Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicacion : 04051012 00000001 Folios: 200
Fecha (AMD): 2004-06-02 16:44:28
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NAC1 229 COMPLEMEN
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

1 **SOLICITUD DE:**

☐ Corrección de Error Material ☒ Modificación a una solicitud

2 **SOLICITANTE**

Nombre: UAB RESEARCH FOUNDATION

Dirección: 701 South 20th Street,
Suite 1120G,
Birmingham, Alabama 35294,
Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Birmingham, Alabama,
Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Alabama,
Estados Unidos de América

Teléfono: 546 09 70 **Fax:** 249 40 70
E-mail: clientes@camyp.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Número: _____

3 **REPRESENTANTE O APODERADO**

Nombre: Emilio FERRERO

Dirección: Carrera 4ª No. 72-35

Teléfono: 347 36 11 **Fax:** 217 92 11

E-mail: cavelier@cavelier.com

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Número: 438.019 TP 31.929

4 **Número de expediente:** 04.051.012

5 **Descripción de la corrección o modificación solicitada:**

Se presenta una nueva traducción de la memoria descriptiva y del capítulo reivindicatorio que incluyen la traducción correspondiente a las páginas 42 a 54 de la solicitud de patente en inglés, ya que por una inadvertencia fueron omitidas de la traducción de la presente solicitud presentada el 01 de junio de 2004.

6 **Comprobante de pago No.** 04 – 41.102 **Fecha:** 25 de mayo de 2004

7 **Anexos**

☒ Comprobante de pago de la tasa.
☐ Poderes, si fuere el caso
☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

8 **NOMBRE:** EMILIO FERRERO

FIRMA: Emilio Ferrero

C.C. 438.019 de Usaquén T.P.A. 31.929

DLM

COMBIACIONES DE ANTICUERPOS SELECTIVOS PARA UN RECEPTOR DE LIGANDO QUE INDUCE A APOPTOSIS RELACIONADA CON FACTOR DE NECROSIS TUMORAL Y OTROS AGENTES TERAPÉUTICOS

RECONOCIMIENTOS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense número 60/391,478, presentada el 24 de junio de 2002 y de la solicitud provisional estadounidense número 60/346,402, presentada en noviembre 1, 2001, y reivindica prioridad de la PCT/US01/14151, presentada en mayo de 2001, que esta actualmente pendiente. La PCT/US01/14151 reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense número 60/201,344, presentada en mayo 2, 2000. Las solicitudes de las cuales reivindica beneficio la presente solicitud se incorporan como referencia en su totalidad.

Esta invención fue hecha con el apoyo del gobierno bajo el otorgamiento NCI P50 CA89019-01 premiado por el Instituto Nacional de Cáncer y bajo el NTH R03-AR44982 premiado por el

Instituto Nacional de Artritis y Enfermedades Musculoesqueletales y de la piel. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con un anticuerpo capaz de ligar específicamente un receptor de ligando (en lo sucesivo denominado como "TRAIL") que induce a apoptosis relacionado con factor (en lo sucesivo denominado "TNF") de necrosis tumoral, más particularmente, con un anticuerpo monoclonal que induce a apoptosis en células *in vivo* y in *vitro* que expresan el receptor tipo simple y terapias basadas en este.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El TRAIL es un miembro de la familia TNF de proteínas, que también incluye el TNF-ά y el ligando Fas (1). Estas proteínas son inductores potentes de apoptosis. Hasta la fecha, se han identificado cinco receptores de TRAIL, dos de los cuales, el DR4 (TRAIL-R1) y DR5 (TRAIL-R2) (2-7), son capaces de trasducir la señal de apoptosis aunque los otros

tres DcR1 (TRAIL-R3), DcR2 (TRAIL-R4), y la osteoprotegerina (OPG) no trasduce la señal apoptosis (8-12). Todos los cinco receptores de TRAIL comparten significativamente homología en sus dominios de unión de ligando extracelular. Similar al receptor 1 Fas y TNF (en lo sucesivo denominado como "TNFR1"), los segmentos intracelulares de ambos DR4 y DR5 contienen un dominio muerto, trasducen una señal de apoptosis a través de una senda que involucra una proteína de dominio muerta asociada con Fas (en lo sucesivo denominada como "FADD") y la caspaza 8 (6,7). Además de trasducir la señal de apoptosis, los receptores DR4 y DR5 también pueden activar una senda que involucra NF_Kb (6,7).

Las funciones biológicas del TRAIL que han sido demostradas incluyen la capacidad del TRAIL de inducírseles selectivamente apoptosis de células tumorales transformadas, con células normales siendo relativamente resistentes a la apoptosis mediada por TRAIL (13-15). Esta selectividad sugiere que, en contraste con el ligando Fas la administración de TRAIL esta asociada con muy bajos niveles de toxicidad como se demostró mediante administración sistémica de TRAIL en un modelo animal sin inducir toxicidad

significativa (13). Así, el TRAIL se ha propuesto como un agente potente que induce a apoptosis que seria un agente terapéutico adecuado para el tratamiento de cáncer y otras enfermedades asociadas con proliferación de células anormales. El TRAIl también se ha propuesto por ser un agente potente inductor de apoptosis que seria adecuado para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y e inflamatorias. Se ha demostrado que la apoptosis mediada por TRAIL esta involucrada en la muerte de células T inducidas por activación, sirviendo de esta manera como un mecanismo alternativo al ligando 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 matanza de células NK (19-21) y en la función inmunomodulatoria de las células denditricas (22,23). Así, la apoptosis mediada por TRAIL también puede funcionar en inmunoprivilegio e inmunosupervisión.

El sistema receptor de TRAIL es complejo, e incluye al menos dos receptores muertos, DR4 y DR5, y al menos dos receptores no apoptocicos, DcR1 y DcR2. todos estos receptores no solo compartes una alta homología de secuencia de aminoácido, sino también exhiben una afinidad de unión similar a TRAIL (2-12).

La capacidad de los receptores DcR1 y DcR2 para completar la unión del TRAIL sin inducir a apoptosis sugiere que ellos puedan actuar como receptores de señuelo que bloquean o modulan la actividad de ligando TRAIL. Más aun, se ha reportado que células no transformadas expresan mayores niveles de receptores señuelo que lo que hacen las células transformadas. Así, se ha propuesto que la modulación diferencial de la expresión de los receptores muertos y señuelo pueden representar un mecanismo regulatorio clave que determina la susceptibilidad de células a la apoptosis mediadas por TRAIL, pero debido a la falta de anticuerpos específicos del receptor (2). Aunque la expresión y función de DR4 y DR5 se han estudiado extensivamente, se ha impedido el progreso por la falta de anticuerpos monoclonales específicos al receptor. La expresión de la superficie celular del DR5 no se ha documentado. Se ha reportado que un panel de anticuerpos receptores anti-TRAIL han sido generados que son capaces de inducir apoptosis de células de melanoma *in Vitro* pero solamente luego de la inmovilización de los anticuerpos, para promover reticulación,. y, de algunos casos, las células requieren cultivar con actinomicina D (24). Varios anticuerpos anti-DR5 se han generado (24). Sin

541

embargo, estos anticuerpos anti-DR5 monoclonales previamente generados tienen una actividad inductora de apoptosis baja *in Vitro* aun bajo las condiciones de reticulación. No se ha reportado ninguna actividad *in vivo*. Estos anticuerpos no se han utilizado para examinar la expresión de la superficie de células de receptores TRAIL (24). Así, existe necesidad de una anticuerpo monoclonal selectivo para cada receptor especifico TRAIL que no sea solamente capaz de ligarse al receptor superficial de la célula sino también de inducir fuertemente apoptosis de varios tipos de células anormales, incluyendo células tumorales, tanto in vivo como in Vitro sin el requisito de reticulación o inmovilización. Tal anticuerpo no solo proporcionaría un agente terapéutico potencial sino también una herramienta de diagnostico para análisis funcional del receptor TRAIL. Existe particular necesidad de un anticuerpo específico contra cada uno de los receptores inductores de muerte DR4 y DR5.

En el desarrollo, o progresión, de muchas enfermedades este a menudo es el caso de células que no son suprimidas. En muchas enfermedades autoinmunes y condiciones inflamatorias, las células activadas sobrevivientes atacan los tejidos o células

normales. Adicionalmente, la progresión de la tumorigénesis y la formación de panus proliferativo de artritis reumatoide están caracterizadas por la proliferación no supervisada de células. Así, la apoptosis insuficiente conduce al desarrollo de la enfermedad, y los usos de ligando que induce a apoptosis el anticuerpo monoclonal agonístico para mejorar la apoptosis para mejorar la apoptosis son considerados como una estrategia terapéutica potencial para la eliminación de aquellas células no deseadas.

Por ejemplo, la artritis reumatoide (en lo sucesivo denominada como "RA") es una enfermedad autoinmune humana común. El entendimiento habitual de la patofisiología de la RA es que las células T y las células B autoinmunes inician una respuesta inflamatoria en las articulaciones, lo cual conduce a la hiperproliferación de sinoviocitos. Como consecuencia de la hiperproliferación de células sinoviales, las metaloproteinasas (en los sucesivo denominadas como "MMPs") son sobreproducidas, lo cual adicionalmente conduce a la destrucción erosiva del cartílago y el hueso que es característico del RA (25). Así, el control de la hiperproliferación de las células sinoviales inflamatorias es

la 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 aparecen transformados", están caracterizados por un retículo endoplasmatico rígido denso, numerosos núcleos irregulares, y cambios en el esqueleto celular normalmente con forma de uso. Se ha propuesto que la incorporación de los oncogenes y los genes derivados de virus podrían ser el disparador primario de la aparición transformada de células y sinoviales RA (46).

Al menos dos aspectos del RA sugieren que la apoptosis desregulada puede contribuir al proceso de enfermedad y que la elicitación terapéutica de apoptosis puede ser un tratamiento efectivo: la falla de la supresión de la células T activadas sugiere que existe muerte deficiente de células inducidas por activación 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 las

544

células sinoviales RA es un factor contribuyente en las etapas multeriores de la patofisiología del RA. De hecho, se ha mostrado que la administración del anticuerpo anti-Fas en las articulaciones inflamatorias inhiben el desarrollo de artritis crónica en ratones transgenicos tax, el cual es un modelo de animal para RA humano (26). Más aun, la traducción localizada con el gen de ligando fas mediante un vector adenoviral es efectivo en la prevención de artritis inducida por colágeno (27). La inhibición de la proliferación de células sinoviales inflamatorias mediante la mejora de apoptosis mediada por Fas se observa en ambos casos. Aunque el ligando Fas es un inductor fuerte de apoptosis en células sinoviales RA, la aplicación de la apoptosis mediada por el ligando Fas como una terapia para humanos se ha limitado por la toxicidad letal al hígado. Así, la apoptosis inducida por el receptor TRAIL representa una terapia más segura y más efectiva del tratamiento de RA que la apoptosis inducida por el ligando Fas. La apoptosis inducida por el receptor TRAIL también representa una terapia más segura y más efectiva para el tratamiento de cáncer que la apoptosis inducida por el ligando Fas. La apoptosis mediada por TRAIL es conocida por inducir específicamente apoptosis de células tumorales

545

transformadas sin afectar las células normales. Se ha mostrado que la administración sistémica del TRAIL soluble trimerizado no origina toxicidad en animales experimentales que todavía fueron capaces de inducir regresión de tumores implantados (13,28). Su potencial como terapia adjunta para tratamientos tradicionales fue subrayado por el reciente hallazgo de la expresión del DR5 y la susceptibilidad de la apoptosis inducida por TRAIL de células cancerosas de mama se mejora mediante la radiación, sugiriendo que combinada con 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, loci con alta frecuencia de mutación en algunas células cancerosas (30). Se ha reportado que al menos dos clases de células tumorales, cáncer pequeño de pulmón (31) y cáncer de cabeza y cuello (32) exhiben mutaciones en el dominio de muerte del gen DR5. Así, existe necesidad de un anticuerpo anti-DR5 en inve4stigación de cáncer para determinar el efecto de la variación del epitope por receptor en el desarrollo y progresión de canceres. Además, la funcionalidad de la mutaciones de receptor TRAIL

probarían una herramienta de diagnostico clínica útil cuando se utiliza en conjunto con otros biomarcadores en la detección temprana de canceres y como un preeditor de la agresividad tumoral.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

En una modalidad, la invención se relaciona con un anticuerpo que reconoce un receptor TRAIL DR5 y que induce apoptosis en la célula que expresa DR5 in vivo o in Vitro. Adicionalmente descrito esta un anticuerpo que reconoce el DR5 pero no el DR4, DcR1, o DcR2. Específicamente detallado esta una anticuerpo monoclonal a DR5 producido por hibridoma.

En otra modalidad, la invención se relaciona con un anticuerpo que reconoce un receptor TRAIL DR4 y que induce a apoptosis en una celda que expresa a DR4 in vivo o in Vitro. Se describe adicionalmente un anticuerpo que reconoce Dr4 pero no DR5, DcR1, o DcR2. Específicamente detallado se encuentra un anticuerpo monoclonal a DR4 producido por hibridoma.

Un método suministrado es la inducción de apoptosis en células objetivo la inhibición de proliferación de células objetivo al poder en contacto una célula con una cantidad terapéutica de un anticuerpo capaz de ligarse a un DR5 o DR4. En varias modalidades del método, la apoptosis se puede inducir o la proliferación celular inhibir al poner en contacto las células objetivo con anticuerpos contra otros receptores de muerte.

También se describe una composición farmacéutica que incluye una cantidad terapéutica del anticuerpo monoclonal activo contra un DR5, un portador farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, un recipiente que incluye el anticuerpo y el portador. Además se suministra por la invención el uso de un anticuerpo que reconoce el DR5 o un anticuerpo que reconoce el DR4 para preparar un terapéutico para la apoptosis selectiva de células anormales o de reguladas.

Un anticuerpo de la presente invención interactúa con un receptor de ligando que induce a apoptosis relacionada con un factor de necrosis tumoral tal como DR4, DR5, DrR1, DrR2 y OPG, induciendo apoptosis en células que expresan tal

548

receptor. Se describe un anticuerpo de la invención capaz de ligar selectivamente un epítopo de receptor ligando al factor de necrosis tumoral agonista o antagonista.

La presente invención suministra un tratamiento para una enfermedad relacionada con apoptosis, cáncer, enfermedad inflamatoria, o una enfermedad autoinmune mediante un método que incluye poner en contacto un tejido objetivo que tiene la enfermedad con una cantidad terapéutica de un anticuerpo de la invención, simplemente o en combinación con otra apoptosis que induce anticuerpos, y/o otros agentes terapéuticos o tratamientos.

Se describe adicionalmente una proteína de fusión que incluye una secuencia de aminoácido receptor de TRAIL antigénico que tiene al menos diez bases, acopladas a una proteína de inmunoglobulina o a un fragmento de esta capaz de elicitar una respuesta inmune dentro de un sujeto.

La presente invención suministra un método de terapia génica en el cual la célula objetivo se transfecta con una secuencia de ácido nucleico del receptor TRAIL en un vector de

expresión de tal forma que el receptor TRAIL se expresa sobre la célula objetivo. En la célula objetivo es entonces expuesta a un anticuerpo que liga selectivamente el receptor TRAIL.

Se suministra secuencias de ácido nucleico y secuencias de aminoácido que codifican las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera de un anticuerpo selectivo para DR5. La secuencia también se suministra para un anticuerpo que liga selectivamente DR4. También se detallan los vectores que incluyen una secuencia de ácido nucleico de la invención y células huésped transformadas con un vector de la invención.

La presente invención suministra un anticuerpo humanizado DR5 (por ejemplo TRA-8) y un DR4 humanizado (por ejemplo 2E12), así como también una célula transfectada que produce el anticuerpo DR5 humanizado y una célula transfectada que produce el anticuerpo DR4 humanizado.

Un proceso para producir un anticuerpo DR5 humanizado o un anticuerpo DR4 se describe en el cual un huésped se transforma con secuencias de ácido nucleico que lo codifican

una cadena ligera 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 inducir apoptosis en células objetivo o para inhibir proliferación celular que incluye poner en contacto una celda objetivo con una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo DR5 humanizado, un anticuerpo DR4 humanizado, o una combinación de un anticuerpo DR5y un anticuerpo para otro receptor de muerte (por ejemplo, un anticuerpo para DR4), en la presencia o ausencia de otros agentes y tratamientos terapéuticos.

Se suministra un kit comercial para inducir apoptosis que incluye un anticuerpo TRA-8 humanizado selectivo para DR5 o un anticuerpo humanizado para DR4 (por ejemplo, 2E12 humanizado), empacado en un recipiente adecuado, y opcionalmente con instrucciones de uso.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJ S

Figura 1. Caracterización de TRA-8. (a) especificidad de unión de TRA-8: análisis de banda de proteína (panel superior): proteínas de fusión recombinantes de la familia TNFR sonseada con TRA-8 o IgG anti-humano. Carril 1: proteína de fusión DR5/hlgG1 (inmunogeno); Carril 2: DR4/hlgG1 (TRAIL-R1); Carril 3: DR5/hlgG1; Carril 4: TRAIL-R3 (DcR-1)/hlgG1; Carril 5: TRAIL-R4 (DcR-2)/hlgG1; Carril 6, CD95/hlgG1; Carril 7: TNFRI soluble. El análisis ELISA (panel inferior): los números de pozo coinciden con aquellos de la banda de proteína excepto el pozo 8 que es una proteína de fusión DR5/hIgG1 de murino. (b) actividad de unión de TRAIL soluble y TRA-8 a DR5 y DR4: platos ELISA fueron recubiertos con DR5/hIgG1 (panel izquierdo) o DR4/hIgG1 (panel medio) y luego incubados con TRAIL o TRA-8. (c) análisis de citometria de flujo de expresión de superficie de DR5. Las células Cos-7 transfectadas con vector de expresión pcDNA3 que contienen cADN de DR5 de longitud completa (histograma sólido), cADN DR4 (histograma abierto, línea sólida) o vector vacío (histograma abierto, línea punteada). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células fueron teñidas TRA-8

seguido por IgG1 antiratón conjugado con PE. (d) la reactividad inmunohistoquîmica in situ para DR5: los portaobjetos de cistopina de células Cos-7 transfectadas con vector de expresión o de control DR5 fueron teñidas con TRA-8 48 horas después de la transfección, (e) la actividad de muerte del TRA-8: células Jurkat fueron incubadas con las concentraciones indicadas de TRA-8. La viabilidad de las células se determinó mediante ATPLite, MTT, y ensayos de exclusión PI después de cultivos durante la noche. Los resultados del ATPLite y los ensayos MTT son presentados como porcentaje del control de medio, y el ensayo PI se presenta como porcentaje de las células negativas PI. (f) análisis de banda de proteína de activación de caspaza: las células Jurkat fueron incubadas con 500 ng/ml de TRA-8 durante el tiempo indicado. Los lisados de célula se separaron mediante el 15% de SDS-PAGE, bandeado, y sondeado con anticuerpos anti-caspaza. Las fechas indican las subunidades clevadas de cada caspaza. g ensayo de inhibición de caspaza: células Jurkat fueron incubadas con 50 ng/ml TRA-8 durante toda la noche en la presencia de varias concentraciones de los inhibidores de caspaza indicados. La viabilidad de las células se determinó mediante el ensayo ATPLite.

Figura 2. Expresión de superficie celular de DR5 y susceptibilidad apoptosis mediada por DR5. Las células T y B normales, aisladas recientemente de sangre periférica, célula T (a y a´), glioma (b y b´), célula de cáncer de próstata (c) y célula B (d) líneas celulares fueron incubadas con TRA-8 o anticuerpo de control de isótopo IgG1 de murino seguido por IgG1 anti-ratón de cabra conjugada con PE. Los histogramas abiertos representan el control anticuerpo de isótopo aunque los histogramas sólidos representan teñido de TRA-8. La apoptosis se determinó mediante el ensayo ATPLite después de incubación durante toda la noche con TRAIL soluble (círculos abiertos) o TRA-8 (círculos cerrados) 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 isótopo IgG de murino. La apoptosis se determinó mediante el ensayo ATPLite después de incubación durante toda la noche con TRAIL soluble (círculos abiertos) o TRA-8 (círculos cerrados).

Figura 3 Glioma (b) y líneas celulares (c) de cáncer de próstata se incubaron con TRA-8 o anticuerpo de control de isótopo IgG1 de murino. La apoptosis se determinó mediante el ensayo ATPLite después de incubación durante toda la noche con TRAIL soluble (círculos abiertos) o TRA-8 (círculos cerrados).

La figura 4 es una serie de gráficas que muestran la viabilidad de la célula para células Jurkat humana después de exposición a las concentraciones indicadas de (A) cepas de anticuerpo TRA-1, -8 y -10 y (B) TRAIL en la presencia de una concentración fija de cepas de anticuerpo de la invención descritas en la figura 4A;

Figura 5. Expresión DR5 en tejidos normales y cancerosos: homogenato de tejido anormal y canceroso fueron sondeados con TRA-8 y desarrollados mediante quimiluminiscensia. (a) El análisis de banda de la proteína DR5 el tejido normal es: carril 1: hígado, carril 2: cerebro, carril 3: pulmón, carril 4: riñón, carril 5: bazo, carril 6: testículos. Carril 7: ovario, carril 8: corazón, carril 9: páncreas. b. Análisis de banda de proteína DR5 el tejido es canceroso. Los canceres

que contienen banda de tejido canceroso proveniente del ovario (carril 1), pulmón (carril 2), hígado (carril 3), recto (carril 4), cerviz (carril 5), piel (carril 6), testículos (carril 7), tiroides (carril 8), útero (carril 10), estomago (carril 11), laringofaringe (carril 12), y páncreas (carril 13) se sondeo. La inmunohistoquímica in situ de tejidos humanos normales (c) y de tejidos de cáncer (d). Secciones congeladas se inmunotiñieron con TRA-8.

Figura 6. Actividad tumoricidad de TRA-8. Ratones SCDI se inocularon subcutáneamente con células 1321N1. Los ratones fueron inyectados intravenosamente con una dosis simple de 100 µg de TRA-8 durante el segundo día después de la inoculación del tumor (a), o con tres dosis de 100 µg de TRA-8 iniciando siete días después de la inoculación del tumor (b) el crecimiento del tumor se determinó por el peso y se examino histológicamente con teñido H&E. las fotografías muestran crecimiento de tumor viable en las tablas de control en ratones tratados con TRA-8 (c panel superior), y teñido H&E el tumor (c panel inferior). Ratones SCID fueron inyectados intravenosamente con 10^6 células Jurkat y tratada con una dosis simple de TRA-8 en el segundo día después de la

inyección. Siete días más tarde, células de bazo fueron cosechadas o mantenidas con anticuerpos CD3 antihumano analizadas mediante citometria de flujo (d), o mediante inmunohistoquímica (e).

La figura 7 muestra expresiones de superficie de células DR5 en RA (A) y O A (B) células sinoviales. 1 X 10^6 células sinoviales cultivadas primarias fueron tenidas con TRA-8 purificado y afinidad y seguido por anticuerpos IgG1 antiratón de cabra conjugado con PE. 10,000 células viables analizadas mediante FACSvantage.

La figura 8 es una serie de gráficas que muestran la viabilidad de las células como una función de apoptosis inducida por concentración de TRAIL y TRA-8 de cepas representativas de RA (A) y O A (B) células sinoviales con varias concentraciones del TRAIL soluble recombinante (los círculos abiertos) o TRA-8 purificado de afinidad (los círculos más cerrados). La viabilidad de la célula es el porcentaje de cpm de células tratadas versus el cpm de células no tratadas.

557

La figura 9 es una serie de gráficas que muestran la dependencia de caspaza de apoptosis mediada por DR5 de células sinoviales RA. Las células sinoviales RA (RA512) son incubadas con 50 ng/ml de ligando Fas soluble (cuadrados abiertos), anticuerpo anti-Fas (CH 11) (cuadros cerrados), TRAIL soluble (círculos abiertos), o anticuerpo anti-DR5 (TRA-8) (círculos cerrados) en la presencia de concentraciones variables de inhibidores de caspaza. Después de cultivo durante toda la noche, la viabilidad de las células se determinó mediante ATPLite.

La figura 10A es un ensayo de cambio de gel electroforetico que indica la activación en NFkb. Células RA1016 son incubadas con 20 ng/ml de TNF-a, 50 ng/ml de TRAIL soluble a 50 ng/ml de TRA-8 los puntos de tiempo indicados antes de ser sometidos a electroforesis. Las figuras 10B y C son gráficas que muestran la producción de MMP-1 y MMP-3. $1X10^6$/ml de células sinoviales RA indicadas son incubadas con concentraciones indicadas de TNF-a (los círculos abiertos), TRAIL (los triángulos abiertos) o TRA-8 (el círculo cerrado). Después del cultivo durante toda la noche, los superdonantes

558

del cultivo son recolectados. Los niveles de MMPs en supernadante de cultivo se determinan mediante ELISA.

Figura 11. El TRA-8 no indica toxicidad hepatocelular. (a) tejido de hígado normal no expresan DR5. Las secciones de parafina de dos tejidos de hígado normal, un tejido de carcinoma hepatocelular, y la reparación de citospina de células HepG2 fueron preparadas para teñido H&E, y secciones congeladas correspondientes fueron teñidas con TRA-8. (b) análisis de citometria de flujo de expresión de superficie celular de DR5. Los hepatocitos, aislados de dos tejidos de hígado normal y de un caso de tejido de carcinoma hepatocelular, en las células HepG2 fueron teñidas con TRA-8, anticuerpo anti-Fas (DX2) o un anticuerpo de control de isótopo. Los histogramas sólidos indican TRA-8 o teñido DX2, y los histogramas abiertos son los controles de isótopos correspondientes.

La figura 12. TRAIL pero no TRA-8 induce toxicidad hepatocelular. Hepatocitos humanos normales frescos fueron mantenidos en un Medio de Cultivo de Hepatocito. (a) apoptosis de hepatocitos se indujo con 1 μg/ml de TRAIL

soluble más reticulador o TRA-8 durante los puntos de tiempo indicado. La viabilidad celular se determinó mediante ATPLite. Los resultados son presentados como células viables porcentuales comparados con el control del medio. Las barras sombreadas indican TRAIL y las barras negras indican TRA-8. (b) los núcleos condensados hepatocitos fueron teñidos con Hoechst 33352 y analizados mediante citometria de flujo. (c) efecto de cicloheximida en apoptosis de hepatocitos. Los hepatocitos fueron cultivados en medio de control o con 1 μg/ml de TRAIL o TRA-8 en la presencia (barras cerradas) o ausencia (barras abiertas) de 1 μg/ml de cicloheximida durante ocho horas. La viabilidad de las células se determinó mediante ATPLite. Los resultados son presentados como media±SEM de cultivos triplicados de dos experimentos. De una comparación de la susceptibilidad de los hepatocitos normales DR5 y apoptosis mediada por Fas. Hepatocitos aislados recientemente fueron incubados con concentraciones indicadas de TRAIL soluble, TRA-8, fasL soluble o el anti-Fas mAb CH11 durante 6 horas. La viabilidad de las células se determinó mediante el ensayo ATPLite. Los resultados son presentados como el porcentaje de las células viables comparadas con el control de medio. Para hepatocitos normales, la media±SEM de

cuatro individuos normales se presenta. Los resultados de la célula de carcinoma hepatocelular de un paciente y células HepG2 se presentan como el promedio de los cultivos triplicados.

Figura 13. TRAIL induce hepatitis. 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 expresión del TRAIL se indujo mediante la dosis indicada de tetraciclina. (a) análisis de banda de proteínas Northern de expresión de TRAIL humano en el hígado 24 horas después de la inoculación del vector e inducción con tetraciclina, el ARN total se aisló de los hígados y se sondeó con cADN de TRAIL humano o β-actina. (b) los niveles de suero de de AST. 24 horas después de transducción de TRAIL, niveles de suero de AST se determinaron. (c) la muerte celular mediada por TRAIL de hepatocitos infectados con vector adenoviral: ratones B6 fueron intravenosamente inoculados con vector adenoviral inducible con tetraciclina. 48 horas después de la inoculación, los hepatocitos delatores de control inoculado y no inoculados se aislaron y se

561

incubaron con concentraciones indicadas de TRAIL durante ocho horas (panel izquierdo). La viabilidad de la célula de los hepatocitos se determinó mediante el ensayo ATPLite. Los ratones como inoculados con vector adenoviral como anteriormente, fueron inyectados intravenosamente con 10 μg de TRAIL humano soluble 48 horas más tarde. Los niveles de suero de AST fueron medidos en promedio 24 horas después de la inyección TRAIL (panel derecho). (d y e.) El análisis de histología del hígado con daño inducido por TRAIL. Los hígados fueron recolectados 24 horas (d) y 7 días (e) después de la transducción con TRAiL. Las secciones de parafina fueron teñidas H&E, y fotografiadas a 100X (panel superior) y 400X (panel inferior).

La figura 14 es una serie de gráficos que muestran la actividad de las células T y las células B purificadas de PBMC humano que expresan niveles crecientes de DR5 como se determinó mediante la citometria de flujo para células de descanso (no llenada) y activadas (sombreadas).

La figura 15 son gráficas de viabilidad como una función de la concentración de TRA-8 para las células B y las células T

purificadas descritas en la figura 14 que han sido estimuladas durante 48 horas anti-CD3 o anti-μ, con células activadas y reticulares mediante diferente densidad de Ficoll-Paque. La viabilidad se determina mediante ensayo ATPLite.

La figura 16 es un histograma y gráficas de citometrias de flujo que muestran la expresión de CD3 en una población de lifoncito de compuerta para ratones NOD/SCID vaciado de células NK inyectados con PBMC humano y TRA-8 o IgG (control).

La figura 17 muestra microfotografías celulares teñidas CD3 y TUNEL para tejido de bazo de ratón como se detalla en el ejemplo 13.

La figura 18 muestra gráficas de citotoxicidad para leucemia lifoncitica crónica (CCL) y células B normales humanas en la presencia de TRA-8 BISVIII y la combinación de estos.

La figura 19 (a). Enlace específico de 2E12 a DR4. Los platos ELISA fueron recubiertos con la forma soluble de proteínas de

fusión IgG1 Fc humano de receptor TRAIL humano como se indico e incubó con concentraciones indicadas de mAb 2E12, seguido por IgG1 de antiratón conjugado con HRP. La reacción se desarrollo con un amortiguador de sustrato TMB y valores OD fueron medidos en 450/650nM.

La figura 19 (b). 2E12 uniéndose a la superficie celular de DR4. Las células Cos-7 se tranfectaron con el vector que contiene longitud completa del cADN para DR4 (histograma solidó) o el vector de control (histograma abierto). Las células transfectadas fueron teñidas con 10 µg/ml 2E12 y igG1 antiratón conjugado con PE. Las células fueron analizadas mediante citometria de flujo.

Figura 19 (c). Actividad inducida por apoptosis de 2E12. Células de linfoma B Ramos Humana fueron incubadas durante toda la noche con las concentraciones indicadas de 2E12 en la presencia de 2 µg/ml de IgG1 de antiratón. La viabilidad de las células se determinó mediante el ensayo ATPLite. (b) la activación de caspaza inducida por 2E12. Células Ramos fueron tratadas con 2E12 y anticuerpo IgG de antiratón en los puntos de tiempo indicado. La activación de caspaza y clivage PARP

se determinaron mediante análisis de bandas de proteínas Western utilizando anticaspaza especifica o anticuerpos de PARP.

La figura 20. El efecto 2E12 y adriamicina en ratones desnudos atimicos que llevan solo injertos de cáncer de mama. Las células 2LMP ($3X10^7$) se inyectaron subcutáneamente en ratones desnudos atimicos en el día 0. Dos grupos de ratones fueron inyectados intraperitonealmente con 200 µg 2E12 en los días 7, 10, 14, 17, 21, y 24. Dos grupos de ratones recibieron adriamicina i.v. (6 mg/kg) en los días 8, 12, 16. Un grupo de ratones no recibió anticuerpos. Los datos son expresados el cambio promedio en el tamaño de tumor con relación al tamaño en el día 7 (n=8 ratones/grupo).

La figura 21. El efecto de TRA-8, 2E12 y adriamicina en ratones desnudos atimicos que llevan solo injertos de cáncer de mama. Las células 2LMP ($3X10^7$) se inyectaron s.c. en ratones desnudos atimicos en el día 0. Dos grupos de ratones fueron inyectados con i.p. con 200 µg de TRA-8 y 2E12 en los días 7, 10, 14, 17, 21, y 24. Dos grupos de ratones recibieron adriamicina i.v. (6 mg/kg) en los días 8, 12, 16.

565

Un grupo de ratones no recibió anticuerpos. Los datos son expresados como el cambio promedio en el tamaño de tumor con relación al tamaño en el día 7 (n=8 ratones/grupo).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La falla al suprimir células es debido a los defectos en el sistema inductor de apoptosis el cual esta asociado con defectos que ilustrativamente incluyen la expresión o función del ligando, el receptor, y las moléculas regulatorias o efectuadas intracelulares. La presente invención logra un método para corregir un sistema inductor de apoptosis deficiente así como también elucidar los defectos específicos inherentes en un sistema de inducción de apoptosis defectuoso.

La presente invención se relaciona con una nueva clase de anticuerpos monoclonales que tienen actividad inductora de apoptosis in vivo e in Vitro selectiva contra receptores TRAIL específicos, que incluyen DR5, DR4, DcR1 y DcR2. Así, los anticuerpos de la presente invención específicamente se

unen a uno de los receptores TRAIL. Por "selectivamente unido" o "que específicamente reconoce" se significa que el anticuerpo se une solo a un receptor TRAIL y muestra poca o ninguna unión a otros tipos de receptores TRAIL que utilizan análisis de banda de proteína Western tradicional. Un anticuerpo DR5 de la presente invención se une al DR5 selectivamente y no muestra unión por encima de aproximadamente 1,5 veces el trasfondo para DR4, DcR1 o DcR2. Similarmente, un anticuerpo DR4 de la presente invención se une al DR4 selectivamente y no muestra unión por encima de aproximadamente 1,5 veces el trasfondo para DR5, DcR1 o DcR2. La presente invención tiene utilidad como reactivo para investigación de señalización de apoptosis, así como también utilidad como un terapéutico efectivo contra receptores TRAIL que expresan células, que ilustrativamente incluyen una amplia clase de células cancerosas, células que muestran desregulación del sistema de apoptosis, linfocitos activados u otras células inmunes activadas (por ejemplo células linfoides y células mieloides), células infectadas viralmente, y células sinoviales anormalmente proliferativas (por ejemplo células sinoviales de artritis reumatoide, que incluyen células sinoviales inflamatorias, linfoides

activados y células de mieloide en el sinovio, los sinoviocitos similares a macrófagos, y los sinoviocitos similares a fibroblastos) de las enfermedades autoinmunes. Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención son específicos en tipos particulares de unión de receptores TRAIL a pesar de la homología entre ellos. Los anticuerpos de la invención logran apoptosis objetivo de solo aquellas células que expresan un receptor TRAIL objetivo o alternativamente, bloquea la apoptosis TRAIL de células que expresan un receptor objetivo.

Un anticuerpo monoclonal DR5 o DR4 de la presente invención sirve como un inductor potente de apoptosis en células que expresan DR5 o DR4, respectivamente, in Vitro y como un potente inductor de apoptosis in vivo. La secuencia CDR fragmentaria humanizadas injertadas sobre estructuras de anticuerpo humanizado y proteína de fusión DR5 o anticuerpos DR4 de la presente invención exhiben propiedades apoptosicas similares.

Hasta la fecha, ningún anticuerpo monoclonal esta disponible que se una a la superficie celular DR5 y el cual, a bajas

concentraciones, induzca a apoptosis de células que expresan DR5 tanto in vitro como in vivo en la ausencia de un reticulador. La presente invención incluye un anticuerpo de DR5 operativo como un agente terapéutico en el tratamiento de una variedad de enfermedades. Aunque el TRAIL soluble se ha mostrado como efectivo en la inducción de apoptosis de células tumorales in vivo, la actividad de muerte aparece ser muy baja con las grandes y repetidas dosis que a menudo son requeridas (13). La presente invención suministra un anticuerpo purificado que se une al receptor TRAIL DR5, en donde dicho anticuerpo, en su forma soluble a bajas concentraciones, tiene una actividad inductora de apoptosis in vivo e in Vitro en las células objetivo que expresan DR5. en una modalidad preferida, el anticuerpo purificado se une al receptor TRAIL DR5 en la ausencia de reticulación de anticuerpo. Preferiblemente, el anticuerpo no induce apoptosis significativa de células de fibroblasto normales. Preferiblemente, la actividad que induce a apoptosis se caracteriza por menos del 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% de viabilidad, o cualquier porcentaje entre ellos, de las células objetivo a concentraciones de anticuerpo de menos de aproximadamente 0,1, 1,5, 10, o 20 µg/ml o cualquier

concentración entre estas. El anticuerpo purificado específicamente se une al receptor TRAIL DR5 y no se une a los receptores TRAIL DR4, DcR1, o DcR2 luego de análisis de banda de proteína Western de rutina. En una modalidad preferida, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, que tiene preferiblemente la misma especificidad de epítopo que un hibridoma ratón-ratón TRA-8 que tiene un Número de Acceso ATCC PTA-1428.

El TRA-8 una serie de anticuerpos DR5 de acuerdo con la presente invención, es farmacéuticamente efectivo en animales que llevan un transgen DR5 humano y también tiene utilidad para establecer un modelo de investigación del papel del DR5 y el TRAIL.

Varias modalidades en la invención suministran anticuerpos que inducen apoptosis en la presencia o ausencia de reticulación. Por ejemplo, una modalidad preferida del anticuerpo DR5 (por ejemplo TRA-8) induce a apoptosis en la ausencia de reticulación o "corsslinking". "Crosslinking" inlcuye, por ejemplo, crosslinking por un anticuerpo secundario. Otras modalidades suministran anticuerpos que

inducen apoptosis en la presencia de reticuladores, que incluyen, por ejemplo, una modalidad preferida del anticuerpo DR4 (2E12).

Así, la invención suministra un anticuerpo purificado que se une específicamente a un receptor TRAIL DR4, en donde dicho anticuerpo, en su forma soluble, tiene una actividad inductora de apoptosis in vivo e in Vitro en células objetivo que expresan DR4. Como una modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que tiene la misma especificidad de epítopo que el hibridoma 2E12 que tiene Número de Acceso ATCC PTA-3798, depositado en Octubre 24, 2001, tiene nombre designado "Clon de Hibridoma 2E12 Contra DR4 Humano", a nombre de la UAb Research Foundation. El 2E12, uno de una serie de anticuerpos DR4 de la presente invención, es farmacéuticamente activo el reducir el tamaño del tumor, comparado con los animales de control no tratados o comparado con el tamaño del tumor antes de tratamiento, in vivo en animales con canceres de expresión DR4.

Anticuerpos a DR5 son efectivos en forma soluble a bajas dosis, por bajas dosis se significa dosis o concentraciones

571

de menos de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 µg/ml in Vitro y menos de aproximadamente 1-10 mg/kg in vivo. Una característica preferida de los anticuerpos de la presente invención es que ellos inducen la apoptosis selectivamente a células que expresan receptores DR5 o DR4, sin inducir apoptosis en hepatocitos normales, no activados, no transformados, fibrositos, sinoviocitos, etc. Un anticuerpo de acuerdo con la presente invención surgida contra un receptor TRAIL es cosechado de acuerdo con la presente invención de un animal experimental pero puede ser hecho mediante cualquier método de producción de anticuerpo o síntesis conocido la técnica. Al humanizar el anticuerpo de acuerdo con la presente invención para mantener la actividad de unión del receptor aunque elicitando una respuesta inmune disminuida y terapéuticamente tolerable dentro de un sujeto humano, un anticuerpo de receptor TRAIL humanizado de acuerdo con la presente invención se utiliza como agonista terapéutico o antagonista para un receptor TRAIL dado. La presente invención es operativa como un terapéutica in vivo en razón a que la reticulación secundaria del anticuerpo receptor antiTRAIL, opcionalmente, no se requiere.

572

La presente invención se extiende más allá de un anticuerpo receptor antiTRAIL simple que tiene efecto apoptosicos agonistas o antagonistas. En su lugar, dos o más anticuerpos receptores antiTRAIL son puestos en contacto con el cultivo de células in Vitro o un tejido de cuerpo del sujeto in vivo para crear un tratamiento mejorado. Por "tratamiento mejorado" se significa cualquier efecto aditivo, sinergistico, o potenciador. Por ejemplo, la línea celular glioma U87 y las líneas celulares hematopoieticas U937 responden a la exposición sinérgica a anti-DR4 angonista y anticuerpo anti-DR5 mientras que la exposición al anticuerpo DR5 agonista solo muestra solamente éxito limitado en inducir apoptosis.

Adicionalmente, los anticuerpos de receptor anti-TRAIL antagonista tienen utilidad particular en la presente invención cuando un anticuerpo es específico para unirse a uno de los receptores señuelo DcR1, DcR2 u OPG. El bloqueo selectivo de un receptor señuelo con un anticuerpo de acuerdo con la presente invención tiene el efecto en los tipos de célula que expresan receptores señuelo de cambiar el equilibrio de unión TRAIL hacia aquellos receptores TRAIL

573

capaces de trasducir la señal de apoptosis. Así, en otra terapia combinada de acuerdo con la presente invención, un receptor señuelo que se une al anticuerpo sensibiliza una célula de expresión hacia una señal de apoptosis agonistica que trasduce la unión del receptor TRAIL.

En otra modalidad, la presente invención logra un método de elucidar epítopos agonistas y antagonistas de un receptor TRAIL dado. Adicionalmente, los polimorfimos entre individuos asociados con un receptor TRAIL dado son elucidados de acuerdo con la presente invención a través del uso de un panel de anticuerpos monoclonales que tiene cada uno una variable diferente o región CDR. Un panel caracterizado de anticuerpos monoclonales suministra la capacidad de definir epítopos agonistas y antagonistas y polimorfismos. Así, un panel de anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención tiene la utilidad en el descubrimiento de drogas y/o escogencia de sujetos para proclividad a enfermedad.

Aun otra modalidad de la presente invención 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 de receptor TRAIL es definido como conteniendo un número suficientes de bases para elicitar una respuesta inmunogenica a un receptor TRAIL activo expresados en una superficie de célula objeto. Un fragmento de fusión de receptor TRAIL que incluye al menos diez aminoácidos una proteína de fusión de inmunoglobulina o un fragmento de este se define aquí por incluir una proteína nativa o sintética o un segmento de polipéptido que tiene un número suficiente de base de aminoácido para activar una respuesta en cascada inmunogenica dentro de un sujeto. Un inmunogeno de la presente invención incluye una fusión de un fragmento de receptor TRAIL acoplado a un fragmento de inmunoglobulina tiene utilidad como un terapéutico in vivo para elicitar un anticuerpo receptor anti-TRAIL in situ dentro de un sujeto.

En aun una modalidad adicional, la presente invención es operativa como terapia de genes. La invención suministra así un método de inducir selectivamente apoptosis en células objetivo que complete las etapas de transfectar las células objetivo con un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico receptor TRAIL expresable; expresar en dichas

575

células un receptor TRAIL codificado por dicha secuencia de ácido nucleico del receptor TRAIL; y poner en contacto dichas células con anticuerpo inductor de apoptosis selectivo para unir dicho receptor TRAIL. En un aspecto de la terapia génica de la presente invención, las células objetivos son trasfectadas 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 la terapia agénica ilustrativamente incluyen adenovirus, pAdCMV5. Luego de que las células otejidoa objetivos expresen el receptor TRAIL trasfectado, las células o tejidos son expuestas a un anticuerpo de acuerdo con la presente invención especifico para unir el receptor TRAIL trasfectado. Se apreciara que el anticuerpo de receptor anti-TRAIL es agonista o antagonista a este consistente con el resultado terapéutico deseado.

