido de expresión resultante que lleva el cADN que codifica la cadena liviana del LM4 TRA-8 humanizado se designó pSR/LM4-5-3-3

(4 4) Construcción de un vector de expresión para la cadena liviana del anticuerpo humanizaao (tipo LM5)

Como se muestra en la SEC ID No 75 de la lista de secuencias, otras humanización de las secuencias de aminoacido (tipo LM5) de la cadena liviana del anticuerpo DR5 antihumano de ratón TRA-8 fabricaao reemplaza el 8 aminoacido (histidina), 9no aminoacido (glicina), 10mo aminoácido (fenilalanina), 11^{avo} aminoácido (metionina), 13^{avo} aminoácido (treonina), 20^{avo} aminoácido (cerina), el 42^{avo} aminoácido (glutamina), 43^{avo} aminoacido (cerina),

77^{avo} aminoácido (asparagina), 78^{avo} aminoácido (valina), 80^{avo} aminoacido (cerina), 83^{avo} aminoácido (leucina), 103^{avo} aminoácido (leucina), y 108^{avo} aminoacido (alanina), proveniente del N-terminal de la secuencia de aminoacido de la cadena liviana de TRA-8 son reemplazados con prolina, serina, serina, leucina, alanina, treonina, lisina, alanina, serina, leucina, prolina, fenilalanina, valina y treonina, respectivamente La secuencia resultante se designa LM5

Los plásmidos de expresión que llevan este tipo de secuencias de aminoácido de cadena liviana humanizada del anticuerpo DR5 antihumano TRA-8 se construyen (tipo LM5) (SEC ID No 75 del listado de secuencias) como sigue

1) Síntesis de los iniciadores para la preparacior de las regiones variable y constante de la cadena liviana de LM5 TRA-8 humanizado

La codificación del ADN para la cadena de polipéptido LM5 (secuencia ID No 75 de la lista de secuencias), cada uno de los cuales es una fusión de la región variable de la cadena liviana TRA-8 del anticuerpo anti-DR5 humanizado y la región constante de la cadena

liviana Ig humana (cadena k), son respectivamente sintetizados al utilizar combinaciones de PCR

Adicionalmente a

7ALIP (SEQ ID No 47), 7ALCN (SEQ ID No 48), MOD1F1 (SEQ ID No 78), MOD1R1 (SEQ ID No 79) MOD1F22 (SEQ ID No 80) MOD1R22 (SEQ ID No 81), MOD1F3 (SEQ ID No 82), MOD1R3 (SEQ ID No 83), MOD1F42 (SEQ ID No 84), MOD1R4 (SEQ ID No 85) MOD1R52 (SEQ ID No 87), MOD1F7 (SEQ ID No 90), y LR17 (SEQ ID No 101),

Los siguientes iniciadores de oligonucleótidose sintetizaron para PCR

5'- gggtctggga cagacttcac cctcaccatc tctagtctgc agccggagga ttttgcagat tat -3'
(MOD1F52, SEQ ID No 94)

5'- ttctgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttcggtggag gcaccaaggt ggaaatc -3'
(MOD1F63, SEQ ID No 95)

5'- cgtccgatag ctgctatatt gctgacagaa ataatctgca aaatcctccg gctgcag -3'
(MOD1R63, SEQ ID No 96)

5 - gaagatgaag acagatggtg cagccacagt ccgtttgatt tccaccttgg tgccttccacc gaa-3
(MOD1R72, SEQ ID No 102)

2) Construcción del plásmido pCR3 1/LM5-3-42 (clonacion de la cadena liviana TRA-8 humanizada tipo LM5)

El fragmento ADN-LM5 que codifica para la secuencia de aminoácido como se definió en la SEC ID No 75 del mismo es preparado llevando a cabo dos etapas PCR, insertado en un vector de plásmido y clonado en E coli

a) PCR de primera etapa

El fragmento LM5-F51B-ADN que codifica para una secuencia de señal de secreción y una porcion de la región con un sitio de escision de la enzima de restriccion HindIII agregada al extremo 5', FRL_1, $CDRL_1$, FRL_2, y $CDRL_2$, FRL_3, $CDRL_3$, FRL_4 y una porción de la región constante es preparado bajo las siguientes condiciones

Composicion de la solución de reacción

Iniciador de oligonucleótido MOD1F1,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1R1,5 pmol

Iniciador de oligonucleotido MOD1F22,5 pmol

Iniciador de oligonucleotido MOD1R22,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1F3,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1R3,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1F42,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1R4,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1F52,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1R52,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1F63,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1R63,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1F7,50 pmol

Iniciador de oligonucleótido MOD1R72,5 pmol

Iniciador de oligonucleótido 7AL1P,50 pmol

Iniciador de oligonucleótido LR17,50 pmol

Cóctel dNTPs, 5,0 µl

Solución 10 X PCR, 5,0 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la anterior composición es ajustada a un volumen final de 50 µl agregando agua redestilada y usada en PCR