Los anticuerpos de la presente invención son también operativos en conjunto con un sensibilizador. Un sensibilizador como se utiliza aquí se define por incluir cualquier estimulo que incluya apoptosis, que incluye luz ultravioleta, moléculas organicas específicamente que

incluyen la clase de bisindolmaleimidas, metales pesados y especies de radicales libres.

En el contexto de la terapia de cáncer, el TRA-8, es capaz de inducir apoptosis de la mayoría de las células tumorales sensibles a TRAIL en una forma dependiente de caspaza en la ausencia de crosslinking secundaria. El TRA-8 o 2E12, solos o en combinación con otros anticuerpos, exhiben una actividad tumoricidad fuerte *in vivo*. La capacidad del TRA-8 o el 2E12 para inducir apoptosis de la mayoría de las células sensibles a TRAIL confirma que bien sea el DR5 o el DR4 solos es suficiente para disparar la apoptosis. La mayoría de las células tumorales detalladas aquí expresa superficie celular DR5 y su susceptibilidad a muerte de célula inducida por TRA-8 paralela su susceptibilidad a TRAIL, que indica que el DR5 es un receptor de muerte primario para la apoptosis mediada por TRAIL en la mayoría de las células tumorales. Similar al resultado se obtuvieron con anticuerpos específicos para DR4 (por ejemplo 2E12). Así, la expresión diferencial del DR5 o DR4 mediante células normales o cancerigenas es operativa en la selectividad de la apoptosis mediada por TRAIL. El TRA-8 puentea los receptores señuelo para inducir la apoptosis

577

mediada por TRAIL. Solamente 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 células tumorales a la apoptosis mediadas por TRAIL.

Aunque estudios previos han indicado que la administración sistémica de la forma soluble de TRAIL en animales induce regresión tumoral sin originar toxicidad [3,4,22], la forma unidad a membrana del TRAIL induce daño al hígado en ratones como se muestra aquí. Sin embargo, la toxicidad hepático del TRAIL es mucho menos potente que la del ligando Fas como se demostró mediante la menor susceptibilidad de los hepatocitos normales a daño inducido por TRAIL comparado con el ligando Fas y mediante la falta de letalidad del TRAIL in vivo. Así como la titulación del TRAIL tiene utilidad en terapia de cáncer.

Como se detalla aquí, la ausencia de niveles significativos de expresión de proteína DR5 mediante hepatocitos normales es mostrada y esta asociada con resistencia de hepatocitos a la apoptosis inducida por TRA-8. La reticulación del DR5 con

578

anticuerpo monoclonal hay suficiente para organizar las formas homopolimericas del receptor de muerte capaz de disparar la apoptosis.

Experimentos en titis no indicaron evidencia de la toxicidad hepática de la administración del TRA-8. Así, un anticuerpo DR5 monoclonal agonista es probable que sea más selectivo y seguro que el TRAIL soluble como un agente terapéutico. Similarmente el DR4 se expresa mediante células transformadas o activadas y no se expresan cantidades apreciables o solo a muchas más bajas cantidades mediante células normales, por ejemplo, fibroblastos. El DR4 de la presente invención de este induce a apoptosis de ciertas células objetivo sin muerte celular apreciable en células no objetivo, como fibroblastos, etc. como se utiliza aquí la ausencia de un efecto o la falta de un efecto apreciable o significativo se refiere e incluye la ausencia completa del efecto o un efecto que es menor que o igual al antecedente o los niveles de control y no excede el antecedente y los niveles de control en más de 1,5 veces el antecedente o el nivel de control.

Como un ensayo escogido o una herramienta de imágenes, la presente invención es bien adecuada para detectar pequeños agrupamientos de células DR4 o DR5 que pueden todavía exhibir morfología de célula anormal. Por ejemplo, el teñido de una sección celular in situ de células cancerosas humanas que incluyen pulmón, próstata y canceres de hígado con anticuerpos marcados de acuerdo con la presente invención fácilmente identifican células cancerosas. Los anticuerpos de la presente invención son también útiles en la escogencia de otras manifestaciones de enfermedad que incluyen, por ejemplo, varias enfermedades inflamatorias y autoinmunes, como artritis reumatoide. Tal escogencia puede ser útil aun antes del ataque de otros síntomas clínicos y se pudieran utilizar para escoger sujetos en riesgo de sufrir una enfermedad, de tal forma que el tratamiento profiláctico se pueda iniciar antes de la manifestación de otros signos y síntomas. Específicamente, las células cancerosas se observa que expresan muy altos niveles de DR5 comparadas con las células normales del mismo tipo. Así, la presente invención tiene utilidad como un método de escogencia sensible para malignidades en etapa temprana dentro de tejidos que incluyan al menos pulmón, próstata, colon, sangre, cerviz, mama, y e

hígado. Un proceso terapéutico se detalla aquí para la inhibición de proliferación e células anormales asociadas con enfermedades de cáncer ilustrativamente malignas y leucemias linfáticas entre otras.

La presente invención se detalla aquí con particularidad a un anticuerpo monoclonal DR5 antihumano designado como TRA-8, que tiene número de acceso ATCC PTA-1428. Se aprecia que las técnicas de resultados detallados con respecto al anticuerpo monoclonal DR5 antihumano agonista TRA-8 son completamente extendibles y aplicables a los anticuerpos DR5 antagonistas, así como también los anticuerpos que surgen contra DR4, DcR1 y DcR2 que actúan tanto de manera agonista como antagonista. Así como la presente invención se detalla aquí con respecto al anticuerpo que induce apoptosis específico para DR4 humano. En una modalidad el anticuerpo tiene la misma especificidad de epítopo que el hibidroma 2E12, el cual fue depositado en Octubre 24, 2001, para procurar un breve acceso a nombre del UAB Research Foundation, con la American Type Culture Collection, Rockville, Md. La descripción de material depositado fue "2E12 Hybridoma Clone Against Human DR4", con la designación de cepa 2E12 y el número de referncia como

PCT/14151. 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 expresión de los receptores señuelo para TRAIL influencia la susceptibilidad de las células. Más aun, se ha sugerido que el DR5 se debe asociar con DR4 para transducción efectiva de la señal de apoptosis a través del FADD y la senda de la caspaza 8. La disponibilidad del anticuerpo anti-DR5 monoclonal agonista permitió la evaluación de la regulación de la señalización de DR5 y su papel relativo en la apoptosis mediada por TRAIL. La comparación de la susceptibilidad de las células a apoptosis mediada por TRA-8 con su susceptibilidad a la apoptosis mediada con TRAIL ofrece discernimiento del papel del DR5 en la apoptosis mediada por TRAIL y el mecanismo que puede afectar la susceptibilidad. Se suministran ventajas similares mediante el anticuerpo de DR4.

Esta ventaja generalmente se extiende a anticuerpo DR5 y DR4 humanizados de la presente invención. Un clon molecular de un anticuerpo a DR5, por ejemplo, se repara mediante técnicas conocidas como se detalla con respecto a los siguientes

582

ejemplos. La metodología de ADN recombinante (33) es operativa aquí para construir secuencias de ácido nucleico que codifican una molécula de anticuerpo monoclonal o una región que se une al antígeno de este.

La presente invención permite la construcción de anticuerpos receptores de TRAIL humanizados que poco probablemente inducen una respuesta del anticuerpo anti-ratón humano (en lo sucesivo demonizado como "HAMA") (34), aunque todavía teniendo una función efectora del anticuerpo efectiva. Los anticuerpos completamente humanos también se pueden hacer al inmunizar ratones capaces de hacer un anticuerpo humano completa (por ejemplo ratones genéticamente modificados para producir anticuerpos humanos), escogiendo clones que según a DR4 o DR5 inducir apoptosis y competir por TRA-8 o el epítopo 2E12. Ver como por ejemplo, Lonberg and Huszar (1995) Human antibodies from transgenic mice, Int. Rev, Immunol. 13:65-93, que se incorpora aquí como referencia de su totalidad para los métodos de producción de anticuerpos completamente humano. Como se utiliza aquí, los términos "humanos" y "humanizados" en relación con los anticuerpos, se relacionan con cualquier anticuerpo que se espera que elicite una

respuesta inmunogénica terapéuticamente tolerable en un sujeto humano.

La presente invención suministra un anticuerpo DR5, un anticuerpo anti-DR5 humanizado, inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera TRA-8 y inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera humanizadas. La invención también suministra un anticuerpo DR4, un anticuerpo DR4 humanizado, inmunoglobulinas de cadenas pesada y ligera del anticuerpo DR4 y e inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera humanizadas, ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos y las cadenas pesada y ligeras, vectores que comprenden aquellos ácidos nucleicos, y células que comprenden los vectores. Ciertos truncamientos de estas proteínas o los genes desarrollan las funciones regulatorias o enzimático de la proteína o el gen de secuencia completa. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifican a estas se pueden altera mediante sustituciones, adiciones, supresiones o expresión multimérica que suministra proteínas funcionalmente equivalentes o genes. Debido a la degeneración de la secuencias que codifican ácido nucleico, otras secuencias que codifican sustancialmente las mismas secuencias de aminoácido

584

como aquellas de proteínas de ocurrencia natural se pueden utilizar en la práctica de la presente invención. Estas incluyen, pero no están limitadas a, secuencias de ácido nucleico que incluyen todas o porciones de las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos anteriores, que son alteradas mediante la sustitución de diferentes codones que codifican un residuo de aminoácido funcionalmente equivalente dentro de la secuencia, produciendo así un cambo silencioso. Se aprecia que la secuencia de nucleótidos de una inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención tolera variaciones de homología de 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, 1998, 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 aminoácido dentro de una secuencia de polipéptido se pueden sustituir mediante otro aminoácido de una polaridad similar que actúa como un equivalente funcional, que resulta en alteración silenciosa.

Los sustitutos para un aminoácido dentro de las secuencias se puede seleccionar de otros miembros de clase a la cual pertenece el aminoácido (es decir, una sustitución conservadora). Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobo) incluyen alanita, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, tritofano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteina, tiroxina, asparagina, y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina y histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. También se incluyen dentro del alcance de la presente invención las proteínas o fragmentos o derivados de esta que son diferencialmente modificados durante o después de la traducción, por ejemplo, mediante glicosilación, clivage proteolitico, unión a una molécula de anticuerpo u otro ligando celulares, etc. además, el vector recombinante que codifica las secuencias de ácido nucleico de los anticuerpos de la presente invención se puede trabajar por ingeniería con el fin modificar el procesamiento a la expresión de un vector. Otras modificaciones se pueden hacer bien sea del ácido nucleico o en la secuencia de aminoácidos sin reducir o

sin reducir sustancialmente la actividad de apoptosis en el anticuerpo. Tales modificaciones pueden ocurrir en las regiones CDRs o no CDR utilizando técnicas de rutina en el arte. Ver, por ejemplo, Yang et al. (1995), J. Mol. Biol. 254:392-403, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad para los métodos de mutagénesis andante CDR.

Adicionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor se puede mutar in Vitro o in vivo para crear y/o destruir la traducción, iniciación y/o secuencias de terminación o crear variaciones regiones de codificación y/o formar nueva restricción de sitios de endonucleasas o destruir aquellas preexistentes, para facilitar modificación in Vitro adicional. Cualquier técnica de mutagénesis conocida en el arte se puede utilizar, incluyendo pero no estando habilitada a mutagénesis dirigida a sitio in Vitro, J. Biol. Chem. 253:6551, uso de ligadores Tab (farmacia), y similares.

Los datos de la cristalografía de rayos X indican que el doblez de inmunoglobulina del anticuerpo forma generalmente una estructura cilíndrica larga que comprende dos capas de laminas b antiparalelas, consistiendo cada una de tres o

cuatro cadenas b. En una región variable, tres ciclos de cada una de los dominios V y de los agrupamientos de las cadenas H y L se juntan para formar un sitio de unían antígeno. Cada una de estos ciclos es denominado una región de determinación de complementariedad (CDR). Los CDRs tienen las variabilidades más altas en las secuencias de aminoácidos con el anticuerpo. Las porciones de la región variable que no son parte de un CDR son denominadas "regiones de estructura" (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 región de unión para la región epítopo receptor a TRAIL. Se apreciara que injertar una porción de la cantidad total de CDR un donador es operativo aquí. Se entiende que injertar generalmente implica el reemplazo, residuo por residuo, de un aminoácido o región, por otro. Sin embargo, ocasionalmente, específicamente 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 e inserciones, así como también los reemplazos y las inversiones, están dentro del desperdicio de los conocedores de la técnica.

Un anticuerpo de la presente invención se obtiene mediante, por ejemplo, injertar cada una de los CDR de las subunidades de la cadena L y la cadena H de un anticuerpo monoclonal receptor anti-TRAIL en una región CDR correspondiente de un anticuerpo humano, humanizando de esta manera un anticuerpo monoclonal de ratón contra un receptor TRAIL.

Los fragmentos de anticuerpo que contienen el idiotipo de la molécula también son generados y operativos aquí utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos ilustrativamente incluyen un fragmento receptor anti-TRAIL (AB`) que se puede producir mediante digestión de pepsina de la molécula de anticuerpo, o los fragmentos AB` del anticuerpo receptor TRAIL generados a través de la reducción de los puentes de disolfuro del fragmento (AB`)2 del receptor TRAIL, y el fragmento del anticuerpo que son generados al tratar la molécula de anticuerpo con papaina y un agente reductor.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden hacer utilizando numerosas técnicas conocidas en el arte. Por vía

de ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-DR5 TRA-8 se puede obtener al cultivar un hibridoma que, a su vez, se puede obtener al inmunizar un ratón con DR5 humano y subsecuentemente fusionar las células de bazo o las células de nodo de linfa de un ratón con células de mieloma de ratón.

La preparación de un anticuerpo monoclonal ilustrativamente involucra las siguientes etapas:

a) purificación de una biomacromolécula para uso como un antígeno;

b) preparación de las células que producen anticuerpos, después de inmunizar primero un animal utilizando inyecciones del antígeno, sangrar el animal ensayar el titulo del anticuerpo, con el fin de determinar cuando remover el bazo;

c) preparación de células de mieloma;

d) fusionar las células que producen anticuerpo y las células de mieloma;

590

e) seleccionar un hibridoma que produce un anticuerpo deseado;

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

g) opcionalmente, cultivar las células de hibridoma, o hacer crecer animales en los cuales las células de hibridoma se han transplantado, para preparación a gran escala del anticuerpo monoclonal;

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

El procedimiento para la preparación del anticuerpo monoclonal se detalla adelante con referencia a las etapas anteriormente descritas. Este método para preparar un anticuerpo de la presente invención pretende solo ser ilustrativo de los métodos de preparación y no limitarse a estos. Otros procedimientos conocidos se pueden seguir o modificar los siguientes métodos, por ejemplo al utilizar

591

células de producción de anticuerpos diferentes de las células de bazo y mieloma.

(a) preparación del antígeno

Una proteína recombinante (en los sucesivo denominada como "DR5 humana recombinante" o "DR4 humana recombinante"), efectiva como el antígeno, se obtiene al transfectar células QBI-293A con vector de expresión pAdDR5-IgG para proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de DR5 o DR4 humano y la región Fc del anticuerpo IgG1 humano (en lo sucesivo denominado como "IgG"), (cf. PTA-1428) para expresarlo al utilizar adeno-Quest Kit (Quantum Biotechnologies Inc., Canada), y reconectar y purificar parcialmente el producto de expresión. El plásmido pAdDR5-IgG esta construido al insertar ADN que codifica un DR5 o un DR4 humano y proteína de fusión IgG humana en pAdDCMV5, que es un vector de expresión para células animales. Otros materiales, tales como el ADN que codifica DR5 o DR4, el vector, y el huésped, son operativos aquí.

592

El DR5 o DR4 humano y la proteína de fusión IgG producidas en el supernadante del cultivo de las células QBI-293ª trasfectadas con el vector pAdDR5-IgG se pueden purificar parcialmente mediante cromatografía de afinidad de proteína A-sefarosa o cromatografía de afinidad de proteína G-sefarosa, o cromatografía de intercambio de iones utilizando una columna de recurso Q (nombre comercial; farmacia).

Alternativamente, el DR5 o el DR4 purificado obtenidos de las membranas de célula de líneas celulares humanas se utilizan como el antígeno. Adicionalmente, en razón a que las estructuras primarias del DR4 y DR5 son conocidas (cf. PTA-1428), un péptido que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO. 1, puede ser químicamente sintetizada mediante un método conocido tal como el método Sanger, y utilizada como el antígeno.

(b) preparación de las células que producen anticuerpo

Un ratón se inmuniza con el inmunogeno producido en la etapa (a), mezclada con adjunvante, tal como el adjuvante o alumno completo o incompleto de Freund's. Otros animales

experimentales adecuados ilustrativamente incluyen ratas, cerdos de guinea, conejos, perros, gallinas, caballos, cerdos, vacas y ovejas.

Las rutas de administración adecuadas para inmunizar los animales experimentales incluyen las rutas de inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, e intramuscular, siendo la inyección subcutánea e intraperitoneal la preferida.

Las inmunizaciones son opcionalmente desarrolladas mediante una dosis simple o, mediante varias dosis repetidas a intervalos apropiados (preferiblemente 1 a 5 semanas). Los animales inmunizado9s son monitoreados para titular el anticuerpo en su suero, y un animal con un titulo de anticuerpo suficientemente alto se selecciona como la fuente de las células que producen anticuerpo. Seleccionar un animal con un titulo alto hace el proceso subsecuente más eficiente. Las células para la fusión subsecuente son generalmente cosechadas del animal 3 a 5 días después de la inmunización final.

Los métodos para ensayar titulo de anticuerpos incluyen varias técnicas bien conocidas tales co9mo radio inmunoensayo (en lo sucesivo, denominado como "RIA") inmunoensayo de enzimas de fase sólida (en lo sucesivo, denominado como "ELISA") ensayo de anticuerpo fluoroescente y ensayo de hematoglutinación pasiva, con RIA y ELISA preferidos por razones de sensibilidad de detención, rapidez, preescisión y potencial para automatización.

La determinación de titulo del anticuerpo se puede desarrollar, por ejemplo, mediante ELISA, como sigue, primero, purificar parcialmente DR5 o DR4 que es absorbido sobre la superficie de una fase sólida, tal como un plato ELISA de 96 pozos, seguido por el bloqueo de cualquier superficie restante, a la cual DR5 o el DR4 no se han unido, con una proteína no relacionada con el antígeno, tal como suero albúmina 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 unión del anticuerpo DR5 o DR4 en la muestra al antígeno. Un anticuerpo de antiratón marcado, como el anticuerpo secundario se agrega para ser unido al anticuerpo de ratón. La marca puede incluir

595

una marca enzimatica, una marca fluorescente u otras marcas conocidas en la técnica. Después de lavado, el sustrato de enzima de enzima se agrega, y el titulo del anticuerpo se estima al determinar el cambio de absorbancia debido al desarrollo de color originado por la alteración del sustrato o similar.

(c) preparación de células de mieloma

Las células de líneas celulares de ratón establecidas sirven como la fuente de células de mieloma, incluyendo por ejemplo ratón resistente a 8-azguanina, derivado de cepas del mieloma de BALB/c P3X63Ag8U.1 (P3-U1) (35), P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1) (36). Sp2/0-Ag14 (SP-2) (37), P3X63Ag8.653 (653) (38) y P3X63Ag8 (X63) (39). La línea celular seleccionada es transferida serialmente en un medio apropiado, tal como medio de 8-azaguanina. El medio de 8-azaguanina incluye un medio Dulbecco's Modificado de Iscove's (en los sucesivo denominado como "IMDM") o medio Eagle Modificado de Dulbecco's (en lo sucesivo denominado "DMEM"). El medio RPMI-1640 suplementado con glutamina, 2-mercatoetanol, gentamicina, suero de ternero fetal (en los sucesico denominado como "FCS"), y 8-

azaguanina. Las células son entonces transferidas a un medio normal, tal como un medio ASF104 (Ajinomoto, K. K.) que contiene 10% FCS, 3 a 4 días antes de la fusión, con el fin de asegurar que al menos $2X10^7$ células estén disponibles en el día de la fusión.

(d) fusión de célula

Las células de linfocitos y de plasma obtenidas de cualquier parte adecuada del animal son células precursora para producir el anticuerpo. Las fuentes de célula del linfocito o plasma ilustrativamente incluyen un bazo, nodos de linfa, sangre periférica, o cualquier combinación apropiada de estas, siendo las células de bazo la fuente más común.

Después de la ultima inyección de refuerzo, el tejido en el cual las células productoras de anticuerpo están presentes se remueve de un ratón que tiene un titulo de anticuerpo predeterminado. La técnica habitualmente favorecida por la fusión de las células de bazo células de mieloma preparadas en la etapa c), emplea polietilenglicol.

597

La técnica de fusión incluye lavado de células de base y mieloma con medio libre de suero (tal como RPMI 1640) o solución salina amortiguada con fosfato (en lo sucesivo denominada como "PBS") de tal forma que el índice del número de células de bazo a células de mieloma esta aproximadamente entre 5:1 y 10:1, y luego se centrifugan. Después de que el supernadante se ha descartado y las células peletizadas se han aflojado suficientemente, un ml de medio libre de suero que contiene 50% (p/v) de polietilen glicol (m.w. 1,000 a 4,000) se agrega gota a gota con mezclado. Subsecuentemente, 10 ml de medio libre de suero se agregan lentamente y luego se centrifuga. El supernadante se descarta de nuevo, y las células peletizadas son suspendidas en una cantidad apropiada de medio HAT que contiene una solución de hipoxantina, aminopterina y timidina (en lo sucesivo denominadas como "HAT") y interleoquina-2 de ratón (en los sucesivo denominada como "IL-2"). La suspensión es entonces dispensada en las células de platos de cultivo (también denominas aquí simplemente como "platos") e incubadas en la presencia de 5% v/v CO^2 a 37°C durante aproximadamente dos semanas, con la adición suplementaria de medio HAT según sea lo apropiado.

598

e) Selección de hibridomas

cuando la sepa de mieloma utilizada es resistente a la 8-azaguanina, es decir, es deficiente la enzima de hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), cualquier célula de mieloma no infundida y cualquier fusión de mieloma-mieloma son incapaces de sobrevivir en media HAT. La otra parte, las fusiones de las células que producen anticuerpo una con la otra, así como también los hibridomas de las células que producen anticuerpo con células de mieloma pueden sobrevivir, la anterior solo teniendo una vida limitada. De acuerdo con esto, la incubación continuada en media HAT da como resultado la selección de solo los hibridomas deseados.

Los hibridomas resultantes crecen en colonias que son entonces transferidas a aminotropina a las que les falta medio HAT (medio HAT). Posteriormente, las aliquotas del cultivo del supernadante son removidas para determinar el titulo del anticuerpo ant-Fas mediante, por ejemplo, ELISA. Cuando la proteína de fusión anteriormente mencionada se utiliza como el antígeno ELISA es tambien necesario eliminar los clones que producen un anticuerpo esta específicamente

unido a la región Fc del IgG1 humano. La presencia o ausencia de tal clon se puede verificar como por ejemplo, mediante ELISA utilizando Fas-IgG1 o IgG1, como el antígeno.

(f) clonación

Los hibridomas que se han mostrado que producen anticuerpos específicos, utilizando un método similar a aquel descrito en la etapa b) para determinar el titulo del anticuerpo, son entonces transferidos a otro plato para clonación. Los métodos de clonación adecuados incluyen: el método de dilución limitante, en el cual los hibridomas son diluidos para contener una célula por pozo de un plato y luego cultivados; el metido de agar suave en cual las colonias son recuperadas después de cultivo en medio de agar suave; un metodo de uso de un micromanipulador para separa las células simples para cultivo; y "sembrar un clon", en el cual las células simples son separadas por un separador de célula.

El procedimiento de clonación de acuerdo a, por ejemplo, el metodo de dilusión limitante se repite de 2 a 4 veces por cada pozo demostrando un titulo de anticuerpo, y los clones

que tienen titulo de anticuerpo estable son seleccionados como anticuerpos monoclonales anti-DR5 que producen hibridomas. Los hibridomas que producen que producen un anticuerpo DR5 antiratón son seleccionados mediante un metodo similar para obtener un anticuerpo monoclonal anti-DR5 que produce línea de célula.

El hibridoma ratón-ratón TRA-8que es una base para los anticuerpos de la presente invención se deposito con el American Type Culture Colletion en Marzo 1, 2000, y tiene el número de acceso PTA-1428. El hibridoma 2E12 se deposito en la American Type Culture Colletion en Octubre 24, 2001, como se describió anteriormente y tiene el número de acceso ATCC número PTA-3798. de acuerdo con esto, cuando se prepara un anticuerpo que utiliza un hibridoma ratón- ratón TRA-8 o cualquier otro hibridoma estabilizado, la reparación se puede desarrollar al seguir un procedimiento que inicia de la etapa (g) de adelante, con las etapas (a) a (f) omitida.

(g) cultivo de hibridoma para preparar anticuerpo monoclonal

El hibridoma obtenido mediante la clonación es luego cultivada en medio normal, no en medio HT. El cultivo a gran escala se desarrolla mediante un cultivo de botella de rodillo, utilizando botellas de cultivo grandes, o un cultivo girador. El supernadante de un cultivo a gran escala es entonces cosechada y purificada mediante un método adecuado, tal como filtración de gel, que es bien conocido por aquellos expertos en la técnica, para obtener un anticuerpo monoclonal DR5 o DR4 que es una base para anticuerpos de la presente invención. El hibridoma también puede crecer intraperitonealmente en un ratón singeneico, tal como un ratón BALB/c o un ratón nu/nu, para obtener ascitos que contienen un anticuerpo monoclonal DR5 o DR4 en grandes cantidades. Los kits de purificación de anticuerpo monoclonal comercialmente disponibles (por ejemplo, trampa MAb GII Kit; farmacia) son convenientemente utilizados para purificar los anticuerpos cosechados.

Los anticuerpos monoclonales preparados como anteriormente tienen una alta especificidad para el DR5 o el DR4 respectivamente.

602

(h) Ensayo de anticuerpo monoclonal

Los métodos de identificación adecuados del isótopo y las subclases del anticuerpo monoclonal incluyen el método Ouchterlony, ELISA y RIA. Preferiblemente, un kit comercial se utiliza para identificación, tal como un "Mouse Typer Kit (nombre comercial, BioRad).

La cuantificación de proteínas se puede desarrollar mediante el método Folin-Lowry, o mediante calculo basado en la absorvancia 280 nm (1,4 (OD280)= inmunoglobulina 1 mg/ml).

La identificación del epítopo que el anticuerpo monoclonal reconoce es desarrollada como sigue. Primero, varias estructuras parciales de la molecula que reconoce el anticuerpo monoclonal es preparada. Las estructuras parciales son preparadas mediante el método en donde varios pépticos parciales de la molécula son sintéticamente preparados mediante técnica de síntesis de oligopéptido conocido, o el método en donde el ADN que codifica el polipéptido parcial deseado se incorpora en un plasmado de expresión adecuado, y se expresa en un huésped adecuado, tal como E.coli, para

producir los péptidos. Generalmente, ambos métodos son frecuentemente utilizados en combinación para el objeto anterior. Por ejemplo, una serie de polipéptidos que tienen longitudes apropiadamente reducidas, trabajando desde el terminal C- o N- de la proteína de antígeno, puede ser preparada al establecer técnicas de ingeniería genética. Al establecer que fragmentos reaccionan con el anticuerpo, se obtiene una idea aproximada del sitio del epítopo.

El epítopo es más cercanamente identificado al sintetizar una variedad de pequeños oligopéptidos que corresponden a este o mutantes del péptido que utilizan técnicas de síntesis de oligopéptido establecidas para determinar una propiedad de unión de los péptidos al anticuerpo monoclonal anti-DR5, por ejemplo, que es la base para la preparación del anticuerpo de la presente invención y una inhibición competitiva de unión del péptido al antígeno con el anticuerpo monoclonal. Los kit comercialmente disponibles, tal como el kit SPOTs (Genosys Biotechnologies, Inc.) y una serie de kits de síntesis de péptido multipin basados en el método de síntesis multipin (Chiti ron Corp.) se pueden convencionalmente utilizar para obtener una gran variedad de oligopéptidos.

Un anticuerpo de la presente invención tiene las varias propiedades funcionales a) a f) descritas adelante, cada una de las cuales se verifica por medio, por ejemplo, de un método descrito aquí adelante.

a) Unión especifica de TRA-8 a células que expresan DR5 humano

Una única característica de la presente invención es la capacidad de unir la superficie celular de DR5. Esto se demuestra mediante análisis de citometria de flujo a células que expresan DR5. Primero, la superficie de la célula específica que se une al DR5 se confirma mediante las células COS-7 trasfectadas con el cADN de longitud completa que codifica DR5. Específicamente, TRA-8 solo reconoce células COS-7 trasfectadas con DR5 pero no el vector de control vació o el vector que codifica DR4. segundo, tres origenes diferentes: hematopoietico, glioma, y cáncer de próstata de células de tumor maligno humano son ensayadas. La mayoría de estas células tumorales transformadas expresan niveles significativos de superficie celular DR5, aunque los niveles

605

de expresión varían grandemente. Tercero, son examinados dos paneles de células de fibroblastos sinovial primario humano provenientes de pacientes RA y OA. Todas las células sinoviales RA expresan niveles significativamente altos de DR5 comparados con las células OA.

b) Inducción de apotosis de células de tumor maligno humano in Vitro en ausencia de reticulación

La capacidad de un anticuerpo producido de acuerdo con la presente invención para reconocido receptor TRAIL y para inducir directamente apoptosis de células de tumor humano maligno se determinan mediante ensayo de viabilidad de célula (ATPLite) durante cultivo de células in Vitro con varias concentraciones de un anticuerpo, específicamente TRA-8. La mayoría de las células tumorales son susceptibles de inducir a apoptosis TRA-8. para algunas células, el TRA-8 exhibe una fuerte actividad inductora de apoptosis, por ejemplo, el TRA-8 es capaz de inducir apoptosis de células Jurkar humanas dentro de los niveles pg/ml. De manera importante, la apoptosis inducida por TRA-8 no requiere reticulación, y en la mayoría de las células, el TRA-8 exhibe una más fuerte

606

actividad inducida por apoptosis que el TRAIL soluble recombinante en la presencia del mejorador.

c) actividad tumoral de TRA-8 in vivo.

La actividad tumoricidal de TRA-8 se evalúa en dos modelos de célula tumoral SCID/humano. Primero, los SCID de ratones son intravenosamente inoculados con células Jurkat de leucemia humana y tratadas con una dosis simple (100 µg) de TRA-8. Los resultados muestran que la mayoría de las células Jurkat implantadas son eliminadas de la sangre periférica y del bazo mediante el tratamiento con TRA-8, como se determinó mediante análisis de citometria de flujo y teñido inmunohistoquímico in situ de las células Jurkat. Segundo, las células de astrocitoma humano, 1321N1, son subcutáneamente inoculados en ratones SCID, y los ratones que llevan tumor son tratados con una dosis simple de TRA-8. el crecimiento de células 1321N1 implantadas es significativamente inhibido en ratones tratados con TRA-8 como se determinó mediante los tamaños del tumor y el análisis histológico.

d) Identificación de células sinoviales RA mediante TRA-8

Las células sinoviales primarias aisladas de 8 pacientes RA y 4 OA son ensayadas para expresión de superficie celular de DR5. El TRA-8 es capaz de filtrar positivamente todas las células RA pero negativamente teñir todas las células OA. Así, el RA se diferencia del OA por medio de la expresión superficial DR5 como se detecto mediante el TRA-8.

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

La capacidad del TRA-8 de inducir a apoptosis de células sinoviales se determina mediante ensayo de viabilidad celular durante el cultivo in Vitro en la presencia de varias concentraciones de TRA-8. Todas las células RA exhibieron niveles altos a intermedio de susceptibilidad hacia el ng/ml de TRA-8. Como contraste, todas las células OA son esencialmente resistentes a apoptosis inducidad por TRA-8. De manera importante, el TRA-8 exhibió una mejor actividad inductora de apoptosis a las células senobiales RA que el

608

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 induce la producción de MMPs en células sinoviales RA

En razón a que el TRA-8 es capaz de inducir activación NF-kb en células sinoviales RA como TNF-a, se determina el efecto del TRA-8 sobre la producción de MMP1 y MMP3 de las células sinoviales. Aunque el TNF-a induce un incremento dependiente de la dosis del MMPs, el TRA-8 es incapaz de inducir cualquier producción de MMP, y en algunas concentraciones, el TRA-8 disminuye ligeramente la producción de los MMP en las células sinoviales RA.

g) El TRA-8 induce múltiple activación de caspaza

En razón a que las caspazas juegan un papel crucial en la inducción de apoptosis. La capacidad del TRA-8 de inducir activación de caspaza se determina en las células Jurkat humanas. Cuando las células Jurkat son incubadas con una baja

609

dosis (50 ng/ml) de TRA-8, la activación de caspaza 8, caspaza 9, y caspaza 3 se observa tan tempranamente como 15 minutos después de la incubación como se demostró mediante análisis de proteína Western y análisis de clivage de caspaza. En términos de tiempo, número e intensidad de la activación de caspaza, los anticuerpos de la presente invención incluyendo el anticuerpo demostrativo TRA-8 exhibieron una mucha mejor actividad que cualquier otro anticuerpo inductor de apoptosis, tal como el anticuerpo antihumano Fas (CH-11).

El anticuerpo 2E12 específicamente se une al DR4 en su forma soluble, tiene una actividad inductora de apoptosis in vivo e in Vitro en células objetivo que expresan DR4 (incluyendo por ejemplo, células de cáncer, células sinoviales de artritis reumatoide, células inmunes activadas como linfocitos activados, y células viralmente infectadas), tiene actividad tumoricidad in vivo (preferiblemente, en la ausencia de toxicidad a células no tumorales). Preferiblemente el anticuerpo DR4 de la invención tiene actividad inductora de apoptosis caracterizada por menos de aproximadamente 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, o 10% de viabilidad de la célula objetivo

en concentraciones de anticuerpo de menos de 30 µg/ml, 3 µg/ml, 0,3 µg/ml, 0,03 µg/ml y actividad tumoricidad caracterizada por 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%,70%, 80%, 90%, o 100% de reducción en el tamaño del tumor. Así, un Anticuerpo de la presente invención es una sustancia que tiene una propiedad de inducir selectivamente apoptosis en células patogénicas como se muestra en efecto (a) y (g), de acuerdo con esto, es útil como un agente profiláctico y terapéutico para enfermedades asociadas con supervivencia inapropiada de células o proliferación inapropiada de células, tales, como aquellas atribuibles a la desregulación de sistemas de apoptosis que incluyen el sistema Fas/ ligando Fas.

La capacidad de un anticuerpo de la presente invención a inducir apoptosis se confirma mediante el cultivo de células tales como la línea celular de leucemia humana Jurkat (American Type Culture número TIB-152) y la línea celular astrocitoma 1321N1 en medio en el cual la muestra de ensayo se ha agregado, y determinar el índice de supervivencia mediante, por ejemplo, un ensayo ATPLite.

611

El anticuerpo de la presente invención, especialmente los anticuerpos DR5 y DR4 que tienen casi la misma inmunogenicidad a anticuerpos humanos, se utiliza como un agente para profilaxis o tratamiento de enfermedades asociadas con supervivencia inapropiada o proliferación de células, incluyendo aquellas atribuibles a la desregulación de los sistemas de apoptosis en enfermedades inflamatorias y autoinmunes incluyen ilustrativamente lupus sistémico eritematoso, enfermedad de Hashimoto's, artritis reumatoide, enfermedad injerto versus-huésped, síndrome de Sjögren, anemia perniciosa, enfermedad de Adisson, Scleroderma, síndrome de Goodpasture`s, enfermedad de Crohn, anemia hemolítica autoinmune, esterilidad, miastemia gravis, esclerosis múltiple, enfermedad de Basedow`s, trombopenia púrpura, diabetes mellitus dependiente de insulina, alergia; asma, enfermedad atopica, arteriosclerosis; miocarditis; cardiomiopatia; nefritis glomerular; anemia hipoplastica; rechazo después de transplante de órgano y numerosas malignidades de pulmón, próstata, hígado, ovario, colon, cerviz, tejidos linfáticos y de mama. Los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar para apuntar e inducir selectivamente apoptosis en células inmunes activadas que

incluyen linfocitos activados, células linfoides, células mieloides,y células sinoviales reumatoides (incluyendo sinoviocitos inflamatorios, sinoviocitos similares a macrofagos, sinoviocitos similares a fibroblastos) y en células viralmente infectadas (incluyendo aquellas infectadas con HIV, por ejemplo) tanto como a aquellas células objetivo que expresan o que pueden hacer expresar los receptores TRAIL especificos (es decir DR4 o DR5).

Tal agente profiláctico o terapéutico puede ser administrado en varias formas. Los modos adecuados de administración incluyen la administración oral, tal como mediante tabletas, capsulas, gránulos, polvos y melasas, o administración parenteral, tal mediante inyección o supositorios.

El anticuerpo o el agente terapéutico se puede administrar oralmente, rectalmente, intracisternalmente, intraventicularmente, intracraneal, intratecal, intra-articularmente, intravaginalmente parenteralmente (intravenosamente, intramuscularmente o subcutáneamente), localmente (polvos, ungüentos o gotas), intraperitonealmente, transdermalmente, mediante inhalación o como un pulverizado

bucal o nasal. La cantidad exacta del anticuerpo o agente terapéutico requerida variara de sujeto a sujeto, dependiendo de la edad, peso y condición general del sujeto y la severidad de la enfermedad que esta siendo tratada, el sitio y tamaño del tumor, los compuestos particulares utilizados, el modo de administración y similares. Una cantidad apropiada se puede determinar mediante un experto en la técnica utilizando solo experimentación de rutina dada las enseñanzas de esta. Las dosis típicas simples de anticuerpo varia desde 0,1-10,000 microorganismos, preferiblemente entre 1 y 100 microorganismos. Típicamente las concentraciones del anticuerpo en un portador varían desde 0,2 a 2,000 nanogramos por milímetro suministrado. Para inyección en una articulación, los volúmenes de anticuerpo y portador variaran dependiendo de la articulación, aproximadamente 0,5-10 ml, y preferiblemente 1-5 ml, se inyectan en una rodilla humana y aproximadamente 0,1-5ml, y preferiblemente 1-2 ml en tobillo humano.

Dependiendo de el modo pretendido de administración, el anticuerpo del agente terapéutico puede estar en composiciones farmacéuticas en la forma de dosis sólida,

614

semisólida o liquida, tal como, por ejemplo, tabletas, supositorios, píldoras, capsulas, polvos, líquidos, o suspensiones, preferiblemente en forma de dosis unitaria adecuada para administración simple de una dosis precisa. Las composiciones incluirán una cantidad efectiva de sustrato seleccionado en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable y, además, puede incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, portadores, o diluyentes. Mediante "farmacéuticamente aceptable" se quiere significar un material que no es biológicamente o en ninguna otra manera indeseable, que se pueda administrar a un individuo junto con el sustrato seleccionado sin originar unos efectos biológicos significativos indeseables o interactuar de manera deletrea con ninguno de los otros componentes de la composición farmacéutica en la cual esta contenido,

Las composiciones adecuadas para inyección parenteral pueden comprender soluciones acuosas y no acuosas estériles fisiológicamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones, y polvos esmeriles para reconstitución en soluciones inyectables estériles o dispersiones. Ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados, diluyentes,

solventes o vehiculos incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietinelglicol, glicerol, y similares), mezclas adecuadas de estos, aceites vegetales (tal como aceite de oliva) y esteres orgánicos inyectables tales etiloleato. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, al mantener el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso tensoactivos.

Estas composiciones también pueden contener ayudantes tal como preservantes, 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, azucares, cloruro de sodio, y similares. La absorción prolongada de la forma inyectable farmacéutica puede ser efectuada aproximadamente mediante el uso de agentes que retrasan 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 ser mezcla con al menos un excipiente (o portador) de costumbre inerte tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio (a) llenadores o extendedores, como por ejemplo, almidones, lactosa, sucrosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) ligadores, como por ejemplo, carboximetil celulosa, alinatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sucrosa, y acacia, (c) humectantes, como por ejemplo, glicerol, (d) agentes desintegrantes, como por ejemplo, agar-agar, bicarbonato de calcio, papa o almidón de tapioca, ácido alinico, ciertos silicatos complejos, y carbonato de sodio, (e) retardadores de solución, como por ejemplo, parafina, (f) aceleradores de absorción, como por ejemplo, compuestos de amonio cuartanario, (g) agentes humectantes, como por ejemplo, cetil alcohol, y monoestearato de glicerol, (h) absorbentes, como por ejemplo, caolín y bentonita, y (i) lubricantes, como por ejemplo, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietinelglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, o mezclas de estos. En el caso de cápsulas, tabletas, y

píldoras, las formas de dosis pueden también comprender agentes amortiguantes.

Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como llenadores en cápsulas de gelatina de llenado suave y duro utilizando tales excipientes como lactosa o azúcar de leche así como también polietilenglicol de alto peso molecular, y similares.

Las formas de dosis sólidas tales como tabletas, grageas, cápsulas, píldoras, y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimiento entericos y otros bien conocidos en la técnica. Ellos pueden contener agentes o pacificantes, y también pueden ser de tal composición que ellos liberen el compuesto activo o los compuestos en ciertas partes del tracto intestinal de una manera retrasada. Ejemplos de composiciones embebidas que se puedan utilizar son sustancias poliméricas y ceras. Los compuestos activos también pueden ser de forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o mas de los excipientes anteriormente mencionados.

618

Las formas de dosis líquida para administración oral incluyen emulsiones farmaceúticamente aceptables, soluciones, suspensiones, melasas, y elixires. Además de los compuestos activos, las formas de dosis líquida pueden contener diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica, tales como agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsificantes, tales como por ejemplo, etil alcohol, isopropil alcohol, etilcarbonato, etilacetato, benzilalcohol, benzilalcohol, benzilbenzoato, propilenglicol, 1,3-butilenoglicol, dimetilformamida, aceites, en particular, aceite de algodón, aceite de cacahuate, aceite germinal de maíz, aceite de castor, aceite de castor y aceite de sésamo, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurilo, esteres polietilenglicoles y esteres de ácidos grasos de sorbitan o mezclas de estas sustancias, y similares.

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

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión, como por ejemplo, isoestearil alcoholes etoxilados, polioxietilen sorbitol y esteres de sorbitan, celulosa microcristalina, metahidroxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragancato, o mezclas de estas sustancias, y similares.

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

Las formas de dosis para administración tópica de un compuesto de esta invención incluyen ungüentos, polvos, pulverizados, e inhalantes. El componente activo se mezcla bajo condiciones estériles con un portador fisiológicamente aceptable y cualquier preservativo, amortiguador, o propulsante tal como se pueda requerir. Las formulaciones

oftálmicas, ungüentos, polvos, y soluciones también se contemplan como dentro del alcance de esta invención.

El termino "sales farmaceúticamente aceptables, esteres, amidas, y prodrogas" como se utilizan aquí se refieren a aquellas sales de carboxilato, sales de adición de aminoácido, esteres, amidas, y prodrogas de los compuestos de la presente invención que están, dentro del alcance del juicio medico, adecuados para uso en contacto con los tejidos de los pacientes sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica, y similar, medido con un índice de beneficio/riesgo razonable, y efectivo para su uso pretendido, así como también con formas zuiterionicas, donde es posible, de los compuestos de la invención. El termino "sales" se refiere a las sales de adición de ácido inorgánico y orgánico relativamente no toxicas de los compuestos de la presente invención. Estas sales se pueden preparar in situ durante el aislamiento y purificación final de los compuestos o al reaccionar separadamente el compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislar la sal así formada. Las sales representativas incluyen el bromohidruro, clorhidruro,

621

sulfato, bisulfato, nitrato, acetato, oxalato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato,citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato mesilato, glucoheptonato, lactobionato, metano sulfonato y sales laurilsulfato, y similares. Estas pueden incluir cationes basados en los metales alcalinos y alcalinoterreos, tales sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y similares, así como también aquellas cationes de amonio y amina cuartenarios, de amonio no toxico que incluyen, pero no están limitados a amonio tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina y similares. (Ver, por ejemplo, S.M Barget et al., "Pharmaceutical Salts," J.Pharm. Sci., 1977, 66:1-19 que se incorporan aquí como referencia).

El termino "prodrogas" se refiere a compuestos que son rápidamente transformados in vivo para producir los compuestos pares de la formula 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 de

A.C.S Symposium Series, y Bioreversible Carries in Drug Desing, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association y Pergamon Press, 1987.

Una célula objetivo es una célula de un animal que ilustrativamente incluye el hombre, primate no humano, gatos, perros, ratas, ratones, cerdos de guinea, conejos, cabras, ovejas, vacas, caballos, pollos, cerdos, titi y hurón.

Además, el anticuerpo del 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 los propósitos de la presente invención.

Las moléculas de anticuerpo son purificadas mediante técnicas conocidas que ilustrativamente incluyen cromatografía de amino absorción o amino afinidad, técnicas cromatografías tales como cromatografía liquida de alta presión, o una combinación de estas.

Otro aspecto de la presente invención incluye un producto farmacéutico para uso en el suministro de un anticuerpo receptor anti-TRAIL biológicamente activo o un anticuerpo receptor anti-TRAIL humanizado a un vertebrado. El producto farmacéutico incluye una cantidad farmaceúticamente efectiva de un anticuerpo o fragmento de receptor anti-TRAIL de este, un portador farmaceúticamente aceptable y un recipiente que incluye un portador y un anticuerpo en una forma estéril.

En una modalidad preferida de la invención, una cantidad farmaceúticamente efectiva de un anticuerpo de la invención inhibe la proliferación celular o induce a apoptosis mediante el contacto con una célula objetivo o con las células objetivo. Una cantidad o monto farmaceúticamente efectivo de un anticuerpo que reconoce el DR5 o el DR4 o un anticuerpo humanizado que reconoce el DR5 o el DR4 en una cantidad administrada a un individuo suficiente para originar un efecto deseado. Como se utiliza aquí, los términos "cantidad farmaceúticamente efectiva" y "cantidad terapéutica" son sinónimos. Los efectos deseados de la administración de una cantidad farmaceúticamente efectiva de DR5 o DR4 que reconocen los anticuerpos incluyen la muerte de una o más

624

células objetivo, la inhibición del crecimiento de una o más células objetivo, la estimulación de DR5 o DR4 respectivamente, la unión a DR5 o DR4, respectivamente, y niveles NFkB incrementados o actividad en una célula objetivo. Una célula objetivo es una célula que expresa DR5 o DR4 e ilustrativamente incluye células con crecimiento anormal y células tumorales tales como papilomas y verrugas; cáncer de mama, cáncer de colon, hepatoma, leucemias, cáncer de pulmón, melanoma, mielomas, osteosarcomas, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de útero, tumores del cerebro tales como astrocitomas, células inmunes activadas (por ejemplo linfocitos activados, linfoides y células mieloides), células inflamatorias, células sinoviales de artritis reumatoide, y células viralmente infectadas. In vivo, la célula objetiva es una célula de un individuo con una condición patológica, que incluye aquellas donde la proliferación celular es anormal o desregulada tal como el cáncer maligno o benigno y la artritis reumatoide.

625

En otra incorporación preferida, la célula objetivo también es contactada por un agente terapéutico. Por lo tanto, los anticuerpos y las composiciones de la presente invención pueden ser administrados solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no están limitados a otros miembros de la familia TNF, agentes quemoterapéuticos, anticuerpo, antivirales anti-inflamatorios esteroides y no-esteroides, agentes inmunoterapéuticos convencionales, citoquinas, quemoquinas, y/o factores de crecimiento. Combinaciones pueden ser administrados ya sea concomitantemente (por ejemplo, como una mezcla), separadamente pero simultáneamente (por ejemplo, uno de los compuestos o agentes es proporcionado primero seguido por el segundo). Por ende, la expresión "combinación" o "combinado" es utilizada para hacer referencia ya sea a la administración concomitante, simultánea, o secuencial de dos o más agentes.

En una incorporación la terapia de combinación incluye la administración de miembros de la familia de TNF. Moléculas de TNF, moléculas relacionados con TNF o moléculas como TNF que puedan ser administradas con el anticuerpo de la

626

invención incluyen, pero no se limitan a formas solubles de TNF-α, limfotoxina- α (LT- α, también conocida como TNF-β), LT-β (encontrado en el complejo heterodímero LT- α2-β) OPGL, FasL, CD27L, CD30L, CD40L, 4-1BBL, DcR3, OX40L, TNF-γ (WO 96/14328), TRAIL, AIM-II (WO 97/34911), APRIL (J. Exp. Med. 188:1185-90), α-endokina (WO 98/07880, TR6 (WO 98/30694), OPG y factor de crecimiento de nervio (NGF), y formas solubles de Fas, CD30, CD27, CD40 y 4-IBB, TR2 (WO 96/34095), DR3 (WO 97/33904), DR4 (WO 98/32856), TR5 (WO 98/30693), TRANK, TR9 (WO 98/56892), TRIO (WO 98/54202), 312C2 (WO 98/06842), y TR12, y formas solubles de CD154, CD70 , y CD153.

En otra incorporación, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con ligandos CD40 (CD40L) de ocurrencia natural, sintéticos o diseñados, incluyendo, por ejemplo, una forma soluble de CD40L (por ejemplo, AVREND), fragmentos biológicamente activos, variantes o derivados de CD40L, anticuerpos CD40L (por ejemplo, anticuerpos agonistas o antagonistas), y/o anticuerpos CD40 (por ejemplo, agonistas o antagonistas).

62

Aún en otra incorporación, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con uno, dos, tres, cuatro, cinco, o más de los siguientes: tacrolimus (Fujisawa), talidomida (por ejemplo, Celgene), anti Tac (Fv)-PE40 (por ejemplo, Protein Design Labs), inolimomab (Biotest), MAK-195F (Knoll), ASM-981 (Novartis), receptor interleuquina-1 (por ejemplo, Immunex), receptor interleuquina-4 (por ejemplo, Immunex), ICM3 (ICOS), BMS-188667 (Bristol Myers Squibb), anti-TNF Ab (por ejemplo, Therapeutic Antibodies), CG-1088 (Celgene), anti-B7 anticuerpo monoclonal (por ejemplo, Innogetics), MEDI-507 (BioTransplant), y ABX-CBL (Abgenix).

De acuerdo con la invención, el anticuerpo de la invención puede ser administrado con ligando de Fas (Fas-L) o un anticuerpo Fas que enlaza Fas y transluce la señal biológica que resulta en apoptosis. Preferiblemente, los anticuerpos Fas empleados de acuerdo con este método son anticuerpos monoclonales.

En ciertas incorporaciones, anticuerpos de la invención son administrados en combinación con agentes anti-retrovirales, inhibidores de nucleósidos de transcriptasa

628

reversa, inhibidores de no-nucleósidos de transcriptasa reversa, y/o inhibidores de proteasa. Inhibidores de nucleósidos de transcriptasa reversa que pueden ser administrados en combinación con los anticuerpos de la invención, incluyen pero no están limitados a RETROVIR® (zidovudine/AZT) (Gaxo-Wellcome, Research Triangle Park, NC), VIDEX® (didanosine/ddI) (Bristol-Myers Squibb, New York), HIVID® (zalcitabine(ddC) (Roche, Nutley, New Jersey), ZERIT® (stavudine) (Bristol-MyersSquibb). Inhibidores de nucleósidos de transcriptasa reversa que pueden ser administrados en combinación con el anticuerpo de la presente invención incluye pero no se limita a VIRAMUNE® (nevirapine) (Boehringer Ingelheim/Roxanne, Columbus, Ohio), RESCRIPTOR® (delavirdine) (Pharmacia & Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan), y SUSTIVA® (efavirenz) (Bristol-Myers Squibb).

Inhibidores de proteasa que pueden ser administrados en combinación con los anticuerpos de la invención incluyen pero no están limitados a CRIXIVAN® (INDINAVIR SULFATE) (Merck & Company, Whitehouse Station, NJ), NORVIR® (ritonavir) (Abbott Laboratories, Chicago, IL), INVIRASE® (saquinavir) (Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ), y VIRACEPT®

(nelfinavir) (Agouron Pharmaceutricals, San Diego, CA). En una incorporación específica, agentes anti-retrovirales, inhibidores de nucleósidos de transcriptasa reversa, inhibidores de no-nucleósidos de transcriptasa reversa, y/o inhibidores de proteasa pueden ser utilizados en cualquier combinación con composiciones de la invención para tratar SIDA y/o prevenir o tratar infecciones de VIH.

En otras incorporaciones, el anticuerpo de la invención puede ser administrado en combinación con agentes de infección anti-oportunistas. Agentes anti-oportunistas que pueden ser administrados en combinación con las composiciones de la invención incluyen, pero no está limitadas por, trimetoprim - pentamidina, silfametoxazole, DAPSONE® (Jacobus Pharmaceuticals, Princeton, NJ), ATOVAQUONE® (GlaxoSMithKline, Research Triangle Park, NC), ISONIAZID® (CIBA Pharmeceuticals, Summit, NJ), RIFADIN® (rifampin) (Hoechst-Marrion-Roussel, Kansas City, MO), PYRAZINAMIDE® (Ledelrle, Pearl River, NY), BIAXIN® (claritromicina) (Abbott Laboratories, Chicago, IL), ETHAMBUTOL® (Ledelrle, Pearl River, NY), RIFABUTIN® (Pharmacia Upjohn Company, Kalamazoo, MI), AZITHROMYCIN®

(Pfizer Inc., New York, NY), GANCICLOVIR (Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ), FOSCARNET® (Astra, Westborough, MA), CIDOFOVIR® (Gilead Sciences, Foster City, CA), KETOCONAZOLE® (Janssen, Titusville, NJ), FLUCONAZOLE® (Pfizer Inc., New York, NY), ITRACONAZOLE® (Janssen, Titusville, NJ), ACYCLOVIR® (Glaxo-Wellcome, Research Triangle Park, NC), FAMCICOLCIR® (SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Pittsburg, PA), pyrimetamina, leucovirina, NEUPOGEN® (filgrastim/GM-CSF) (Amgen, Thousand Oaks, CA), y LEUKINE® (sargramostim(GM-CSF)(Immunex, Seattle, WA).

En una incorporación específica, el anticuerpo de la invención es utilizado en una combinación con trimetoprim-sulfametoxazole y/o Atovaquone, Dapsone, Pentamidina, para farmacéuticamente tratar y/o prevenir una infección de neumonía de *Pneumocystis carinii* oportunista.

En otra incorporación específica, el anticuerpo de la invención es utilizado en cualquier combinación con Isoniazida, RIFADIN®, (Merrell Dow Pharmaceuticals, Cincinnati, Ohio), Pyrazinamida, y/o Etambutol para tratar profilácticamente y/o prevenir una infección de complejo de

Mycobacterium avuim oportunista. En otra incorporación específica, el anticuerpo de la invención es utilizado en cualquier combinación con Rifabutina, Claritromicina, y/o azitromicina para tratar profilácticamente y/o prevenir una infección de tuberculosis de un Mycobacterium oportunista. En otra incorporación específica, el anticuerpo de la invención es utilizado en cualquier combinación con Ganciclovir, Foscarnet, y/o Cidofovir, para tratar profilácticamente y/o prevenir una infección de citomegalovirus oportunista. En otra incorporación específica, el anticuerpo de la invención es utilizado en cualquier combinación con Fluconazole, Traconazole, y/o ketoconazole para tratar profilácticamente y/o prevenir infecciones de hongos oportunistas. En otra incorporación específica, el anticuerpo de la invención es utilizado en cualquier combinación con Acyclovir y/o Famcicolvir para tratar profilácticamente y/o prevenir una infección oportunista del virus simples de herpes tipo I y/o tipo II. En otra incorporación específica, el anticuerpo de la invención es utilizado en cualquier combinación con pirimetamina y/o leucovirina para tratar profilácticamente y/o prevenir una infección de una *Toxoplasma gondii* oportunista. En otra incorporación específica, el anticuerpo

632

de la invención es utilizado en cualquier combinación con leucovina y/o NEUPOGEN® (Amgen, Thousand Oaks, CA) para tratar profilácticamente y/o prevenir una infección de bacteria oportunista.

En una incorporación adicional, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con un agente antiviral. Agentes antivirales que pueden ser administrados incluyen, pero no están limitados a, acyclovir, ribavirina, amantadina, y remantidina.

En una incorporación adicional, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con un agente antibacterial. Agentes antibacteriales que pueden ser administrados con las composiciones de la invención incluyen, pero no están limitados a, amoxicilina, aminoglicosidos, beta-lactama (glicopeptido), betalactamasas, clindamicina, cloramfenicol, cefalosporinas, ciprofloxacina, eritromicina, fluroquinolonas, macrolidas, metronidazole, penicilinas, quinolonas, ritampina, streptomicina, sulfonamida, tetraciclinas, trimetoprima, trimetoprimsulfamtoxazole, y vancomicina.

633

Agentes convencionales inmunosupresivos no-específicos, que pueden ser administrados en combinación con el anticuerpo de la invención incluyen, pero no están limitados a esteroides, cicloesporina, análogos de cicloesporina, ciclofosfamida metilprednisone, prednisone, azatioprina, FK-506 (Fujisawa Pharmaceuticals, Deerfield, IL), 15 deoxispergualina, y otros agentes inmunosupresores que actúan por la supresión de la función de las células inmunes que responden (incluyendo, por ejemplo, células T), directamente (por ejemplo, por la acción sobre células inmunes) o indirectamente (por la acción sobre otras células mediadoras).

En incorporaciones especificas, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con inmunosupresantes. Preparaciones de inmunosupresantes que pueden ser administrados con el anticuerpo de la invención incluyen, pero no están limitados a, ORTHOCLONE® (OKT3) (Ortho Biotech, Raritan, NJ), SANDIMMUNE® ORAL (ciclosporina) (Sandoz Pharmaceuticals, Ahnover, NJ), PROGRAF® (tacrolimus)(Fujisawa Pharmaceuticals, Deerfield, IL),

634

CELLCEPT® (mycofenolato) (Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ), azatioprina, glucorticosteroides, y RAPAMUNE® (sirolimus) (Wyeth, Collegeville, PA). En una incorporación especifica, los immunosupresantes en combinación con el anticuerpo pueden ser utilizados para prevenir rechazo de transplantes de órgano o medula ósea.

En una incorporación adicional, el anticuerpo de la invención es administrado sólo o en combinación con uno o más preparaciones intravenosas de inmunoglobulina. Preparaciones intravenosas de inmunoglobulina que pueden ser administrados con el anticuerpo de la invención incluyen, pero no están limitados a, GAMMARE® (Centeno, Kankakee, IL), IVEEGAM® (Immuno-US Inc., Rochester, MI), SANDOGLOBULFN® (Sandoz Pharmaceuticals, hanover, NJ), GAMMAGARD® (Baxter Healthcare, Glendale, CA), y GAMIMUNE® (Bayer Biological, West Heaven, CT). En una incorporación específica, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con preparaciones intravenosas de inmunoglobulina en terapia de transplante (por ejemplo, transplante de medula ósea).

635

En una incorporación adicional, el anticuerpo de la invención es administrado solo o en combinación con un agente anti-inflamatorio. Agentes anti-inflamatorios que pueden ser administrados con las composiciones de la invención incluyen, pero no están limitados a, glucocorticoides y los anti-inflamatorios no-esteroides, derivados de ácido aminoarilocarboxílico, derivados de ácido arilacético, derivados de ácido arilbutírico, ácidos ailcarboxílico, derivados de ácido arilpropiónico, pirasoles, pirazolones, derivados de ácido salicílico, tiazinecarboxamidas, ácido e-acetamidocapróico, S-adenosilmetionine, ácido 3-amino-4-hidroxibutírico, amixetrina, bendazac, benzydamine, bucoloma, difenpiramida, ditazol, emorfazona, guaiazulene, nabumetone, ninesulida, orgoteína, oxaceprol, paranilina, perisoxal, pifoxime, proquazone, proxazole, y tenidap.

En otra incorporación, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con terapia esteroide. Esteroides que pueden ser administrados en combinación incluyen metilprednisolona (por ejemplo, IV metilprednisolona). En una incorporación específica, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con prednisona. En una

636

incorporación específica adicional, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con prednisona y un agente inmunosupresivo. Agentes inmunosupresivos que pueden ser administrados y prednisona son aquellos descritos en la presente, e incluyen, pero no están limitados a, azatioprina, ciclofosfamida, y ciclofosfamida IV. En una incorporación específica, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con metilprednisolona. En una incorporación específica adicional, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con metilprednisolona y un agente inmunosupresivo. Agentes inmunosupresivos que pueden ser administrados con metilprednisolona son aquellos descritos en la presente, pero no están limitados a, azatioprina, ciclofosfamida, y ciclofosfamida IV.

En otra incorporación, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con un anti-malarial. Antimalariales que pueden ser administrados con las composiciones de la invención incluyen, pero no están limitados a, hidroxicloroquina, cloroquina, y/o quinacrina.

637

Aún en otra incorporación, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con un NSAID. Opcionalmente, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con uno, dos, tres, cuatro, cinco, diez, o más de los siguientes medicamentos: NRD-101 (Hoechst Mation Roussel, Kansas City, MO), diclofenac (Dimethaid, Notario, CN), potasio de oxaprozina (Monsanto), mecasermina (Chiron, Emeryville, CA), T-614 (Toyama), premetrexed disódico (Eli Lilly, Indianápolis, IN), atreleutona (Abbott, Chicago, IL), valdecoxib (Monsanto), eltenac (Byk Gulden, Melville, NY), campath, AGM-1470 (Takeda, Lincolnshire, IL), CDP-571 (Celltech, Rochester, NY), CM-101 (CarboMed, Nachville, TN), ML-3000 (Merck), CB-2431 (KS Biomedix, Surrey, UK), CBF, BS2 (KS Biomedix, Surrey, UK), IL-Ira terapia génica (Valentis, Burlingame, CA), JTE-522 (Japan Tobacco, Tokio, Japón), paclitaxel (Angiotech, Vancouver, BC), DW-166HC (Dong Wha, Seoul, Corea), darbufelona mesilato (Pfizer Inc., New York, NY), receptor 1 de TNF soluble (synergen; Amgen, Thousand Oaks, CA), IPR 6001 (Institute for Pharmaceutical Research), trocade (Hoffman-La Roche, Nutley, NJ), EF5 (Scotia Pharmaceuticals), VIL-284 (Boehringer Ingelheim, Ridgefield, CT), BIIF-1149 (Boehringer Ingelheim, Ridgefield, CT),

638

LEUKOVAX® (Inflamatics, Malvern, PA), MK-663 (Merck, Whitehouse Station, NJ), ST-1482 (Sigma-Tau, Gaithersburg, MD), y butixocort propionato (Pfizer Inc. New York, NY).

Aún en otra incorporación, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con uno o más DMARDs. Por lo tanto, uno, dos, tres, cuatro, cinco o más de los siguientes medicamentos pueden ser utilizados: metotrexato, leflunomida, edatrexato, epiroprima, iometrexol, piritrexim, trimetrexato, brodimoprima, MX-68, N-[4-]3-(2,4-diamino-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]-pirimidina-5-il)propil]benzoil]-L-ácido glutámico, N-[[5-[2-(2-amino-1,4,5,6,7,8-hexahidro-4-oxipirirido[2,3-d]pirimidim-6-il)etil]-2-tienil]carbonil]-L-ácido glutámico, RN-[[5-[2-(2-amino-1,4,5,6,7,8-hexahidro-4-oxopirido[2,3-d]pirimidina-6-il)etil]-2-tienil]-carbonil]L-ácido glutámico, N-((2,4-diamino-3,4,5,6,7,8-hexahidropirido[2,3-d]pirimidin-6-il)etil)-2-tienilcarbonil-L-ácido glutámico, (S)-2-[[[4-carboxi-4-[[4-[[(2,4-diamino-6-pteridinil)metil]
amino]benzoil]amino]butil]amino]carbonil]ácido benzóico, N-[4-[3-(2,4-diamino-1-H- pirrolo[2,3-d]pirimidin-5-il)propil]benzoil]-L- ácido glutámico, 2,4-diamino-6-(N-(4-

fenilsulfonil)benzil)metilamino) quinazolina, 2,4-diamino-5-[4-[3-(4-aminofenil-4-sulfonilfenilamino)propoxi]-3,5-dimetoxibenzil] pirimidina, N-[4-4-(2,4-diamino-5-pirimidinil)butil] benzoil]-L-ácido glutámico, N-[4-[3-(2,4-diamino-5-pirimidinil)propil]benzoil]-L-ácido glutámico, N-[4-[2-(2,4-diamino-6-pteridinil)etil]-benzoil]-4-metilene-DL-ácido glutámico y N-(1-metiletil)-N'[3-2,4,5-triclorofenoxi)propoxi] diamide clorhidrato imidodicarbonimídico (PS15), sulfasalazina, aurotiomalato de sodio, auranofina, cicloesporina, penicilamina, azatioprina, un medicamento antimalaria (por ejemplo, como se describe en la presente), ciclofosfamida, clorambucilo, oro, Enbrel (etanercepto)(Wyeth-Ayerst Laboratories, Philadelphia, PA), aticuerpo anti-TNF, y prednisolona. En una incorporación más preferida, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con un antimalarial, metotrexato, anti-TNF, Enbrel y/o sulfasalazina.

En una incorporación, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con metotrexato. En otra incorporación, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con anticuerpo anti-TNF. En otra

incorporación, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con metotrexato y anticuerpo anti-TNF o anticuerpo anti-Fas. En otra incorporación, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con sulfasalazina.

En otra incorporación específica, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con metotrexato, anticuerpo anti-TNF, anticuerpo anti-Fas y sulfasalazina. En otra incorporación, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con Enbrel. En otra incorporación, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con Enbrel y metotrexato. En otra incorporación, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con Enbrel, metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, etroricoxib, misoprostol/diclofenac de sodio, valdecoxib, tiracoxib, rofecoxib, celecoxib, galantamina, mesilato de darbufelona, aceclofenac, ML-3000, anakinra, hvaluronato de sodio, nimesulida, micofenolato mofetilo, diacereina, sivelest de sodio, deflazacot, clorhidrato de nalmefene, samarium-153 lexidronam de pentasodio, pentostatin, T-614, clorhidrato de amiprilosa, rocepafant,

ampiroxicam, famesilato de prednisolona, meloxicam, diclofenac de sodio, lomoxicam, salazosulfapiridina, etodolac, maleato de flupirtina, ebselen, hidrato de tacrolimus, nabumetona, cloprednol, cinnamato de piroxicam, proquazona, rimexolona, hidroxibenzoato de imidazole, droxicam, fentiazac, alfacalcidol, diacetato de halopredone, clorhidrato de gusperimus, inosine pranobex, actarit, indometacin farnesil, mizoribina, acido tolfenamico, diflunisal, piroxicam, oxaprozin, hyaluronato de sodio, bucilamina, ciclospporina, floctafenina, tenoxicam, palmitato de dexametasona, amfenac de sodio, acemetacina, auranofina, lobenzarit disodio, o cualquier combinación de las mismas.

En otra incorporación, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con Enbrel, metotrexato y sulfasalazina. En otras incorporaciones, una o más antimalariales son combinados con una de las combinaciones citadas anteriormente. En una incorporación específica, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con un antimalarial (por ejemplo, hidroxicloroquina), Enbrel, metotrexato y sulfasalazina. En otra incorporación específica, el anticuerpo de la invención es administrado en

642

combinación con un antimalarial (por ejemplo hidroxicloroquina), sulfazalazina, anticuerpo anti-TNF, y metotrexato.

En otra incorporación, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con un agente quimioterapéutico. Agentes quimioterapéuticos que pueden ser administrados con las composiciones de la invención incluyen, pero no están limitados a, derivados de antibióticos (por ejemplo, doxorubicina, bleomicina, daunorubicina, y dactinomicina); antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifen); antimetabolitos (por ejemplo, fluorouracilo, 5-FU, metotrexato, floxuridina, interferon alpha-2B, ácido glutámico, plicamicina, mercaptopurina, y tioguanina); agentes citotóxicos (por ejemplo, carmustina, BCNU, lomustina, CCNU, citosina arabinosida, ciclofosfamida, estramustina, hidroxiurea, procarbazina, mitomicina, busulfan, cis-platin, y sulfato de vincristina); hormonas (por ejemplo, medroxiprogesterona, estramustina de fosfato de sodio, etinil estradiol, estradiol, acetato de megestrol, metiltestosterona, difosfato de dietilstilbestrol, clorotrianisene, y testolactona); derivados de mostazas nitrogenadas de (por ejemplo, mefalen,

643

clorambucil, mecloretamina (nitrogeno de mostaza) y tiotepa); esteroides y combinaciones (por ejemplo, fosfato de sodio de betametasona); y otros (por ejemplo, dicarbazina, asparaginasa, mitotant, sulfato de vincristina, sulfato de vinblastina, y etoposida). Otros quimioterapéuticos incluyen, por ejemplo, CPT-11, deflunomida, cicloheximida, y mitomicina.

En una incorporación específica, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona) y cualquier combinación de los componentes de CHOP. En otra incorporación, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con Rituximab. En una incorporación adicional, el anticuerpo de la invención es administrado con Rituximab y CHOP, o Rituximab y cualquier combinación de los componentes de CHOP.

En una incorporación adicional, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con citoquinas. Citoquinas que pueden ser administradas con las composiciones de las invenciones incluyen, pero no están limitadas a , GM-

649

CSF, G-CSF, IL-lalfa, IL-Ibeta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, anti-CD40, CD40L, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gama, TNF-alfa, y TNF-beta.

En una incorporación adicional, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con factores de crecimiento hematopoiéticos. Factores de crecimiento hematopoiéticos que pueden ser administrados con las composiciones de la invención incluyen, pero no están limitadas a, LEUKINA® (sargramostim) y NEUPOGEN® (filgrast).

En incorporaciones adicionales, el anticuerpo de la invención es administrado en combinación con uno o más regímenes terapéuticos o profilácticos, tales como, por ejemplo, terapia de radiación.

Como se ha utilizado a lo largo del texto, un "agente terapéutico" es un compuesto o composición efectiva en mejorar una condición patológica. Un ejemplo ilustrativo de un agente terapéutico incluyen compuestos anti-cáncer, miembros de la familia de TNF, agentes anti-inflamatorios,

645

agentes anti-virales, agentes anti-retrovirales, agentes anti-oportunistas, antibióticos, agentes inmunosupresivos, inmunoglobulinas, agentes anti-malariales, medicamentos anti-reumáticos modificadores de enfermedad (DMARDs), citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, y segundos anticuerpos que promueven la apoptosis de la célula objetivo.

Un compuesto anti-cáncer o un agente quimioterapéutico es un compuesto o composición efectiva en la inhibición o en el arresto de crecimiento de una célula de crecimiento anormal. Por lo tanto, un agente como tal puede ser utilizado terapéuticamente para tratar cáncer como también otras enfermedades marcadas por crecimiento anormal de células. Una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto anti-cáncer es una cantidad administrada a un individuo suficiente para causar inhibición o arresto del crecimiento de una célula que crece de manera anormal. Ejemplos ilustrativso de compuestos anti-cancer incluyen: bleomicina carboplatina, clorambicul, cisplatin, colchicina, ciclofosfamida, daunorubicina, dactinomicina, dietilstilbestrol doxorubicina, etoposida, 5-fluorouracilo, floxuridina, melfalan, metotrexato, mitomicina, 6-mercaptopurina, teniposida, 6-

tioguanina, vincristina y vinblsatina. Ejemplos adicionales de compuestos anti-cáncer y agentes terapéuticos se encuentran en *"The Merck Manual of Diagnosis and Therapy"* 15 ava Ed., Berkow et al., eds, 1987, Rahway, NJ y Sladek et al. *"Metabolism and Action of Anti-Cancer Drugs"*, 1987, Powis et al. eds., Taylor y Frnacis, New York, NY.

El anticuerpo de la presente invención puede ser combinado además con otras terapias, tal como quimioterapia y/o radioterapia en el tratamiento de malignidad, y la eficacia de la terapia puede ser mejorada por compuestos que inducen apoptosis, tales como bisindolilmaleimida VIII (BisVIII) u otros agentes sintetizadores como SN-50 o LY294002. Por lo tanto, en una incorporación, el anticuerpo o anticuerpos de la presente invención pueden ser combinados con BisVIII u otro agente sintetizador y un quimioterapéutico (por ejemplo, adriamicina, etoposida, topetecan, taxotere, o paclitaxel). En otra incorporación, el anticuerpo o anticuerpos de la presente invención puede ser combinado con un medicamento anti-inflamatorio no-esteroidal (por ejemplo, sulfuro de sulindac u otro inhibidor COX-1 o COX-2) un quimioterapéutico (por ejemplo, adriamicina, etoposida,

topetecan, taxotere, o paclitaxel). En el tratamiento de otras enfermedades, por ejemplo, enfermedades auto-inmunes e inflamatorias, combinaciones de tratamiento pueden también ser utilizadas.

Por ejemplo, un anticuerpo puede ser administrado en conjunto con otros agentes terapéuticos como agentes anti-inflamatorios, DMARDs, agentes quimioterapéuticos, metotrexato, bisindolilmaleimida VIII u otros agentes sensibilizadores, y parecidos. Radioterapia puede también ser combinada con otros agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y auto-inmunes. Una persona versada en la materia técnica podría adaptar la forma de radiografía para la enfermedad inflamatoria o auto-inmune específica (por ejemplo, radiación de sinovectomia en el tratamiento de artritis).

Terapia utilizando un anticuerpo de la presente invención puede también ser combinada con terapia que utiliza otro anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo para DR5 puede ser administrado a un sujeto con necesidad de lo mismo junto con, antes de, o posterior a la administración de un

anticuerpo para DR4, TNF, B7, ligando CD40, CD20 (por ejemplo, rituximab), Fas, o una combinación del mismo. Dicha terapia de anticuerpos combinatoria puede ser además combinada con la administración de uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, quimioterapéuticos, doxorubicina, y/o metotrexato), radioterapia, o ambos.

Por lo tanto, la invención proporciona un método para inducir selectivamente apoptosis o inhibir proliferación en células objetivo que expresan DR5, que comprende los pasos de (a) contactar las células objetivo con una cantidad terapéutica de un anticuerpo que enlaza específicamente un receptor DR5 de TRAIL, en donde dicho anticuerpo, en su forma soluble, tiene actividad inductora de apoptosis *in vivo* e *in vitro* en células objetivo que expresan DR5 y (b)contactar las células objetivo con una cantidad terapéutica de uno o más agentes terapéuticos. En una incorporación, uno o ambos pasos de contacto son opcionalmente llevados a cabo *in vivo*. En otra incorporación, uno o ambos pasos de contacto son llevados a cabo *in vitro*. Las células objetivo pueden ser seleccionadas de células que muestran desregulación del sistema de apoptosis, neutrofilos, linfocitos activados u

otras células inmunes activadas (por ejemplo, células linfoides y células mieloides), células infectadas viralmente, y células sinoviales de proliferación anormal (por ejemplo, células sinoviales de artritis reumatoide, incluyendo células sinoviales inflamatorias, células mieloides y linfoides activadas en el sinovium, sinoviocitos macrófago-parecidos, y sinoviocitos fibroblasto-parecidos) de enfermedades auto-inmunes.

Comparados con anticuerpos anti-DR5 previamente publicados (24), la actividad inductora de apoptosis del anticuerpo TRA-8 demostrativo de la presente invención es muy fuerte, y es capaz de inducir apoptosis de las células Jurkat con los niveles pg/ml in Vitro y demuestra actividad tumoricidad superior in vivo comparada el TRAIL soluble previamente reportado. La administración intravenosa de una dosis simple de TRA-8 es suficiente para inhibir el crecimiento tanto de tumor sólido como de células tumorales hematopoyeticas, mientras que la inducción de regresión tumoral in vivo con el TRAIL soluble requiere un dosis mucho más alta (500 μg cada día durante 10 días). Los anticuerpos del receptor anti-TRAIL de la presente invención parecen ser seguros como TRAIL

soluble en razón a que el anticuerpo de ejemplo TRA-8 no induce apoptosis de célula de fibroblasto no transformada. Resultados similares se han observado con anticuerpos DR4.

Los vectores de la presente invención incluyen una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina de un anticuerpo DR5 o DR4 operablemente ligado a un elemento regulatorio tal como un promotor o mejorador. "operablemente ligados" se refiere a una disposición de secuencias nucleotidicas configuradas con el fin de desarrollar su función usual. Así, un elemento regulatorio operablemente ligado a una secuencia nucleotidica que codifica un polpeptido es capaz de direccionar la trascripción, replicación y/o traducción del polipéptido. Se reconocerá por aquellos expertos en la técnica un vector simple opcionalmente incluye secuencias codificantes tanto para inmunoglobulina de cadena pesada como ligera de anticuerpo DR5 o DR4. en una modalidad los vectores codifican inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera humanizadas.

Los siguientes ejemplos que se establecen adelante para ilustrar los métodos y resultados de acuerdo con la presente

invención. Estos ejemplos no pretenden incluir todos los aspectos de la presente invención, sino al contrario ilustrar los métodos representativos y los resultados. Estos ejemplos no pretenden excluir equivalentes y variaciones de la presente invención que sean evidentes para un experto en la técnica.

Ejemplo 1. Preparación de antígeno DR5

1.1 Clonación de cADN DR5

El ADN que codifica la proteína DR5 se clona al seguir el método RT-PCR que utiliza:

a) Templado

El total de ARN de las células HeLa se extrae al utilizar un reactivó TRIzol (GIBCOBRL). El molde para la reacción PCR utiliza cADN que se obtiene al utilizar el kit de síntesis de cADN de primera (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con el manual de instrucciones suministrado con el kit.

6.52

b) Cebadores PCR

Los siguientes cebadores de oligonucleotido son sintetizados para el PCR: 5'-gacgatgcccgatctactttaaggg-3' (DR5p1: SEQ ID número 1);

5'-ccactgggtgatgttggatggg-3' (DR5p2: SEQ ID número 2);

A menos que se especifique otra cosa todos los oligonucleotidos en estos ejemplos son sintetizados por Lifetechnologies. Todos los oligonucleotidos son almacenados a -20°C después de ser disueltos en agua destilada.

c) Reacción PCR

La composición de la solución de reacción PCR:
molde cADN, 5 µl de un total de 33 µl de reacción
cebador DR5p1, 10 pmol;
cebador DR5p2, 10 pmol;
amortiguador PCR concentrado 10 x (suministrado con el kit), 10 µl;
DNTP (cada uno 2,5 mM), 4 µl; y

653

polimerasa Taq (promega), 5 unidades.

Agua destilada estéril se agrega a la solución a un volumen total de 100 µl.

A menos que se especifique otra cosa, los dNTP son una mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP (2,5 mM cada uno).

La reacción PCR se conduce como sigue. La solución se calienta primero a 94°C durante 2 minutos, después de los cual se repite un ciclo de calentamiento a 94°C durante 30 segundos, 52°C durante 1 minuto y 72°C durante 3 minutos, 40 veces. Después de completar este procedimiento, la solución de reacción se calienta a 72°C durante 10 minutos.

Los fragmentos de ADN amplificados, obtenidos así, se separan en un gel de agarosa al 1% que contiene 0,25 ug/ml de bromuro de etidio. Las bandas determinadas por contener los fragmentos de ADN deseados son cortadas utilizando una hoja de afeitar y el ADN se recupera de este utilizando un kit Gene Clean (BIO101). El fragmento de ADN se clona utilizando

654

un kit de clonación TA (Invitrogen, CA). Este se desarrolla como sigue.

El fragmento de ADN recuperado de la solución de reacción PCR, junto con 50 ng de un vector pCR2.1 que se suministra con un kit de clonación TA, se mezcla con 1 µl de un amortiguador de reacción de ligasa 10 X (6mM Tris-HCl (pH 7,5), 6mM de cloruro de magnesio, 5mM de cloruro de sodio, 7 mM β-mercaptoetanol, 0,01 mM ATP, 2 mM DTT, 1 mM de espermidina, 0,1 mg/ml de albumina de suero bovino), al cual se han agregado 4 unidades de T4 de ADN ligasa (1 µl), el volumen total de la mezcla se ajusta a 10 µl con agua dionizada estéril, y la solución de ligasa resultante se incuba a 14°C durante 15 horas. Luego de este tiempo, 2 µl de la solución de reacción de ligasa se debe a la 50 µl de cepa de E.coli competente TOP10F', la cual se suministra con el kit de clonación TA y se trae a competencia de acuerdo con el manual de instrucción, al cual 2 µl de 0,5 M de β-mercaptoetanol se han agregado, y la mezcla resultante se mantiene sobre hielo durante 30 minutos, luego a 42°C durante 30 segundos, y de nuevo sobre hielo durante 5 minutos. Luego, 500 µl de medio que contiene 2% de triptona v/v, 0,5% de

extracto de levadura, 0,05% p/v cloruro de sodio, 2,5 mM de cloruro de potasio, 1 mM de cloruro de magnesio y 20 mM de glucosa (en lo sucesivo denominada como medio "SOC") se agrega al cultivo, y la mezcla se incuba durante 1 hora a 37°C con agitación. Después de este tiempo, el cultivo se esparce sobre un plato de caldo de agar L (1% v/v triptona, 0,5% p/v de extracto de levadura, 0,05% 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. Ampicilina resistente a colonias que aparecen sobre el plato son seleccionadas y raspadas con una argolla de transferencia de platino, y cultivada en un medio de caldo L que contiene 100 µg/ml de ampicilina a 37°C, durante toda la noche con agitación a 200 r.p.m,. Después de incubación, las células son cosechadas mediante centrifugación, del cual se prepara ADN de plásmido mediante el método álcali. El fragmento EcoRI-EcoRI DR5 cADN del plásmido así obtenido se subclona en un plásmido pcADN3 (Invitrogen, CA). La longitud completa del gen DR5 pcADN3 son secuenciadas y coinciden con la secuencia publicada. El plásmido así obtenido se designa como plásmido pcADN3-DR5.

1.2 Construcción de un vector de expresión DR5-IgG

Con el fin de obtener una forma soluble de DR5 humano al que le falta un dominio de transmembrana, se construye un vector de plásmido de expresión. Este vector se diseña para codificar una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular del DR5 humano fusionado al IgG1 humano Fc ADN (41). El ADN que codifica el DR5 humano al que le falta el dominio de transmenbrana de obtiene mediante la siguiente reacción PCR.

a) **Molde**

El molde para la reacción PCR utiliza pcDNA3-DR5

b) **Cebadores PCR**

Los siguientes cebadores de oligonucleotidos son sintetizados para PCR

5'-gacgatgcccgatctactttaaggg-3' (DR5p1: SEQ ID número 1);

5'-ggatccgtggacacattcgatgtc-3' (DR5p3: SEQ ID número 3);

657

A menos de que se especifique otra cosa, todos los oligonucleotidos en estos ejemplos son sintetizados por Lifetechnologies. Todos los oligonucleotidos son almacenados a -20°C después de ser disueltos en agua destilada.

c) **Reacción PCR**

La reacción PCR es ADN conducido y amplificado aislado como para el ejemplo 1.1 (c).

El plásmido así obtenido se diseña como plásmido pCR-ΔDR5. el fragmento BamHI-EcoRI que codifica fragmento Fc humano que se recupera del pmFas-hIgG1Fc se subclona en sitios de multiclonación BamHI y EcoRI de pcDNA3. El plásmido así obtenido se designa pcDNAFc. Adicionalmente, el fragmento BamHI-BamHI que codifica la región DR5 soluble humana que se recupera del pCR-ΔDR5 se subclona en el sitio BamHI del plásmido pcDNAFc. El plásmido así obtenido se designa como plásmido pcDNAΔDR5-Fc. El fragmento EcoRI que codifica la región igGFc humano DR5 soluble humano que se recupera del plásmido pcDNAΔDR5-Fc es despuntado al utilizar un fragmento Klenow de polimerasa ADN (GIBCO BRL) y luego subclonado en el

vector lanzadera pAdCMV5 (Quantum Biotechnologies Inc., Canada) que es despuntada después de cortar el BamHI. El plásmido así obtenido se designa de pAdΔDR5-Fc.

1.3 Expresión y purificación de la proteína de fusión DR5-IgG1 humano.

Las células QBI-293A (suministradas con el kit ADENO-Quest) son co-transfectadas con pAdΔDR5-Fc y ADN viral QBI (suministrado con el kit ADENO-Quest) utilizando el kit ADENO-Quest (Quantum Biotechnologies Inc., Canada) de acuerdo con el manual de instrucción. Las placas de virus recombinantes son cultivadas y tamizadas para expresión de la proteína de fusión DR5-IgG mediante análisis ELISA y el supernadante. Las placas positivas son amplificadas en QBI-293A y almacenadas a -80°C como almacenamiento de virus. Cincuenta platos (150 mm) de células QBI-293ª son transfectadas con virus recombinante pAdΔDR5-Fc a 10 m.o.i. (multiplicidad de infección). Los medios de cultivo son cosechados después de transfección durante 48 horas.

659

Las células trasfectadas que tienen el gen DR5-IgG crecen hasta una densidad celular 1 x 10^6 células/ml mediante incubación en 500 ml de un medio DMEM (GIBCO), que contiene 10% v/v de de FCS, A 37°C en una atmósfera de 5% v/v de CO^2 durante 2 días. El cultivo es entonces centrifugado (1,000 r.p.m., 5 minutos) recolectado el supernadante. La purificación del DR5-IgG del supernadante se logra utilizando cromatografía de afinidad CL-4B de proteína A-sefarosa (farmacia) bajo las siguientes condiciones:

columna: columna CL-4B Proteína A-sefarosa (tamaño de columna 2 ml; farmacia);
amortiguador de dilución: 0,1 M de glicina (pH 2,4), 0,15 M NaCl;
amortiguador de neutralización: 1M Tris-HCl (pH 8,5).

Después que todo el supernadante se aplica a la columna, esta es lavada tres veces con 20 ml de PBS y luego 1 ml de amortiguador de dilución se agrega 10 veces. La densidad óptica de cada fracción eluada (1 ml) se mide. La segunda

fracción hasta la quinta fracción (con $OD_{280} \geq 0,1$) son recolectados y después de adición de 100 µl de amortiguador de neutralización, los eluados son ubicados separadamente en un tubo de diálisis, y los eluados son dializados contra un litro de PBS (pH 7,5) a 4°C. El amortiguador de diálisis se cambió dos veces.