Condiciones termicas del PCR calentamiento a 94° C durante dos minutos, después de lo cual se repite un ciclo térmico de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, repetido 30 veces, seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos

El fragmento de LM5-F51C-ADN que codifica para una porción de la región constante con un sitio de escision de enzima de restricción EcoR I agregado en el extremo 3' es preparado bajo las siguientes condiciones

Los plásmidos de plantilla pSRPDHH, es obtenido siguiendo la descripción en una solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1

Composicion de la solucion de reacción

Plásmido pSRPDHH ADN, 25 ng

Iniciador de oligonucleótido MOD1F7,50 pmol

Iniciador de oligonucleótido 7ALCN,50 pmol

Cóctel dNTPs, 5,0 µl

Solución 10 X PCR, 5,0 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solucion de reacción que tiene la composicion anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl al agregar agua redestilada y utilizarla en el PCR

Las condiciones térmicas del PCR calentamiento a 94° C durante dos minutos, después de lo cual se repite un ciclo térmico de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, repetido 30 veces, seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos

Los fragmentos de ADN amplificados despues del PCR son separados por electroforesis del gel de poliacrilamida al 5% El gel después de la electroforesis es marcado con 1 µg/ml de bromuro de etidio para detectar el ADN producido bajo luz UV Las bandas de ADN respectivas así detectadas son cortadas con una cuchilla de afietar

b) segunda etapa PCR

El LM5-ADN en el cual se escribió anteriormente los fragmentos LM5-F51B-ADN, y LM5-F51C-ADN son fusionados se preparan bajo las siguientes condiciones

Composición de la solución de reacción

Fragmento de gel de LM5-F51B-ADN preparado en el PCR de primera etapa,

Fragmento de gel de LM5-F51C-ADN preparado en el PCR de primera etapa,

Iniciador de oligonucleótido 7AL1P, 50 pmol

Iniciador de oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol

Cóctel dNTPs, 5,0 µl

Solucion 10 X PCR, 5,0 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solucion de reaccion que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl al agregar agua redestilada y utilizarla en PCR

Condiciones termicas PCR calentamiento a 94° C durante dos minutos, después de lo cual se repite un ciclo termico 30 veces de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, seguido por el calentamiento a 72° C durante 10 minutos

El fragmento LM5-ADN preparado así se inserta en el pCR3,1 ADN de plásmido usando un kit de clonación Eukariotic TA (Invitrogen) siguiendo el protocolo del

fabricante e introducido en el E Coli TOP10F' competente contenido en el kit Las secuencias de nucleótido de estos ADN que codifican la cadena liviana del LM5 TRA-8 humanizado se confirman mediante el método dideoxi (Sanger, F S , et al , (1977), Proc Natl Acad Sci USA, 74 5463-5467) utilizando un analizador de ADN

Los plásmidos resultantes se designan pCR3,1/LM5-3-42 (el plásmido que lleva el cADN que codifica la región variable de cadena liviana del LM5 TRA-8 humanizado y una región constante de cadena liviana Ig humano)

El plásmido obtenido PCR3 1/LM5-3-42 que contiene el fragmento LM5-ADN es digerido con las enzimas de restriccion HindIII y EcoR I

Un µg de ADN pHSG399 de plásmido de clonación se digiere con las enzimas de restricción HindIII y EcoR I, y luego desfosforilizada con CIP El ADN pHSG399 desfosforilizado resultante y el fragmento LM5-ADN, que se ha digerido con las enzimas de restricción HindIII y EcoR I, son ligadas utilizando el kit de ligacion de ADN versión 2 0 (Takara Shyuzo, Col Ltd) Luego la E Coli

DH5α se transforma con el ADN ligado y esparcido sobre el medio de agar LB que contiene 0,1 mm de IPTG, 0,1% de X-Gal y 50 µg/ml de cloramfenicol (concentraciones finales) Los transformantes blancos obtenidos se cultivan en medio LB líquido que contiene 50 µg/ml de cloramfenicol, y ADN de plásmido se extrae del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS El ADN de plasmido extraído se digiere con HindIII y EcoR I, y luego un clon que lleva el fragmento LM2-ADN se selecciona mediante electroforesis de gel de agarosa al 1%

Como resultado del procedimiento anterior, el plásmido pHSG/M5-3-27 que lleva un fragmento de fusión de la región variable de la cadena liviana del TRA-8 LM5 humanizado y la región constante de la cadena Igk humana se obtiene

3) Construcción del plasmido pSR/LM5-3-27-1 (plasmido de expresion para la cadena liviana del TRA-8 LM5 humanizado)

El plasmido obtenido pHSG/M5-3-27 que lleva un fragmento de la fusion de la región variable de la cadena liviana TRA-8 LM5 humanizada y la región constante de la cadena Igk humana se digiere con las enzimas de restricción HindIII y EcoR I