Los eluados son entonces ensayados para expresión del producto de gen DR5-IgG mediante ELISA. Primero, 100 µl de cada fracción son ubicados separadamente en pozos de un microplato de 96 pozos (Costar) e incubado a 37°C durante 1 hora. Después de este tiempo, la solución en los pozos es removida, y el plato es lavado tres veces con 100 µl/pozo de PBS que contiene 0,1% v/v de Tween 20 (en lo sucesivo denominado como "PBS-Tween"). Después de lavado, el PBS que contiene 2% de p/v de albúmina de suero bovino (en lo sucesivo denominada como "BSA") se agrega en cantidades de 100 µl/pozo y el plato es entonces incubado a 37°C durante 1 hora. Después de este tiempo, los pozos son lavados tres veces adicionales con 100 µl por 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

se agrega a cada pozo, y el plato es una vez de nuevo incubado a 37°C durante 1 hora. Los pozos son entonces lavados tres veces con 100 µl/pozo de PBS-Tween. El sistema de sustrato líquido 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (en lo sucesivo denominado como "TMB") (Sigma) es entonces agregado en una cantidad de 100 µl/pozo y al plato le es permitido permanecer a temperatura a ambiente durante 5 minutos y luego la reacción detenida al agregar 100 µl/pozo de 0,2N de H_2SO_4. la absorbancia de cada pozo es leída a 450 nm para estimar la concentración del anticuerpo de unión, utilizando la absorbancia a 650 nm como la lectura de control. La absorbancia es medida utilizando un lector de microplato (dispositivos moleculares). La producción del DR5-IgG1 es confirmada utilizando este método ELISA. El peso molecular de la proteína de fusión DR5-IgG1 expresada se determina utilizando análisis western blotting en el cual se utiliza IgG1 mAb antihumano (Sigma) 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 paridad lograda es mayor de 90% evaluada mediante el análisis sobre SDS-PAGE y detección de la proteína mediante teñido con azul Coomasic.

Ejemplo 2. Generación de anticuerpos monoclonales contra DR5 humano

2.1. Inmunización

Ratones Balb/c hembras (Jakson Laboraty, Bar Habor, ME) de 6-8 semanas de edad, son inmunizados con proteína de fusión DR5/hIgG1 humana purificada por afinidad. Para la inmunización "foot-pad" inicial, la proteína de fusión (50 μg) se emulsifica en un adyuvante completo Freund's (Difco, Detroit, MI). Los ratones son entonces reforzados con cuatro inyecciones de 50 μg de proteína de fusión administrada sin adyuvante cada tercer día. Tres días después de la ultima inyección, los linfocitos provenientes de nodos de linfa locales son fusionados con células de mieloma NS-1, y los hibridomas son cultivados en un medio F104 suplementado con 10% de suero de becerro fetal. Los hibridomas positivos son seleccionados mediante ELISA en el cual los platos son recubiertos con un μg/ml de DR5/hIgG1 o la misma cantidad de Fas/hIgG1 como un control. El isótopo de los hibridomas se determina mediante ELISA utilizando un panel de anticuerpos

de cabra específico de isótopo Ig de ratón (Southern Biotechology, Birmingham, AL). Los anticuerpos monoclonales son purificados mediante cromatografía de afinidad utilizando IgG1 de anti-ratón inmovilizado o proteína G (Sigma).

2.2. Fusión de célula

En el tercer día después de la inyección de refuerzo, los nodos de linfa locales son removidos del ratón y ubicados en 10 ml de medio RPMI 1640 libre de suero (GIBCO BRL) que contiene 50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml estreptomicina, y 300 µg/ml de ácido L-glutamico, y irrumpidos al pasar el órgano a través de una malla (Cell Strainer; Falcon) utilizando una espátula. La suspensión de célula resultante se centrifuga para peletizar las células de nodos de linfa locales que son entonces lavadas dos veces con un medio RPMI libre de suero. Las células lavadas son entonces suspendidas en un medio RPMI libre de suero y contadas.

Mientras tanto, las células NS1 de mieloma (American Type Culture Colletion TIB-18) han crecido hasta una densidad de

célula que no excede de 1 x 10^8 células/ml en un medio ASF104 (Ajinomoto, K. K.) que contiene 10% v/v de FCS (Gibco BRL) ("medio ASF con suero") a 37°C bajo 5% v/v CO_2, y estos son irrumpidos de manera similar, lavados, resuspendidos y contados.

Una cantidad de suspensión de célula NS1 calculada para contener 3 x 10^7 células es mezclada con una cantidad de suspensión de célula de bazo calculada para contener 3 x 10^8 células. La mezcla resultante es centrifugada y se descarta el supernadante. Las siguientes etapas de la fusión células son desarrolladas aunque manteniendo todas las veces el tubo plástico que contiene el glóbulo a 37°C en un beaker de agua caliente.

Un ml de 50% (p/v) de polietilenglicol 1500 (Boehringer Manheim) es luego lentamente agregado al tubo, todo lo cual agitando el glóbulo utilizando la punta de una pipeta. Subsecuentemente, 1 ml de medio RPMI libre de suero, precalentado a 37°C, es agregado lentamente en dos porciones, seguido por la adición 7 ml adicionales de medio RPMI libre de suero. La mezcla resultante es entonces centrifugada, el

supernadante descartado y 10 ml de medio HAT que contiene 10% v/v FCS son agregados aunque agitando suavemente con la punta d una pipeta. 20 ml adicionales de un medio HAT que contiene 10% v/v de FCS se agrega, y la suspensión se dispensa en microplatos de cultivo de célula de 96 pozos a 100 µl/pozo e incubados a 37°C en una atmosfera de 5% de v/v CO_2. Después de 7 u 8 días 100 µl/pozo de medio HAT fresco son utilizados para reemplazar el medio en cualquiera de los pozos que exhiben un matiz amarilloso. Las células de fusión provenientes de estos pozos son clonadas al limitar la dilución como se describe adelante.

2.3. Clonación mediante dilución limitante.

Los timos provenientes de ratones BALB/c hembras de 4 a 10 semanas de edad (de Japan SLC, Inc.) son removidos, irrumpidos sobre una malla (Cell Strainer; Falcon) como se describió anteriormente y las células irrumpidas son lavadas dos veces con medio HT que contiene 10% v/v de FCS. Una cantidad de célula de timo que corresponden a aquellas provenientes de un ratón se suspenden en 30 ml de medio HT que contiene 10% v/v de FCS para producir una suspensión de

célula alimentadora. La preparación de la célula de fusión obtenida anteriormente en el ejemplo 2.2 se diluye con esta suspensión de célula alimentadora 10- a 100 veces y se diluye adicionalmente en serie con una suspensión de célula alimentadora para hacer que las suspensiones tangan densidades de célula de fusión de 5,1 y 0,5 células/ml. Las muestras así preparadas son dispensadas en pozos de microplatos de cultivo de célula 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 supernadantes del cultivo provenientes de los hibridomas de crecimiento son tamizados mediante ELISA utilizando platos recubiertos con µg/ml de DR5/hIgG1 o la misma cantidad de Fas/hIgG1 (41) como un control. Los anticuerpos de unión son detectados utilizando inmunoglobulinas de anti-ratón conjugadas con peroxidasa de rabano (HRP) (Southern Biotechnology. Birmingham, AL) con TMB (Sigma,St Louis,MI)

como el substrato. El DR5-IgG1 purificado a una concentración de 1 µg/ml o la misma cantidad de Fas-hIgG1 son introducidos en un pozo de un ELISA/RIA STRIP PLATE de 96 pozos (Costar, NY). El plato es mantenido permaneciendo a 4°C durante la noche para permitir la absorción de la proteína sobre la sup0erficie del pozo. Después de ese tiempo, la solución en los pozos es descartada y cada pozo es lavado tres veces con PBS-Tween. Luego, 100 µl de PBS que contiene 1% (p/v) de albúmina de suero bovino (A3803; Sigma Chemicals Co.) se agregan a cada pozo y el plato se incuba a 37°C durante 1 hora. Los pozos son entonces lavados una tres veces adicionales con PBS-Tween, y luego 50 µl de cada cultivo de supernadantes provenientes de hibridomas de crecimiento son agregados a cada pozo. El plato es entonces incubado a 37°C durante 1 hora, y los pozos son de nuevo lavado cuatro veces con PBS-Tween. Después de lavado, 50 µl de anticuerpo de inmunoglobulina anti-ratón de cabra marcado con peroxidasa de rabano (Southern Biotechnology. Birmingham, AL), diluida 1000 veces con PBS, se agrega por pozo y el plato es de nuevo incubado a 37°C durante 1 hora, después de lo cual los pozos son lavados cuatro veces con PBS-Tween. El sistema de sustrato liquido 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB) (sigma)

668

es entonces agregado en una cantidad de 100 µl/pozo al plato se le permite permanecer a temperatura ambiente de cuarto durante 5 minutos y luego la reacción se detiene mediante la adición de 100 µl/pozo de $0,2NH^2SO_4$. la absorbancia de cada pozo a 450 nm (control 650 nm) se mide utilizando un lector de microplato (Molecular Devices) y las células de fusión son seleccionadas de la muestra que tenia la absorbancia (450 nm-650 nm, valores OD;> 0,5) claramente mayor que aquellos a los cuales se les había agregado supernadante de células de fusión (valores OD; más o menos = 0,03), adicionalmente, los supernadantes del cultivo proveniente de los hibridomas de crecimiento son también funcionalmente tamizados al mdir la actividad inductora de apoptosis utilizando células Jurkat. Cincuenta µl de un medio RPMI que contiene células Jurkat (1000 células por pozo) y 5 uM de Bisindolilmaleimida VIII (BisVIII, Alexis, San Diego, CA) son agregados en platos de 96 pozos en la presencia de 50 µl de suepernadante de cultivo proveniente de hibridomas de crecimiento. Las células son cultivadas en una incubadora humidificada a 37°C durante la noche. La apoptosis se determina mediante viabilidad celular utilizando el kit ATPLite con instrucciones por el fabricante

(Packard Instruments), y las muestras son contadas utilizando un TopCounter (Packard Instruments).

2.5. Unión ELISA de TRAIL Y TRA-8 a los receptores

Los platos ELISA son recubiertos con 2 μg/ml de proteína de fusión DR4-Ig o DR5-Ig durante la noche. Después de bloquear con BSA al 3%, el TRAIL-FLAG o TRA-8 soluble se agrega a concentraciones indicadas e incubadas a 37°C durante 1 hora. La unión de TRAIL o TRA-8 se detecta mediante anticuerpo anti-Flag conjugado HRP (Alexis) o IgG antimurino conjugado con HRP (Southern Biotechnology), respectivamente. Las reacciones son desarrolladas mediante amortiguador de sustrato TMB y medidas mediante el lector de microplato Benchmark (BioRad). Los valores Kd son estimados por o mediante el modelo de unión de un sitio de regresión no lineal utilizando un software de prisma GraphPad (GraphPad Software, San Diego, CA). Para ELISA competitivo, se agregan 100 ng/ml de TRAIL-FLAG y se incuban en la presencia de varias concentraciones de TRA-8. la unión de TRAIL se determina como anteriormente.

2.6. Clonación

Las etapas descritas en el ejemplo 2.3 y 2.4 anterior son repetidas 5 veces para las células seleccionadas en 2.4, posibilitando de esta manera la selección de varios clones de hibridoma cada uno de los cuales produjeron un anticuerpo simple que se unió a DR5-IgG pero no se unió a Fas-IgG. Como resultado de este procedimiento de selección el hibridoma ratón-ratón designado TRA-8 y que produce una unión de anticuerpo a DR5-IgG, pero no a Fas -IgG, se obtiene. Este hibridoma, TRA-8, se deposito con la American Type Culture Colletion en Marzo 1, 2000, y le ha sido asignado el número de acceso PTA-1428.

La subclase del anticuerpo producido mediante hibridoma ratón-ratón TRA-8 (en lo sucesivo denominada simplemente como "TRA-8") se demuestra por ser IgG1, κ, después de ensayar con unb kit de isotipiado de anticuerpo monoclonal (Pierce).

Utilizando nuestra proteína de fusión DR5-IgG1 humana como inmunogeno, siete clones de hibridoma son obtenidos mediante tamizado ELISA inicial, todos los cuales son fuertemente

671

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

2.7. Análisis Western blot

Filtros para análisis Western blot de homogenato de tejido humano normal y canceroso son comercializados por Geno Tecnhology (St Louis, MO). Cada carril es cargado con una cantidad igual de proteína según se determinó mediante un anticuerpo anti-β-actina. Las manchas son sondeadas con 1 μg/ml de TRA-8 durante la noche, y seguidas por IgG1 antiratón de cabra conjugado con HRP (Southern Biotechnology) a temperatura ambiente de cuarto durante 1 hora, y desarrollada mediante quimioluminiscencia.

2.8. Inmunohistoquimica in situ

Los tejidos humanos son obtenidos del Tissue Procurement Center de UAB. Las 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 de cuarto durante 60 minutos. El kit ABC de IgG antiratón con diaminobenzidina (Vector, Burlingame, CA) se utiliza como el sustrato colorimetrico para visualizar la reactividad.

2.9. Análisis de activación de caspaza

Células Jurkat (1 x 10^6/ml) son incubadas con 500 ng/ml de TRA-8. aliquotas (30 μg de proteína) de lisado de células son separadas sobre 15% de SDS-PAGE, manchadas sobre una membrana de nailon, y las manchas son sondeadas con 8,9 y 3 anticuerpos anticaspaza (BD Pharmingen, San Diego, CA) seguido por anticuerpo secundario conjugado con HRP y visualización de quimioluminiscencia de productos clivados. El inhibidor de caspaza ajustado es comercializado de R&D Systems (Minneapolis, MN). Cada inhibidor de caspaza es agregado al cultivo a concentraciones indicadas.

Ejemplo 3.Purificación de anticuerpo monoclonal TRA-8

693

El hibridoma ratón-ratón, TRA-8, esta creciendo a una densidad de celular de 1 x 10^6 células/ml mediante incubación en 500 ml de medio ASF, conteniendo 10% v/v de FCS, a 37°C bajo 5% v/v CO^2 durante 5 días. El cultivo es entonces centrifugado (1,000 r.p.m., 5 minutos) y el supernadante recolectado. La purificación del TRA-8 de supernadante se logra utilizando cromatografía de afinidad CL-4B de proteína G-sefarosa (farmacia) bajo las siguientes condiciones:

columna: columna CL-4B proteína G-sefarosa (tamaño de columna 2 ml; farmacia);
amortiguador de dilución: 0,1 M de glicina (pH 2,4), 0,15 M de NaCl;
amortiguador de neutralización: 1 M de Tris-HCl (pH 8,5).

Después del todo el supernadante es aplicado a la columna, 20 ml de PBS se lava tres veces y luego se agrega amortiguador de elusión en volúmenes de 1 ml durante 10 veces. La densidad aplicada a presión eluada (1 ml) se mide. La fracción del número 2 al número 5 (> OD_{280} es = 0,1) son recolectados separadamente.

Después de regar 100 µl de amortiguador de neutralización, los elodos son ubicados en tubería de diálisis separadamente, y los eluados dializados contra 1 litro de PBS (pH 7,5) a 4°C. El amortiguador de diálisis es cambiado dos veces. Esta muestra es ensayada para actividad de anticuerpo anti-DR5 mediante ELISA utilizando una proteína de fusión DR5-IgG humana preparada anteriormente utilizando la técnica descrita arriba.

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

Los procedimientos de los ejemplos 1-3 son repetidos con cADN de plantilla DR4 y los cebadores en lugar de aquellos detallados en el ejemplo 1 para obtener un antígeno DR4 que se utiliza como para los ejemplos 1, 2-3 para obtener un anticuerpo monoclonal específico contra DR4.

Ejemplo 5. Anticuerpos monoclonales contra DcR1 y DcR2

675

Los anticuerpos monoclonales surgen contra receptores señuelo DcR1 y DcR2 al sustituir los correspondientes cADN y los cebadores para crear los respectivos antígenos como para el ejemplo 1.los vectores de expresión para la fusión DcR1 o DcR2 con inmunoglobulina G y los anticuerpos monoclonales purificados resultantes son creados como para los ejemplos 2 y 3.

Ejemplo 6. La especificidad de un anticuerpo monoclonal

Como todos los receptores para TRAIL y otras proteínas de la familia TNFR comparten homología significativa, la especificidad del anticuerpo de ejemplo TRA-8 para DR5 se determina mediante análisis western blot utilizando dos proteínas de fusión DR5- IgG humana diferentes y solubles, formas recombinantes de otras proteínas relacionadas. Una primer proteína de fusión DR5-Ig se construye al fusionar cADN de los residuos 1-180 de la porción extracelular del DR5 y cADN que codifica la región constante delo IgG1 huamno. El cADN fusionado es clonado en un vector adenoviral recombinante (Quantum Biotechnogies, Inc., Montreal, Canada).

La proteína de fusión DR5/hIgG1 expresada, que tenia un peso molecular relativo de 50 kDa se purifica utilizando una columna de afinidad IgG antihumana (Sigma, St Louis, MO). Para el análisis western blot de especificidad, una segunda proteína de fusión DR5/IgG1 humana recombinante (aa. 52-212), así como también las proteínas de fusión TRAIL-R1, R3 y R4 son comercializadas por Alexis. Las formas solubles del Fas humano y TNFR1 son amablemente suministradas por el Dr. Carl Edwards Of Amgen, Inc., Thousands Oaks, Ca, USA. El DR4, DcR1, DcR2, TNFR1, R4, humano soluble recombinante, y las moléculas Fas utilizadas son proteínas de fusión IgG1 humanas. 0,5 μg de cada proteína se separan mediante 10% de SDS-PAGE y manchadas sobre una membrana de nitrocelulosa. Las manchas son bloqueadas con 5% de leche seca en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora, y sondeadas con 1 μg/ml de anticuerpo anti-DR5 monoclonal purificado (clon: TRA-8) o IgG anti humano de cabra conjugado con HRP a 4°C durante toda la noche. El IgG de antiratón de cabra conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) se utiliza como anticuerpo secundario para detectar la unión TRA-8. las manchas son desarrolladas mediante quimioluminiscencia.

677

Las células Cos-7 trasfectadas con el vector pcADN3 (Clontech, Palo Alto, CA) que contienen el DR5 o DR4 de longitud completa o el vector vacíos son utilizados para análisis de citometria de flujo. El cADN de longitud completa que codifica el TRAIL humano o el ligando de Fas de murino es clonado en el vector pTRE corriente abajo de promotor controlable con tetraciclina (Clontech). Los fragmentos XhoI-HindIII de pTRE-hTRAIL o pTRE-mFasL son adicionalmente clonados en el vector de pAdBN adenoviral (Quantum Biotechnologies, Inc.). Las células huésped 293 son cotrasfectadas con el pAd-TRE-hTRAIL o el pAd-TRE-mFasL de un fragmento de ADN de adenovirus. La expresión de TRAIL humano funcional o ligando Fas de murino de las placas de virus recombinante es tamizado utilizando un ensayo de liberación ^{51}Cr con Jurkat como los objetivos.

El TRA-8 reacciona fuertemente con proteína de fusión DR5-IgG (-50 kDa), que se utiliza para inmunización como se muestra en la figura 1a, DR5, número 1, y débilmente con la segunda proteína de fusión DR5- IgG (-60 kD) como se muestra en la fugura 1a, DR5, número 2. No existe unión significativa de TRA-8 a DR4, DcR1, DcR2, Fas (CD95) o TNFRI. Estos resultados

indican que el TRA-8 reconoce los epítopos que son específicos para DR5 pero no compartidos por los otros miembros de la familia.

El TRA-8 no alcanza con otros miembros de la superfamilia receptora de TNF, tal como el Fas (CD95) y el receptor I TNF, ni reacciona cruzadamente el TRA-8 con el homologo de murino de DR5 como se muestra mediante las p0roporciones de absorbancia optica para 450 nm y 650 nm, en donde los números de panel inferior 1-7 (figura 1a, la columna 8 del panel inferior), el TRAIL soluble y la unión TRA-8 comparablemente con el DR5 inmunizado (figura 1b, panel izquierdo). En contraste, el TRAIL se une al DR4, pero el TRA-8 no exhibe ninguna actividad de unión al DR4 (figura 1b, panel medio). Los valores Kd para la unión 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 para unirse al DR5 pero no para unirse al DR4, como se muestra en el ELISA competitivo (figura 1b, panel derecho). Estos resultados establecen la especificidad del TRA-8 para el DR5 humano.

679

El TRA-8 es capaz de detectar expresión de superficie celular de DR5, con análisis citometrico de flujo que indica unión especifica a las superficie celular de las células Cos-7 trasfectadas con DR5 humano de longitud completa, pero no de células Cos-7 trasfectadas con DR4 o vector vacío (figura 1c). De manera similar, la inmunohistoquimica in situ con TRA-8 demostró reactividad con células Cos-7 trasfectadas con ADN DR5 de longitud completa pero no con aquellas trasfectadas con el vector de control (figura 1d). El TRA-8 no induce a apoptosis de células Cos-7 no trasfectadas, y RT-PCR de ARN de células Cos-7 utilizando cebadores pareados que codifican DR5 humano no mostrado en productos PCR específicos. El análisis funcional adicional utilizando células Jurkat humanas como objetivo demostraron que, en la ausencia de reticulación, el DR5 induce fuertemente muerte celular, demostrada por tres diferentes ensayos para viabilidad de célula incluyendo ATPLite, MTT y exclusión PI (figura 1e). Más del 50% de las células Jurkat son muertas mediante niveles de nanogramo de TRA-8 como se muestra en el ensayo ATPLite. La actividad de muerte del TRA-8 es especifica para DR5 en la medida que este pudiera ser bloqueado por el DR5-Ig pero no por la proteína de fusión

DR4-Ig (datos no mostrados). El clivage de las caspazas 8, 9 y 3 se podía detectar mediante análisis western blot tan tempranamente como 30 minutos después del tratamiento TRA-8 de las células Jurkat (figura 1f), y la muerte celular de las células Jurkat es completamente inhibida por el inhibidor de caspaza general (Z-VAD) (figura 1g). Los inhibidores de caspaza individuales para caspaza 8, 3, 9 y 10 inhiben parcialmente la muerte celular, indicando adicionalmente que la muerte celular mediada por TRA-8 es primariamente a través de mecanismo apoptosico dependiente de caspaza.

Ejemplo 7. Análisis citometrico de flujo de la expresión de la superficie celular DR5: Un receptor de muerte mayor sobre muchas células tumorales pero no sobre células normales

La capacidad del TRA-8 de unirse a DR5 expresado sobre la superficie celular y la especificidad de esta reacción es luego evaluada utilizando células Cos-7 (American Type Culture Colletion número CRL-1651) trasfectadas con vector de expresión que contiene el DR5 o DR4 cADN humano de longitud completa o vector vacío como control. El IgG1 anti-ratón conjugado con ficoeritina (PE) es utilizada como el Segundo

anticuerpo para detectar la unión de TRA-8. la fluoroescencia de 1 x 10^4 células es medida, utilizando un fluocitometro (FACSVantage) bajo las siguientes condiciones:

Longitud de onda de excitación: 488 nm;
Longitud de onda de detección 600 nm.

El análisis de citometria de flujo mostró que el TRA-8 tenia aproximadamente el 30% de las células Cos-7 trasfectadas con el vector DR5 como se mostró en el histograma sólido de la figura 1c. Este porcentaje es paralelo a la eficiencia de trasfecciòn como se determinó mediante análisis de trasfecciòn utilizando proteína fluorescente verde (GFP) (datos no mostrados). El TRA-8 no tiñe significativamente las células trasfectadas bien sea con DR4 (el histograma abierto) o el vector de control (el histograma punteado), indicando que el TRA-8 es especifico para el DR5 de la superficie celular.

Aunque la expresión del DR5 en células tumorales ha sido estudiada extensivamente al nivel mARN (REFERENCIA por favor inserte), la expresión de superficie del DR5 no se ha

682.

documentado. 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 siguiente panel de células (1×10^6) se incuba con 10 µg/ml de TRA-8 purificado de afinidad a temperatura ambiente de cuarto durante 30 minutos, y luego teñido con IgG1 anti ratón conjugado con PE (Pharmingen) durante otros 30 minutos. 10.000 células viables son analizadas utilizando el citometro de flujo FACS vantage bajo las siguientes condiciones:
Longitud de onda de excitación: 488 nm;
Longitud de onda de detección: 600 nm.

Las cinco líneas celulares hematopoyeticas ensayadas, son células CEM-6, Molt-4, H-9 y U937 Jurkat. La expresión DR5 es detectable sobre la superficie de células CEM-6, H-9, y U937 Jurkat peor es casi indectetable en células Molt-4 como se muestra en la figura 2a y 2a'. Aunque los altos niveles de expresión del DR5 ARN han sido descritos previamente (43), el análisis FACs indico que estas células no expresan altos niveles de DR5 de superficie. Estos resultados indican que la expresión superficial de la célula del DR5 no se correlaciona

con la expresión transcripcional del DR5, lo cual no es inesperado para tal receptor. El nivel de expresión superficial celular del DR5 puede ser específico de linaje celular en razón a que la mayoría de las células de origen hematopoyetico expresaron bajos niveles mientras la mayoría de glioma y próstata expresaron altos niveles de DR5.

El anticuerpo monoclonal TRA-8 es utilizado para determinar el papel del DR5 en la inducción de la apoptosis mediada por TRAIL al examinar su expresión en la superficie celular entre un panel de diferentes tipos de células tumorales humanas así como también la susceptibilidad de estas células tanto a la apoptosis mediada por TRAIL como TRA-8. Las células T de sangre periférica primaria no expresaron niveles significativos de DR5 superficial celular y son resistentes tanto a apoptosis mediada por TRAIL como TRA-8 (figura 2a, 2a', y 3a'). aunque todas las cinco líneas celulares de leucemia T ensayadas expresaron no obstante niveles relativamente bajos de DR5 de superficie celular, dos de ellas (Jurkat y CEM-6) son altamente susceptibles tanto a apoptosis mediada por TRAIL como a la mediada por TRA-8, indicando que el DR5 solo es suficiente para inducir

apoptosis de estas células. Las células 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 puedan estar involucrados en la trasducción de una señal de apoptosis. Las células H-9 son resistentes tanto a la apoptosis mediada por TRAIL como por TRA-8, indicando un bloque mediado por una senda antiapoptosis intracelular.

El panel de las células incluyo las líneas celulares de glioma maligno humano, Hs683, U251MG, D37MG, D54MG, U373MG, CH235MG, U87 y los astrositos humanos normales, los cuales fueron suministrados por el Dr. Yancey Gillespie del Departamento de Neurocirugía de la Universidad de Alabama en Birmingham. Las líneas celulares de cancer de próstata humano, Du154, PC3 y LnCap, fueron suministradas por el Dr. William Grizzle del Departamento de Patología de la Universidad de Alabama en Birmingham que había obtenido las líneas celulares del American Type Culture Collection. Las líneas celulares T de leucemia humana, el linfoma de célula B, las Jurkat HepG2 (American Type Culture Collection TIB-152) y las CCRF-CEM CEM-6 (American Type Culture Collection

CCl-119); las líneas celulares de monolito, U937 (American Type Culture Collection CRL-2367); fueron comercializadas del American Type Culture Collection. Todas las líneas celulares anteriores son cultivadas en RPMI 1640 suplementadas con 10% de FCS. La línea celular de astrocitoma humano, 1321N1, fue amablemente suministrada por el Dr. Richard Jope del Departamento de Psiquiatría de la Universidad de Alabama en Birmingham, y cultivadas en DMEM suplementado con 5% de FCS.

El TRAIL humano recombinante soluble, comercializado por Alexis Corporation (San Diego, CA), es una proteína de fusión comprendida de dominio extracelular de TRAIL humano (residuos aa 95 a 281) fusionado en el Terminal N del marcador FLAF y un péptido ligador de 8 aminoácidos. A diferencia del His etiquetado TRAIL previamente reportado, esta reparación de TRAIL solo no induce una respuesta apoptosica fuerte en células Jurkat y requiere un anticuerpo anti-FLAF como un reticulador para mejorar la apoptosis. El anticuerpo anti-FLAF también fue comercializado por Alexis.

Todas las 10 células de glioma maligno humano ensayadas expresaron niveles detectables de DR5 en la superficie

celular. La mayoría expreso niveles intermedios a altos de DR5 como se muestra en la figura 2b. Tres líneas, D-54MG, U373MG y CH-235MG expresaron altos niveles de DR5 aunque seis líneas, Hs-683, U251-MG, D37-MG, U87, SMK1 y 1321N1, expresaron niveles intermedios de DR5. Solo una línea celular H-465 expreso bajo niveles de DR5. Todas las tres líneas celulares de cáncer de próstata expresaron varios niveles de DR5 como se muestra en la figura 2c.

Como las células T primarias normales, las células B primarias no expresan niveles significativos de DR5 y no sufren apoptosis después del tratamiento con TRAIL o TRA-8 (Figura 2d). Tres (SKW6.4, EB-3, y Raji) de los cuatro líneas celulares de linfoma B ensayadas expresaron relativamente altos niveles de DR5 y son muy susceptibles tanto a apoptosis mediada por TRAIL como TRA-8. La cuarta línea celular Daudi, expreso muy bajo niveles de DR5 y es mucho menos susceptible a apoptosis mediada por TRAIL o TRA-8. Aunque los astrositos primarios no expresan niveles detectables de DR5 en la superficie celular (figura 2b'), todas las cuatro líneas celulares de glioma ensayadas expresaron altos niveles de DR5. el mayor nivel de expresión del DR5 sobre las células de

glioma que sobre las células T y B no se acompaña por una susceptibilidad significativamente mayor de apoptosis mediada TRAIL y DR5,sugiriendo, que el nivel de expresión de superficie celular de DR5 no esta necesariamente correlacionado con el nivel de apoptosis de las células tumorales. El RT-PCR, desarrollado para determinar niveles de mensaje de DR4, DR5 y DcR2, detecto mensaje en todas las células ensayadas (tabla 1).

Sin embargo, en general, las células normales primarias expresaron relativamente bajo niveles de DR5 comparados con células tumorales transformadas.

Tabla 1: análisis RT-PCR de expresión de receptor TRAIL *

Células	DR5	DR4	DcR2
Células T 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 B primarias	<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
Astrositos 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

*El ARN total fue aislado de las células y se desarrollo RT-PCR como se describió en los métodos. Los productos PCR fueron separados en 3% de gel de agarosa y analizados mediante el sistema Fluor-S MAX MultiImager System (BioRad). Los valores son presentados como un índice relativo a β-actina.

Ejemplo 8. Inducción de apoptosis in Vitro en células malignas.

Para determinar si el TRA-8 induce a apoptosis en células perfumadas in Vitro, todas las células tumorales positivas

DR5 son examinadas por su susceptibilidad a la apoptosis inducida bien sea por TRA-8 o TRAIL.

Las células objetivo (1 x 10^3 por pozo) son cultivadas en platos e 96 pozos en la presencia de concentraciones indicadas de TRAIL soluble más reticulador (Alexis) o TRA-8 a 37°C durante la noche. La viabilidad celular se determina utilizando (1) el kit ATPLite de acuerdo con la instrucciones del fabricante (Packard Instruments, Meriden, CT); (2) el kit de proliferación/viabilidad de células MTT (Sigma); o (3) el teñido PI de células muertas y analizadas mediante citometria de flujo. Al final del cultivo, las células son teñidas con 10 μg/ml de PI y las células negativas PI son consideradas como células viables. Para el análisis de núcleos condensados de hepatocitos, las células son teñidas con 10 ng/ml de Hoechst 33352 (sondas moleculares) y analizadas mediante citometria de flujo.

El anticuerpo TRA-8 es capaz de inducir apoptosis en la mayoría de las líneas celulares de glioma humano maligno (9/10), en 2 de las 3 líneas celulares de cáncer de próstata, y en 2 de las 4 líneas celulares hematopoyeticas positivas

DR5. Este no indujo a apoptosis en la línea celular Molt-4, la cual expreso casi niveles superficiales celulares detectables de DR5. Los niveles de susceptibilidad de las células a apoptosis mediada por TRA-8 vario considerablemente entre las líneas de células, sin embargo.

La variabilidad de la susceptibilidad de las cèlulas a apoptosis inducida por anticuerpo TRA-8 sugiere aunque un nivel mínimo de expresión de superficie celular de DR5 se requiere, el nivel de expresión de superficie celular del DR5 no es necesariamente el determinante primario de la susceptibilidad y otros factores influencian este proceso. Aunque todas las células de glioma generalmente expresaron niveles significativamente altos o mayores de DR5 superficial que lo que lo hicieron las células hematopoyeticas, la susceptibilidad de las células de glioma apoptosis inducida por TRA-8 no es proporcionalmente incrementada comparada con las células hematopoyeticas. La susceptibilidad de cinco de las líneas celulares de glioma, D-37MG, D54-MG, U373.MG, CH235-MG y 1321N1 a 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

celulares de glioma, H-456 y SMK1, son mucho menos susceptibles a la apoptosis inducida por TRA-8. En el caso de las células H-456, la expresión superficial del DR5 es baja; sin embargo, la expresión superficial del DR5 en SMK1 es similar a las líneas celulares más susceptibles, sugiriendo que otro mecanismo podría jugar un papel en la determinación de la susceptibilidad a la apoptosis mediada por TRAIL. Aunque las tres líneas celulares de cáncer de próstata expresaron altos niveles de DR5, las células Du145 son más sensibles a la apoptosis inducida por TRA-8, las células PC3 son parcialmente sensibles aunque las células LnCAP son completamente resistentes como se muestran en la figura 3c. Entre las células hematopoyeticas, se encuentra que las Jurkat y las CEM-6 son muy susceptibles a la apoptosis por TRA-8 como se muestra en la figura 2a aunque ambas líneas celulares se han encontrado que expresan bajo niveles de DR5. Aunque el DR5 es detectable sobre células U937, estas células son resistentes a apoptosis inducida por TRA-8. e manera similar, 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 por DR5.

La superficie adicional que se une a anticuerpos anti-DR5 son producidos por los procedimientos de los ejemplos 1-3. dos anticuerpos adicionales anti-DR5 designados TrA-1 y TRA-10 son estudiados junto con el TRA-8 para determinar la capacidad comparativa de inducir apoptosis y actuar de esta manera como un antagonista o al contrario bloquear la apoptosis mediada por TRAIL, actuando de esta manera cmo un antagonista. Las células Jurkat humanas son utilizadas como un objetivo para determinar la actividad agonista y/o antagonista de los tres anticuerpos anti-DR5 denotados TRA-1 TRA-8 y TRA-10. como se muestra en la figura 4, la viabilidad celular es aproximadamente del 90%, 70% y 20% para TRA-10, TRA-1 y TRA-8, respectivamente luego de incubación mediante la noche con 2,5 μg por ml. El TRA-8 induce una fuerte respuesta apoptosica en una forma dependiente de dosis aunque el TRA-1 induce solo una respuesta apoptosica moderada y el TRA-10 induce una débil respuesta. El TRA-8 es por lo tanto clasificado como un agonista del anticuerpo anti-DR5. La figura 4, la viabilidad de las células Jurkat humanas se

muestra como una función dependiente de la dosis de la apoptosis inducida por TRAIL. La apoptosis bloqueada por el TRA-10 de las células Jurkat humanas a una extensión significativa en un estudio de apoptosis inducido por TRAIL de baja dosis. Así, el TRA-10 es clasificado como un antagonista del anticuerpo anti-DR5.

La susceptibilidad de cinco de las líneas celulares de glioma, D-37MG, D54-MG, U373-MG, CH235-MG y 1321N1 a 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 células es mediada primariamente a través de DR5. Más aun, dos de las líneas celulares de glioma, Hs683 y U251-MG, son resistentes a la apoptosis inducida por TRAIL pero parcialmente sensible a la apoptosis inducida por TRA-8, indicando que la función de los receptores señuelo en estas células y que utilizan el anticuerpo TRA-8 puentean este mecanismo regulatorio. En las líneas celulares de cáncer de próstata a pesar de la sensibilidad variante a la apoptosis inducida por TRA-8, este hace paralela la sensibilidad de las células a la apoptosis inducida por TRAIL, de nuevo

sugiriendo que el DR5 juega un papel principal de la apoptosis mediada por TRAIL en las células de cáncer de próstata. Entre las células hematopoyeticas, se encuentra que las Jurkat y las CEM-6 son muy susceptibles tanto a apoptosis mediada por TRA-8 como por TRAIL. El nivel de apoptosis inducido por TRA-8 es comparable con aquel inducido por TRAIL como se muestra en las figuras 2a y 3a'. Solamente una de las lineas celulares de glioma, U87, y dos líneas celulares hematopoyeticas, U937 y Molt-4 exhibieron sensibilidad a la apoptosis inducida por TRAIL pero son menos sensibles o resistentes a la apoptosis inducida por TRA-8. Una línea celular H-9, expreso niveles detectables DR5 pero es resistente a la apoptosis inducida bien sea por TRA-8 o por TRAIL. Aunque niveles mínimos de expresión DR5 son requeridos para la apoptosis inducida por TRA-8, el nivel de expresión del 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 jugar un papel importante en la mayoría de las células ensayadas hasta la fecha; como anticipo el anticuerpo TRA-8 puentea los efectos de los receptores señuelo; las mutaciones funcionales

695

del receptor DR5 pueden ocurrir en células transformadas; y, finalmente, mecanismo regulatorio intracelular puede ser tan importante, o más importante que los receptores señuelo en la definición de la susceptibilidad de las células a apoptosis mediada por TRAIL DR5.

Los estudios previos han mostrado mARN para el DR5 se distribuyen ampliamente en tejidos normales[7]. Para evaluar la expresión del DR5 en el nivel de proteína, se sondea un panel de homogenato de tejido humano normal (Geno Technology, St. Louis, MO) con anticuerpo TRA-8 en un análisis western blot. Entre los nueve tejidos humanos normales, el tejido del cerebro es débilmente positivo (figura 5a, carril 2). La proteína DR5 no es detectable mediante reactividad TRA-8 en el hígado (carril 1), pulmón (carril 3), riñón (carril 4), bazo (carril 5), testículos (carril 6), ovario (carril 7), corazón (carril 8, o páncreas (carril 9). Como contraste, todos los trece tejidos de cáncer humanos teñidos positivamente con TRA-8 (figura 5b), incluyendo canceres de ovario (carril 1), pulmón (carril 2), hígado (carril 3), recto (carril 4), cerviz (carril 5), piel (carril 6), testículos (carril 7), tiroides (carril 8), útero (carril

10), estomago (carril 11), laringofaringe (carril 12), y páncreas (carril 13). Más aun, la inmunohistoquímica in situ de tejidos normales y de cáncer con TRA-8 confirmo que además de las pocas células positivas esparcidas en el bazo la expresión DR5 en tejidos de mama, pulmón y bazo normales no es detectable (figura 5c). Los tejidos de cáncer correspondientes que incluyen carcinoma ductal infiltrante de mama, cáncer de pulmón de célula pequeña, y linfoma reaccionaron positivamente con el TRA-8 (figura 5d). Entre un total de 22 tejidos con cáncer examinados, 5 de 6 canceres de mama, 2 de 2 canceres de cerviz, 4 de 5 canceres de hígado, 5 de 8 linfoma, 2 de 2 canceres de pulmón y 2 de 2 canceres de próstata reaccionaron positivamente con TRA-8. Estos resultados son consistentes con aquellos del análisis de citometria de flujo que indico que los tejidos de cáncer expresan mayores niveles de proteína DR5 que lo que hacen los tejidos normales.

Ejemplo 9. Actividad tumoricidad de TRA-8 in vivo

Por varias razones, muchos agentes que muestran promesa en estudios in Vitro no muestran eficacia in vivo. Es por lo

tanto importante ensayar la eficacia del TRA-8 en un modelo animal in vivo. Para lograr esto el anticuerpo DR5 antihumano TRA-8 es administrado a ratones que llevan senoinjertos humanos que expresan la molécula DR5 humana. Los ratones utilizados son ratones NOD/SCID de ocho semanas (Jackson Laboratory), que son inoculados subcutáneamente con astrocitoma humano 1321N1 (1×10^7), o inoculados intravenosamente con células Jurkat de leucemia humana (1×10^6). En el día dos después de la inoculación del tumor, los ratones son inoculados intravenosamente con TRA-8 (100 μg). cinco días después del tratamiento con TRA-8, el creciemitno de tumor 1321N1 se determina por el tamaño y peso de la masa del tumor. El crecimiento de las células Jurkat se determina por el peso del bazo y el porcentaje de células Jurkat positivas CD3 humanas en el bazo de los animales inoculados. Las biopsias de los tejidos tumorales son tomadas y examinadas histológicamente.

El tratamiento temprano con una dosis intravenosa simple de 100 μg de TRA-8 en un día después de la inoculación del tumor inhibió completamente las células 1321N1 de formar un tumor sólido de (figura 6a). El tratamiento tardío con tres dosis

de TRA-8 una semana después de la inoculación del tumor redujo el peso del tumor cuatro veces o más (figura 6b). La formación del tumor no es visible en animales tratados con TRA-8 en un punto de tiempo temprano (figura 6c, panel superior). El análisis histológico revelo tejido tumoral dramáticamente degenerado en animales tratados con TRA-8 (figura 6c, panel inferior). De manera similar, el tratamiento con TRA-8 inhibió la población del bazo mediante células Jurkat como se demostró por la escasez de las células Jurkat positivas CD3 en el bazo (figura 6d, 6e). El análisis histológico del tumor implantado mostró unas pocas células tumorales esparcidas en el tejido suave en animales tratados con TRA-8 aunque los controles mostraron la formación de un tumor sólido como se mostré en la figura 6c. En el modelo de célula Jurkat, el número de células Jurkat en los pasos de los animales con TRA-8 es menor del 2% comparado con aproximadamente el 10% en el bazo de los animales de control como se demostró mediante de análisis de citometria de flujo como se muestra en la figura 6ª y en el teñido de CD3 in situ de la figura 6c.

Estos resultados confirman la resiente demostración que la administración sistémica de TRAIL recombinante reticulado inhibe el crecimiento del tumor in vivo (13). Estos resultados indican que una dosis simple de TRA-8 es altamente efectiva en la eliminación de células tumorales in vivo.

Como se utiliza un anticuerpo antihumano en un modelo de murino, la toxicidad del tratamiento con TRA-8 no pudo ser evaluada. Sin embargo, el estudio de administración de TRAIL in vivo índico que ninguna toxicidad significativa se asocia con este tratamiento (13).

Ejemplo 10. Las células sinoviales RA son susceptibles a apoptosis inducida por TRAIL y TRA-8

La mayoría de los estudios de la técnica anterior de la apoptosis mediada por TRAIL se ha enfocado en las células malignas. La apoptosis mediada por TRAIL de acuerdo con la presente invención también es terapéutica en condicione auto inmunes es inflamatorias, tal como RA.

10.1. Análisis citometrico de flujo de la expresión de la superficie celular DR5 en células sinoviales RA.

La expresión DR5 sobre un panel de ocho células sinoviales primariamente cultivadas provenientes e pacientes como RA es comparada con aquellas ocho células sinoviales cultivadas provenientes de pacientes con osteoartritis (en los sucesivo denominados como "OA"). Los ocho cultivos de células sinoviles RA primarios humano RA-1014, RA-1016, RA-1021, RA-512, RA-707, RA-811, RA-716, y RA-929 son amablemente suministradas por el Dr. M. Ohtsuki (Sankyo Co. Ltd., Tokyo, Japan) y cultivadas en DMEM suplementado con 10% de FCS, penicilina, estreptomicina, y glutamina. Los siete cultivos de células primarias de células sinoviales OA son aislados de los tejidos sinoviales de los pacientes OA mediante método de colágenas estándar y cultivados bajo las mismas condiciones. El número de pasos de todas las células es inferior a 10. la expresión del DR5 se determina mediante análisis FAC como se describe en el ejemplo 5.

Todos los cultivos primarios de células RA expresaron altos niveles de DR5 de superficie, y existe 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 de superficie sobre la superficie de las células sinoviales aisladas provenientes de pacientes OA es muy baja o no detectable como en la figura 7b. Las células sinoviales trasformadas SV40 se encuentra que expresan altos niveles de DR5 comparables con aquellos que exhibieron las células RA. En contraste, ninguna de las células de fibroblasto trasformadas expresaron bajo niveles de DR5 comparables con aquellos exhibidos por las células OA en la figura 7b.

10.2. Susceptibilidad de las células sinoviales RA a apoptosis mediada por TRA-8 o TRAIL

En general, todas las células sinoviales aisladas de los pacientes RA son susceptibles tanto de apoptosis inducida por anticuerpo TRAIL como anti-DR5, y todas las células OA son resistentes a apoptosis inducida por anticuerpo TRAIL y anti-DR5 como en la figura 8a, b. estos estudios indican que el

anticuerpo TRA-8 apunta a células alteradas en la presencia de células normales. Más aún, el patrón de la susceptibilidad o de la apoptosis inducida por TRAIL esta correlacionado con aquel inducido por anticuerpo anti-DR5 indicando que las células sinoviales primariamente utilizan Dr5 para disporar apoptosis TRAIL.

Como se describió para las células malignas, la susceptibilidad a apoptosis inducida por anticuerpo TRAIL o anti-DR5 vario entre las células sinoviales RA aunque expresando los mismos niveles de DR5. El Ra-512 y RA-707 son más susceptibles sobre el 80% de las células que son muertas por concentraciones de TRAIL o TRA-8 por debajo de 20 ng/ml. El RA-1014, RA-811, RA-716, y RA929 están entre aquellos con la susceptibilidad intermedia al TRAIL o el TRA-8, con aproximadamente 100% de la muerte celular ocurriendo en la presencia de altas concentraciones de TRAIL o TRA-8 (>50 ng/ml). En célula Ra-1016 y RA1021, aunque la mayoría (sobre el 60%) de las células son muertas por dosis bajas de TRAIL o TRA-8, una porción de las células sobrevivientes en la presencia de altas concentraciones de TRAIL o TRA-8, indica que la subpoblación de células son resistentes a apoptosis

mediada por TRAIL. En contraste, todas las células OA son mucho menos susceptibles a TRAIL y a apoptosis inducida por TRAIL y TRA-8. no más del 60% de las células son muertas en el OA52F y el OA69F aun en la presencia de altas concentraciones de TRAIL o TRA-8. Las células OA72M son completamente resistentes a apoptosis inducida por TRAIL o TRA-8. Las células sinoviales transformadas SV40 también son susceptibles a apoptosis inducida por TRAIL y TRA-8 (datos no mostrados). En contraste, las células de fibroblasto no transformadas parecieron ser resistentes al TRAIL y al TRA-8.

Se ha mostrado previamente que el DR5 utiliza una senda dependiente 8 de FADD/caspaza para disparar la apoptosis (44). Para determinar la dependencia a la caspaza de la apoptosis mediada por DR5 de las células sinoviales RA, las células RA son cultivadas con anticuerpo TRAIL o ant-DR5 de la presencia de inhibidores de caspaza específicos. Entre los ocho inhibidores de caspaza ensayados, los 6,8 y 10 inhibidores de caspaza son capaces de inhibir la apoptosis de células sinoviales RA inducidas tanto por TRAIL como DR5 como se muestra en la figura 9, indicando que estas caspazas están involucradas en la apoptosis mediada por DR5.

10.3. El TRA-8 o el TRAIL inducen activación de NF-xb en células sinoviales RA sin liberación creciente de MMP.

Existe evidencia considerable para soportar el concepto de que hay límites cercanos entre la señalización de apoptosis y la señalización de proliferación (45). Se ha establecido que el DR5 es capaz de activar una senda NF-kb además de la trasducción de señalización de apoptosis, y que la activación NF-kb puede ser capaz de trasduccir una señal de anti-apoptosis. Por lo tanto un ensayo de cambio de gel es llavdo a cabo. Las células son estimuladas por 50 ng/ml de TRAIL soluble recombinante, ligando Fas en la presencia de 1 mg/ml de mejorador, o 50 ng/ml de TRA-8 durante el tiempo indicado. Los extractos nucleares son preparados e incubados con la sonda oligo-ADN marcada [^{32}P] con doble teñido. Los resultados son analizados utilizando un productor de imágenes ciclon fosfa (TopCount NXT, Packard Instrument Company, CT). Después de que las células RA son ioncubadas con TNF-α o TRAIL, el NF-kb es activado en una forma dependiente del tiempo. El anticuerpo TRA-8es capaz de activar fuertemente NF-kb. Como

contraste, el ligando Fas es incapaz de inducir activación NF-kb como en la figura 10a.

Así, aunque los anticuerpos TRAIL y TRA-8 inducen una fuerte respuesta de apoptosis en células sinoviales RA, ellas también activan NF-kb, y activación NF-kb se ha creido que contribuye al papel pro inflamatorio del TNF-α en RA. Así, es posible que el TRAIL, con el TRA-α pueda servir como citoquina pro inflamatoria. Para determinar si existe una consecuencia biológica similar de la activación Nf-kb inducida por TRAIL y TNF-α, la producción de los MMP se determina mediante ELISA. Las células sinoviales son cultivadas en medio solo o con 50 ng/ml de interleucina 1b, 10 ng/ml TNF-a, 50 ng/ml TRAIL, o 50 ng/ml de TRA-8 durante la noche. Los niveles del MMP-1 y MMP-3 en los supernadantes del cultivo son determinados mediante los kits ELISA.

Cuando las células sinoviales RA son incubadas con citoquina pro inflamatoria, el TNF-α o el IL-1b, la producción de MMp-1, 3 y 13 se incrementan comparados con el control de medio como se muestra en la figura 10 b, c. en contraste, el

706

tratamiento con anticuerpo TRAIL o anti-DR5 no esta asociado con la liberación creciente de estos MMP.

Ejemplo 11A. Falla al inducir toxicidad hepatocelular.

Durante ensayos de viabilidad de célula de 24 horas, hepatocitos humanos normales frescos en platos de 96 pozos fueron comprados de in Vitro Technology (Baltimore, MD). Los hepatocitos son cultivados en le medio de cultivo de hepatocito que contiene 1 μg/ml de TRAIL o TRA-8 soluble. Durante ensayos de viabilidad de 6 horas, los hepatocitos normales o las células de cáncer hepatocelular son aislados de especimenes quirúrgicos frescos recolectados del Tissue Procurement Center UAB. Todos los reactivos para aislamiento de hepatocitos humanos incluyendo amortiguador de perfusiòn de hepatocitos, medio de digestión, medio de lavado, y medio de unión fueron comprados de Gibco. Los cortes de tejido son digeridos en medio de digestión de hepatocito a 37°C con agitación (50 rpm) durante 1 hora. Los hepatocitos aislados son cosechados mediante centrifugación a baja velocidad (50 g, 3 min), y lavados con medio de lavado de hepatocito 6 veces. La suspensión de célula simple de hepatocitos es

cultivada en el medio de union que contiene 10% de FCS en platos Matrigel de 96 pozos (BD) durante 6 horas. Los hepatocitos no unidos son removidos mediante lavado dos veces con medio de unión precalentado. Los hepatocitos unidos son además incubados con varias concentraciones de TRAIL o FasL soluble, en la presencia de reticulador, o TRA-8 o Ch11 durante 6 horas.

El TRAIL tiene al menos dos receptores (DR4 y DR5) que son capaces de inducir apoptosis. El TRA-8 es utilizado 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 examinada inicialmente en cinco tejidos de hígado humano normales y cinco tejidos cancerosos de hígado mediante inmunohistoquímica in situ utilizando TRA-8. Las secciones de los tejidos de hígado normales mostraron arquitectura normal y morfología de célula sobre el teñido H&E (figura 11a, paneles superiores izquierdos) en ausencia de reactividad positiva con TRA-8 para DR5 (figura 11a, paneles inferiores izquierdos). En contraste, el tejido de carcinoma hepatocelular humano reacciono positivamente con TRA-8 en un patrón consistente tanto membrana de célula como

presencia citoplasmatica del DR5 sobre las células cancerosa. La línea celular de carcinoma hepatocelular humano HepG2 es también positiva para DR5. Estos resultados son consistentes entre los cinco tejidos de hígado normal, y solo uno (adenoma de hígado) de los cinco tejidos de cáncer de hígado es negativo a DR5. Estos resultados son consistentes con los datos del wertern blot, mostrados en la figura 5a que, con otros tejidos normales, el tejido de higado humano normal no expresa niveles significativos e proteína DR5. Adicionalmente, el análisis western blot de hepatocitos humanos normales aislados sondeados con TRA-8 no revela niveles detectables de DR5.

La expresión de superficie celular del DR5 sobre hepatocito humanos mediante análisis de citometria de flujo demostro que hepatocitos normales preparados recientemente no expresan nivels detectables de DR5 en la superficie celular (figura 11b, panel izquierdo superior). Neither es detectado sobre hepatocitos humanos normales que hayan sido clio preservados o ubicados en cultivos de corto plazo. En contraste, las células de carcinoma hepatocelular recientemente aisladas así como también la célula HepG2 expresan DR5 en la superficie

celular. Utilizando 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 obtenidos utilizando inmunohistoquímica in situ y western blot e indican que el DR5 de la superficie celular es altamente expresado en células de hígado cancerosas pero no hepatocitos normales. La presencia de niveles de mARN para DR4, DR5, DcR1, y DcR2 en hepatocitos humanos, demostrado por RT-PCR[23], sugiere que los hepatocitos humanos podrian expresar niveles muy bajos de proteína DR5 que son inferiores al umbral de detección para 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 TRAIL soluble más reticulador se examina. Cuando los hepatocitos normales son cultivados en la presencia de una alta concentración de TRAIL, una disminución dependiente del tiempo de la viabilidadcelular se observa mediante ATPlite (figura 12a) y ensayos MTT. La muerte celular mediada por TRAIL de

hepaocitos normales podria verse tan tempranamente como 4 horas después de la adición de TRAIL. Al final de un cultivo de 24 horas, más del 80% de los hepatocitos son muertos por el TRAIL. Como contraste, durante el mismo periodo de cultivo, el TRA-8 no indujo muerte celular significativa en hepatocitos normales. Los núcleos conensados teñidos con Hoechst, una caracteristica de apoptosis, son incrementados en TRAIL tratado pero no con hepatocitos tratados con TRA-8 (figura 12b). El número de hepatocitos apoptocicos esta bien correlacioando con la viabilidad celulr disminuida determinada mediante ensayo ATPLite, sugiriendo que la muerte celular inducida por TRAIL de los hepatocitos es mediada por apoptosis. Esto se confirma mediante la capacidad del Z-VAD para inhibir toxicidad mediada por TRAIL de hepatocitos. Como la cicloheximida es un potente mejorador de apoptosis, el efecto de este compuesto sobre hepatocitos tratados con TRAIL y TRA-8 se investiga. Durante un cultivo de 4 horas la ciclohexímina mejoro significativamente la muerte celular de hepatocitos inducidos por TRAIL, con más del 70% de hepatocitos siendo muerto por el TRAIL la presencia de una cicloheximida (figura 12c). Sin embargo, el tratamiento con cicloheximida es incapaz de mejorar la muerte celular mediada

711

por TRA-8 en hepatocitos. Para comparar las caracteristicas de apoptosis inducida por TRA-8 con aquella inducida por TRAIL en hepatocito, los hepatocitos normales tambien como las células cancerosas son incubadas con concentraciones variables de TRAIL soluble con reticulador o TRA-8. Durante un periodo de cultivo de 6 horas, el TRAIL, indujo una respuesta apoptosica moderada en hepatocitos normales. Más del 20% de los hepatocitos son muertos en la presencia de 500 ng/ml de TRAIL (figura 12d, izquierdo superior). El tratamiento TRA-8 de hepatocitos normales no elicito ninguna muerte celular significativa durante el mismo periodo de tiempo. Como contraste a los hepatocitos normales, las células de carcinoma hepatocelular primario (figura 12d, medio superior) y las células HepG2 (figura 12d, derecho superior) son alatamente susceptibles a la apoptosis mediada bien sea por TRAIL o por TRA-8. más del 80% de las células de carcinoma hepatocelular y cerca al 100% de las células HepG2 son muertas durante el periodo de cultivo de 8 horas. 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 son las células de cáncer de hígado. Utilizando

ligando Fas y anticuerpo anti-Fas (CH-11), no existe diferencia significativa de la susceptibilidad de apoptosis mediada por Fas entre los hepatocitos normales, las células de carcinoma hepatocelular, y las células HepG2 (figura 2c, paneles inferiores).

Ejemplo comparativo 11B. Inducción de TRAIL unidad a membrana humana de hepatitis in vivo.

Ratones B6 hembras de 8 a 10 semanas son intravenosamente inyectados con 10^9 pfu Ad/hTRAIL con un número igual de Ad/Tet-on. Los ratones son alimentados con diferntes concentraciones de tetraciclina en su agua de bebida inmediatamente después de la inoculación de vectores adenovirales. El daño al hígado se determina mediante los niveles de suero de AST utilizando un kit de diagnostico AST (Sigma). La expresión de TRAIL se determina mediante análisis Northern blot.

Para determinar si la forma que se une a la membrana de TRAIL induce daño al higado in vivo, se construye un vector adenoviral recombinante que codifica el TRAIL (Ad/hTRAIL)

humano de longitud completa, cuya expresión esta bajo el control del promotor inducible de tetraciclina. 24 horas después de la inoculación intravenosa de los ratones B6 con Ad/hTRAIL, la expresión inducida de tetraciclina de TRAIl humano se observa en el hígado en una forma dependiente de dosis como se demostro mediante análisis Nothern blot (figura 13a). los niveles de expresión de TRAIL se correlacionaron bien con el daño al hígado como se muestra mediante el limpiamiento de la dependencia de tetraciclina en los niveles de suero de trasaminasas, de nuevo en forma dependiente de dosis (figura 13b). Como la inoculación del vector adenoviral per se podria incrementar la susceptibilidad de los hepatocitos a la apoptosis mediada por TRAIL, los hepatocitos de ratones inoculados con Ad/TRAIL son aislados y ensayados para muerte celular mediada por TRAIL. No existe muerte celular significativamente creciente de los hepatocitos infectados por Ad/TRAIL comparado con aquellos de los ratones de control (figura 13c, panel izquierdo).

Más aun, el Ad/TRAIL inoculado en ratones no exhibió un daño al hígado creciente después de las inyecciones intravenosas de TRAIL humano soluble. Asì, lo que si es que la hepatitis

inducidad por Ad/TRAIL es mediada por los altos nivels de expresión de TRAIL en su forma de membrana. El análisis histologico de las secciones de hígado revelo que el daño a los hepatocitos es evidente tan tempranamente como 24 horas después de la inoculación del vector (figura 13d), y persistio durante unos 7 días (figura 13e). Estas alteraciones patologicas en el hígado tambien son dependientes de tetraciclina y ocurrieron de una manera dependiente de dosis. En una fase temprana, dentro las 24 horas del tratamiento, el daño al hígado inducido por TRAIL se caracteriza por foci de necrosis. La infiltración de células inflamantorias no se observan en esta etapa pero a ocurrido hemorragia. Alrededor del día 7 después de la inoculación, un daño difuso al higado es evidente con marcado desarreglo lobular, degeneración severa de los hepatocitos con citoplasma colocado en grupos irregularmente y espacios grandes claros, y apoptosis prominente y necrosis. Un infiltrado extensivo de células mononucleares es una caracteristica tipica de esta etapa. Estos resultados indican que el TRAIL humano en su forma unidad a la membrana es capaz de ilusir daño al higado in vivo. A pesar de la propensión del TRAIL humano a originar hepatitis severa en ratones, este

315

no induce una respuesta letal. En contraste, los ratones inoculados con vectores similares controlados con tetraciclina que codifican el ligando Fas desarrollaron hepatitis fulminante con apoptosis masiva y necrosis de hepatocitos acompañados por hemorragia severa y por mortalidad que ocurrio en una dosis dependiente de tetraciclina dentro de las 72 horas de inoculación. El indice de mortalidad alcanzo el 100% a las 48 horas en aquellos subgrupos que recibieron 3 mg/ml o más tetraciclina. Como contraste, todos los ratones que recibieron Ad/hTRAIL, sin importar la dosis de tetraciclina, estan aun vivos cuatro semanas después de la inoculación. De esta manera, se concluye que, in vivo, la forma de union a la membrana de TRAIL es un inductor menos potente de daño hepatocelular que el ligando Fas. Ellos además sugieren que el TRAIL podia inducir daño al hígado a traves de un mecanismo que difiere del mecanismo subyacente de la toxicidad del ligando Fas.

Ejemplo 12. Células T y B humanas activadas que expresan niveles crecientes de DR5.

Para determinar si el DR5 juega un papel en la apoptosis mediada por TRAIL de células T y células B activadas, se examina la expresión de superficie de DR5 en células T y células B que descanzan y activadas utilizando TRA-8. Las células T humanas no estimuladas en PBMC no expresan niveles significativos de DR5 (figura 14). A las 48 horas después de estimulación anti-CD3 o Con-A, la expresión de DR5 en la superficie celular se ha incrementado significativamente. De manera similar, las células B no estimuladas expresan muy bajos niveles de DR5. la estimulación anti-μ pero no LPS dio como resultado una expresión de la superficie celular incrementada de DR5. Estos resultados indican que tanto las célñulas T como B activadas expresan niveles mayores de DR5 en la superficie celuar. Las células son teñidas con 20 μg/ml de TRA-8 y IgG1 antiratón PE.

717

Ejemplo 13. Células T y B activadas 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 las células B de PBMC humanos son estimuladas con anti-CD3 o anti-μ in vitro durante 48 horas, respectivamente. Las células viables y las células reticulares proliferantes son recolectadas mediante centrifugación de gradiente, e incubadas con varias concentraciones de TRA-8. las células T y las células B no estimuladas no son susceptibles a apoptosis mediada por TRA-8 (figura 15). Las células T y las células B estimuladas totales mostraron una susceptiblidad moderadamente creciente a la apoptosis mediada por TRA-8, con 20% de las células siendo muertas por TRA-8 después de cultivo durante toda la noche. Las células T reticulares altamente proliferantes son ahora más susceptibles a la apoptosis mediada por TRA-8. Más del 70% de las células T reticulares podrian ser muertas por el TRA-8. Las células B reticulares tambien son más susceptibles a la apoptosis mediada por TRA-8 comparada con otras. Estos resultados

indican que las células T y las células B activadas son susceptibles a la apoptosis mediada por DR5.

Ejemplo 14. El TRA-8 agota las células T activadas en ratones humanos/SCID

Para determinar la eficacia de las células anti-T in vivode TRA-8, ratones NOD/SCID son inyectados intravenosamente por 1 x 10^8 PMBC humano. Normalmente, las células T humanas en ratones SCID son rapidamente activadas en respuesta a estimulación senogeneica. Los ratones PBMC/SCID humanos son intraperitonealmente inyectados con 100 μg de TRA-8 o IgG1 de control desde el día de la trasferencia, repetido diariamente durante tres días. Cinco días después de la trasferencia, las células mononucleares son aisladas del bazo y son teñidas con anticuerpos CD3 antihumanos, y la población de linfocitos es evaluada mediante analisis de citometria de flujo, y son analizadas las células T humanas positivas a CD3. Aproximadamente el 30% de los linfocitos esplenicos son células T humanas como se determinó mediante teñido con CD3 antihumano en ratones tratados de control. Sin embargo, solo unas pocas células T humanas (menos del 3%) son observadas

719

entre los linfocitos esplenicos en ratones tratados con TRA-8 (figura 16). El estudio histologico in situ revelo que en el bazo de los ratones de control, las células T humanas son repobladas en el bazo con solamente unas pocas células apoptosicas observadas como se demostro mediante teñido TUNEL. Como contraste, la repoblación con células T humanas viables no se observa en el bazo de los ratones tratados con TRA-8, en su lugar muchas células apoptosicas son observadas (figura 17). Estos resultados demuestran que le TRA-8 tiene actividad de células anti-T in vivo, e indica la utilidad de los anticuerpos de la invención para el tratamiento de la enfermedad GVH.

Ejemplo 15. Actividad terapeutica anticáncer de TRA-8

15.1 Expresión y función de DR5 en tejidos de cáncer humano y líneas celulares

i) expresión DR5 en tejidos de cancer humano mediante teñido in situ con TRA-8. para determinar si las células de tejidos cancerosos expresan diferencialmente más altos niveles de DR5, un panel de tejidos de cáncer humano que incluyen màs de 20 canceres de mama, 6 canceres de

ovario, 5 canceres de colon y 5 canceres de prostata son teñidos con TRA-8 para inmuno histoquimica. La mayoria de estos tejidos cancerosos expresanron DR5 detectable. Los nivels de expresión de DR5 en estos tejidos cancerosos varian. En general, los tejidos cancerosos expresaron mayores niveles de DR5 que los tejidos involucrados. Además, la expresión de DR5 esta aparentemente no correlacionada con la mutación de p53.

ii) Expresión y función de DR5 en líneas celulares de cancer humano (tabla 2).

Nueve líneas celulares de cancer de mama humano, tres lineas de cancer de ovario, tres lineas de cancer de colon y tres lineas de cancer de prostata son examinadas para la expresión de la superficie celular de DR5 y la susceptibilidad a apoptosis inducida por TRA-8 in vitro. 7 de 9 de líneas de cancer de mama, 3 de 3 líneas de cáncer de ovario, 3 de 3 líneas de cáncer de colon y 3 de 3 líneas de cáncer de prostata expresaron niveles variables de DR5 en la superficie celular. De 9 líneas de cáncer de mama, tres son muy susceptibles, tres son intermedias y tres son resistentes a

721

la apoptosis mediada por TRA-8. Todas las tres líneas de cáncer de ovario son muy susceptibles. Una de tres lineas de cancer de colon es muy susceptible, aunque dos tienen sensibilidad intermedia. Dos de tres lineas de cancer de prostata tiene sensiblidad intermedia y una es resistente.

Tabla 2. Expresión y función de DR5 en células de cancer humano.

Linea celular	Origen	Expresión[1]	Susceptibilidad[2]
2LMP	Mama	+	++++
LCC6	Mama	+++	++++
MB468	Mama	+++	+++
MB231	Mama	++	+++
ZR-75-1	Mama	+++	++
SKBR3	Mama	+	++
MB453	Mama	++	+
BT474	Mama	+	-
DY36T2	Mama	-	-

Línea celular	Origen	Expresión[1]	Susceptibilidad[2]
Caov-3	Ovario	+	++++

722

OVCAR-3	Ovario	++	++++
Skov-3	Ovario	+	+++
WiDR	Colon	+++	++++
HST29	Colon	++	+++
T84	Colon	+	++
PC3	Prostata	+++	++
LnCap	Prostata	+++	+
Du-145	Prostata	+++	+

Nota: [1]determinado mediante citometria de flujo, las células son teñidas con 20 µg/ml de TRA-8 y comparadas con el anticuerpo de control. [2]determinado mediante ensayo ATPLite. ++++: más de 80% de muerte, +++: muerte entre 60-80%, ++: muerte entre 40-60%, +: muerte entre 20-40%, - no hay muerte.

iii) Citotoxicidad combinada de TRA-8 con adriamicina. En varias líneas de cáncer de mama, se examina el efecto de la adriamicina sobre la apoptosis inducida por TRA-8. Dosis altas de adriamicina exhibieron un efecto aditivo. Sin embargo, en algunas de las líneas resistentes a TRA-8, las dosis bajas de adriamicina mejoran sinergicamente la apoptosis inducida por TRA-8.

723

iv) Actividad de union in vitro e in vivo de TRA-8 a células de cáncer humano. Utilizando TRA-8 marcado con radioisotopo. La actividad de union de TRA-8 a la línea de cáncer de mama se examina in vitro e in vivo en ratones SCID implantados con tumor, la actividad de union in vitro a células de cáncer se estima como el valor Kd de 3 nM, que es constante con nuestra estimación previa utilizando ELISA, y al menos 50 veces mayor que TRAIL soluble. In vivo, el TRA-8 localizo tejidos tumorales implantados.

15.2. Terapia de leucemia linfolitica cronica en ratones NOD/SCID con TRA-8.

La leucemia linfolitica cronica (CLL) es una forma comun de malignidad de célula B. la mayoria de las células B malignos en CLL son del fenotipo maduro y son resistentes a muchos estimulos de apoptosis. La expresión DR5 y la función en las células B de cinco pacientes con CLL se examina. Todos los pacientes tuvieron altos conteos de células B perifericas como se muestra en más del 95% de las células B CD19+ en PBMC. Comparadas con las células B primarias normales, las

células CLL de todos los pacientes tuvieron mayores niveles de DR5 en la superficie celular y son más susceptibles a apoptosis inducidad por TRA-8 in vitro. De manera interesante, las células b CLL tambien son sensibles a citotoxicidad inducida por bisindolemaleimida VIII (BisVIII). Luego del tratamiento combinado con TRA-8 y BisVIII, aproximadamente el 50% de las células B CLL son muertas aunque células B normales permanecieron sin respuesta (figura 18). La trasferncia de células B CLL a ratones NOD/SCID dio como resultado aproximadamente 25%-30% de células B CD19+ repobladas en el bazo de los ratones receptores 5 días después de la trasferencia. Sin embargo, tres dosis de 100 μg de tratamiento con TRA-8 eliminaron completamente las células B CLL en cuatro de cinco pacientes en el bazo de los ratones SCID receptores. Asi, el TRA-8 solo o en concierto con otras sustencias es activo como un agente terapeutico para leucemia linfolitica cronica.

Ejemplo 16. Clonación de cADN

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

725

Con el fin de obtener cADN de cadena pesada y ligera de TRA-8, las secuencia de aminoácido N-terminal de las cadena pesada y ligera de TRA-8 son genes TRA-8 clonados como se determinó mediante tecnicas conocidas.

Diez μg de solución que contienen el anticuerpo DR5 antihumano TRA-8 es sometido a electroforesis de gel de poliacrilamida SDS ("SDS-PAGE"), utilizando una concentración de gel del 12% p/v, 100 V de voltage constante, durante 12 minutos. Después de la electroforesis, el gel se sumerge en un amortiguador de trasferencia 25 mM de Tris-HCL (pH 9,5), 20% de metanol, 0,02% v/v de SDS durante 5 minutos. Después de este tiempo, el contenido de proteína del gel es trasferido a una membrana de difloruro de polivinideno ("membrana PVDF"; tamaño de poro 0,45 um; Milipore, Japan), preenbibida del amortiguador de trasferencia, utilizando una aparato de manchado (KS-8451; Marysol) bajo condiciones de 10V de voltage constante, 4°C durante 14 horas.

Después de este tiempo, la membrana PVDF se lava con amortiguador de lavado 25 mM NaCl, 10 mM de amortiguador de

726

borato de sodio (pH 8,0), luego se tiñe en una solución de teñido (50% v/v metanol, 20% v/v de ácido acetico y 0,05% p/v de azul brillante Coomassie) durante 5 minutos para localizar las bandas de proteína. La membrana PVDF es luego desteñida con 90% v/v de metanol acuoso, y las bandas correspondientes a la cadena pesada, la banda con menor movilidad y la cadena ligera, la banda con mayor movilidad previamente localizada sobre la membrana PVDF son extirpadas y lavadas con agua desionizada.

Las secuencias de aminoácido N-terminal de las cadenas pesada y ligera se determinan mediante el metodo automotizado Edman (Edman, P., et al., (1967), Eur. J. Biochem., 1,80) utilizando un secuenciador de proteína de fase de gas (PPSQ-10; Shimadzu Seisakusyo, K. K.).

La secuencia de aminoácido N-terminal de la banda que corresponde a la cadena pesada se determina por proteína que es:

727

Glu-Val-Met-Leu-Val-Glu-Ser-Gly-Gly-Gly-Leu-Val-Lys-Pro-Gly-Gly-Ser-Leu-Lys-Leu (SEQ ID número 4 de la lista de secuencia);

Y que la banda que corresponde a la cadena ligera se determinó que:
Asp-Ile-Val-Met-Thr-Gln-Ser-His-Lys-Phe-Met-Ser-Thr-Ser-Val-Gly-Asp-Arg-Val-Ser (SEQ ID número 5 de la lista de secuencia).

La comparación de estas secuencias de aminoácido con la base de datos de la seciuencia de aminoácidos de los anticuerpos producida por Rabat et el. (Rabat E. A., et al., (1991), en "Sequences of Protiens of Immunological Interest Vol. II," U.S. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos) revelo que la cadena pesada (cadena γ1) y la cadena ligera (cadena k) del TRA-8 pertenecia a los subtipos 3d y 1, respectivamente.

(2) clonación de cADN

728

Con base en los anteriores hallasgos, los cebadores de oligonucleotido son sintetizados los cuales se esperaria que hidribizaran con las porciones de las regiones no traduccidas 5' y en los puros extremos de la regiones traduccidas 3' de los genes que pertenecen a estos subtipos de ratón. Luego, los cADN que codifican las cadenas pesada y ligera del TRA-8 son clonados por la siguiente combinación de trascripción inversa de PCR (RT-PCR):

a) Plantilla

el ARN total del hibridoma de TRA-8 (ATCC número PTA-1428) se extrae al utilizar reactivo TRIzol (GIBCO BRL). La plantilla para la reacción PCR utilizo cADN que se obtuvo al utilizar un kit de sintesis de cADN de primera hebra (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo al manual de instrucciones suministrado con el kit.

b) Cebadores de PCR

Los siguientes cebadores de oligonucleotidos son sintetizados para el PCR:

729

5'-cagcactgaa cacggacccc-3' (H5NCS1: SEQ ID No. 6 of the Sequence Listing);

5'-aaaggtaatt tattgagaag-3' (H5NCS2: SEQ ID No. 7 of the Sequence Listing);

5'-cctcaccatg aacttcgggc-3' (H5SS1: SEQ ID No. 8 of the Sequence Listing);

5'-Ctgttgtatg cacatgagac-3' (H5SS2: SEQ ID No. 9 of the Sequence Listing);

5'-gaagtgatgc tggtggagtc-3' (H5CS1: SEQ ID No. 10 of the Sequence Listing);

5'-agtgtgaagt gatgctggtg-3' (H5CS2: SEQ ID No. 11 of the Sequence Listing);

5'-tttaccagga gagtgggaga g-3' (H3CR: SEQ ID No. 12 of the Sequence Listing);

5'-tgcagagaca gtgaccagag-3' (H3VR: SEQ ID No. 13 of the Sequence Listing);

5'-tgttcaggac cagcatgggc-3' (L5NCS1: SEQ ID No. 14 of the Sequence Listing);

5'-aagacatttt ggattctaac-3' (L5NCS2: SEQ ID No. 15 of the Sequence Listing);

5'-tatcatgaag tctttgtatg-3' (L5SS1: SEQ ID No. 16 of the Sequence Listing);

5'-gatggagaca cattctcagg-3' (L5SS2: SEQ ID No. 17 of the Sequence Listing);

5'-gacattgtga tgacccagtc-3' (L5CS: SEQ ID No. 18 of the Sequence Listing);

5'-ttaacactca ttcctgttga-3' (L3CR: SEQ ID No. 19 of the Sequence Listing); and

5'-gactgggtca tcacaatgtc-3' (LCSR: SEQ ID No. 20 of the Sequence Listing).

A menos de que se especifique otra cosa, todos lo oligonucleotidos en estos ejemplos son sintetizados por farmacia Biotech. Todos los oligonucleotidos son almacenados a -20°C después de ser disueltos en agua destilada.

c) **Reacción PCR**

La composición de la solución de reacción PCR:

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

cebador DR5p1, 10 pmol;

cebador DR5p2, 10 pmol;

amortiguador PCR concentrado 10 x (sumimistrado con el kit), 10 µl;

dNTP (cada uno 2,5 mM), 4 µl; y

polimerasa Taq (Promega), 5 unidades.

Se agrega agua destilada esteril a la solución de un volumen total de 100 µl. a menos de que se especifique otra cosa, los dNTP son una mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP (2,5 mM cada uno).

La reacción PCR se conduce como sigue. La solución es primero celentada a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual un ciclo de calentamiento a 94°C durante 30 segundos, 52°C durante 1 minuto y 72°C durante 3 minutos, se repite 40 veces. Después de completar este procedimiento, la solución de reactor se calienta a 72°C durante 10 minutos.

732

Los fragmentos de ADN amplificado, obtenidos asi, son separados sobre un gel de agaroza al 1% que contiene 0,25 µg/ml de bromuro de etidio. Las bandas determinadas por el contener los fragmentos de ADN deseados son cortadas utilizando una hoja de afeitar y el ADN se recupera de este utilizando un kit Gene Clean (BIO101). El fragmento de ADN se clona utilizando un vector pGEM-T Easy (Promega). Este se desarrolla como sigue.

El fragmento de ADN se recupera de la solución de reacción PCR, junto con 50 ng del vector pGEM-T Easy (suministrado con el kit), es mezclado con 1 µl de amortiguador de reacción de ligasa 10 x (6 mMde 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), al cual se han agregado 4 unidades de ligasa T4 ADN (1 µl) el volumen total de la mezcla se ajusta hasta 10 µl con agua esteril desionizada, y la solución de ligasa resultante se uincuba a 14°C durante 15 horas. Después de este tiempo, 2 µl de la solución de reacción de ligasa se agregan a 50 µl de la cepa de E.coli competente JM109 (suministrada con el kit y

traida a competencia de acuerdo con el manual de instrucción) al cual 2 µl de 0,5 M de β-mercaptoetanol han sido agregados, y la mezcla resultante se mantiene sobre hielo durante 30 minutos, luego a 42°C durante 30 segundos, y de nuevo sobre hielo durante 5 minutos. Luego 500 µl de medio que contiene 2% v/v 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 (en lo sucesivo denominada como medio "SOC") se agrega al cultivo, y la mezcla se incuba durante i hora a 37°C con agitación. Después de este tiempo, el cultivo se esparce sobre un plato de caldo agar L (1% v/v de triptona, 0,5% p/v de extracto de levadura, 0,5% p/v de cloruro de sodio, 0,01% p/v de glucosa, y 0,6% p/v bactoagar (Difco)), que contiene 100 µg/ml. Las colonias resistentes a ampicilina que aparecieron sobre el plato son seleccionadas y raspadas con un aro de trasferencia de paltino, y cultivadas en un medio de caldo L que contiene 100 µg/ml de ampicilina a 37°C, durante toda la noche, con agitación a 200 r.p.m. después de incubación, las células son cosechadas mediante centrifugación, del cual el ADN del plásmido es preparado mediante el metodo alcali. El plásmido obtenido se designa como plásmido pH62 para la cadena pesada

del TRA-8 o pL28 para la cadena ligera del TRA-8. JM109/pH62 y E.coli JM109/pL28 fueron depositados con el International Patent Organism Depositary, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnologia Industrial avanzada, 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 Deposito de Microorganismos, y les fue acordado los números de acceso FERM BP-7560 y FERM BP-7561, respectivamente. Las secuencias de nucleotido de estos ADN que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del TRA-8 son confirmados por el metodo dideoxi (Sanger, F.S., et al., (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467) utilizando un analizador 3700 ADN (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems, Japan).

Las secuencias de nucleótido de las cadenas pesada y ligera de TRA-8 son dadas como ID de Sec. No. 21 y número 22 del listado de secuencia, respectivamente. La secuencia de aminoácido de las cadenas pesada y ligera del TRA-8 es dada como ID de Sec. No. 23 y número 24 del listado de secuencia, respectivamente. Las secuencias de aminoácido N-terminal de las cadenas pesada y ligera del TRA-8 establecidas

735

anteriormente cazaron perfectamente. Adicionalmente, cuando las secuencias de aminoácido de las cadenas pesada y ligera son comparadas con las bases de datos de las secuencias de aminoácido los anticuerpos, se establece que, para la cadena pesada, los oligonucleótidos número 58 a 414 en la ID de Sec. No. 21 constituyeron la región variable, mientras los nucleótidos números 415 a 1392 en la ID de Sec. No. 21 constituyeron la región constante. Para la cadena ligera, los nucleótidos números 64 a 387 en ID de Sec. No. 22 constituyeron la región variable, mientras los nucleótidos números 388 a 702 en ID de Sec. No. 22 constituyeron la región constante. Las localizaciones y secuencias de los CDR también son elucidadas al comparar las homologáis con la base de datos. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena pesada de TRA-8 son mostradas en la ID de Sec. No. 25, número 26, y número 27, respectivamente. Las secuencias de aminoácido de CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena ligera del TRA-8 son mostradas en la ID de Sec. No. 28, número 29, y número 30, respectivamente.

Ejemplo 17. Designando una versión humanizada del anticuerpo TRA-8

736

(1) modelamiento molecular de una región variable de TRA-8

El modelamiento molecular de la región variable del TRA-8 se desarrolla mediante el método generalmente conocido como modelamiento de homologa (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)). Las secuencias primarias de las regiones variables de la inmunoglobulina humana registrada en el Protein Data Bank (Nuc Acid.Res 28, 235-242 (2000)), para lo cual las estructuras tridimensionales derivadas de cristalografia de rayos X estan disponibles, son comparadas con las regiones de estructura del TRA-8 determinadas anteriormente. Como resultado, el INCD y el 1 HIL son seleccionados por tener la secuencia más alta de homologáis con las regiones de estructura para las cadenas ligera y pesada del TRA-8, respectivamente. Las estructuras tridimensionales de las regiones de estructuras son generadas al coordinar los coordinados del 1NCD y 1HIL que corresponden a las cadenas ligera y pesada del TRA-8, para obtener el "modelo de estructura". Utilizando la clasificación definida por Chothia et al., los CDR del TRA-8 son clasificados como

737

sigue; $CDRL_1$, $CDRL_2$, $CDRH_1$ Y $CDRH_2$ pertenecientes a la clases canónica 2,1,1,3, respectivamente, mientras en $CDRL_3$ no pertenece a ninguna clase canónica especifica. Los CDR $CDRL_1$, $CDRL_2$, $CDRH_1$ Y $CDRH_2$ están fijos a las conformaciones inherentes a sus clases canónicas respectivas, e integrados en el modelo de estructura. $CDRL_3$ le es asignada a la conformación del agrupamiento 8A, de acuerdo con la clasificación de Thornton et al., (J. Mol. Biol., 263, 800-815, (1996)), y $CDRL_3$ es clasificado en k(8)C utilizando la regla H3 (carta FEBS 455, 188-197 (1999)). Luego las confirmaciones representativas para $CDRL_3$ y $CDRH_3$ son integradas en el modelo de estructura.

Finalmente, los cálculos de energía son llevados a cabo para eliminar los contactos intraatómicos desfavorables, con el fin de obtener un modelo molecular probable de la región variable del TRA-8 en términos de energía. El procedimiento anterior se desarrolla utilizando el sistema de modelamiento molecular comercialmente disponible ABM (Oxford Molecular Limited, Inc.). Para el modelo molecular obtenido, la precisión de la estructura se evalúa adicionalmente

utilizando el software, PROCHECK (J. Appl. Cryst. (1993), 26, 283-291).

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

La construcción de anticuerpos TRA-8 humanizados se desarrolla mediante el método generalmente conocido como injertos de CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). El anticuerpo aceptador se escoge con base en la homología de aminoácido en la región de estructura. Las secuencias de la región de estructura del TRA-8 son comparadas con todas las secuencias de estructura humana en la base de datos Kabat de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos (Nuc. Acid Res. 29, 205-206 (2001)). Como resultado, el anticuerpo mAB58'CL se selecciona como un aceptador debido a la mayor homología de secuencia del 80% de la región de estructura. Los residuos de aminoácido en la región de estructura para el mAb58'CL se alinean con aquel del TRA-8 y las posiciones donde diferentes aminoácidos son utilizados son identificadas. La localización de aquellos residuos son analizadas utilizando un modelo tridimensional

del TRA-8 construido anteriormente y los residuos donadores que deben ser injertados sobre el aceptador son escogidos mediante los criterios dados por Queen et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Las secuencias TRA-8 humanizadas son construidas como se describió en el ejemplo siguiente al transferir varios de los residuos donadores en el anticuerpo aceptador, mAb58'CL.

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

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

Con el fin de determinar la actividad del TRA-8 humanizado, el plásmido que lleva a la cadena pesada del TRA-8 humanizado se construye como sigue. Sin embargo, se apreciara que la humanización del TRA-8 no esta limitada a estos ejemplos.

Como se muestra en ID de Sec. No. 31 de la lista de secuencia, la humanización de las secuencias de aminoácido de la cadena pesada del anticuerpo DR5 antihumano de ratón TRA-8

implico reemplazar el aminoácido 13 (lisina), el aminoácido 19 (lisina), el aminoácido 40 (treonina), el aminoácido 42 (ácido glutámico), el aminoácido 44 (arginina), el aminoácido 84 (serina), el aminoácido 88 (serina), el aminoácido 93 (metionina), el aminoácido 114 (treonina), el aminoácido 115 (leucina) con glutamina, arginina, alanina, glicina, asparagina, alanina, valina, leucina, y valina, respectivamente.

El plásmido que lleva el ADN que codifica la región variable de la cadena pesada del TRA-8 humanizado (ID de Sec. No. 31 del listado de secuencia) se construye como sigue.

El PCR se utiliza para construir las siguientes secuencias de ADN, cada una de las cuales comprenden lo descrito anteriormente:

Las siguientes 12 oligonucleótidos son sintetizadas:

5'-ttggataagc ttggcttgac ctcaccatgg gatggagctg tatcatcctc ttcttggtag caacagctac aggtgtccac-3' (A; ID DE SEC NO. 32);

5'-tctgaagtaa tgctggtgga gtctggggga ggcttagtac agcctggagg gtccctgaga ctctcctgtg cagcctctgg-3' (B ; ID DE SEC NO 33);

5'-attcactttc agtagttatg taatgtcttg ggttcggcag gcaccaggga agggtctgga gtgggttgca accattagta-3' (C; ID de SEC No.34);

5'-gtggtggtag ttacacctac tatccagaca gtgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaatgccaa gaacaccctg-3' (D;ID de SEC No.35);

5'-tatctgcaaa tgaacagtct gagagcagag gacacggctg tttattactg tgcaagaagg ggtgactcta tgattacgac-3' (E;ID de SEC No.36);

5'-ggactactgg ggccaaggga ccctggtcac agtctcctca gcctccacc aagggcccat cggtc- 3' (F;ID de SEC No.37);

5'-ctaccaagaa gaggatgata cagctccatc ccatggtgag gtcaagccaa gcttatccaa-3' (G;ID de SEC No.38);

5'-tctcagggac cctccaggct gtactaagcc tcccccagac tccaccagca ttacttcaga gtggacacct gtagctgttg-3' (H; ID de SEC No.39);

5'-tccagaccct tccctggtgc ctgccgaacc caagacatta cataactact gaaagtgaat ccagaggctg cacaggagag-3'(I;(ID de SEC No.40);

5'-ctctggagat ggtgaatcgg cccttcacac tgtctggata gtaggtgtaa ctaccaccac tactaatggt tgcaacccac-3' (J; ID de SEC No.41);

742

5'-ccttcttgca cagtaataaa cagccgtgtc ctctgctctc agactgttca tttgcagata cagggtgttc ttggcattgt-3' (K;ID de SEC No.42); y

5'-gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtgacc agggtccctt ggccccagta gtccgtcgta atcatagagt cacc-3' (L; SEC ID No. 43).