Un µg del ADN pSRPDHH del plásmido clonado (solicitud de patente europea 0-909-816-A1) se digiere con las enzimas de restricción HindIII y EcoR I, luego se desfosforiliza con CIP El ADN pSRPDHH desfosforilizado resultante y el fragmento de ADN HindIII-EcoR I, obtenido del pHSG/M3-3-27 se ligan utilizando un kit de ligado de ADN versión 2 0 (Takara Shyuzo, Co Ltd) Entonces, el E Coli DH5α se transforma con el ADN ligado y se esparce sobre el agar LB Los transformantes obtenidos se cultivan en un medio LB líquido que contiene 100 µg/ml de ampicilina, y de ADN de plasmido y se extraen del cultivo resultante de acuerdo con el metodo alcalino-SDS La inserción y orientación del fragmento de ADN deseado en el vector pSRPDHH se confirma mediante la secuenciacion de ADN utilizando un analizador de secuencia de gen (analizador de ADN ABI Prism 3700, Applied Biosystems)

El plásmido de expresion resultante que lleva el cADN que codifica la cadena liviana del LM5 TRA-8 humanizado se designó pSR/LM5-3-27-1

(4 5) Construcción de un vector de expresión para la cadena liviana del anticuerpo humanizado (tipo quimera)

La secuencia mostrada en la SEC ID No 76 de la lista de secuencias, la secunecia de aminoacido de la cadena liviana de TRA-8 tipo quimera se designa como LM6

Los plásmidos de expresión que llevan este tipo de secuencias de aminoácido de cadena liviana humanizada del anticuerpo DR5 antihumano TRA-8 se construyen (tipo LM6) (SEC ID No 75 del listado de secuencias) como sigue

1) Síntesis de los iniciadores para la preparación de las regiones variable y constante de la cadena liviana de LM6 TRA-8 humanizado

La codificación del ADN para la cadena de polipéptido LM6 (secuencia ID No 76 de la lista de secuencias), cada uno de los cuales es una fusion de la region variable de la cadena liviana TRA-8 del anticuerpo

anti-DR5 humanizado y la region constante de la cadena liviana Ig humana (cadena k), son respectivamente sintetizados al utilizar combinaciones de PCR

Adicional a 7AL1P (SEC ID No 47) y 7ALCN (SEC ID No 48), los siguientes iniciadores de oligonucleótidos son sintetizados para PCR

5 - tgatgtggac atgaatttgt gagactgggt catcacaatg tcaccagtgg a -3 (HKSPR13, SEQ ID No 97),

5 - tggggttccag gctccactgg tgacattgtg atgacccagt ctcacaaatt c -3' (MVF11, SEQ ID No 98),

5'- aagacagatg gtgcagccac agcccgtttg atttccagct tggtgcctc 3' (MVR11, SEQ ID No 99) y

5 - aagctggaaa tcaaacgggc tgtggctgca ccatctgtct tcatc -3'(MCF11 SEQ ID

2) Construcción del plásmido pCR3 1/LM6-1-16 (clonacion de la cadena liviana TRA-8 numanizada tipo LM6)

El fragmento LM6-ADN como se definió en la SEC ID No 75 de la lista de secuencias codifica para la secuencia de aminoácido como se define en la SEC ID No 46 de la misma que es preparada mediante el desarrollo

del PCR de segunda etapa, insertado dentro de un vector plasmido y clonado en E Coli

a) PCR de primera etapa

El fragmento LM6-F1-ADN que codifica para una secuencia de señal de secreción y una porción de la región FRL_1 con un sitio de escisión de la enzima de restricción HindIII agregada al extremo 5' se prepara bajo las siguientes condiciones Los plasmidos de plantilla, pHSGHM17 y pSRPDHH, se obtienen al seguir la descripción en una solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1

Composición de la solución de reaccion

ADN pHSGHM17 de plásmido, 25 ng

Iniciador de un oligonucleotido 7AL1P, 50 pmol

Iniciador de un oligonucleótido HKSPR11, 50 pmol

Coctel dNTPs, 5 µl

Solución 10xPCR, 5 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq (Perkin Elmer), 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl al agregar agua redestilada y utilizarla en el PCR

Las condiciones térmicas del PCR calentamientoa 94° C durante dos minutos, despues de lo cual se repite un ciclo térmico de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos

En el fragmento de LM6-F2-ADN que codifica para una porción del FRL_1, $CDRL_1$, FRL_2, $CDRL_2$ FRL3, CDRL3, FRL4 y una porcion de la region constante se prepara bajo las siguientes condiciones

Composición de la solución de reaccion

ADN pL28 de plásmido, 25 ng

Iniciador de oligonucleotido MVF11, 50 pmol

Iniciador de oligonucleótido MVR12, 50 pmol

Cóctel dNTP, 5 µl

Solución 10 X PCR, 5 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta al volumen final de 50 µl al agregar agua redestilada y utilizarla en PCR

Condiciones térmicas PCR calentamiento a 94° C durante dos minutos, despues de lo cual se repite un ciclo térmico 30 veces de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, seguido por el calentamiento a 72° C durante 10 minutos

El fragmento de LM6-FR3-ADN que codifica para una porción del FRL4 y la region constante con un sitio de escisión de enzima de restricción EcoR I agregado en ele extremo 3' se prepara bajo las siguientes condiciones

Composicion de la solución de reacción

ADN pSRPDHH de plásmido 25 ng
Iniciador de oligonucleótido MCF11, 50 pmol
Iniciador de oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol
Cóctel dNTPs, 5 µl

Solución 10 X PCR, 5 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solucion de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl al agregar agua redestilada y usarla en PCR

Condiciones térmicas PCR calentamiento a 94° C durante dos minutos, despues de lo cual se repite un ciclo térmico 30 veces de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, seguido por el calentamiento a 72° C durante 10 minutos

Los fragmentos de ADN amplificados despues de PCR se separan mediante electroforesis de gel de poliacrilamida al 5% El gel después de la electroforesis se tiñe con 1 µg/ml de bromuro de etidio para detectar el ADN producido bajo luz UV Las bandas de ADN respectivas se detectan así y son escisionadas con una cuchilla

b) PCR de segunda etapa

LM6-ADN en el cual los fragmentos anteriormente descritos de LM6-F1-ADN, LM6-F2-ADN, y LM6-F3-ADN son fusionados y se preparan bajo las siguientes condiciones

Composición de la solucion de reacción

Fragmento de gel de LM6-F1-ADN preparado en el PCR de primera etapa,

Fragmento de gel de LM6-F2-ADN preparado en el PCR de primera etapa,

Fragmento de gel de LM6-F3-ADN preparado en el PCR de primera etapa,

Iniciador de oligonucleotido 7AL1P, 50 pmol

Iniciador de oligonucleotido 7ALCN, 50 pmol

Cóctel dNTPs, 5,0 µl

Solucion 10 X PCR, 5,0 µl

Polimerasa de ADN ampliTaq 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl al agregar agua redestilada y utilizarla en PCR

Condiciones térmicas PCR calentamiento a 94° C durante dos minutos, después de lo cual se repite un ciclo térmico 30 veces de 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, seguido por el calentamiento a 72° C durante 10 minutos

El fragmento LM6-ADN preparado así se inserta en el pCR3,1 ADN de plásmido usando un kit de clonación Eukariotic TA (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante e introducido en el E Coli TOP10F' competente contenido en el kit Las secuencias de nucleótido de estos ADN que codifican la cadena de luz del TRA-8 humanizado se confirman mediante el método dideoxi utilizando un analizador de ADN

Los plásmidos resultantes se designan pCR3,1/LM6-1-16 (el plásmido que lleva el cADN que codifica la región variable de cadena liviana del TRA-8 de raton y una región constante de cadena liviana Ig humano)

El plásmido obtenido PCR3 1/LM6-1-16 que contiene el fragmento LM6-ADN es digerido con las enzimas de restricción HindIII y EcoR I

Un µg de ADN pHSG399 de plásmido de clonación se digiere con las enzimas de restriccion HindIII y EcoR I, y luego desfosforilizada con CIP El ADN pHSG399 desfosforilizado resultante y el fragmento LM6-ADN, que se ha digerido con las enzimas de restricción HindIII y EcoR I, son ligadas utilziando el kit de ligación de ADN version 2 0 (Takara Shyuzo, Col Ltd) Luego la E Coli DH5α se transforma con el ADN ligado y esparcido sobre el medio de agar que contiene 0,1 mm de IPTG, 0,1% de X-Gal y 50 µg/ml de cloramfenicol (concentraciones finales) Los transformantes blancos obtenidos se cultivan en medio LB líquido que contiene 50 µg/ml de cloramfenicol, y ADN de plásmido se extrae del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS El ADN de plásmido extraído se digiere con HindIII y EcoR I, y luego un clon que lleva el fragmento LM6-ADN se selecciona mediante electroforesis de gel de agarosa al 1%

Como resultado del procedimiento anterior, el plasmido pHSG/M6-1-4-1 que lleva un fragmento de fusión de la región variable de la cadena liviana del TRA-8 de ratón y de la región constante de la cadena Igk humana se obtiene La sepa E coli transformante que guarda estos

plasmidos, designada como E coli DH5α/pHSG/M6-1-4-1 se deposito con el deposito de organismos para patentes internacionales, National Institue of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japon en abril 20, 2001, de acuerdo con el tratado de Budapest para el depósito de microorganismos, y se acordo el número de acceso FERM BP-7566

3) Construcción del plasmido pSR/LM6-1-4-6 (plasmido de expresion para la quimera tipo LM6 de la cadena liviana TRA-8)