Los 2 siguientes cebadores PCR se sintetizaron como se describió anteriormente: 5'-ttggataagc ttggcttgac-3' (PI ; SEC ID No. 44); y

5'-gaccgatggg cccttggtgg a-3' (P2; SEC ID No. 45).

La síntesis del ADN que codifica una cadena de polipéptido comprende una secuencia de señal de secreción, una región variable de la cadena pesada del TRA-8 humanizada y 8 residuos de aminoácidos N- términos de la región IgG-CH1 es llevado a cabo usando una combinación de PCR respectivamente.

El fragmento de ADN es preparado como sigue.

La composición de la solución de reacción PCR:

Oligonucleótido A, 10 pmol;

Oligonucleótido B, 10 pmol;

Oligonucleótido C, 10 pmol;

Oligonucleótido D, 10 pmol

Oligonucleótido E, 10 pmol;

Oligonucleótido F, 10 pmol;

Oligonucleotico G, 10 pmol;

Oligonucleótido H, 10 pmol;

Oligonucleótido I, 10 pmol;

Oligonucleótido J, 10 pmol;

Oligonucleótido K, 10 pmol;

Oligonucleótido L, 10 pmol;

Cebador de oligonucleótido P1, 2 μM;

Cebador de oligonucleótido P2, 2 μM;

Amortiguador 10X pirobest II II, 10 μl;

Mezcla de dNTP, 8 μl;

Polimeresa de ADN Pirobest, 0.5 μl; y

Agua redestilada hasta un volumen final de 50μl.

La reacción PCR es conducida como sigue. La solución se calienta primero a 94° C durante 5 minutos, después de lo cual un ciclo de calentamiento de 98° C durante 10 segundos,

55° C durante 30 segundos y 72° C durante 1 minuto, se repite 7 veces. Después de completar éste procedimiento, la solución de reacciones calentada a 72° C durante 15 minutos.

Un volumen igual de fenol- cloroformo (50% v/v de fenol saturado con agua, 48% v/v de cloroformo, 2% v/v de alcohol de isoamilo) es agregado a 200µl de cada uno de los productos PCR, y se mezcla rigurosamente durante 1 minuto. Después de éste tiempo la mezcla es centrifugada a 10.000 Xg, y la capa acuosa es recuperada y mezclada con un volumen igual de cloroformo- alcohol isoamilo (96% v/v de cloroformo y 4% v/v de alcohol isoamilo), el cual es nuevamente mezclado rigurosamente a 10.000 Xg y la capa acuosa es recuperada. La serie de etapas mencionadas en éste párrafo se refieren a, de aquí en adelante, como "extracción de fenol".

La precipitación de etanol es entonces llevada a cabo sobre la capa acuosa recuperada. Como se usa y se refiere aquí, "precipitación de etanol" consiste en agregar, con mezclado, un décimo del volumen de acetato de sodio al 3M (pH 5.2) y 2.5 volúmenes de 100% de etanol a la solución a ser tratada, y congelar la mezcla usando hielo seco. La mezcla resultante

es entonces centrifugada a 10.000 Xg para recuperar el ADN común precipitado.

Después de la extracción de fenol y la precipitación de etanol, el precipitado de ADN resultante es secado en vacío, disuelto en un mínimo de agua redestilada, y separado por electroforesis de gel de azarosa al 3%. Después de la electroforesis, el gel es marcado con 1μg/ml de solución acuosa de bromuro de etidio para permitir la detección del ADN bajo luz UV. La banda de ADN correspondiente al TRA-8 ADN humanizado es cortada usando una cuchilla de afeitar y eluida a partir del gel usando Geneclean Spin Kit (BIO 101, CA, USA). Después de la extracción de fenol, el ADN eluido es entonces concentrado por centrifugación a 7.500 Xg, seguido por precipitación de etanol, y finalmente disuelto en 5μl de agua destilada.

El resultante, cada ADN extraído es clonado usando el rector pGEM-T Easy (promega) como sigue:
El fragmento de ADN recuperado de la reacción PCR, 5μl;
Amortiguador de taq polimerasa 10X 1μl
Mezcla de dNTP, 1μl

746

Polimerasa taq (5 unidades/ml) 1µl; y

Agua redestilada hasta un volumen de 10µl.

Después de que cada solución anterior se hace reaccionar a 70° C durante 30 minutos, cada solución de ADN y vector pGEM-T Easy son ligados usando la versión 2.0 del kit de ligación de ADN (Takara Shuzo Co.,Ltd.) usándolo en el protocolo del fabricante.

Después de 4 horas de incubación a 15°C, 2µl de la solución de reacción incubada es mezclada con 100µl de la sepa JM 109 del E coli competente a una densidad de célula de 1-2 $X10^9$ células/ml (Takara Shuzo Co.,Ltd), y la mezcla se mantiene sobre hielo durante 30 minutos, y luego a 42°C durante 30 segundos, y nuevamente sobre hielo durante 1 minuto. Entonces, 500µl de medio SOC (2% v/v de tristona, 0.5% de p/v de extracto de levadura, 0.05% de p/v de cloruro de sodio, 2.5 mM p/v de cloruro de potasio, 1 mM de cloruro de magnesio, y 20mM de glucosa) es agregado a la mezcla, la cual es incubada durante una hora adicional, con agitación. Las cepas transformantes son entonces aisladas, y el plasmado de ADN es preparado a partir de las cepas como se describió en

747

"Molecular Cloning A Laboratory Manual". Las secuencias de nucleótidos de éstos DNA que codifican la cadena pesada del TRA-8 humanizado son confirmados por el método de dideoxy (sanger, F.S., et al.,(1977), Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 74:5463-5467) usando el analizador de ADN 3 700 (ABI PRISM;parking Elmer Applied Biosystems, Japón).

El plasmado resultante es designado como pHB14 (el plasmado que porta el cADN que codifica la cadena pesada del TRA-8 humanizado). La sepa E coli transformante que aloja éstos plásimidos, designada como E. coli JM 109/ pHB 14fue depositada con el Internacional Patent Organism Depositary, Nacional Institute of Advance 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 macroorganismos, y se le asignó el número de acceso FERM BP-7556.

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

748

Los vectores de expresión reconvinantes para células animales son construidos insertando el ADN que codifica la cadena pesada del TRA-8 humanizado (clonado anteriormente) como sigue.

Un μg del plasmado pSRHHH3 (Solicitud de patente Europea EP 0-909-816-A1) que porta la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-Fas humanizado HFE7A y la región constante del ADN genómico del IgG1 humano, un vector de expresión para células de mamíferos, es digerido con las enzimas de restricción HindIII y ApaI, y separadas por electroforesis de gel de azarosa al 3%. Después de la electroforesis, el gel es marcado con 1μg/ml de una solución acuosa de bromuro de etidio para permitir la detección del ADN bajo luz UV. Las bandas del vector de ADN que contienen el ADN genómico de la región constante IgG1 humano sin la región variable de la cadena pesada del HFE7A humanizado son cortados usando un a cuchilla de afeitar y eluidos a partir del gel usando Geneclean Spitn Kit (BIO 101, Ca, USA).Después de la extracción de fenol, el ADN eluido es entonces concentrado por centrifugación a 7.500 Xg, seguido por la precipitación de etanol, y finalmente disuelto en 5μl de agua

749

destilada y luego desfosforilado usando CIP. El plasmado desfosforilado digerido resultante (100ng) es ligado con 1μg del fragmento pHB14 ADN que contiene el ADN que codifica la región variable de la cadena pesada del TRA-8 humanizado, que también a sido digerido con HindIII y ApaI, usando una versión 2.0 del DNA Ligation Kit (Takara Shuzo Co.,Ltd). La mezcla de ligación es entonces usada para el E coli JM 109 transformado, el cual es entonces plateado sobre placas de agar LB que contienen 50μg/ml de ampicilina.

Los transformantes obtenidos por éste método son cultivados en 2 ml del medio liquido LB que contiene 50μg/ml de ampicilina a 37° C durante la noche, y el plasmado de ADN es extraído subsecuentemente del cultivo resultante por el método alcalino-SDS.

El plásmido de ADN extraído es digerido con HindIII y ApaI, y sometido a electroforesis por gel de agarosa al 3% P/v para confirmar la presencia o ausencia del inserto del ADN que codifica la región variable de la cadena pesada del TRA-humanizado. La incersión y orientación del fragmento de ADN deseado en el vector es confirmado por el secuenciamiento de

ADN usando un analizador de secuencia de genes (ABI Prism 3700 ADN Analyzer; Applied Biosystems). El plásmido de expresión resultante que lleva el cADN que codifica la cadena pesada del TRA-8 humanizado se ha designado como pHB14-1.

Ejemplo 19. Construcción de un vector de expresión para la cadena de luz del anticuerpo humanizado

(1) Construcción de los vectores para las cadenas de luz de las versiones humanizadas del anticuerpo TRA-8

Como se muestra en la SEQ ID No.46 del listado de secuncias, en humanizar la secuencia de aminoácido de la cadena luz del anticuerpo DR5 antihumano de ratón TRA-8, el 8vo aminoácido (histidina), 9vo aminoácido (glicina), el décimo aminoácido (fenilanalina), el 11vo aminoácido (metionina), el 13vo aminoácido (trionina) el 20vo aminoácido (serina), el 42vo aminoácido (glutamina) el 43vo (serina), el 60vo aminoácido (ácido aspártico), el 63vo aminoácido(trionina), el 77vo aminoácido (asparagina), el 78vo aminoácido (valiana), el 80vo aminoácido (serina) el 83vo aminoácido(leucina) el 85vo aminoácido (ácido aspártico), el 87vo aminoácido

(fenilananina), el 99 aminoácido (glicina), el 103vo aminoácido (leucina) y el 108vo aminoácido (alanina) del N-términos de la secuencia de aminoácidos del TRA-8 de la cadena de luz son reemplazados con prolina, cerina, cerina, leucina, alanina, treonina, licina, alanina, serina, serina, serina, leucina, prolina, fenilananina, trionina, tiroxina, glutamina, valina y treonina respectivamente. La secuencia resultante es designada como LM2.

Los plásmidos de expresión que portan éste tipo de secuencias de aminoácido de cadenas luz humanizada del DR5 antihumano del anticuerpo TRA-8se construyen como sigue.

1) Síntesis de los cebadores para preparar las regiones variables y constantes de la cadena de luz del TRA- 8 humanizado

El ADN que codifica para la cadena de polipéptido LM 2 (ID de SEC No.46 del listado de secuncias), cada una de las cuales es una fusión de la región variable del anticuerpo TRA-8 de la cadena de luz anti- DR5 humanizada y la región constante de la cadena de luz Ig humana (Cadena K), son respectivamente sintetizadas usando combinaciones de PCR.

752

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

Further to 7AL1P (SEC ID No. 47) and 7ALCN (SEC ID No. 48), los siguientes cebadores de oligonucleótido para PCR se sintetizan.

5'-gtccoccaca gatgcagaca aagaacttgg agattgggtc atcacaatgt caccagtgga-3' (HKSPR11; SEC ID No. 49);

5'-ccaagttctt tgtctgcatc agtaggagac agggtcacca tcacctgc-3' (HKCDF11; SEC ID No. 50);

5'-agtgtgccgg gtggatgccc agtaaatcag tagtttagga gctttccctg gtttctg-3' (HKCDR12; SEC ID No. 51);

5'-tgggcatcca cccggcacac tggggtccca agcaggttta gtggcagt-3' (HKCDF22; SEC ID No. 52);

5'-ataactacta tattgctgac agtaataggt tgcaaaatcc tccggctgca gactagagat ggt-3' (HKCD22; SEC ID No. 53); and

5'-cagcaatata gcagctatcg gacgttcggt caaggcacca aggtggaaat caaacggact gtg-3' (HKCF12; SEC ID No. 54).

2) construcción del plásmido pCR3.1/M2-1 (clonación de la cadena de luz del TRA- 8 humanizado)

El fragmento LM2-ADN como se definió en la ID de sec No.55 del listado de secuencias que codifican para las secuencias de aminoácidos como se definido en la ID de SEC No. 46 del mismo se preparan por medio de llevar a cabo 2 etapas PCR, insertando en el vector de plásmido y clonando en el E. coli.

a) primera etapa PCR

El fragmento LM2-F1-DNA que codifica para una secuencia de señal de secreción y una porción de la región FRL_1 con un sitio de fractura de la encima de restricción Hind III en el extremo 5' es preparada bajo las siguientes condiciones. Los plásmidos de plantilla, pHSGHM17 y pSRDHH, son obtenidos siguiendo la solicitud de patente Europea EP 0909816 A1.

Composición de la solución de reacción:

Plásmido pHSGHM17 ADN (Solicitud de patente Europea EP 0909816 A1, 25 ng.

Cebador de oligonucleótido 7AL1P, 50 pmol

Cebador de oligonucleótido HKSPR11, 50 pmol

Coctel de dNTPs, 5μl

Amortiguador PCR 10X ,5μl

Amplitaq ADN polimerasa (Perkin Elmer), 2.5 unidades

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

Las condiciones térmicas del PCR:

Calentar a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual un ciclo térmico de 94° C durante un minuto, 55° C durante 1 minuto y 72° C dutante 2 minutos repetido 30 veces, seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos.

El fragmento LM2-F2-DNA que codifica para una porción de FRL_1, $CDRL_1$, FRL_2 Y $CDRL_2$ es preparado bajo las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

Plásmido pL 28 de ADN, 25ng

Cebador de oligonucleótido HKCDF11, 50 pmol

Cebador de oligonucleótido HKCDR12, 50 pmol

Cóctel de los dNTPs, 5µl

Amortiguado 10X PCR, 5µl

Amplitaq de ADN polimerasa, 2.5 unidades

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

Las condiciones térmicas del PCR: calentar a 94° C durante 2 minutos, después de lo cual un ciclo térmico de 94° C durante 1 minuto, 55° C durante 1 minuto y 72° C durante 2 minutos, repetido 30 veces, seguido por el calentamiento a 72° C durante 10 minutos.

El fragmento LM2-F3 ADN que codifica para el CDRL2, FRL_3, y una porción de $CDRL_3$ es preparado bajo las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

Plásmido pSRPDHH ADN (solicitud de patente europea EP 0909816 A1), 25 ng

Cebador de oligonucleótido HKCDF22, 50 pmol

Cebador de oligonucleótido HKCDR22, 50 pmol

Cóctel de los dNTP, 5µl

Amortiguador 10X PCR, 5µl

Amplitaq ADN polimerasa, 2.5 unidades.

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

Condiciones térmicas del PCR: Calentar a 94° C durante 2 minutos, después de lo cual un ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55° C durante 1 minuto y 7° C durante 2 minutos, repetido 30 veces, seguido por un calentamiento a 72° C durante 10 minutos.

El fragmento LM2-F4-ADN que codifica para el $CDRL_3$, FRL_4 y la región constante con un sitio de fractura de la encima de restricción EcoR I agregada al extremo 3' es preparada bajo las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

Plásmido pSRPDHH ADN 25 ng

Cebador de oligonucleótido HKCF12, 50 pmol

Cebador de oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol

757

Cóctel de los dNTPs, 5µl

Amortiguador 10X PCR, 5µl

Amplitaq ADN polimerasa, 2.5 unidades.

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

Condiciones térmicas del PCR: calentar a 94° C durante 2 minutos, después de lo cual un ciclo térmico de 94° C durante 1 minuto, 55° C durante 1 minuto y 72° C durante 2 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 de gel de poliacrilamida al 5%. El gel después de la electroforesis es marcado con 1µg/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.

758

b) Segunda etapa de PCR

El LM2-ADN en el cual se describió anteriormente LM2-F1-ADN,LM2-F2-ADN,LM2-F3-ADN y LM2-F4-ADN como fragmentos son fusionados y se preparó bajo las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

Fragmento de Gel LM2-F1-ADN preparado en la primera etapa PCR,
Fragmento de Gel LM2-F2-ADN preparado en la primera etapa PCR,
Fragmento de Gel LM2-F3- ADN preparado en la primera etapa PCR,
Fragmento de Gel LM2-F4- ADN preparado en la primera etapa PCR,
Cebador de oligonucleótido 7 A11P, 50 pmol
Cebador de oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol
Coctel de los dNTPs, 5.0 μl
Amortiguador 10X PCR, 5.0 μl
Amplitaq ADN polimerasa, 2.5 unidades.

759

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

Condiciones térmicas del PCR; calentar a 94° C durante 2 minutos, después de lo cual un ciclo térmico de 94° C durante 1 minuto, 55° C durante 1 minuto y 72° C durante 2 minutos, repetido 30 veces, seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos.

El fragmento Lm2-ADN así preparado es insertado en el plásmido pCR3.1 ADN usando el estuche de clonación eucariótico TA (Invitrigen) siguiendo el protocolo del fabricante e introducido dentro del E. coli TOP10F'competente contenido en el kit. Las secuencias de nucleótido de éstos ADN que codifican la cadena de luz del TRA-8 humanizado son confirmados por el método dideoxi (Sanger, F.S., et al., (1977), Proc. Natl.Acad.Sci USA, 74:5463-5467) usando el analizador de ADN (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems, Japón).

Los plásmidos resultantes son designados pCR3.1/M2-1 (el plásmido que porta el cADN que codifica la región variable de la cadena de luz del TRA-8 humanizado y una región constante de la cadena de luz de Ig humano).

El plásmido pCR3.1/M2-1 que contiene el fragmento LM2-ADN es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

Un μg del plásmido de clonación pHSG399 ADN es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I. y luego desfosforilado con CIP. El pHSG399 ADN desfosforilado y el fragmento LM2-ADN resultantes, que han sido digerido con las enzimas de restricción Hind III y Ecor I, son ligados usando la versión 2.0 del Kit de Ligación de ADN (Takara Syuzo, Co. Ltd). Entonces, el E. coli DH5α es transformado con el ADN ligado y esparcido sobre un medio LB que contiene 0,1 mM IPTG, 0,1% X-Gal y 50μg/ml de cloranfenicol (concentraciones finales). Los transformantes blancos obtenidos son cultivados en el medio líquido LB que contienen 50μg/ml de cloranfenicol y el plásmido de ADN es extraído a partir del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS. El plásmido de ADN extraído es diferido con Hind III y Ecor I, y luego un

clon que porta el fragmento LM-ADN es seleccionado por electroforesis de gel de agarosa al 1%.

Como resultado del anterior procedimiento, el plásmido pHSG/M2-1-4 que lleva un fragmento de fusión de la región variable de la cadena de luz LM2 TRA-8 humanizada y la región constante de la cadena Igk humana es obtenido. La sepa E coli transformante que aloja estos plásmidos, designada como E coli DH5α/pHSG/M2-1-4 fue depositada con el International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, ibaraki-ken, 305-5466, Japan en Abril 20,2001, de acuerdo con el tratado de Budapest para el depósito de microorganismos, y se le asignó el número de acceso FERM BP-7562.

3) Construcción del plásmido pSR/M2-1 (plásmido de expresión para la cadena de luz LM2-TRA-8 humanizada).

El plásmido pHSG/M2-1-4 obtenido que porta un fragmento de fusión de la región variable de la cadena de luz LM2 TRA-8

humanizada y la región constante de la cadena Igk humana es digerido con las enzimas de restricción Hind III y Ecor I-

Un µg del plásmido pSRPDHH ADN de clonación (solicitud de patente EP 0-909-816 A1) es digerida con las enzimas de restricción Hind III y Ecor I, y luego desfosforilado con CIP. El pSRPDHH ADN desfosforilado resultante y el fragmento Hind III y Ecor I ADN obtenidos de pHSG/M2-1-4 son ligados usando la vresión 2.0 del Kit de Ligación de ADN (Takara Syuzp, Co.Ltd). Luego, *E coli* DH5α es transformado con el ADN ligado y esparcido en agar LB. Los transformantes obtenidos son cultivados en el medio líquido de LB que contiene 100µg/ml de ampicilina, y el plásmido de ADN es extraído del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS. La inserción del fragmento de ADN deseado en el vector pSRDHH es confirmada por el secuenciamiento de ADN usando un analizador de secuencia de genes (ABI Prism 3700 ADN Analyzer; Applied Biosystems).

763

El plásmido de expresión resultante que porta el cADN que codifica la cadena de luz del TRA-8 humanizado se ha designado, pSR/M2-1.

Ejemplo 20. Producción de Anticuerpo Humanizado

La transfección de células COS-7, es decir, una línea celular derivada del riñón de mono, con los plásmido de expresión para la cadena pesada del TRA-8 humanizada y la cadena de luz TRA-8 humanizada obtenida anteriormente es conducido por los métodos de ractivos de transfección FUGENE6 (Boehringer Mannheim Biochemica) de acuerdo con el manual de instrucciones suministrado con el kit.

Las células COS-7 (American Type Culture Collection No. CRL-1651) se hacen crecer hasta ser semiconfluentes (3 X 10^6 células/plato) en un plato de cultivo (área de cultivo: 57 cm^2; Sumitomo Bakelite) que contiene un medio modificado Eagle Dulbecco (llamado de aquí en adelante como "D-MED";

Gibco BRL) suplementado con 10% de suero de ternero fetal (de aquí en adelante abreviado "FCS"; Moregate).

Mientras tanto, 10 µg/plato (total 5 platos) el plásmido de expresión de ADN de cadena pesada de DR5 humanizada (pHA15-1) y 10 µg/plato del plásmido de expresión de ADN de cadena liviana DR5 humanizada preparada por el método alcalino-SDS y un gradiente de densidad de cloruro de cesio con centrifugación son mezclados y luego precipitados con etanol, seguido por una suspensión en 5 µl/plato de dH_2O.

Después 15 µl/plato del reactivo de transfección FUGENE6 es mezclado con 180 µl/plato de D-MEM sin FCS, esta solución FUGENE (185 µl/plato) es mezclada con 5 µl/plato de la solución de ADN que contiene 10 µg/plato del plásmido de expresión de ADN de la cadena pesada de DR5 humanizado y 10 µg/plato del plásmido de expresión de ADN de la cadena liviana DR5 humanizada. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, la suspensión de plásmido obtenida (200 µl) es agrega a los platos de COS-7 preparados anteriormente.

765

Después de incubación el 5% de CO_2 a 37° C durante 24 horas, el medio de cultivo es cambiado con D-MEM sin FCS. Después de incubar 5% de CO_2 a 37° C durante 72 horas, el sobrenadante del cultivo es recuperado para purificación de los productos de expresión en los fluidos sobrenadantes. Por el método según se describió anteriormente, las células COS-7 son transfectadas con cada una de las combinaciones de plásmidos siguïentes:

(A): Ningún plásmido de ADN

(B): Cotransfección de pHB14-1 y pSR/M2-1

El cultivo es entonces centrifugado (1.000 r.p.m., 5 minutos) y recolectado el sobrenadante. El sobrenadante es centrifugado nuevamente (9.800 r.p.m., 15 minutos) y filtrado con 0,45 µm de filtro (ADVANTEC TOYO DISMIC-25cs, Cat # 25CS045AS). La purificación del IgG de los filtrados es lograda usando cromatografía de afinidad de proteína G-POROS (Applied Biosystems) bajo la siguientes condiciones:

HPLC: BioCad 700E (Applied Biosystems)

Columna: Cartucho sensor de proteína G-ID (tamaño de columna: 2,1 mmID x 30 mM LD, volumen de lecho: 0,1 ml; Cat # 2-1002-00, Applied Biosystems)

Amortiguador de elución: 0,1 M Glycina-HCl (pH 2,5)

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

Detección: 280 nm

Velocidad 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 de que todo los filtrados son aplicados a la columna, 30 ml de PBS (Sigma, cat # 1000-3) es usado para lavar la columna. Cuando el amortiguador de elusines es aplicado el recolectador de fracciones se inicia. Cada microtubo de

fracción previamente contenida en 55 µl de NaCl al 1M, 110 µl de amortiguador de neutralización y 74 µl de 2 mg/ml de alúmina de suero de bovino (Sigma, Cat # 7030) en PBS. Las fracciones del No. 8 hasta el número 10 son recolectadas y dializadas contra 1 litro de PBS (pH 7,5) a 4° C durante 1 día usando Slide-A lyser (Pierce, Cat # 66450). El amortiguador de diálisis es cambiado dos veces.

Verificación de la expresión de los anticuerpos humanizados y ensayos de cuantificación de los productos de expresión en los fluidos sobrenadantes del cultivo preparado se lleva a cabo por ELISA con un anticuerpo contra IgG antihumano.

A cada pozo de una placa de 96 pozos (MaxiSorp, Nunc), 100 µl de IgG Fc de anticuerpo policlonal específico de IgG Fc anti-humano de cabra (Kappel) disuelto a concentración final de 0.5 µg/ml en un amortiguador de adsorción (hidrogencarbonato de sodio al 0,5 M, 0,02% de azida de sodio, pf 9,6) es agregado y la placa es encubada a 37° C durante 2 horas para causar adsorción del anticuerpo. Entonces, la placa es lavada

con 350 µl de PBS(-) que contiene 0,05% de Tween-20 (BioRad) (de aquí en adelante referido como "PBS-T") cinco veces. A los pozos después de lavado, el sobrenadante del cultivo es diluido con D-MEM que contiene 10% de FCS es agregado e incubado a 37° C durante 2 horas. Después del lavado nuevamente con PBS-T, 100 µl de anticuerpo policlonal específico Fc del IgG anti-humano de cabra marcado por fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research Lab.) diluido 10.000 veces con PBS-T es agregado a cada pozo e incubado a 37° C durante 2 horas. Después de lavar nuevamente con PBS-T, una solución de sustrato de p-nitrofenil fosfato obtenida del estuche Alkaline Fosfatase Substate (BioRad) es agregado de acuerdo con el manual de instrucción suministrado con el kit. Después de incubar a 37° C durante 0,5 a 1 hora, la absorbancia a 405 nm es medida. En los experimentos presentes, la inmunoglobina G del plasma humano subclase 1 (IgG1) (Biopure AG) diluida con D-MEM que contiene 10% FCS a ciertas concentraciones es usado como muestras de referencia de concentración de los anticuerpos DR5 humanizados contenidos en los fluidos del sobrenadante del cultivo.

Como un resultado, la expresión y los productos purificados en el sobrenadante del cultivo son detectados específicamente con el anticuerpo IgG anti-humano. La cantidad de anticuerpo IgG es 8,96 µg (800 µl).

Ejemplo 21. Actividad Inductora de Apoptosis del Anticuerpo Humanizado

Las células Jurkat (ATCC No TIB-152), son usadas para examinar la actividad inductora de apoptosis del anticuerpo TRA-8 humanizado purificado.

Las células Jurkat cultivadas en RPMI1640 como medio con 10% de FCS (Gibco BRL) a 37° C durante 3 días en la presencia de 5% de CO_2 son dispensadas en cada pozo de una microplaca de 96 pozos (Sumitomo Bakelite) a 50 µl por pozo. El TRA-8 humanizado preparado en el Ejemplo 20 es ajustado para tener una concentración del producto final de 100ng/ml con el medio RPMI1640 que contiene 10% de FCS por medio de 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 ajustados a 100 ng/ml es usado para producir dilusiones seriales por dilusión doble serial repetida con RPMI1640 que contiene 10% de FCS. Cada una de las soluciones de TRA-8 humanizado diluida es agregado a cada pozo a 50 µl por pozo. Después de hacer reaccionar 37° C durante 12 horas, 50 µl de 25 µMPMS (metosulfato de fenazina; Sigma Chemical Co.) que contiene 1 mg/ml de XTT (2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolio-5-carboxianirida sal interna; Sigma Chemical Co.) es agregada (concentraciones finales de 250 µg/ml para XTT y 5µM para PMS). Después de incubación durante 3 horas, la absorbancia a 450 nm de cada pozo es medida para calcular la viabilidad celular usando la habilidad de reducción de la mitocondria como el índice.

La viabilidad de las células en cada pozo es calculada de acuerdo con la siguiente fórmula:

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

En donde "a" es la medida de un pozo de ensayo, "b2 es la medida de un pozo sin células, y "c" es la medida de un pozo sin anticuerpo agregado.

Como resultado, el producto de expresión preparado en el Ejemplo 20 (TRA-8 humanizado) demostró que induce a apoptosis en las células del antígeno DR5 humano de expresión de la línea de células del linfoma T.

Ejemplo 22. Reactividad del TRA-8 a varias moléculas DR5

Para poder determinar la reactividad del TRA-8 a varias moléculas DR5, la reactividad del TRA-8 es examinada usando linfocitos activados como sigue.

Primero, muestras de sangre periferal son tomadas de un humano (30ml), titi (3ml), y mico cinomologus (20ml). Las muestras de sangre tenían 1 ml de heparina (Novoheparin; Novo) agregada a ellos y las muestras entonces fueron regadas en capas lentamente sobre volúmenes iguales de la solución Ficoll- Paque PLUS ((Amersham Farmacia Biotech) gravedad

específica: 1.700 para todos excepto para los micos cinomoljus, que tenían una gravedad específica de 1.072) y centrifugado a1.700r.p.m. durante 30 minutos para poder obtener una fracción de las células mononucleares de sangre periferal. Esta fracción de células mononucleares es lavada dos veces con solución salina balanceada de Hanks y luego suspendida en RPMI 1640 como medio con 10% de v/v de FCS hasta una densidad celular de 1 $X10^6$ células/ml. Fitoemaglutinina -P (PHA-P, Sigma Chemicals, CO.) es agregada a la suspensión resultante hasta una concentrción final de 5μg/ml y la muestra es incubada a 37° C bajo 5% v/v de Co_2 durante 24 horas. Después de éste tiempo, las células son recuperadas por centrifugación, lavadas y resuspendidas en el medio RPMI 1640 que contiene 10% v/v FCS. Entonces, para activar las células recuperadas, se agregó interleukin-2 (Amersham Farmacia Biotech) a la suspensión hasta una concentración final de 10 unidades/ml, y ésta es incubada a 37°C bajo 5% v/v Co_2 durante 72 horas.

Una cantidad de la preparación activada calculada para contener 1 x 10_6 células de linfocito activadas es colocada en u tubo de ensayo y sea suspendida en 50μl de 0.5, 1, 5,10

μg/ml de TRA-8 en PBS o 50μl de PBS sólo. La suspensión resultante se le permite estar en reposos sobre hielo durante una hora, después de lo cual las células son lavadas 3 veces con alícuotas de 500μl de PBS y luego suspendidas en 50 μl de 20μg/ml de anticuerpo igG anti ratón marcado FITC (Bioresurce) en PBS. Usando las células suspendidas en 500μl de PBS como control, las intensidades de fluorescencia son medidas, usando el sitómetro de flujo (FACS Calibur; Becton Dickinson).

Las distribuciones de número de células por intensidad de fluorescencia son obtenidas y las propotrciones de los números de las células marcadas contra aquellas células totales se ha calculado. Adicionalmente, cada valor Kd es calculado usando la concentración de TRA-8 y las proporciones de los números de las células marcadas frente a aquellas células totales. Cada frecuencia de reactividad para los linfocitos activados de humanos, titi y micos cinomologus es caso igual. De acuerdo con lo anterior, TRA-8 es capaz de ligar un amplio rango de DR5 primate incluyendo humanos contra los cuales el TRA-8 se ha preparado originalmente.

Ejemplo 23. Estudio de dosis escalonada de TRA-8 en Titis

Un estudio de toxicidad preliminar de dosis escalonada de TRA-8 es llevado a cabo usando un macho y una hembra titi. Tres conjuntos de dosis intravenosas únicas, que son separadas por un periodo de retiro de 7 días, se llevan a cabo. La dosis de TRA-8 es establecida en 50, 250 y 1250μg/cuerpo. 48 horas después de cada tratamiento, la sangre es recolectada de la vena femoral y el plasma es preparado. Las actividades de la aminotransferasa de aspartato del plasma y aminotranferasa de alanina son medidas usando un analizador (FUJI DRI-CHEM: Fuji Film Medical Co., Limited).Toda la sangre es retirada sin ninguna anestesia. Como resultado, no hay evidencias que indiquen daño hepático notadas en el examen bioquímico del plasma después de cada tratamiento.

Ejemplo 24. Estudios farmacológicos In Vitro e In vivo del TRA- 8 contra las células de cáncer

Para poder determinar si el TRA-8 tiene la eficacia terapéutica en terapia anti cáncer, actividad de muerte in

Vitro del TRA-8 usando varias líneas de células de cáncer es examinado como sigue.

Varias células (2-8 X 10^3 células/50μl) cultivadas en medio RPMI1640 (por Jurkat), medio DMEM (para HCT-116), MEM-R (para Wide) o DMEM- F12 (para COL2-JcK) obtenido de Gibco BRL con 10% de FCS (Gibco BRL) a 37° C en la presencia de 5% CO2 son dispensadas dispensadas dentro de cada poso de una micro placa de 96 pozos (Sumitomo Bakelite. El TRA-8 son ajustados para tener la concentración del producto final de interés de 100ng/ml con el medio que contiene 10% de FCS. La solución de TRA-8 (100ng/ml) es usada para producir diluciones seriales por dilución serial repetida con el medio que contiene 10% de FCS. Cada una de las soluciones de TRA-8 diluidas es agregada a cada pozo a 50μl por pozo e incubadas a 30° C. Después de hacer reaccionar a 37° C durante 72 horas, 50μl de 25μM de PMS (Metosulfato de fenasina; Sigma Chemical Co.) que contiene 1mg/ml de XTT es agregado (concentraciones finales de 250μg/ml para XTT y 5μM para PMS). Después de incubar durante 3 horas, la absorbancia a 450 nm de cada pozo es medida para calcular la viabilidad celular usando la habilidad de reducción de la mitocondria como el índice.

La viabilidad de las células en cada pozo es calculada de acuerdo con la siguiente fórmula:

Viabilidad (%)= 100X (a-b)/ (c-b)

En donde "a" es la medida de un pozo de ensayo, "b" es la medida de un pozo sin ninguna célula, y "c" es una medida de un pozo con ningún anticuerpo agregado.

Los resultados se dan en la tabla 3 que sigue.

Tabla 3

Células	ED 50' (µg/ml)
Jurkat	0.001-0.01
HCT-116	0.004-0.02
Wide	0.007-0.03
COL2-Jck	2.28

Varias líneas de células cancerosas se les ha inducido fuertemente la apoptósis por el TRA-8 bajo las condiciones in Vitro.

Más aún, el efecto anti tumor in vivo del TRA-8 en ratones desnudos trasplantados con células Wide es determinado, porque el TRA-8 no es reactivo cruzado con la murina DR5.

El anticuerpo DR5 antihumano del TRA-8 es administrado a los ratones desnudos que portan injertos humanos que expresan la molécula DR5 humana. Los ratones usados fueron 6 ratones desnudos/c nud/BALb de 6 semanas de nacidos (embras, de Clea Japon Inc.), que fueron transplantados con líneas de células de cáncer de colon humano WiDr (5 mm^3).Al día después del trasplante del tumor, éstos ratones trasplantados son tratados diariamente con una inyección intra articular de TRA-8 (5μg/ cuerpo) hasta 14 veces. El crecimiento del tumor WiDr es determinado diariamente por el tamaño de la masa tumoral. Los resultados se dan en la tabla 4, que sigue.

Tabla 4

	8 días	11 días	15 días	18 días	22 días	25 días
Control (PBS) SD	196 ± 55	249 ± 77	469 ± 149	584 ± 230	833 ± 230	1193 ± 419
TRA-8 SD	158 ± 78	97 ±30	155 ± 60	195 ± 58	365 ± 91	530 ± 135

En este modelo, aunque todos los animales no tratados exhibieron un crecimiento visible del tumor, el crecimiento del tumor en los animales tratados con TRA-8 es inhibido como se demostré por el tamaño del tumor. Estos resultados indican que el TRA-8 es efectivo en la eliminación de células tumorales in vivo.

Ejemplo 25. Estudio de combinación del TRA-8

La línea de células cancerígenas de la próstata humana PC-3 es obtenida de la American Tissue Culture Collection (ATCC)y mantenida en una mezcla nutriente de F-12K (21127-022, Gibco BRL) que contenía 10% de suero bovino fetal (FBS, Hiclona), 1% de L- glutamina-200 mM (25030-149, Gibco BRL) y 0.5% de solución de penicilina estreptomicina (P-7539,sigma). El medio RPMI1640 (MED-008,IWAKI) suplementado con 10% de FBS y

0.5% de solución de penicilina estreptomicina es usado en el siguiente experimento. Células PC-3 de crecimiento exponencial son recolectadas por tripcinización y lavadas doble vez con medio fresco. Las células son entonces contadas, re suspendidas en un medio fresco a una densidad de 5 X 10^4 células/ml y distribuidas en triplicado en placas de 96 pozos de fondo plano (3598, Corning- Coster) en un volumen total de 100µl/pozo un día antes de iniciar el experimento. Una droga representativa anti cáncer, paclitaxel (169-18611, Wako) disuelta en dimetilsulfóxido (10mg/ml) es diluida en medio fresco y entonces agregada a las placas de 96 pozos que contenían las células a 50µl/pozos. Las concentraciones finales de dimetilsulfóxido son menores a 0.1%. Luego de incubación durante 24 horas a 37° C en 5% de CO_2 como atmósfera, el TRA-8 diluido en medio fresco es agregado a los pozos. Después de incubación durante 24 horas adicionales, 50µl de medio mínimo esencial (11095-098, Gibo BRL) que contenía un mg/ml de XTT y 25 mM de PMS es agregado a los pozos y las placas son incubadas durante 6 horas. El OD450 es entonces medido por SPECTRA MAX 250 (Molecular Devices)y la viabilidad celular es calculada como sigue.

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

El resultado del anterior ensayo para el TRA-8 combinado con una droga anti cáncer representativa, paclitaxel, sigue. El paclitaxel redujo la viabilidad celular de las células PC-3en más de 40% de las señales indicadas como que células cancerosas viables todavía permanecían a concentraciones de hasta 200nM. Notablemente, la adición de 0.1ng/ml de TRA-8 disminuyó grandemente la viabilidad celular de las células de cáncer, hasta un 10% aún que ninguna reducción en la viabilidad celular es vista después de una aplicación única de TRA-8 en esta concentración. Este resultado claramente indica que el TRA-8 exhibió actividad anti cáncer sinergísticamente cuando se combinó con otras drogas anti cáncer

Ejemplo 26. Análisis de otros anticuerpos tipo humanizados de TRA-8

781

(1) Diseñar anticuerpos humanizados

La construcción de una versión humanizada del TRA-8 se lleva a cabo por el método conocido generalmente como ingertación CDR, el anticuerpo mAB58'CL es usado como un receptor como se describió en el ejemplo de referencia número 2y la región CDR del anticuerpo TRA-8 son injertadas en el receptor. En la región de marco de trabajo, algunos aminoácidos son injertados en el receptor sea del TRA-8 o de secuencias con censo humanas por el criterio dado por Queen et al. (Proc.Natl. Acad. Sci. USA 86.10029-10033, (1989))y las secuencias de TRA-8 humanizadas son construidas como se describe de aquí en adelante.

(2) Construcción del plásmido que porta la región variable de ADN de la cadena pesada de otros tipos de TRA-8 de ratón o humanizados

Como se muestra en la ID de SEC No.56 del listado de secuencias, la humanización tipo H1 de las secuencias de

aminoácidos de la cadena pesada del anti cuerpo DR5 anti humano de ratón del TRA-8 conllevó remplaza el tercer aminoácido (metionina), el 13vo aminoácido (licina), el 19vo aminoácido (licina), el 40vo aminoácido (treonina), el 42vo aminoácido (ácido glutámico), el 44vo aminoácido (arginina), el 84vo aminoácido (serina) el 88vo aminoácido (serina), el 93vo aminoácido(metionina), el 114vo aminoácido (treonina), el 115vo aminoácido (leucina),con glutamina, glutamina, arginina, alanina, glicina, glicina, asparagina, alanina, valina, leucina, y valina respectivamente.

Como se muestra en la ID de SEC No.59 del listado de secuencias, la humanización tipo H3 de las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo DR5 anti humano de ratón del TRA-8 conllevó remplazar el 13vo aminoácido (licina), el 19vo aminoácido (licina) el 40vo aminoácido (treonina), el 42vo aminoácido (ácido glutámico), el 44vo aminoácido (arginina), el 88vo aminoácido (serina), el 93vo aminoácido (metionina), el 114vo aminoácido (treonina), el 115vo aminoácido (leucina) con glutonina, arginina , alanina, glicina, glicina, alanina, valina, leucina y valina, respectivamente.

Como se muestra en ID de SEC No.60 del listado de secuencias, la humanización de tipo H4 de las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada del anti cuerpo DR5 anti humano de ratón del TRA-8 conllevó a remplazar el 13vo aminoácido (licina), el 19vo aminoácido (licina), el 88vo aminoácido (serina), el 93vo aminoácido (metionina), el 114vo aminoácido (treonina), el 115vo aminoácido (leucina)con glutamina, arginina, alanzan, valina, leucina, y valina, respectivamente.

Como se muestra en la ID de SEC No.61 del listado de secuencias, el plásmido que porta la región variable del ADN de la cadena pesada del TRA-8 quimérico está designado como "tipo M". En adición, el TRA-8 humanizado descrito en los ejemplos 17 y 18 se ha designado como "tipo H2".

Los plásmidos que portan el ADN que codifica la región variable de la cadena pesada del TRA-8 humanizado o quimérico se construye como siguen.