El plásmido obtenido pHSG/LM6-1-4-1 que lleva un fragmento de la fusión de la región variable de la cadena liviana TRA-8 de ratón y la region constante de la cadena Igk humana se digiere con las enzimas de restricción hindIII y EcoR I

Un µg del ADN pSRPDHH del plasmido clonado se digiere con las enzimas de restriccion HindIII y EcoR I, luego se desfosforiliza con CIP El ADN pSRPDHH desfosforilizado resultante y el fragmento de ADN

HindIII-EcoR I, obtenido del pHSG/LM6-1-4-1 se ligan utilizando un kit de ligado de ADN versión 2 0 (Takara Syuzo, Co Ltd) Entonces, el E Coli DH5α se transforma con el ADN ligado y se esparce sobre el agar LB Los transformantes obtenidos se cultivan en un medio LB líquido que contiene 100 µg/ml de ampicilina, y el ADN de plásmido y se extraen del cultivo resultante de acuerdo con el metodo alcalino-SDS La inserción y orientacion del fragmento de ADN deseado en el vector pSRPDHH se confirma mediante la secuenciación de ADN utilizando un analizador de secuencia de genes

El plasmido de expresión resultante que lleva el cADN que codifica la cadena liviana del TRA-8 tipo quimera (se designa pSR/LM6-1-4-6)

(5) Producción de diversos anticuerpos de TRA-8 tipos químérico o humanizado

La transfección de las células COS-7, es conducida por los metodos de reactivo de transfección FUGENE6 (Boenringer Mannheim Biochemica) de acuerdo con el manual de instruccion suministrado con el kit

Las células COS-7 (American Type Culture Collection No CRL-1651) crecen a semiconfluente (3 x 10^6 células/plato) en un plato de cultivo (área de cultivo 57 cm^2, Sumitomo Bakelite) que contiene un medio Eagle modificado Dulbecco (en lo sucesivo denominado como "D-MEM", Gibco BRL) suplementado con suero de ternero fetal al 10% (en lo sucesivo abreviado como "FCS", Moregate)

En el entretanto, 10 µg/plato (total cinco platos) del ADN de plásmido de expresión de cadena pesada DR5 humanizado (pHA15-1) y 10 µg/plato del ADN de plásmido de expresión de cadena liviana DR5 humanizado preparado mediante el metodo alcalino-SDS y la centrifugacion de gradiente de densidad de cloruro de cesio se mezclan, y luego se precipitan con etanol, seguido mediante suspension en 5 µl/plato de dH_2O

Después de 15 µl/plato de reactivo de transfección FUGENE6 se mezcla con 180 µl/plato de D-MEM sin FCS, esta solucion FUGENE (185 µl/plato) se mezcla con 5 µl/plato de una solución de ADN que contiene 10 µg/plato del ADN de plásmido de expresión de cadena pesada DR5 humanizado

y 10 µg/plato del ADN del plásmido de expresión de cadena liviana DR5 humanizado Despues de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, la suspensión de plásmido obtenida (200 µl) se agrega a los platos COS-7 preparados previamente Después de incubar en CO_2 al 5% a 37° C durante 24 horas, el medio de cultivo se cambia con D-MEM sin FCS Después de incubación en CO_2 al 5% a 37° C durante 72 horas, el supernadante del cultivo se recupera para purificar los productos de expresión en los fluidos supernadantes Mediante el método como se describió anteriormente, las celulas COS-7 se transfectan con cada una de las siguientes combinaciones de plasmido

(A) cotransfección de pHA15-1 y pSR/LM1-2 (H2L2)

(B) cotransfección de pHB14-1 y pSR/M2-1 (H2L2)

(C) cotransfección de pHB14-1 y pSR/M3-3-44-10 (H2L3)

(D) cotransfección de pHB14-1 y pSR/LM4-5-3-3 (h2L4)

(E) cotransfeccion de pHC10-3 y pSR/M2-1 (H3L2)

(F) cotransfeccion de pHC10-3 y pSR/LM3-3-44-10 (H3L3)

(G) cotransfeccion de pHC10-3 y pSR/LM4-5-3-3 (H3L4)

(H) cotransfección de Phd21-1 y pSR/LM5-3-27-1 (H4L5)

(I) cotransfección de pM11-1 y pSR/LM6-1-4-6 (quimera)

Se centrifuga entonces el cultivo (3 500 r p m , 15 minutos) y se recolecta el supernadante El supernadante se filtra con un filtro de 0,45 µm (ADVANTEC TOYO DISMIC-25CS, Cat # 25CS045 AS) La purificacion del IgG proveniente de los filtrados se logra utilizando cromatografía de afinidad de Protein G-POROS (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones

Sistema HPLC BioCAD 700E (Applied Biosystems)

Columna cartucho sensor ProteinG-ID (tamaño columna 2 1 mmID x 30 mm LD, volumen de lecho 0,1 ml, Applied Biosystems)

Solucion de elusión glicina-HCl 0,1 M (pH 2,5)

Solución de neutralización Tris-HCl 1M (pH 8,5)

Detección 280 nm

Proporción de flujo 1 ml/min

Tamaño de fracción 0,5 ml/0,5 min

Tubo de fracción 1,5 ml de microtubo de polietileno

Temperatura 4° C

Después que todos los filtrados aplicados a la columna, 30 ml de PBS (Sigma, Cat # 1000-3) se utiliza para lavar la columna Cuando se aplica la Solución de elusion, se inicia el recolector de fracción Cada microtubo de fracción previamente contenía 55 µl de NaCl 1 M, 110 µl de Solución de neutralizacion y 74 µl de 2 mg/ml de albúmina de suero de bovino (Sigma, Cat # A-7030) en PBS Las fracciones del número 7 hasta el número 8 se recolectan

La verificación de la expresion de los anticuerpos humanizados y el ensayo cuantitativo de los productos de expresión en los fluidos de cultivo supernadantes preparados se desarrollan mediante ELISA con un anticuerpo contra IgG antihumano

A cada pozo de un plato de 96 pozos (MaxiSorp, Nunc), se agregaron 100 µl de anticuerpo policlonal específico IgG Fc antihumano de cabra (Kappel) disuelto a

la concentración final de 0,5 µg/ml en solución de adsorción (hidrogencarbonato de sodio 0,05 M, azida de sodio 0,02% Ph 9,6) y el plato se incubó a 37° C durante dos horas para originar la adsorcion del anticuerpo Luego, el plato se lavó con 350 µl de PBS-T cinco veces A los pozos despues de lavados, se agregó el cultivo supernadante diluido con D-MEM que contenía 10% de FCS y se incubó a 37° C durante dos horas Después de lavar de nuevo con PBS-T, 100 µl de anticuerpo policlonal especifico de IgG Fc antihumano de cabra etiquetado alcalino fosfatasa (Jakson Inmuno Research Lab) diluido 10 000 veces con PBS-T se agregó a cada pozo y se incubo a 37° C durante dos horas Después de lavar de nuevo con PBS-T, se agregó una solucion de sustrato de p-nitrofenilfosfato obtenido del kit Alkalin Phosphatase Suostrate (Bio Rad) de acuerdo con el manual de instruccion suministrado con el kit Despues de incubar a 37° C durante 0,5 a una hora, se midió la observancia a 405 nm En los presentes experimentos, inmunoglobulina G de plasma de humano subclase 1 (IgG1) (Biopure AG) diluido con D-MEM que contenía 10% de FCS a ciertas concentraciones se utilizó como muestras de referencias

de concentración de los anticuerpos DR5 humanizados contenidos en los fluidos sobrenadantes del cultivo

Como resultado, los productos de expresión y purificados en el cultivo supernadante se detectaron específicamente con anticuerpo IgG antihumano La cantidad de anticuerpo IgG humano es 44,03 µg (H1-L1), 39,8 µG/ml (H2L2), 26,7 µg/ml (H2L3), 41 0 µg/ml (H2L4), 39,3 µg/ml (H3L2), 24,7 µg/ml (H3L3), 21,5 µg/ml (H3L4), 16,7 µg/ml (H4L5) y 18,3 µg/ml (quimera), respectivamente

(6) Actividad inducida por apoptosis de diversos tipos de anticuerpo humanizado o de anticuerpo quimerico

Las celulas Jurkat (ATCC No TIB-152), se utilizaron para examinar la actividad que inducia apoptosis del anticuerpo TRA-8 humanizado purificado

Las celula Jurkat cultivadas en medio RPMI1640 con 10% FCS (Gibco BRL) a 37° C durante tres días en la presencia de CO_2 al 5% son suministradas en cada pozo de un microplato de 96 pozos (Sumitomo Bakelite) a 50 µl por

pozo El TRA-8 humanizado preparado en este ejemplo 26 se ajustó para que tuviera la concentración del producto final de interés de 100 ng/ml con un medio RPMI1640 que contiene 10% de FCS para estimar sus concentraciones en los fluidos de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 26 Cada una de las soluciones de los productos de expresión así ajustada a 100 ng/ml se utilizó para producir dilusiones seriales al repetir la dilusion serial dos veces con RPMI1640 que contiene 10% de FCS Cada una de las soluciones de TRA-8 humanizadas eluidas (H1L1, H2L2, H2L3, H2L4, H3L3, H3L4 o H4L5) se agregó a cada pozo a 50 µl por pozo Después de reaccionar a 37° C durante 12 horas, se agregaron 50 µl de 25 µM de PMS que contiene 1 ng/ml de XTT es agregado (concentraciones finales de 250 µg/ml para XTT y 5 µM para PMS) Después de incubar durante tres horas, la absorbancia a 450 nM de cada pozo se midió para calcular la viabilidad de la célula al utilizar la capacidad de reducción de las mitocondrias como el índice