PCR es usado para construir las siguientes secuencias de ADN, cada una de las cuales comprende lo descrito anteriormente:

Los siguientes 24 oligonucleótidos se han sintetizado:

5'-ttggataagc ttggcttgac ctcaccatgg gatggagctg tatcatcctc ttcttggtag caacagctac aggtgtccac-3' (A; ID DE SEC NO. 32);

5'-tctgaagtaa tgctggtgga gtctggggga ggcttagtac agcctggagg gtccctgaga ctctcctgtg cagcctctgg-3' (B ; ID DE SEC NO 33);

5'-tctgaagtac agctggtgga gtctggggga ggcttagtac agcctggagg gtccctgaga ctctcctgtg cagcctctgg-3' (B2;ID de SEC No. 57);

5'-tctgaagtaa tgctggtgga gtctggggga ggcttagtaa agcctggagg gtccctgaaa ctctcctgtg cagcctctgg-3' (b3;ID de SEC No.66);

5'-attcactttc agtagttatg taatgtcttg ggttcggcag gcaccaggga agggtctgga gtgggttgca accattagta-3' (C; ID de SEC No.34);

5'-attcactttc agtagttatg taatgtcttg ggttcggcag actccagaga agaggctgga gtgggttgca accattagta-3' (C2;ID de SEC No.64);

5'-gtggtggtag ttacacctac tatccagaca gtgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaatgccaa gaacaccctg-3' (D;ID de SEC No.35);

5'-tatctgcaaa tgaacagtct gagagcagag gacacggctg tttattactg tgcaagaagg ggtgactcta tgattacgac-3' (E;ID de SEC No.36);

5'-tatctgcaaa tgagcagtct gagagcagag gacacggctg tttattactg tgcaagaagg ggtgactcta tgattacgac-3' (E2; ID de SEC No.62);

5'-tatctgcaaa tgagcagtct gagatctgag gacacggcta tgtattactg tgcaagaagg ggtgactcta tgattacgac-3' (E3;ID de SEC No.67);

5'-ggactactgg ggccaaggga ccctggtcac agtctcctca gcctccacc aagggcccat cggtc- 3' (F;ID de SEC No.37);

5'-ggactactgg ggccaaggga ccactctcac agtctcctca gcctccacc aagggcccat cggtc- 3' (F2 ;ID de SEC No.68);

5'-ctaccaagaa gaggatgata cagctccatc ccatggtgag gtcaagccaa gcttatccaa-3' (G;ID de SEC No.38);

5'-tctcagggac cctccaggct gtactaagcc tcccccagac tccaccagca ttacttcaga gtggacacct gtagctgttg-3' (H; ID de SEC No.39);

5'-tctcagggac cctccaggct gtactaagcc tcccccagac tccaccagct gtacttcaga gtggacacct gtagctgttg-3' (H2;ID de SEC No.58);

5'-tttcagggac cctccaggct ttactaagcc tcccccagac tccaccagca ttacttcaga gtggacacct gtagctgttg-3' (H3; ID de SEC No.69);

5'-tccagaccct tccctggtgc ctgccgaacc caagacatta cataactact gaaagtgaat ccagaggctg cacaggagag-3'(I;(ID de SEC No.40);

5'-tccagcctct tctctggagt ctgccgaacc caagacatta cataactact gaaagtgaat ccagaggctg cacaggagag-3' (12; ID de SEC No.65);

5'-ctctggagat ggtgaatcgg cccttcacac tgtctggata gtaggtgtaa ctaccaccac tactaatggt tgcaacccac-3' (J; ID de SEC No.41);

5'-ccttcttgca cagtaataaa cagccgtgtc ctctgctctc agactgttca tttgcagata cagggtgttc ttggcattgt-3' (K;ID de SEC No.42);

5'-ccttcttgca cagtaataaa cagccgtgtc ctctgctctc agactgttca tttgcagata cagggtgttc ttggcattgt-3' (K2;ID de SEC No.63);

5'-ccttcttgca cagtaataca tagccgtgtc ctcagatctc agactgctca tttgcagata cagggtgttc ttggcattgt-3' (K3; ID de SEC No.70);

5'-gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtgacc agggtccctt ggccccagta gtccgtcgta atcatagagt cacc-3' (L; ID de SEC No.43) and

5'-gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtgaga gtggtccctt ggccccagta gtccgtcgta atcatagagt cacc-3' (12;ID de SEC No.71)

Los siguientes 2 cebadores PCR son sintetizados como redescribe anteriormente: 5'-ttggataagc ttggcttgac-3' (P1 ;

SEQ ID no. 44); and 5'-gaccgatggg cccttggtgg a-3' (P2; SEQ ID no. 45).

La síntesis del DNA tipo H1 que codifica una cadena de polipéptido que comprende una secuencia de señal de secreción, una región variable de la cadena del TRA-8 humanizada y los 8 residuos de aminoácido en N. términos de la región IgG-Ch1 se lleva a cabo usando la combinación de PCR respectiva.

El fragmento de ADN tipo H1 es preparado como sigue.

Composición de la solución de reacción PCR:

Oligonucleótido A, 10 pmol;

Oligonucleótido B2, 10 pmol;

Oligonucleótido C, 10 pmol;

Oligonucleótido 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

Oligonucleótido L, 10 pmol

Cebador de Oligonucleótido P1, 2μM;

Cebador de Oligonucleótido P2, 2μl;

Mezcla de dNTP, 8μl

Polimerasa de ADN pirobest, 0.5μl; y

Agua redestilada hasta un volumen final de 50μl.

La reacción PCR es conducida como sigue. La solución es primero calentada a 95° C durante 5 minutos, después de lo cual un ciclo de calentamiento a 98° C durante 10 segundos, 55° C durante 30 segundos y 72° C i minuto, se repite 7 veces. Después de completar éste procedimiento, la solución de reacciones calentada a 72° C durante 15 minutos.

Después de la extracción de fenol y la precipitación de etanol, el precipitado de ADN resultante es secado en vacío, disuelto en un mínimo de agua redestilada, y separado por electroforesis de Gel de garosa al 3%. Después de la electroforesis, el Gel es marcado con 1μg/ml de solución acuosa de bromuro de etidio para permitir la detección del

ADN bajo luz UV. Las bandas de ADN correspondientes al ADN tipo H1 se cortan usando una cuchilla de afeitar y se eluyen a partir del Gel usando el Geneclean Spin Kit (BIO 101, CA, USA). Después de la extracción de fenol, el ADN eluido es entonces concentrado por centrifugación a 7.500 X g, seguido por precipitación de etanol, y finalmente disuelto en 5μl de agua destilada.

La síntesis del ADN tipo H3 que codifica una cadena de polipéptido que comprende una secuencia de señal de secreción, una región variable de la cadena pesada del TRA-8 humanizado y los 8 residuos de aminoácido en el N-términos del la región IgG-CH1 se lleva a cabo usando la combinación de PCR respectiva.

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;

Oligonucleótido K2, 10 pmol;

Cebador de Oligonucleótido P1, 2 μM;

Cebador de Oligonucleótido P2, 2 μM;

Amortiguador pirobest 10 X II, 10μl;

Mezcla de dNTP, 8μl;

Polimerasa de ADN pirobest, 0.5μl; y

Agua redestilada hasta un volumen final de 50μl.

La reacción PCR es conducida como sigue. La solución es primero calentada a 94° C durante 5 minutos, después de lo cual un ciclo de calentamiento a 98° C durante 10 segundos, 55° C durante 30 segundos y 72° C durante i minuto, se repite 7 veces. Después de completar éste procedimiento, la solución de reacción es calentada a 72° C durante 15 minutos.

Después de la extracción de fenol y precipitación por etanol, el precipitado de ADN resultante es secado en vacío, disuelto en un mínimo de agua redestilada, y separado por electroforesis del Gel de garosa al 3%. Después de la electroforesis, el Gel es marcado con 1μg/ml de una solución acuosa de bromuro de etidio para permitir la detección del ADN bajo luz UV. Las bandas de ADN correspondientes al ADN tipo H3 se cortan usando una cuchilla de afeitar y se diluyen a partir del Gel usando el Geneclean Spin Kit. Después de la extracción por fenol, el ADN eluido es entonces concentrado por centrifugación a 7.500 X g, seguido por precipitación por etanol, y finalmente disuelto en 5μl de agua destilada.

La síntesis del ADN tipo H4 que codifica una cadena de polipéptidos que comprende una secuencia de señal de secreción, una región variable de la cadena pesada del TRA-8 humanizado y los 8 residuos de aminoácido en el N. términos de la región IgG-CH1 se lleva a cabo usando la combinación de PCR respectiva.

El fragmento de ADN tipo H4 es preparado como sigue.
Composición de la solución de reacción PCR:

792

Oligonucleótido A, 10 pmol;

Oligonucleótido B, 10 pmol;

Oligonucleótido C2, 10 pmol;

Oligonucleótido D, 10 pmol;

Oligonucleótido E2, 10 pmol;

Oligonucleótido F, 10 pmol;

Oligonucleótido G, 10 pmol;

Oligonucleótido H, 10 pmol;

Oligonucleótido 12, 10 pmol;

Oligonucleótido J, 10 pmol;

Oligonucleótido K2, 10 pmol;

Oligonucleótido L, 10 pmol;

Cebador de oligonucleótido P1, 2μM;

Cebador de oligonucleótido P2, 2μM;

Carga pirobest 10X II, 10μl;

Mezcla de dNTP, 8μl;

Polimerasa de ADN pirobest, 0.5μl; y

Agua redestilada hasta un volumen final de 50μl.

La reacción PCR se conduce como sigue, La solución es primero calentada a 94° C durante 5 minutos, después de lo cual un

ciclo de calentamiento a 98° C durante 10 segundos, 55° C durante 30 segundos y 72° durante 1 minuto, es repetida 7 veces. Después de computar éste procedimiento, la solución de reacción es calentada a 72° C durante 15 minutos.

Después de la extracción por fenol y la precipitación por etanol, el precipitado de ADN resultante es secado en vació, disuelto en un mínimo de agua redestilada, y separado por electroforesis del Gel de garosa al 3%. Después de la electroforesis, el, Gel es marcado con 1μg/ml de solución acuosa de bromuro de etidio para permitir la detección del ADN bajo luz UV. Las bandas de ADN correspondientes al ADN tipo H4 se cortan usando una cuchilla de afeitar y se eluyen a partir del Gel usando el Geneclean Spin Kit. Después de la extracción por fenol, el ADN eluido es entonces concentrado por centrifugación a 7.500 X g, seguido por la precipitación por etanol, y finalmente disuelto en 5μl de agua destilada.

La síntesis del ADN tipo M que codifica una cadena de polipéptido que comprende una secuencia de señal de secreción, una región variable de la cadena pesada del TRA-8 quimérico y los 8 residuos de aminoácido en el N- términos 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 solución de reacción PCR:

Oligonucleótido A, 10 pmol;

Oligonucleótido B3, 10 pmol;

Oligonucleótido C2, 10 pmol;

Oligonucleótido D, 10 pmol;

Oligonucleótido E3, 10 pmol;

Oligonucleótido F2, 10 pmol;

Oligonucleótido G, 10 pmol;

Oligonucleótido H3, 10 pmol;

Oligonucleótido 12, 10 pmol;

Oligonucleótido J, 10 pmol;

Oligonucleótido K3, 10 pmol;

Oligonucleótido L2, 10 pmol;

Cebador de oligonucleótido P1, 2μM;

Cebador de oligonucleótido P2, 2μM;

Amortiguador pirobest 10 X II, 10μl;

Mezcla de dNTP, 8μl;

Polimerasa de ADN pirobest, 0.5µl; y

Agua redestilada hasta un volumen final de 50µl.

La reacción PCR es conducida como sigue. La solución es primero calentada a 94° C durante 5 minutos, después de lo cual un ciclo de calor a 98° c durante 10 segundos, 55° C durante 30 segundos y 72° C durante 1 minuto, se repite 7 veces. Después de completar éste procedimiento, la solución de reacción es calentada a 72° C durante 15 minutos.

Después de la extracción por fenol y la precipitación por etanol, el precipitado de ADN resultante es secado en vacío, disuelto en un mínimo de agua redestilada, y separado por electroforesis de Gel de garosa al 3%. Después de la electroforesis, el Gel es marcado con 1µg/ml de solución acuosa de bromuro de etidium para permitir la detección del ADN bajo luz UV. Las bandas de ADN correspondientes al, ADN tipo M se cortan usando una cuchilla de afeitar y se eluyen a partir del Gel usando el Geneclean Spin Kit. Después de la extracción por fenol, el, ADN eluido es entonces concentrado por centrifugación a 7.500 X g, seguido por precipitación por etanol y finalmente disuelto en 5µl de agua destilada.

El resultante, cada ADN extraído (tipo H1, tipo H3, tipo H4, y tipo M) es clonado usando el vector pGEM-T Easy (Promega) como sigue:

El fragmento de ADN recuperado de la reacción PCR (H1, H3, H4 o M) 5µl:
Amortiguador de taq polimerasa 10 X, 1µl;
Mezcla de dNTP, 1µl
Taq polimerasa (5 unidades/ml), 1µl; y
Agua redestilada hasta un volumen final de 10µl.

Después de lo anterior cada solución se hace reaccionar a 70° C durante 30 minutos, cada solución de ADN y vector pGEM-T Easy son ligados usando la versión 2.0 del Kit de ligación de ADN (Takara Shuzo Co.,Ltd.) usando el protocolo del fabricante.

Después de 4 horas de incubación a 15° C,2µl de la solución de reacción incubada se mezclan con 100µl de la sepa JM 109 E.coli competente a una densidad celular de 1 a 2 X10^9 células/ml (Takara Shuzo Co.,Ltd), y y la mezcla es mantenida

sobre hielo durante 30 minutos, entonces a 42° C durante 30 segundos y nuevamente sobre hielo durante 1 minuto. Entonces, 500µl de SOC medio (2%v/v de tristona,0.5%p/v de extracto de levadura, 0.05%p/v de cloruro de sodio, 2.5mM p/v de cloruro de potasio, 1mM de cloruro de magnesio, y 20 mM de glucosa) se agrega a la mezcla, lo cual es incubada durante una hora adicional, con agitación. Las cepas transformantes son entonces aisladas, y el ADN del plásmido es preparado de las cepas como se describió en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". La secuencia del nucleótido de éste ADN que codifica la cadena pesada del TRA-8 de ratón o humanizado es confirmada por el método dideoxi respectivamente (Sanger, F.S., et al (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467) usando el analizador de ADN 3.700(ABI PRISMA; Perkin ElmerApplied Biosystems, Japón).

El plásmido resultante es designado pHA15 (el plásmido porta el cADN que codifica la cadena pesada tipo H1 del TRA-8 humanizado), pHC10 (el plásmido que porta el cADN que codifica la cadena pesada tipo H3 del TRA-8 humanizado), pHD21 (el plásmido que porta el cADNque codifica la cadena pesada tipo H4 delTRa-8 humanizada), y pM11(el plásmido que

porta el cADN que codifica la cadena pesada del TRA-8 quimerizo). Las cepas transformadas E. Coli que alojan estos plásmidos, designadas como E. ColiJM 1097pHA15, E. Coli, JM109/pHC10, E. Coli JM109/pHD21, y E.ColiJM109/pM11 fueron depositadas con el Internacional Patent Organism Depositary, Nacional Institute of Advance Industrial Science an 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 le asignó el número de acceso FERM BP-7555, FERM BP-7557, FERM BP-7558, y FERM BP-7559, respectivamente.

(3) Construcción de los plásmidos de expresión que portan la región variable de la cadena pesada de ADN de diversos tipos de TRA-8 humanizado o de ratón

Los vectores de expresión recombinante para las células animales son construidos insertando el ADN que codifica la cadena pesada del tipo H1, tipo H3, y tipo H4 humanizado o tipo M quimérico desde el TRA-8 (clonado anteriormente) como sigue.

Un µg del plásmido pSRHHH3 (solicitud de patente Europea EP 0 909 816 A1) que porta la región variable en la cadena pesada del anticuerpo HFE7A monoclonal antifaz humanizado y la región constante del ADN genómico del IgG1 humano, un vector de expresión para células de mamíferos, es digerido con las enzimas de restricción hindi y ApaI, y separado por electrofóresis de gel de azarosa al 3%. Después de la electrofóresis, el gel es marcado con un µg/ml de una solución acuosa de bromuro de etidio para permitir la detección del ADN bajo luz UV. Las bandas del vector de ADN que contienen el ADN genómico de al región constante del IgG1 humano sin la región variable de la cadena pesada del HFE7A humanizado son cortados usando una cuchilla de afeitar y eluidos a partir del gel usando el Geneclin Spin Kit. Después de la extracción por fenol, el ADN eluido es entonces concentrado por centrifugación a 7500 X g, seguido por precipitación por etanol, y finalmente disuelto en 5 µl de agua destilada y luego desfosforilado usando CIP. El plásmido desfosforilado digerido resultante (100 ng) es ligado con un µg del fragmento de ADN de 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 ha sido

digerido con HindIII y ApaI, usando una versión 2.0 del kit de ligación de ADN (Takara Shiuzo Co., Ltd.). La mezcla de ligación es entonces usada para transformar el E. coli JM 109, que es entonces plateado sobre placas de agar LB, que contienen 50 µg/ml de ampicilina.

Los transformantes obtenidos por este método son cultivados en 2 ml de un medio líquido de LB que contiene 50 µg/ml de ampicilina a 77° durante la noche, y el ADN del plásmido es extraído subsecuencialmente del cultivo resultante por el método alcalino - SDS.

El ADN del plásmido extraído es digerido con HindIII y ApaI y sometido a electrofóresis de gel de azarosa al 3% p/v para confirmar la presencia o ausencia del inserto de ADN que codifica la regiónm variable de la cadena pesada del TRA-8 humanizado o quimérico. La inserción y orientación del fragmento de ADN deseado en el vector se confirma por el secuenciamiento de ADN usando un analizador de secuencias de genes (ABI Prism 3700 DAN Analizer; Applied Biosystems). Los plásmidos de expresión resultantes que portan el cADN que codifica la cadena pesada del TRA-8 humanizado quimérico

fueron designados pHA15, pHC10-3, pHD21-1, y pM11-1, respectivamente.

(4) Construcción de Vectores para las Cadenas Livianas Humanizadas

(4.1) Construcción de un Vector de Expresión para la Cadena Liviana del Anticuerpo Humanizado (tipo LM1)

Como se muestra en la ID de Sec No.: 72 del listado de secuencias, otra humanización (tipo LM1) de las secuencias de aminoácidos de la cadena liviana del anticuerpo DR5 antihumano del TRA-8 de ratón conlleva reemplazar el tercer aminoácido (valina) el 8vo aminoácido (histidina), el 9no aminoácido (lisina), el 10mo aminoácido (fenilalanina), el 11vo aminoácido (metionina), el 13vo aminoácido (treonina), el 20mo aminoácido (serina), el 42vo aminoácido (glutamina), el 43vo aminoácido (serina), el 60vo aminoácido (ácido aspártico), el 63vo aminoácido (treonina), el 77avo aminoácido (asparagina), el 78avo aminoácido (valina), el 80avo aminoácido (serina), el 83avo aminoácido (leucina), el 85avo aminoácido (ácido aspártico), el 87avo aminoácido

(fenilalanina), y el 99avo aminoácido (glicina), el 103avo aminoácido (leucina) y el 108avo ácido (alanina) del N-terminus de la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del TRA-8 son reemplazados con glutamina, prolina, serina, serina, leucina, alanina, treonina, licina, alanina, serina, serina, serina, leucina, prolina, fenilalanina, treonina, tirosina, glutamina, valina y treonina, respectivamente. La secuencia resultante se ha designado como LM1.

Los plásmidos de expresión que portan este tipo de secuencias de aminoácidos de cadena liviana humanizada del anticuerpo DR5 del TRA-8 antihumano (tipo LM1, ID de Sec No.: 72 del listado de secuencias) se construye como sigue:

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

La codificación del ADN para la cadena de polipéptido LM1 (ID de Sec No.: 72 del listado de secuencias), cada una de las cuales es una fusión de la región variable de la cadena liviana del TRA-8 del anticuerpo anti-DR5 humanizado (tipo

LM1) y la región constante de la cadena liviana Ig humana (cadena K), son sintetizados respectivamente usando combinaciones de PCR.

Adicional al 7AL1P (ID de Sec No.: 47), 7ALCN (ID de Sec No.: 48), HKCDF11 (ID de Sec No.: 50), HKCDR12 (ID de Sec No.: 51), HKCDF22 (ID de Sec No.: 52), HKCDR 22 (ID de Sec No.: 53), y HKCF12 (ID de Sec No.: 54).

Los siguientes cebadores de oligonucleótido son sintetizados por PCR:

5'-gtcccccaca gatgcagaca aagaacttgg agattgggtc atctgaatgt caccagtgga-3' (HKSPR12; ID de Sec. No.: 77)

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

El fragmento de LM1-ADN que codifica para la secuencia de aminoácido según se definió en la ID de Sec No.: 72 del mismo es preparado llevando a cabo dos etapas PCR, insertado en un vector de plásmido y clonado en E. coli.

a) Primera etapa PCR

El fragmento LM1-F1-ADN que codifica para una secuencia de señal de secreción y una porción de la región FRL_1 con un sitio de fractura de enzima de restricción HindIII agregado en el extremo 5' es preparado bajo las siguientes condiciones. Los plásmidos plantilla, pHSGHM17 y pSRPDHH, son obtenidos siguiendo la descripción en una solicitud de patente europea EP0 909 816 A1.

Composición de la solución de reacción:

El plásmido pHSGHM17 ADN, 25 ng
Cebador de oligonucleótido 7AL1P, 50 pmol
Cebador de oligonucleótido HKSPR12, 50 pmol
Cóctel de los dNTP, 5 µl
Amortiguador 10 x PCR, 5 µl
ampliTaq ADN polimerasa (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 térmicas del PCR: calentara 94° C durante 2 minutos, después de lo cual 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 LM1-F2-ADN que codifica para una porción de FRL_1, $CDRL_1$, FRL_2, y $CDRL_2$ se prepara bajo las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:ADN del plásmido pL28, 25 ng

Cebador de oligonucleótido HKCDF11, 50 pmol
Cebador de oligonucleótido HKCDR12, 50 pmol
Cóctel de dNTP, 5 µl.

Amortigudor 10 X PCR, 5 µl

ampliTaq ADN polimkerasa 2,5 unidades

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

Las condiciones térmicas del PCR: calentar a 94° C duyrante dos minutos, después de lo cual un ciclo térmico de 94° c durante un minuto,k 55° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos, repetido 30 veces, seguido por calor a 72° C durante 10 minutos.

El fragmento LM1-F3-ADN que codifica para el CDRL2, FRL_3, y una porción de CDRL3 es preparado bajo las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

ADN del plásmido pSRPDHH, 25 ng
Cebador de oligonucleótido HKCDF22, 50 pmol
Cebador de oligonucleótido HKCDR22, 50 pmol

Cóctel de los dNTP, 5 µl

Amortiguador 10 x PCR, 5 µl

AmpliTaq de ADN polimerasa, 2,5 unidades

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

Las condiciones térmicas del PCR:

Calentar a 94° C durante dos minutos, después de lo cual 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 LM1-F4-ADN que codifica para el $CDRL_3$, FRL_4, y la región constante con un sitio de fractura por la enzima de restricción EcoR I agregado al terminal 3' es preprado bajo las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

ADN del plásmido pSRPDHH, 25 ng

Cebador de oligonucleótido HKCF12, 50 pmol

Cebador de oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol

Cóctel de los dNTP, 5 µl

Amortiguador 10 x PCR, 5 µl

AmpliTaq de ADN polimerasa, 2,5 unidades

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

Las condiciones térmicas del PCR: calentar a 94° C durante dos minutos, después de lo cual aplicar 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 amplificado después del PCR son separados por electrofóresis de gel de poliacrilamida al 5%. El gel después de la electrofóresis 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 de PCR

El LM1-ADN el cual se describió anteriormente los fragmento LM1-F1-ADN, LM1-F2-ADN, LM1-F3-ADN, y LM1-F4-ADN son fusionados se preparó bajo las siguientes condiciones.

Composición 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,
Cebador oligonucleótido 7AL1P, 50 pmol
Cebador oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol
Cóctel de los dNTP, 5,0 µl

Amortiguador 10 x PCR, 5,0 µl

ampliTaq de ADN polimerasa, 2,5 unidades

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

Condiciones térmicas de PCR: Calentar a 94° C durante 2 minutos, después de lo cual se aplica 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-ADN preparado así es insertado dentro del plásmido pCR3.1ADN usando el kit de clonación TA eucariótico (in vitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante e introducido dentro del E. coli TOP 10F' 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) usando el

analizador de ADN 3700 (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems, Japón).

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

El plásmido obtenido pCR3.1/LM1-2 que contiene el fragmento LM1-ADN es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

Un µg del plásmido de clonación pHSG399 ADN es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoRI, y luego desfosforilado con CIP. El ADN PHSG399 desfosforilado resultante y el fragmento LM1-ADN, que ha sido diferido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, son ligados usando la versión 2.0 del kit de ligación de ADN (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Entonces el E. coli DH5α es transformado con el ADN ligado y esparcido sobre un medio de LB agar que contiene 0.1 mg de IPTG, 0,1% de X-Gal y 50 µg/ml de cloramfenicol (concentraciones finales). Los transformantes

blancos obtenidos son cultivados en un medio líquido 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 extraído es digerido con Hind III y EcoR I, y entonces un clon que porta el fragmento LM1-ADN es seleccionado por electroforesis de gel de agarosa al 1%.

Como resultado del procedimiento anterior, el plásmido pHSG/M1-2-2 que porta un fragmento de fusión de la región variable de la cadena liviana LM1 del TRA-8 humanizado y laregión constante de la cadena Igk humana se obtiene. La sepa transformante E. coli que aloja estos plásmidos, designada como E. coli DH5α/pHSG/M1-2-2 fue depositada con el International Patent Organism Depositary, Nacional 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 los microorganismos, y se le asignó el número de acceso FERM BP-7562.

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

El plásmido pHSG/M1-2- obtenido que porta un fragmento de fusión de la región variable de la cadena liviana de LM1 del TRA-8 humanizado y la región constante de la cadena Igk humana es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

Un µg del ADN del plásmido pSRPDHH clonado (solicitud de patente Europea EP 0 909 816 A1) es digerido con las enzimas de restricción Hid III y EcoR I, y luego desfosforilado con CIP. El ADN del pSDRHH desfosforilado resultante y el fragmento de ADN Hind III EcoR I obtenido del pHSG/M1-2-2 son ligados usando la versión 2.0 del kit de ligación de ADN (Takara Siuzo, Co. Ltd.). Entonces el E. coli DH5α es transformado con el ADN ligado y esparcido sobre LB agar. Los transformantes obtenidos son cultivados en un medio líquido de LB que contiene 100 µg/ ml de ampicilina, y el ADN del plásmido es extraído del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS. La inserción y orientación del fragmento de ADN deseado en el vector pSRPDHH es confirmado por el

secuenciamiento de ADN usando un analizador de secuencias de genes.

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

(4.2) Construcción de un Vector de Expresión para la cadena liviana del anticuerpo humanizado (tipo LM3)

Como se muestra en la ID de Sec No. 3 del listados de secuencias, otra humanización (tipo LM3) de las secuencias de aminoácidos de la cadena liviana del TRA-8 de ratón anticuerpo DR5 anti humano conlleva a reemplazar el 8vo aminoácido (histidina), el 9no aminoácido (lisina), el 10mo aminoácido (fenilalanina), el 11avo aminoácido (metionina), el 13avo aminoácido (treonina), el 20avo aminoácido (serina), el 42avo aminoácido (glutamina), el 43avo aminoácido (serina), el 77avo aminoácido (asparagina), el 78avo aminoácido (valina), el 80avo aminoácido (serina), el 83avo aminoácido (leucina), el 85avo aminoácido (ácido aspártico), el 87avo aminoácido (fenilalanina), el 99avo aminoácido

(glicina), el 103avo aminoácido (leucina), y el 108avo aminoácido (alanina) del N- terminus de la secuencia de aminoácido de la cadena liviana del TRA-8 son reemplazados con prolina, serina, serina, leucina, alanina, treonina, lisina, alanina, serina, leucina, prolina, fenilalanina, treonina, tirosina, glutamina, valina, y treonina, respectivamente. La secuencia resultante es designada como LM3.

Los plásmidos de expresión que portan este tipo de secuencias de aminoácido de cadena liviana humanizada del TRA-8 antihumano del anticuerpo DR5 (tipo LM3, ID de Sec No.: 73 del listado de secuencias) se construyen como sigue.

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

El ADN que codifica para la cadena de polipéptido LM3 (ID de Sec No.:73 del listado de secuencias), cada uno de los cuales es una fusión de la región variable de la cadena liviana del TRA-8 del anticuerpo anti-DR5 humanizado y la región

constante de la cadena liviana Ig humana (cadena k), son sintetizados respectivamente usando combinaciones de PCR.

Adicionalmente a 7AL1P (ID de Sec No.: 47) y 7ALCN (ID de Sec No.: 48), los siguientes cebadores de oligonucleótidos son sintetizados para PCR:

5'-atctagttct cagagatgga gacagacaca atcctgctat gggtgctgct gctctgggtt ccagg-3' (MOD1F1; ID de Sec. No. 78);

5'-cagcacccat agcaggattg tgtctgtctc catctctgag aactagatga gaggatgctt cttaagctt-3' (MOD1R1; ID de Sec. No. 79);

5'-ctccactggt gacattgtga tgacccaatc tccaagttct ttgtctgcat ctgtggggga cagggtc-3' (MOD1F22; ID de Sec. No. 80);

5'-acttggagat tgggtcatca caatgtcacc agtggagcct ggaacccaga gcag-3' (MOD1R22; ID de Sec. No. 81);

5'-accatcacct gcaaggccag tcaggatgtg ggtactgctg tagcctggta ccaacagaaa ccaggaa -3' (MOD1F3; ID de Sec. No. 82);

5'-tacagcagta cccacatcct gactggcctt gcaggtgatg gtgaccctgt cccccacaga tgcagacaaaga -3' (MOD1R3; ID de Sec. No. 83);

817

5'-aagcacccaa actcctcatc tattgggcat ccacccggca cactggggtc ccagataggt ttacaggcagt - 3' (MOD1F42; ID de Sec. No. 84);

5'-cccagtgtgc cgggtggatg cccaatagat gaggagtttg ggtgcttttc ctggtttctg ttggtaccaggc - 3' (MOD1R4; ID de Sec. No. 85);

5'-gggtctggga cagacttcac cctcaccatc tctagtctgc agccggagga ttttgcaacctat - 3' (MOD1F5; ID de Sec. No. 86);

5'-actagagatg gtgagggtga agtctgtccc agacccactg cctgtaaacc tatctgggac -3' (MOD1R52; ID de Sec. No. 87);

5'-tactgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttcggtcaag gcaccaaggt ggaaatc -3' (MOD1F6; ID de Sec. No. 88);

5'-cgtccgatag ctgctatatt gctgacagta ataggttgca aaatcctccg gctgcac -3' (MOD1R6; ID de Sec. No. 89)

5'-aaacggactg tggctgcacc atctgtcttc atcttcccgc catctgatgag - 3' (MOD1F7; ID de Sec. No. 90);

5'-gaagatgaag acagatggtg cagccacagt ccgtttgatt tccaccttgg tgccttgaccgaa -3' (MOD1R7 ; ID de Sec. No. 91); y

5'-agatttcaac tgctcatcag atggcgggaa (LR17; ID de Sec. No. 101).

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

El fragmento LM3-ADN que codifica a la secuencia de aminoácido según se definió en la ID de Sec. No. 73 del mismo es preparado llevando a cabo dos etapas PCR, insertando dentrote un vector de plásmido y clonado en el E. coli.

a) Primera etapa PCR

El fragmento LM3-F31B-ADN que codifica para una región de secuencia de señal de secreción con un sitio de fractura por encima de restricción Hind III agregado al extremo 5', FRL_1, $CDRL_1$, FRL_2, y $CDRL_2$, FRL_3, $CDRL_3$, FRL_4 y una porción delaregión constante es preparado bajo las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

Cebadores de oligonucleótido MOD1F1, 5 PMOL
Cebadores de oligonucleótido MOD1R1, 5 PMOL
Cebadores de oligonucleótido MOD1F22, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1R22, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1F3, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1R3, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1F42, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1R4, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1F5, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1R52, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1F6, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1R6, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1F7, 50 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1R7, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido 7AL1P, 50 PMOL

Cebadores de oligonucleótido LR17, 50 PMOL

Cóctel dNTP, 5 µl

Amortiguador 10 x PCR, 5 µl

Polimerasa ADN ampliTaq, 2,5 unidades

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

Condiciones térmicas del PCR: calentar a 94° C durante 2 minutos, después de lo cual un ciclo térmico de 94° C por un minuto, 55° C durante 1 minuto y 72° C durante dos minutos, repetido 30 veces, seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos.

El fragmento LM3-F31C-ADN que codifica para una porción de la región constante con un sitio de fractura por la enzima de restricción EcoR I agregado al 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:

El plásmido pSRPDHH ADN, 25 ng
Cebador de oligonucleótido MOD1F7, 50 pmol
Cebador de oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol
Cóctel de los dNTP, 5 µl
Amortiguador 10 x PCR, 5 µl

821

ampliTaq ADN polimerasa, 2,5 unidades

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

Condiciones térmicas de PCR: calentar a 94° C durante dos minutos, después de lo cual un ciclo térmico de 64° 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 de PCR son separados por electrofóresis por gel de poliacrilamida al 5%. El gel después de la electrofóresis es marcado con 1 µg/ml de bromuro de etidio para detectar el ADN producido bajo luz UV. Las bandas de ADN respectivas que son así detectadas son cortadas con una cuchilla.

b) Segunda etapa PCR

822-

El LM3-ADN en el cual se describió anteriormente los fragmentos LM3-FB31B-ADN, y LM3-F31C-ADN son fusionados es preparado bajo las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

Fragmento de gel de LM3-F31B-ADN preparado en la primera etapa PCR,
Fragmento de gel de LM3-F31C-ADN preparado en la primera etapa PCR,
Cebador oligonucleótido 7AL1P, 50 pmol
Cebador oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol
Cóctel de los dNTP, 5,0 µl
Amortiguador 10 x PCR, 5,0 µl
ampliTaq de ADN polimerasa, 2,5 unidades

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

Condiciones térmicas de PCR: calentar a 94° C durante dos minutos, después de lo cual 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 LM3-ADN así preparado es insertado en el plásmido pCR3.1ADN usando el kit de clonación TA eucariótico (in vitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante e introducido dentro el E. coli TOP10F' competente contenido en el kit. Las secuencias de nucleótidos de estos ADN que codifican la cadena liviana del TRA-8 humanizado tipo LM3 son confirmadas por el método dideoxi (Sanger, F.S., et al., (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467) usando el analizador de ADN 3700 (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems, Japón).

Los plásmidos resultantes se han designado pCR3.1/LM3-3-44 (el plásmido que porta el cADN que codifica la región variable de la cadena liviana del TRA-8 humanizado tipo LM3 y una región constante de la cadena liviana Ig humana).

El plásmido obtenido pCR3.1/LM3-3-44 que contiene el fragmento LM3-ADN es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

Un µg del ADN del plásmido pHSG399 de clonación es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y luego es desfosforilado con CIP. El ADN pHSG399 desfosforilado resultante y el fragmento LM3-ADN, que ha sido digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I son ligados usando la versión 2.0 del kit de ligación de ADN (Takara Shiuzo, Co. Ltd.). Entonces el E. coli DH5α es transformado con el ADN ligado y esparcido sobre un medio de LB agar que contiene 0,1 mm de IPTG, 0,1% X-Gal y 50 µg/ml de cloramfenicol (concentraciones finales). Los transformantes blancos obtenidos son cultivados en el medio líquido de LB que contiene 50 µg/ml de cloramfenicol, y el ADN es extraído del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS. El ADN del plásmido extraído es digerido con Hind III y EcoR I, y luego un clon que porta el fragmento LM3-ADN es seleccionado por electrofóresis de gel de agarosa al 1%.

Como resultado del anterior procedimiento, el plásmido pHSG/M3-3-22 que porta un fragmento de fusión de la región variable de la cadena liviana del TRA-8 humanizado tipo LM3 y la región constante de la cadena Igk humana es obtenido. La cepa transformante E. coli que porta estos plásmidos, designada como E. coli DH5α/pHSG/M3-3-22 fue depositada con el International Patent Organism Depositary, 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 le asignó en número de acceso FERM BP-7564.

3) Construcción del plásmido pSR/LM3-3-44-10 (plásmido de expresión para la cadena liviana del TRA-8 humanizada tipo LM3)

El plásmido obtenido pHSG/M3-3-22 que porta un fragmento de fusión de la región variable de la cadena liviana del TRA-8 humanizada tipo LM3 y la región constante de la cadena Igk humana es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

826

Un µg del ADN del plásmido pSRPDHH ADN de clonación (solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1) es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y luego desfosforilado con CIP. El ADN pSRPDHH desfosforilado resultante y el fragmento Hind III - EcoR I obtenido del pHSG/M3-3-22 son ligados usando la versión 2.0 del kit de ligación de ADN (Takara Shiuzo Co., Ltd.). entonces en E. coli DH5α es transformado con el ADN ligado y esparcido sobre LB agar. Los transformantes obtenidos son cultivados en un medio líquido de LB que contiene 100 µg/ml de ampicilina, y el ADN del plásmido es extraído del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino - SDS. La inserción y orientación del fragmento de ADN deseado en el vector pSRPDHH es confirmado por el secuenciamiento de ADN usando un analizador de secuencias de genes (ABI Prism 3700 DAN Analizer; Applied Biosystems).

El plásmido de expresión resultante que porta el cADN que codifica la cadena liviana del TRA-8 humanizado tipo LM3 se designa pSR/LM3-3-44-10.

827

(4.3) Construcción de un vector de Expresión para la Cadena Liviana del Anticuerpo Humanizado (tipo LM4)

Como se muestra en la (ID de Sec No.: 74 del listado de secuencias, otra humanización (tipo lm4) de las secuencias de aminoácido de la cadena liviana del TRA-8 del anticuerpo DR5 antihumano de ratón conlleva el reemplazo del 8vo aminoácido (histidina), el 9no aminoácido (lisina), el 10mo aminoácido (fenilalanina), el 11vo aminoácido (metionina), el 13vo aminoácido (treonina), el 20mo aminoácido (serina), el 42vo aminoácido (glutamina), el 43vo aminoácido (serina), el 77avo aminoácido (asparagina), el 78avo aminoácido (valina), el 80avo aminoácido (serina), el 83avo aminoácido (leucina), el 85avo aminoácido (ácido aspártico), el 99avo aminoácido (glicina), el 103avo aminoácido (leucina) y el 108avo ácido (alanina) del N-terminus de la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del TRA-8 son reemplazados con prolina, serina, serina, leucina, alanina, treonina, licina, alanina, serina, leucina, prolina, fenilalanina, treonina, glutamina, valina y treonina, respectivamente. La secuencia resultante se ha designado como LM4.

Los plásmidos de expresión que portan este tipo de secuencias de ácido de cadena liviana humanizada del TRA-8 antihumana del anticuerpo DR5 (tipo LM4) (ID de Sec No.: 74 del listadote secuencias) son construidos como sigue.

1) Síntesis de los cebadores para preparar las regiones variable y constante de la cadena liviana del TRA-8 humanizada tipo LM4.

El ADN que codifica para la cadena de polipéptido LM4 (ID de Sec No.: 74 del listado de secuencias), cada uno de los cuales es una fusión de la región variable de la cadena liviana del TRA-8 anticuerpo del anti - DR5 humanizado y la región constante de la cadena liviana Ig humana (cadena K), son sintetizados respectivamente usando combinaciones de PCR.

Adicionalmente a 7AL1P (ID de Sec. No. 47), 7ALCN (ID de Sec. No. 48), MOD1F1 (ID de Sec. No. 78), MOD1R1 (ID de Sec. No. 79), MOD1F22 (ID de Sec. No. 80), MOD1R22 (ID de Sec. No. 81), MOD1F3 (ID de Sec. No. 82), MOD1R3 (ID de Sec. No. 83), MOD1F42 (ID de Sec. No. 84), MOD1R4 (ID de Sec. No. 85), MOD1F5 (ID de Sec. No. 86), MOD1R52 (ID de Sec. No. 87),

MOD1F7 (ID de Sec. No. 90), and MOD1R7 (ID de Sec. No. 91), LR17 (ID de Sec. No. 101), los siguientes cebadores de oligonucleótido son sintetizados para PCR:

5'-ttctgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttcggtcaag gcaccaaggt ggaaatc-3' (MOD1F62; ID de Sec. No.: 92)
5'-cgtccgatag ctgctatatt gctgacagaa ataggttgca aaatcctccg GCTGCAG-3; (MOD1R62; ID de Sec. No.: 93)

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

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

a) Primera etapa PCR

El fragmento LM4-F41B-ADN que codifica para una región de secuencia de señal de secreción con un sitio de fractura por la enzima de restricción Hind III agregado al terminal 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.

Composición de la solución de reacción:

Cebadores de oligonucleótido MOD1F1, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1R1, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1F22, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1R22, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1F3, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1R3, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1F42, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1R4, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1F5, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1R52, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1F62, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1R62, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1F7, 50 PMOL

Cebadores de oligonucleótido MOD1R7, 5 PMOL

Cebadores de oligonucleótido 7AL1P, 50 PMOL

Cebadores de oligonucleótido LR17, 50 PMOL

Cóctel dNTP, 5 µl

Amortiguador 10 x PCR, 5 µl

Polimerasa ADN ampliTaq, 2,5 unidades

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

Condiciones térmicas del PCR: calentar a 94° C durante 2 minutos, después de lo cual un ciclo térmico de 94° C por un minuto, 55° C durante 1 minuto y 72° C durante dos minutos, repetido 30 veces, seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos.

El fragmento LM4-F41C-ADN que codifica para una porción de la región constante con un sitio de fractura por la enzima de restricción EcoR I agregado al extremo 3' es preparado bajo las siguientes condiciones.

Los plásmidos de plantilla, pSRPDHH, son obtenidos siguiendo la descripción en una solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1.

Composición de la solución de reacción:

El plásmido pSRPDHH ADN, 25 ng

Cebador de oligonucleótido MOD1F7, 50 pmol

Cebador de oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol

Cóctel de los dNTP, 5 µl

Amortiguador 10 x PCR, 5 µl

ampliTaq ADN polimerasa, 2,5 unidades

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

Condiciones térmicas de PCR: calentar a 94° C durante dos minutos, después de lo cual 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 de PCR son separados por electrofóresis por 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 que son así detectadas son cortadas con una cuchilla.

b) Segunda etapa PCR

El LM4-ADN en el cual se describió anteriormente los fragmentos LM4-FB41B-ADN, y LM4-F41C-ADN son fusionados es preparado bajo las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

Fragmento de gel de LM4-F41B-ADN preparado en la primera etapa PCR,
Fragmento de gel de LM4-F41C-ADN preparado en la primera etapa PCR,
Cebador oligonucleótido 7AL1P, 50 pmol
Cebador oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol
Cóctel de los dNTP, 5,0 µl
Amortiguador 10 x PCR, 5,0 µl
ampliTaq de ADN polimerasa, 2,5 unidades

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

Condiciones térmicas de PCR: calentar a 94° C durante dos minutos, después de lo cual 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 LM4-ADN así preparado es insertado en el plásmido pCR3.1ADN usando el kit de clonación TA eucariótico (in vitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante e introducido dentro el E. coli TOP10F' competente contenido en el kit. Las secuencias de nucleótidos de estos ADN que codifican la cadena liviana del TRA-8 humanizado tipo LM4 son confirmadas por el método dideoxi (Sanger, F.S., et al., (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467) usando el analizador de ADN 3700 (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems, Japón).

Los plásmidos resultantes se han designado pCR3.1/LM4-5-3 (el plásmido que porta el cADN que codifica la región variable de la cadena liviana del TRA-8 humanizado tipo LM4 y una región constante de la cadena liviana Ig humana).

El plásmido obtenido pCR3.1/LM4-5-3 que contiene el fragmento LM4-ADN es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

Un µg del ADN del plásmido pHSG399 de clonación es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y luego es desfosforilado con CIP. El ADN pHSG399 desfosforilado resultante y el fragmento LM4-ADN, que ha sido digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I son ligados usando la versión 2.0 del kit de ligación de ADN (Takara Shiuzo, Co. Ltd.). Entonces el E. coli DH5α es transformado con el ADN ligado y esparcido sobre un medio de LB agar que contiene 0,1 mm de IPTG, 0,1% X-Gal y 50 µg/ml de cloramfenicol (concentraciones finales). Los transformantes blancos obtenidos son cultivados en el medio líquido de LB que contiene 50 µg/ml de cloramfenicol, y el ADN es extraído del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS.