La viabilidad de las células en cada pozo se calculó de acuerdo con la siguiente formula

Viabilidad (%) = 100 x (a-b)/(c-b)

En donde "a" se mide como un pozo de ensayo, "b" es la medición de un pozo sin células, y "c" es la medición de un pozo sin agregar anticuerpo

Como resultado, los anticuerpo humanizados ensayados demostraron que inducen la apoptosis en las células de la línea de celulas limfoma T que expresan el antígeno DR5 humano

Más aún, la actividad inducida por apoptosis del TRA-8 humanizado al PC-3 es examinada agregando taxol de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 25

La linea celular de cancer de próstata de humano PC-3 se obtuvo (ATCC No CRL-435) de American Tissue Culture Collection (ATCC) y se mantuvo en una mezcla de nutrientes F-12K (21127-022, Gibco BRL) que contenía 10% de suero bovino fetal (FBS, hyclone), 1% de L-glutamina-200 mM (25030-149, Gibco BRL) y solución de penicilina Streptomicina 0,5% (P-7539, Sigma) El medio RPMI1640 (MED-008, IWAKI) suplementado con FBS al 10 % y solución de penicilina estreptomisina 0,5% se utilizó en el

siguiente experimento Células PC-3 con crecimiento exponencial se recolectaron mediante tripsinización y se lavaron dos veces con medio fresco Las células son entonces contadas, resuspendidas en un medio fresco, a una densidad de 5 * 10^4 células/ml y distribuidas en triplicado en platos de 96 pozos de fondo plano (3598, Corning-Coster) en un volumen total de 100 µl/pozo un día antes de iniciar el experimento Una droga anticancer representativa, Paclitaxel (169-18611, Wako) disuelta en dimetilsulfóxido (10 mg/ml) se diluyó en un medio fresco y luego se agrego a platos de 96 pozos que contenían células a 50 µl/pozo Las concentraciones finales del dimetilsulfóxido son menores de 0,1% Después de la incubacion durante 24 hr a 37° C en una atmósfera de CO_2 al 5%, el TRA-8 humanizado (H1L1, H2L2, H2L3, H2L4, H3L2, H3L3 H3L4 o H4L5) diluido en medio fresco se agregó a los pozos Despues de la incubación por 24 horas adicionales se agrearon 50 µl de Minimum Essential Medium (11095-098, Gibco BRL) que contenia 1 mg/ml de XTT y 25 mM de PMS a los pozos y los platos son incubados durante 6 h El OD450 es entonces medido mediante el contador multimarca ARVO MTS 1420 (Wallac Berthold) y la viabilidad celular se calculó como sigue

Viabilidad celular (%) = (OD450 para el pozo que contenia celulas tratadas con Taxol y/o TRA-8 (agente (s))-OD450 para el pozo que no contenía ni celulas ni agentes) x 100 / (OD450 para el pozo que contenia células sin agente - OD450 para el pozo que no contenía ni células ni agentes)

Como resultado, los anticuerpos humanizados ensayados demostraron que inducen apoptosis en las celulas de cáncer de próstata que expresan el anticuerpo DR5 humano

Cualesquier patentes o publicaciones mencionadas en la especificación son indicativas del nivel de aquellos versados en la técnica a la cual pertenece la invencion Estas patentes y publicaciones son incorporadas aqui como referencia al mismo grado como si cada publicacion individual fuera expeecifia e individualmente que se incorpora como referencia

La presente invención no está limitada en alcance por los anteriores depositos o modalidades descritos en los ejemplos que tienen el proposito de ser ilustraciones

de unos pocos aspectos de la invencion y cuales quier modalidades que sean equivalentes funcionalmente están dentro del alcance de la invencion Varias modificaciones de la invención en adicion a aquellas mostradas y descrita aqui serán aparentes o seran evidentes para aquellos versados en la tecnica y tienen el propósito de caer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas

REFERENCIAS

Wiley SR, Schooley K Smolak PJ, Din WS Huang CP, Nicholl JK Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA et al Immunity 1995 Dec 3(6) 673-82

Pan G O Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J Dixit VM Science 1997 Apr 4 276(5309) 111-3

Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT EMBO J 1997 Sep 1,16(17) 5386 97

MacFarlane M Ahmad M, Srinivasula SM Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, Alnemri ES J Biol Chem 1997 Oct 10,272(41) 25417-20

Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG Immunity 1997 Dec,7(6) 813 20

Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L Immunity 1997 Dec,7(6) 821-30

Schneider P Thome M Burns K Bodmer JL Hofmann K Kataoka I Holler N, Tschopp J Immunity 1997 Dec,7(6) 831 6

Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H Waugh J, Huang CP DuBose RF, Goodwin RG, Smith CA J Exp Med 1997 Oct 6,186(7) 1165-70

Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A Science 1997 Aug 8 277(5327) 818-21

Pan G, Ni J, Wei YF Yu G, Gentz R, Dixit VM Science 1997 Aug 8,277(5327) 815-818

Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M Baldwin D Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A Curr Biol 1997 Dec 1,7(12) 1003-6

Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C DiPrinzio R Dodds RA, James IE,

Rosenberg M Lee JC Young PR J Biol Chem 1998 Jun 5,273(23) 14363-7

Walczak H Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J Woodward A Le T Smith C Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT Schuh JC, Lynch DH Nat Med 1999 Feb,5(2) 157-63

Gazitt Y Leukemia 1999 Nov,13(11) 1817-24

Rieger J, Naumann U Glaser T Ashkenazi A Weller M FEBS Lett 1998 May 1 427(1) 124 8

Jeremias I Herr I, Boehler T Debatin KM Eur J Immunol 1998 Jan,28(1) 143-52

Martinez-Lorenzo MJ Alava MA, Gamen S, Kim KJ, Chuntharapai A, Pineiro A, Naval J, Anel A Eur J Immunol 1998 Sep,28(9) 2714-25

Phillips TA, Ni J, Pan G, Ruben SM, Wei YF, Pace JL, Hunt JS J Immunol 1999 May 15,162(10) 6053-9

Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Takeda K, Akiba H, Tsutsui H, Okamura H, Nakanishi K, Okumura K Yagita H J Immunol 1999 Aug 15,163(4) 1906-13

Johnsen AC, Haux J Steinkjer B, Nonstad U, Egeberg K, Sundan A, Ashkenazi A, Espevik T Cytokine 1999 Sep,11(9) 664-72

Zamai L, Ahmad M Bennett IM Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B J Exp Med 1998 Dec 21,188(12) 2375-80

Fanger NA, Maliszewski CR, Schooley K Griffith TS J Exp Med 1999 Oct 18 190(8) 1155-64

Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR, Fanger NA J Exp Med 1999 Apr 19,189(8) 1343-54

Griffith TS, Rauch CT, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Lynch DH Smith CA, Goodwin RG, Kubin MZ J Immunology 1999 162 2597-2605

Albani S and Carson DA 1997 Arthritis and allied conditions, a textbook of rheumatology, 13th edition volume 2, 979-992

Fujisawa K Asahara H, Okamoto K Aono H Hasunuma T Kobata T Iwakura Y Yonehara S Sumida T and Nishioka K J Clin Invest 1996 98(2) 271-278

Zhang H, Yang Y, Horton JL Samoilova EB Judge TA Turka LA Wilson JM, and Chen Y 1997 J Clin Invest 100(8), 1951-1957

Roth W, Isenmann S, Naumann U Kugler S, Bahr M Dichgans J Ashkenazi A, Weller M Locoregional Biochem Biophys Res Commun 1999 Nov 19,265(2) 479-83

Chinnaiyan AM Prasad U, Shankar S, Hamstra DA, Shanaiah M Chenevert TL, Ross BD Rehemtulla A Proc Natl Acad Sci 2000 Feb 15, 97(4) 1754-1759

Arai T, Akiyama Y, Okabe S, Saito K, Iwai T, Yuasa Y Cancer Lett 1998 Nov 27,133(2) 197-204

Lee SH, Shin MS, Kim HS, Lee HK, Park WS, Kim SY, Lee JH, Han SY Park JY Oh RR, Jang JJ Han JY, Lee JY, Yoo NJ Cancer Res 1999 Nov 15,59(22) 5683-5686

Pai SI, Wu GS, Ozoren N, Wu L, Jen J, Sidransky D, El-Deiry WS 1998 Cancer Res Aug 15 58(16) 3513-3518

Maniatis et al , 1982, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harber, NY

Schroff et al , 1985 Cancer Res , 45, 879-885

Yelton D E , et al , 1978 Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7

Kohler, G , et al , 1976 European J Immunology, 6, 511-519

Shulman, M et al 1978 Nature, 276 269-270

Kearney, J F , et al , 1979 J Immunology, 123, 1548-1550

Honbata, K and Harris A W , 1975 Nature, 256 495-497

Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurnev A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P and Ashkenazi A, 1997 Science 277 818 821

Cheng J et al 1994 Science, 263, 1759-1762

Bendele AM et al 1999 Clin Exp Rheumatol 17(5) 553-560

Sheridan JP, Marsters AS Pitti RM, Gurney A Skubatch M Baldwin D Ramakrishnan L, Gray CJ, Baker K Wood WI Goddard AD Godowski P, and Ashkenazi A 1997 Science, 277, 818 821

Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL Hofmann K, Kataoka T, Holler N, Tschopp J, 1997 Immunity Dec 7(6) 831-836

Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J, and Budd RC 1999 J Exp Med 1891-1896

Miller-Ladner U, Gay RE, and Gay S, 1997 Arthritis and allied conditions, a textbook of rheumatology, 13th edition, Volume 1, 243-254