El ADN del plásmido extraído es digerido con Hind III y EcoR I, y luego un clon que porta el fragmento LM4-ADN es seleccionado por electroforesis de gel de agarosa al 1%.

Como resultado del anterior procedimiento, el plásmido pHSG/M4-5-1 que porta un fragmento de fusión de la región variable de la cadena liviana del TRA-8 humanizado tipo LM4 y la región constante de la cadena Igk humana es obtenido. La cepa transformante E. coli que porta estos plásmidos, designada como E. coli DH5α/pHSG/M4-5-3-1 fue depositada con International Patent Organism Depositary, National Institute of Advance 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 le asignó el número de acceso FERM BP-7565.

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

El plásmido pHSG/M4-5-3-1 obtenido que porta un fragmento de fusión de la región variable de la cadena liviana del TRA-8

humanizado tipo LM4 y la región constante de la cadena Igk humana es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

Un μg del ADN de plásmido pSRPDHH de clonación (solicitud de patente Europea EP 0 909 816 A1) es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y luego es desfosforilado con CIP. El ADN pSRPDHH desfosforilado resultante y el fragmento HindIII-EcoRI ADN obtenido del pHSG/M4-5-3-1 son ligados usando la Versión 2.0 del Kit de Ligación de ADN (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Luego, el *E. coli* DH5α es transformado con el ADN ligado y esparcido en el LB agar. Los transformantes obtenidos son cultivados en el medio líquido LB que contiene 100 μg/ml de ampicilina, y el ADN del plásmido es extraído del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino SDS. La inserción y orientación del fragmento de ADN deseado en el vector pSRPDHH es confirmado por el secuenciamiento de ADN usando un analizador de secuencias de genes (ABI 3700 ADN Analyser; Applied Biosystems).

El plásmido de expresión resultante que porta el cADN que codifica la cadena liviana del TRA-8 humanizado tipo LM4 se designado pSR/LM4-5-3-3.

(4.4) Construcción de un Vector de Expresión para la Cadena Liviana del Anticuerpo Humanizado (Tipo LM5)

Como se muestra en la ID de Sec. No.75 el Listado de Secuencias, otra humanización (tipo LM5) de la s secuencias de aminoácidos de la cadena liviana del TRA-8 anticuerpo DR5 antihumano de ratón conlleva el reemplazo del 8vo aminoácido (histidina), 9no aminoácido (lisina), 10mo aminoácido (fenilalanina), 11avo aminoácido (metionina), 13avo aminoácido (treonina), 20avo aminoácido (serina), 42avo aminoácido (glutamina), 43avo aminoácido (serina), 77avo aminoácido (asparagina), 78avo aminoácido (valina), 80avo aminoácido (serina), 83avo aminoácido (leucina), 103avo aminoácido (leucina) y 108avo aminoácido (alanina) del N-terminus de la secuencia de aminoácido de la cadena liviana del 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 ha designado LM5.

Los plásmidos de expresión que portan este tipo de secuencias de aminoácido de cadena liviana humanizada del TRA-8 anticuerpo DR5 antihumano (tipo LM5) (ID de Sec. No.75 del Listado de Secuencias) es construido como sigue.

1) Síntesis de los cebadores para preparar las regiones variable y constante de la cadena liviana del LM5 TRA-8 humanizado

El ADN que codifica para la cadena de polipéptido LM5 (ID de Sec. No. 75 del Listado de Secuencias), cada uno de los cuales es una fusión de la región variable de la cadena liviana del TRA-8 anticuerpo anti-DR5 humanizado y la región constante de la cadena liviana Ig humana (cadena k), son sintetizados respectivamente usando combinaciones de PCR.

Adicionalmente a 7AL1P (ID de Sec. No. 47), 7ALCN (ID de Sec. No. 48), MOD1F1 (ID de Sec. No. 78), MOD1R1 (ID de Sec. No. 79), MOD1F22 (ID de Sec. No. 80), MOD1R22 (ID de Sec. No.

81), MOD1F3 (ID de Sec. No. 82), MOD1R3 (ID de Sec. No. 83), MOD1F42 (ID de Sec. No. 84), MOD1R4 (ID de Sec. No. 85), MOD1R52 (ID de Sec. No. 87), MOD1F7 (ID de Sec. No. 90), y LR17 (ID de Sec. No. 101), los siguientes cebadores de oligonucleótidos son sintetizados para PCR:

5'-gggtctggga cagacttcac cctcaccatc tctagtctgc agccggagga ttttgcagat tat-3' (MOD1F52 ; ID de Sec. No. 94)

5'-ttctgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttcggtggag gcaccaaggt ggaaatc-3' (MOD1F63 ; ID de Sec. No. 95)

5'-cgtccgatag ctgctatatt gctgacagaa ataatctgca aaatcctccg GCTGCAG-3' (MOD1R63 ; ID de Sec. No. 96)

5'-gaagatgaag acagatggtg cagccacagt ccgtttgatt tccaccttgg tgcctccacc gaa-3' (MOD1R72 ; ID de Sec. No. 102)

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

El fragmento LM5-ADN que codifica para la secuencia de aminoácido como se define en la ID de Sec. No. 75 del mismo es preparado llevando a cabo 2 etapas PCR, insertado en un vector de plásmido y clonado en *E. coli*.

a) Primera etapa PCR

El fragmento LM5-F51B-ADN que codifica para la región de secuencia de señal de secreción con un sitio de fractura de enzima de restricción Hind III agregado en el extremo 5', FRL_1, $CDRL_1$, FRL_2, $CDRL_2$, FRL_3, $CDRL_3$, FRL_4 y una porción de la región constante es preparado bajo las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

Cebador oligonucleótido MOD1F1, 5 pmol
Cebador oligonucleótido MOD1R1, 5 pmol
Cebador oligonucleótido MOD1F22, 5 pmol
Cebador oligonucleótido MOD1R22, 5 pmol
Cebador oligonucleótido MOD1F3, 5 pmol
Cebador oligonucleótido MOD1R3, 5 pmol

Cebador oligonucleótido MOD1F42, 5 pmol

Cebador oligonucleótido MOD1R4, 5 pmol

Cebador oligonucleótido MOD1F52, 5 pmol

Cebador oligonucleótido MOD1R52, 5 pmol

Cebador oligonucleótido MOD1F63, 5 pmol

Cebador oligonucleótido MOD1R63, 5 pmol

Cebador oligonucleótido MOD1F7, 50 pmol

Cebador oligonucleótido MOD1R72, 5 pmol

Cebador oligonucleótido 7AL1P, 50 pmol

Cebador oligonucleótido LR17, 50 pmol

Coctel de los dNTP, 5 µl

10x amortiguador PCR, 5 µl

ampliTaq ADN polimerasa, 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 usado en PCR.

Condiciones térmicas PCR: Calentar a 90° C durante 2 minutos, después de lo cual un ciclo térmico de 94° C durante 1 minuto, 55° C durante 1 minuto, y 72° C durante 2 minutos,

repetido 30 veces, seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos.

El fragmento LM5-F51C-DNA que codifica para una porción de la región constante con un sitio de fractura de la enzima de restricción Eco R I agregado en el extremo 3' es preparado bajo las siguientes condiciones. Los plásmidos plantilla, pSRPDHH, es obtenido siguiendo la descripción en la solicitud de patente Europea EP 0 909 816 A1.

Composición de la solución de reacción:

ADN del plásmido pSRPDHH, 25 ng
Cebador de oligonucleótido MOD1F7, 50 pmol
Cebador de oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol
Coctel de los dNTP, 5 µl
10x amortiguador PCR, 5 µl
ampliTaq ADN polimerasa, 2.5 unidades

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

Condiciones térmicas PCR: Calentar a 94° C durante 2 minutos, después de lo cual un ciclo térmico de 94° C durante 1 minuto, 55° C durante 1 minuto y 72° C durante 2 minutos, repetido 30 veces, seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos.

Los fragmentos de ADN amplificados después de PCR son separados por electroforesis del gel de poliacrilamida del 5%. El gel después de la electroforesis es marcado con un 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 afeitar.

b) Segunda etapa PCR

LM5-ADN en el cual se describió anteriormente los fragmentos LM5-F51B-ADN y LM5-F51C-ADN que son fusionados se preparó bajo las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

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

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

Cebador de oligonucleótido 7AL1P, 50 pmol

Cebador de oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol

Coctel de los dNTP, 5.0 µl

10x amortiguador PCR, 5.0 µl

ampliTaq ADN polimerasa, 2.5 unidades

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

Condiciones térmicas PCR: Calentar a 94° C durante 2 minutos, después de lo cual un ciclo térmico de 94° C durante 1 minuto, 55° C durante 1 minuto y 72° C durante 2 minutos, repetido 30 veces, seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos.

El fragmento LM5-ADN así preparado es insertado en el plásmido pCR3.1ADN usando el Kit de clonación TA Eucariótico

(In Vitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante y se introduce 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 tipo LM5 son confirmadas por el método dideoxi (Sanger, F.S., et al., (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467) usando el analizador de ADN.

Los plásmidos resultantes se han designado como pCR3.1/LM5-3-42 (el plásmido que porta el cADN que codifica la región variable de la cadena liviana del TRA-8 humanizado tipo LM5 y una región constante de la cadena liviana Ig humana).

El plásmido pCR3.1/LM5-3-42 obtenido que contiene el fragmento LM5-ADN es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

Un μg del ADN del plásmido pHSG399 de clonación es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y luego desfosforilado con CIP. El ADN pHSG399 desfosforilado resultante y el fragmento LM5-ADN, que ha sido digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, son ligados

usando la Versión 2.0 del Kit de Ligación de ADN (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Luego, el E. coli DH5α es transformado con el ADN ligado y esparcido en un medio de LB agar que contiene 0.1 mM IPTG, 0.1% de X-Gal y 50 μg/ml de cloramfenicol (concentraciones finales). Los transformantes blancos obtenidos son cultivados en el medio líquido 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 extraído es digerido con Hind III y EcoR I, y luego un clon que porta el fragmento LM5-ADN es seleccionado por electroforesis de gel de agarosa al 1%.

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

3) Construcción del plásmido pSR/LM5-3-27-1 (plásmido de expresión para la cadena liviana del TRA-8 tipo LM5 humanizado)

El plásmido pHSG/M5-3-27 obtenido que porta un fragmento de fusión de la región variable de la cadena liviana del TRA-8 tipo LM5 y la región constante de la cadena Igk es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

Un μg del plásmido ADN pSRPDHH de clonación (solicitud de patente Europea EP 0 909 816 A1) es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y luego desfosforilado con CIP. El ADN PSRPDHH desfosforilado resultante y el fragmento de ADN Hind III-EcoRI obtenido del pHSG/M5-3-27 son ligados usando la Versión 2.0 del Kit de Ligación de ADN (Takara syuzo, Co. Ltd.). Luego, el *E. coli* DH5α es transformado con el ADN ligado y esparcido en LB agar. Los transformantes obtenidos son cultivados en un medio líquido LB que contiene 100 μg/ml de ampicilina, y el ADN del plásmido es extraído del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS. La inserción y orientación del fragmento de ADN en el vector pSRPDHH es confirmado por el secuenciamiento de ADN usando un analizador de secuencias de gen (ABI Prism 3700 DNA Analyzer; Applied Biosystems).

El plásmido de expresión resultante que porta el cADN que codifica la cadena liviana del TRA-8 humanizado tipo LM5 se ha designado como 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 ID de Sec. No. 76 del Listado de Secuencias, la secuencia del aminoácido de la cadena liviana del TRA-8 tipo quimera, es designado como LM6.

Los plásmidos de expresión que portan este tipo de secuencias de aminoácido de cadena liviana humanizada del TRA-8 anticuerpo DR5 antihumano (tipo LM6) (ID de Sec. No. 75 del Listado de Secuencias) es construido como sigue.

1) Síntesis de los cebadores para preparar las regiones variables y constantes de la cadena liviana del TRA-8 humanizado tipo LM6

El ADN que codifica para la cadena de polipéptido LM6 (ID de Sec. No. 75 del Listado de secuencias), cada uno de los

cuales es una fusión de la región variable de la cadena liviana del TRA-8 anticuerpo anti-DR5 de ratón (tipo LM6) y la región constante de la cadena liviana Ig humana (cadena k), son sintetizados respectivamente usando combinaciones de PCR.

Adicionalmente a 7AL1P (ID de Sec. No. 47) y 7ALCN (ID de Sec. No. 48), los siguientes cebadores de oligonucleótidos son sintetizados para PCR:

5'-tgatgtggac atgaatttgt gagactgggt catcacaatg tcaccagtgg a-3' (HKSPR13; ID de Sec. No. 97);
5'-tgggttccag gctccactgg tgacattgtg atgacccagt ctcacaaatt c-3' (MVF11; ID de Sec. No. 98);
5'-aagacagatg gtgcagccac agcccgtttg atttccagct tggtgcctc-3'; (MVR11; ID de Sec. No. 99); y
5';-aagctggaaa tcaaacgggc tgtggctgca ccatctgtct tcatc-3'; (MCF11; ID de Sec. No. 100).

2) Construcción del plásmido pCR3.1/LM6-1-16 (clonación de la cadena liviana de TRA-8 humanizada tipo LM6)

El fragmento LM6-ADN que codifica para la secuencia de aminoácido como se definió en la ID de Sec. No. 75 del mismo es preparado llevando a cabo 2 etapas PCR, insertado en un vector de plásmido, y clonado en *E. coli*.

a) Primera etapa PCR

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 fractura de la enzima de restricción Hind III en el terminal extremo 5' es preparado bajo las siguientes condiciones. Los plásmidos plantilla, pHSGHM17 y pSRPDHH son obtenidos siguiendo la descripción de una solicitud de patente Europea EP 0 909 816 A1.

Composición de la solución de reacción:

ADN de plásmido pHSGHM17, 25 ng
Cebador de oligonucleótido 7AL1P, 50 pmol
Cebador de oligonucleótido HKSPR13, 50 pmol
Coctel de los dNTP, 5 µl
10x amortiguador PCR, 5 µl

ampliTaq ADN polimerasa (PerkinElmer), 2.5 unidades

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

Condiciones térmicas PCR: Calentar a 94° C durante 2 minutos, después de lo cual un ciclo térmico de 94° C durante 1 minuto, 55° C durante 1 minuto y 72° C durante 2 minutos, repetido 30 veces, seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos.

El fragmento LM6-F2-ADN que codifica para una porción de FRL_1, $CDRL_1$, FRL_2, $CDRL_2$, FRL_3, $CDRL_3$, FRL_4 y una porción de la región constante es preparado bajo las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

ADN de plásmido pL28, 25 ng
Cebador de oligonucleótido MVF11, 50 pmol
Cebador de oligonucleótido MVR12, 50 pmol

853

Coctel de los dNTP, 5 µl

10x amortiguador PCR, 5 µl

ampliTaq ADN polimerasa, 2.5 unidades

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

Condiciones térmicas PCR: Calentar a 94° C durante 2 minutos, después de lo cual un ciclo térmico de 94° C durante 1 minuto, 55° C durante 1 minuto y 72° C durante 2 minutos, repetido 30 veces, seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos.

El fragmento LM6-F3-ADN que codifica para una porción de FRL_4 y la región constante con un sitio de fractura con enzima de restricción EcoR I en el extremo 3' preparado bajo las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

ADN de plásmido pSRPDHH, 25 ng

Cebador de oligonucleótido MCF11, 50 pmol

Cebador de oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol

Coctel de los dNTP, 5 µl

10x amortiguador PCR, 5 µl

ampliTaq ADN polimerasa, 2.5 unidades

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

Condiciones térmicas PCR: Calentar a 94° C durante 2 minutos, después de lo cual un ciclo térmico de 94° C durante 1 minuto, 55° C durante 1 minuto y 72° C durante 2 minutos, repetido 30 veces, seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos.

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

b) Segunda etapa PCR

LM6-ADN en el cual se describió anteriormente los fragmentos LM6-F1-ADN, LM6-F2-ADN y LM6-F3-ADN son fusionados es preparado bajo las condiciones siguientes.

Composición de la solución de reacción:

Framento de gel de LM6-F1-ADN preparado en la primera etapa PCR,
Fragmento de gel de LM6-F2-ADN preparado en la primera etapa PCR,
Fragmento de gel de LM6-F3-ADN preparado en la primera etapa PCR,
Cebador de oligonucleótido 7AL1P, 50 pmol
Cebador de oligonucleótido 7ALCN, 50 pmol
Coctel de los dNTP, 5.0 µl
10x amortiguador PCR, 5.0 µl
ampliTaq ADN polimerasa, 2.5 unidades

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

Condiciones térmicas PCR: Calentar a 94° C durante 2 minutos, después de lo cual un ciclo térmico de 94° C durante 1 minuto, 55° C durante 1 minuto y 72° C durante 2 minutos, repetido 30 veces, seguido por calentamiento a 72° C durante 10 minutos.

El fragmento LM6-ADN así preparado es insertado dentro del plásmido pCR3.1ADN usando el Kit de clonación TA Eucariótico (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 son confirmados por el método dideoxi usando un analizador de ADN.

Los plásmidos resultantes se han designado pCR3.1/LM6-1-16 (el plásmido que porta el cADN que codifica la región variable de la cadena liviana del TRA-8 de ratón y una cadena liviana Ig humana de región constante).

El plásmido obtenido pCR3.1/LM6-1-16 que contiene el fragmento LM6-ADN es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

Un μg del plásmido de ADN pHSG399 de clonación es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y luego desfosforilado con CIP. El ADN pHSG399 desfosforilado resultante y el fragmento LM6-ADN, que ha sido digerido con las enzimas de restricción Hind III-EcoRI son ligados usando la Versión 2.0 del Kit de Ligación de ADN (Takara syuzo, Co. Ltd.). Luego, el *E. coli* DH5α es transformado con el ADN ligado y esparcido sobre un medio de LB agar que contiene 0.1 nm de IPTG, 0.1% de X-Gal y 50 μg/ml de cloramfenicol (concentraciones finales). Los transformantes blancos obtenidos son cultivados en un medio líquido 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 extraído es digerido con Hind III y EcoR I,y luego un clon que porta el fragmento LM6-ADN es seleccionado por electroforesis de gel de agarosa al 1%.

Como resultado del anterior procedimiento, el plásmido pHSG/M6-1-4-1 que porta un fragmento de fusión de la región variable de la cadena liviana del TRA-8 de ratón y la región constante de la cadena Igk humana es obtenido. La cepa de *E. coli* transformante que aloja estos plásmidos, designada como E. coli DH5α/pHSG/M6-1-4-1 fue depositada con el International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japón en Abril 20 del 2001, de acuerdo con el Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos, y se le asignó el número de acceso FERM BP-7566.

3) Construcción del plásmido pSR/LM6-1-4-6 (plásmido de expresión para la cadena liviana del TRA-8 quimera del tipo LM6)

El plásmido pHSG/LM6-1-4-1 obtenido que porta 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 es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

Un μg del plásmido de ADN pSRPDHH de clonación es digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y luego desfosforilado con CIP. El ADN PSRPDHH desfosforilado resultante y el fragmento de ADN Hind III-EcoRI obtenido del pHSG/LM6-1-4-1 son ligados usando la Versión 2.0 del Kit de Ligación de ADN (Takara syuzo, Co. Ltd.). Luego, el *E. coli* DH5α es transformado con el ADN ligado y esparcido sobre un medio de LB agar. Los transformantes obtenidos son cultivados en un medio líquido LB que contiene 100 μg/ml de ampicilina, y el ADN del plásmido es extraído del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS. La inserción y orientación del fragmento de ADN en el vector es confirmada por el secuenciamiento de ADN usando un analizador de secuencias de genes.

El plásmido de expresión resultante que porta el cADN que codifica la cadena liviana del TRA-8 (tipo quimera) se ha designado pSR/LM6-1-4-6.

(5) Producción de diversos tipos de anticuerpos de TRA-8 humanizados o quiméricos

La transfección de las células COS-7 es conducida por los métodos de reactivo de transfección FUGENE6 (Boehringer Mannheim Biochemica) de acuerdo con el manual de instrucción suministrado con el kit.

Las células COS-7 (American Type Culture Collection No. CRL-1651) se hacen crecer hasta semi-confluentes (3 x 10^6 células/plato) en un plato de cultivo (área de cultivo: 57 cm^2; Sumitomo Bakelite) que contiene el medio modificado Modificado Tagle Dulbecco (referido de aquí en adelante como "D-MED"; Gibco BRL) suplementado con 10% de suero de ternero fetal (de aquí en adelante abreviado como "FCS"; Moregate).

Mientras tanto, 10 μg/plato (total 5 platos) del ADN del plásmido de expresión de cadena pesada DR5 humanizado (pHA15-1) y 10 μg/plato del ADN del plásmido de expresión de cadena liviana DR5 humanizado preparado por el método alcalino-SDS y centrifugación con gradiente de densidad de cloruro de cesio son mezclados, y luego precipitados con etanol, seguido por la suspensión en 5 μl/plato de dH_2O.

Después que se ha mezclado 15 µl/plato del reactivo de Transfección FUGENE6 con 180 µl/plato de D-MEM sin FCS, esta solución de FUGENE (185 µl/plato) es mezclada con 5 µl/plato de la solución de ADN que contiene 10 µg/plato del ADN del plásmido de expresión de cadena pesada DR5 humanizado y 10 µg/plato del ADN del plásmido de expresión de cadena liviana DR5 humanizado. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, la suspensión de plásmido obtenida (200 µl) es agregada a los platos de COS-7 preparados previamente. Después de incubar en 5% de CO_2 a 37° C durante 24 horas, el medio de cultivo es cambiado con D-MEM sin FCS. Después de incubar en 5% de CO_2 a 37° C durante 72 horas, el sobrenadante del cultivo es recuperado para purificar los productos de expresión en los fluidos sobrenadantes. Por el método como se describió anteriormente, las células COS-7 son transfectadas con cada una de las siguientes combinaciones de plásmido:

(A): cotransfección de pHA15-1 y pSR/LM1-2 (H1L1)

(B): cotransfección de pHB14-1 y pSR/M2-1 (H2L2)

(C): cotransfección de pHB14-1 y pSR/LM3-3-44-10 (H2L3) (D): cotransfección de pHB14-1 y pSR/LM4-5-3-3 (H2L4)

(E): cotransfección de pHC10-3 y pSR/M2-1 (H3L2)
(F): cotransfección de pHC10-3 y pSR/LM3-3-44-10 (H3L3) (G): cotransfección 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 pML11-1 y pSR/LM6-1-4-6 (Quimera)

El cultivo es entonces centrifugado (3500 r.p.m., 15 minutos) y recolectado el sobrenadante. El sobre nadante es filtrado con un filtro de 0.45 μm (ADVANTEC TOYO DISMIC-25cs, Cat#25CS045 AS). La purificación del IgG de los filtrados se logra usando cromatogrgafía de afinidad de Proteína G-POROS (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones:

Sistema HPLC: BioCAD 700E (Applied Biosystems)
Columna: cartucho sensor de ProteínaG-ID
(tamaño de columna: 2.1 mm ID x 30 mm LD, volumen del lecho: 0.1 ml; Applied Biosystems)
Amortiguador de elusión: glicina-HCl al 0.1 M (pH 2.5)
Amortiguador de neutralización: Tris-HCl al 1 M (pH 8.5)
Detección: 280 nm
Velocidad de flujo: 1 ml/min
Tamaño de fracción: 0.5 ml/0.5 min

Tubo de fracción: microtubo de polipropileno de 1.5 ml

Temperatura: 4° C

Después de que todos los filtrados son aplicados a la columna, 50 ml de PBS (Sigma, Cat#1000-3) es usado para lavar la columna. Cuando el amortiguador de elusión es aplicado, el recolector de fracción se inicia. Cada microtubo de fracción previamente contenía 55 µl de NaCl al 1 M, 110 µl de amortiguador de neutralización y 74 µl de 2 mg/ml de albúmina de suero bovino (Sigma, Cat#A-7030) en PBS. Las fracciones desde No. 7 a No. 8 son recolectadas.

La verificación de la expresión de los anticuerpos humanizados y los ensayos cuantitativos de los productos de expresión en los fluidos sobrenadantes del cultivo preparados se lleva a cabo por ELISA con un anticuerpo contra el IgG antihumano.

A cada pozo de una placa de 96 pozos (MaxiSorp, Nunc), 100 µl de anticuerpo policlonal específico de IgG Fc antihumano de cabra (Kappel) disuelto a concentración final de 0.5 µg/ml en amortiguador de adsorción (hidrogencarbonato de sodio al 0.05

M, 0.02% de azida de sodio, pH 9.6) es agregado y la placa es incubada a 37° C durante 2 horas para causar la adsorción del anticuerpo. Entonces, la placa es lavada, con 350 µl de PBS-T cinco veces. A los pozos después de lavado, el sobrenadante del cultivo diluido con D-MEM que contenía 10% de FCS es agregado e incubado a 37° C durante 2 horas. Después de lavado nuevamente con PBS-T, 100 µl de anticuerpo policlonal específico de IgG Fc antihumano de cabra marcado con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research Lab.) diluido 10,000 veces con PBS-T es agregado a cada pozo e incubado a 37° C durante 2 horas. Después de lavado nuevamente con PBS-T, una solución de sustrato de fosfato de p-nitrofenilo obtenida de Alkaline Phosphatase Substrate kit (Bio Rad) es agregado de acuerdo con el manual de instrucción suministrado con el kit. Después de incubar a 37° C durante 0.5 a 1 hora, la absorbancia a 405 nm es medida. En los experimentos presentes la inmunoglobulina G de plasma humano subclase 1 (IgG1) (Biopure AG) diluida con D-MEM que contiene 10% de FCS hasta ciertas concentraciones es usado como muestras de referencia de concentración de los anticuerpos DR5 humanizados contenidos en los fluidos de sobrenadante del cultivo.

Como un resultado, los productos de expresión y purificados en el sobrenadante de cultivo son detectados específicamente con el anticuerpo IgG antihumano. La concentración final del anticuerpo IgG antihumano es 44.03 μg/ml (H1L1), 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 inductora de apoptosis de los diversos tipos de anticuerpo humanizado o anticuerpo quimérico

Las células Jurkat (ATCC No. TIB-152), son usadas para examinar la actividad inductora de apoptosis del anticuerpo TRA-8 humanizado purificado.

Las células Jurkat cultivadas en un medio de RPMI1640 con 10% de FCS (Gibco BRL) a 37° C durante 3 días en la presencia de 5% de CO_2 son dispensadas en acda pozo de una microplaca de 96 pozos (Sumitomo Bakelite) a 50 μl por pozo. El TRA-8 humanizado preparado en este ejemplo 26 son ajustados para tener la concentración del producto final de interés de 100

ng/ml con el medio RPMI1640 que contiene 10% de FCS por 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 ajustados a 100 ng/ml es usado para producir diluciones seriales por 2 diluciones seriales repetidas con RPMI1640 que contienen 10% de FCS. Cada una de las soluciones de TRA-8 humanizadas diluidas (H1L1, H2L2, H2L3, H2L4, H3L3, H3L4 o H4L5) son agregadas a cada pozo a 50 µl por pozo. Después de hacer reaccionar a 37° C durante 12 horas, 50 µl de 25 µM de PMS que contiene 1 mg/ml de XTT es agregado (concentraciones finales de 250 µg/ml para XTT y 5 µM para PMS). Después de incubar durante 3 horas, la absorbancia a 450 nm de cada pozo es medida para calcular la viabilidad celular usando la habilidad de reducción de la mitocondria como el índice.

La viabilidad de las células en cada pozo es calculada de acuerdo con la siguiente fórmula:

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

En donde "a" es la medida de un pozo de ensayo, "b" es la medida de un pozo sin células y "c" es la medida de un pozo sin anticuerpo agregado.

Como resultado, los anticuerpos humanizados ensayados han demostrado que inducen la apoptosis en células del antígeno DR5 humano que expresa la línea celular del linfoma T.

Adicionalmente, la actividad inductora de apoptosis del TRA-8 humanizado en PC-3 es examinada agregando taxol de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 25.

La línea PC-3 celular de cáncer de próstata humano (ATCC No. CRL-1435) es obtenida del American Tissue Culture Collection (ATCC) y mantenida en la Mezcla de Nutriente F-12K (21127-022, Gibco BRL) que contiene 10% de suero fetal bovino (FBS, Hiclone), 1% de L-Glutamina-200 mM (25030-149, Gibco BRL) y 0.5% de Solución de Penicilina Estreptomicina (P-7539, Sigma). El medio RPMI1640 (MED-008, IWAKI) suplementado con 10% de FBS y 0.5% de la Solución de Penicilina Estreptomicina es usado en el siguiente experimento. Las células PC-3 que crecen exponencialmente son recolectadas por tripsinización y

lavadas doble vez con medio fresco. Las células son entonces contadas, resuspendidas en medio fresco a una densidad de 5 x 10^4 células/ml y distribuidas en triplicado en 96 pozos de placa 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) es diluida en medio fresco y luego agregada a los 96 pozos de la placa que contiene las células a 50 µl/pozo. Las concentraciones finales de dimetilsulfóxido son menores a 0.1%. Después de incubación durante 24 horas a 37° C en CO_2 al 5% en atmósfera, el anticuerpo TRA-8 humanizado (H1L1, H2L2, H2L3, H2L4, H3L2, H3L3, H3L4 o H4L5) diluido en medio fresco es agregado a los pozos. Después de incubación durante 24 horas adicionales, 50 µl de Medio Mínimo Esencial (11095-098, Gibco BRL) que contiene 1 mg/ml de XTT y 25 mM de PMS es agregado a los pozos y las placas son incubadas durante 6 horas. El OD450 es entonces medido por el Contador Multimarca ARVO HTS 1420 (Wallac Berthold) y la viabilidad celular es calculada como sigue.

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

Como un resultado, los anticuerpos humanizados ensayados han demostrado que inducen apoptosis en las células de cáncer de próstata humano que expresan el antígeno DR5 humano.

Ejemplo 27. Producción del Anticuerpo DR4

Una proteína de fusión que contiene el dominio extracelular del DR4 humano (a.a. 1-236) y la porción Fc del IgG1 humano fue expresada en las células Cos-7 transfectadas con un vector adenoviral recombinante. La proteína de fusión fue purificada por la columna de afinidad de proteína A. Ratones Balb/c fueron inmunizados con la proteína de fusión purificada como se describió anteriormente. Un clon de hibridoma , 2E12 (IgG1, k), con el ligado específico al DR4 y la capacidad de inducir apoptosis de las células del linfoma B humano Ramos fue subclonada tres veces. La especificidad de

ligación del 2E12 fue determinada por ELISA y por el análisis Western Blot usando DR5 humano, DcR1 y DcR2 y la proteína de fusión IgG1 como antígenos de control. El ligado de 2E12 a la superficie celular de DR4 fue determinado por el análisis de citometría de flujo de las células Cos-7 transfectadas con el cADN de longitud completa que codifica el DR4 humano. La actividad inductora de apoptosis fue determinada por medio de incubar las células Ramos con 1 μg/ml de 2E12 en la presencia de IgG1 antiratón de cabra. La viabilidad celular fue determinada por el ensayo ATPLite como se describió anteriormente.

Ejemplo 28. Caracterización del Anticuerpo DR4

El anticuerpo monoclonal DR4 (2E12) es específico para el DR4 humano ya que este no liga a otros receptores TRAIL tal como el DR5, DcR1 y DcR2 en ELISA (Figura 19a). El 2E12 reconoció la superficie celular del DR4 como se demostró por el análisis de citometría de flujo de las células Cos-7 transfectadas con DR4 (Figura 19b). El 2E12 fue capaz de inducir apoptosis de las células del linfoma Ramos en la presencia del segundo anticuerpo reticulando de una manera

dependiente de dosis (Figura 19c). El tratamiento in Vitro de las células Ramos con el 2E12 resultó en una activación dependiente del tiempo de caspasa 8, 9 y 3, y fracturas de PARP (Figura 19d). Estos resultados indican que el 2E12 es un anticuerpo anti-DR4 agonístico, que induce apoptosis de una manera dependiente de caspasa.

Usando el anti-DR4 (2E12), seguido por el anticuerpo IgG1 antiratón de cabra conjugado con PE y la citometría de flujo, el anticuerpo DR4 se mostró que se liga a las células de una línea celular de fibrosarcoma (Hs 913T) y varias líneas celulares de cáncer de pecho (2LMP.MDA-MB231, y MCA-MB 453), pero mostró poca o ningún ligado a las líneas celular de fibroblasto de piel humana normal (Malme-3).

Ejemplo 29. Actividad Tumoricidal de los anticuerpos DR4

La actividad tumoricidal del 2E12 fue ensayada usando modelos de tumor de cáncer de pecho. Ratones desnudos fueron inoculados *s.c.* con líneas de células de cáncer de pecho humano, 2LMP. El tratamiento con dosis *i.p.* de 200 µg de 2E12 ocurrió en el día 7, 10, 14, 17, 21 y 24 después de la

872

inyección de las células de tumor. Los animales recibieron adriamicina *i.v* (doxorubicina) (6 mg/kg) en los días 8, 12 y 16. El tratamiento con 2E12 y adriamicina (Figura 20) produjo una mayor inhibición de crecimiento del tumor que cualquiera de los 2E12 o adriamicina solos.

La actividad tumoricidal del TRA-8 en combinación con el 2E12 fue ensayada usando los mismos modelos de tumor de cáncer de pecho. El tratamiento con las dosis *i.p* de 200 µg de TRA-8 y 2E12 ocurrió en los días 7, 10, 14, 17, 21, y 24 después de la inyección de las células de tumor. Los animales recibieron adrimicina *i.v* (6mg/kg) en los días 8, 12, y 16. El tratamiento con TRA-8 más 2E12, o TRA-8 m{as 2E12 y adriamicina produjo entre 88% y 100% de regresión de tumor completo, respectivamente. (Figura 21.)

Ejemplo 30. Actividad tumoricidal de los anticuerpos DR4/DR5 en combinación con otras terapias

(1) Líneas de Células y Reactivos

873

El subclon 2LMP de la línea de células de cáncer de pecho humano MDA-MB-231, el subclon LCC6 del MDA-MB-435, y el subclon DY36T2 del MDA-MB-361 fueron obtenidos del Dr. MARC Lipmann (Georgetown University, Washington, D.C.) y mantenido en MEM suplementado mejorado con 10% de FBS (Hyclone, Logan, UT). El MDA -MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-468, Bt-474, SK-BR-3, y ZR-75-1G de las líneas de células de cáncer de pecho humano fueron obtenidas del American Type Culture Collection (Manassas, VA). La células MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-468, se hicieron crecer en DMEM suplementado con vitamina MEM, aminoácidos no esenciales MEM, 1 mM de piruvato de sodio y 10 % de FBS. Las células Bt-474 se hicieron crecer en RPMI 1640 suplementado con 10 µg/ml de insulina, 4,5 g/l de glucosa, 10mM de HEPES, 1 nM de piruvato de sodio y 10% de FBS. Las células SK-BR-3 se hicieron crecer en un medio McCoy con 15% de FBS. ZR-75-1 las células ZR-75-1 se hicieron crecer en el medio F12K de Ham con 20% de FbS. Todas las líneas de células fueron mantenidas en un medio libre de antibiótico hasta 37° C en una atmósfera de CO2 al 5% y rutinariamente tamizados para la contaminación de micoplasma.

El mAb del TRA-8 (IgG1) purificado fue producido a UAB y también suministrado por Sankyo Co., Ltd (Tokyo, Japan). Los anticuerpos de control IgG1 anti-ratón de cabra conjugado con ficodeeritrina y IgG1 específico de isotipo fueron obtenidos de Southern Biotechnología Associates (Birmingham Hospital Pharmacy (Birmingham, AL). la adriamicina paclitaxel fueron comprados de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) y fueron preparadas como soluciones de partida de 10 mM en H_2O destilado o DMSO, respectivamente. Para los estudios del animal la formulación química de la paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Co., Princeton, NJ) fueron obtenidos de la universidad de Alabama en el Birmingham Hospital Pharmacy (Birmingham, AL). esta preparación fue diluida 1:5 en PBS inmediatamente antes de uso.

(2) Inmunofluorescencia Indirecta y Análisis de Citometría de Flujo de la Expresión DR5

Las células en fase de crecimiento exponencial fueron lavadas una vez con PBS de Dulbecco (Ca2 + y Mg2 + deficiente) y cosechadas con 4 mM EDTA/0,5% de KCl a 37° C. las células fueron recolectas por centrifucación a 4° C durante 5 min a

1.000 rpm, lavadas una vez y resuspendida en PBS que contenía 1 % de de BSA y 0,01% de azida de sodio (amortiguador FACS) a 4° C. las células fueron encubadas con 10 µg/ml de TRA-8 purificado o un anticuerpo de control IgG1 específico isotipo durante 60 min a 4° C, lavado una vez con amortiguador, entonces encubado con 10 gµ/ml del IgG1 anti-ratón de cabra conjugado con PE durante 20 min a 4° C. después de marcar el anticuerpo, la c{elulas fueron lavadas una vez con amortiguador de FACS y fijadas en paraformaldehido a 1% durante 15 min sobre hielo. Las muestras fueron analizadas en un FACScan (San José, CA) y los datos fueron analizados usando el software CellQuest.

(3) Ensayos de viabilidad celular usando ATPLite

Las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en un medio de cultivo completo. 1000 células por pozo fueron plateadas en placas de 96 pozos negros óptimamente claros (Costar #3904, Corning, NY) e incubadas durante la noche a 73° C antes iniciar los tratamientos. Las drogas y anticuerpos fueron diluidos en el medio de cultivo inmediatamente antes

876

del uso, y la concentración final del DMSO fue siempre menor o igual a 0,001%. La viabilidad celular fue lograda después de 24 horas de exposición al TRA-8 solo. Para los tratamiento de combinación con drogas citotóxicas, las células fueron pretratadas con la droga durante 24 horas antes de agregar el anticuerpo, e incubadas durante 24 horas adicionales antes de lograr la viabilidad celular por medio de medir los niveles de ATP celular usando el ensayo con base en luminiscencia ATPLite (Packard Instruments, Meriden, CT). El protocolo recomendado por el fabricante fue seguido con la excepción de que todos los volúmenes de reacción (medios de cultivo y reactivo) fueron reducidos a la mitad. Todas las muestras fueron ensayadas en triplicado y son reportadas como promedio ± SSE de un mínimo de tres experimentos independientes.

(4) Estudios de terapia de TRA-8 solo o en combinación con quimioterapia o radiación en xenoinjertos de cáncer de pecho que son portados en ratones desnudos atímicos

Ratones desnudos atímicos fueron inyectados s.c. con 3 x 107 2LMP de células. Después de 7 días de inyección de las células de tumor, 200 0 600 µg (10 o 30 mg/kg) de TRA-8 se

admnistró i.p. seguido por cinco inyecciones adicionales en los días 10, 14, 17, 21 y 24. el crecimiento de los tumores fue monitoreado durante el tiempo. En estudios subsecuentes, los tumores 2LMP s.c. fueron inyectados i.p. con 200 µg de TRA-8 en los días 7, 10, 14, 17, 21, y 24 solo o en combinación con adriamicina (6 mg/kg i.v., en los días 8, 12, y 16) o paclitaxel (20 mg/kg i.p., y en los días 8, 12,16, 20, y 24). El tamaño del tumor y las ratas de regresión fueron determinadas. En adición, un estudio fue llevado a cabo con TRA-8 y adriamicina usando el mismo régimen descrito anteriormente en combinación con irradiación 3 $Gy^{60}Co$ de xenoinjertos 2LMP en los días 9 y 17.

(5) Análisis de apoptosis en xenoinjertos

Ratones desnudos atímicos fueron inyectados s.c. con 3 x 107 2LMP de células en el día 0 recibieron 100 µg de TRA-8 i.p. en los días 7 y 10. los grupos de dos ratones cada uno recibieron adriamicina (3 mg/kg) en los días 8 y 11, paclitaxel (10 mg/kg) en los días 8 y 11, o la combinación de TRA-8 y adriamicina o paclitaxel con la misma dosis y

horario. Un grupo de ratones no fue tratado. Los Xenoinjertos fueron disectados para el estudio de apoptosis en el día 14 después de la inyección de la célula de tumor. La razón para la reducción sustancial en la intensidad del tratamiento comparado con nuestro protocolo de tratamiento estándar era de permitir tejido tumoral adecuado para el análisis en el día 14. el ensayo túnel para apoptosis en xenoinjertos de tumor fue llevado a cabo como sigue. Secciones de parafina de 5 micrones de tejido fueron montadas en placas Superfrost/Plus y calentadas a 58° C durante una hora. Las secciones de tejido fueron desparafinizadas en tres cambios de xileno y rehidratadas con un cambio de etanol absoluto, etanol al 95%, y etanol al 70%, cada uno en incrementos de 5 min. entonces, las secciones fueron colocadas en tris-salina amortiguada (tris base al 0,5 M, NaCl al 0,15 M, 0,0002% de Tritón X-100, pH 7,6). Los núcleos apotóticos fueron detectados usando un kit de Apop Tag Peroxidase (Intergen, Parchase, NY). La proteinasa K (20 µg/ml en H_2O destilada desionizada) fue agregada a los especimenes de tejido e incubada a temperatura ambiente durante 15 min. Las peroxidasas endovenosas fueron calmadas con una solución acuosa de 3% de peróxido de hidrógeno durante 5 min. Las

secciones fueron tratadas con un amortiguador de equilibrio durante 30 min y luego incubadas con el TdT/enzima (diluido en mezcla dereacciònmarcada) durante 1 h a 37° C usando cubiertas para película. Durante esta incubación, la enzima TdT se ligó a los extremos 3'-OH de los fragmentos de ADN y catalizó la adición de deoxinucleótidos digoxingénicos marcados y no marcados. Los controles negativos fueron incubados con H_2O destilada (diluidos en mezcla dereacción marcada) en lugar de la enzima TdT. Un amortiguador de detención fue agregado durante 10 min a temperatura ambiente para terminar la reacción de marcado. Un conjugado anti-digoxigenino fue agregado a cada placadurante 30 min. El cromagen 3,3' DAB fue usado para visualizar el extremo 3' OH marcado de los fragmentos de ADN. Las placas fueron entonces enjuagadas en agua desionizada y contramarcads ligeramente con hematoxilina, deshidratadas usando alcoholes graduados y xileno y cubiertas selladamente usando Permount. Aproximadamente 10 campos aleatorios fueron evaluados para el porcentaje de túnel marcado y porcentaje de cuerpos apoptóticos marcados intensamente por todo el tejido.

(6) Análisis Estadístico

(A) Análisis de la Interacción TRA-8 con la Citotoxicidad de Droga Invitro

Los datos de citotoxicidad fueron evaluados para lograr si los efectos de la combinación citotóxica eran aditivos, menos que aditivos (antagonísticos), o más que aditivos (sinergísticos). Las relaciones de respuesta de dosis para los agentes solos y en combinación fueron modelados usando un segundo modelo de respuesta de superficie de segundo orden con términos lineales, cuadráticos e interacción para cada una de las nueve líneas celulares (Montgomery, D.C. Design and Análisis of Experiments, New York: Willey, 2001), como se recomendó por Gennings (en el ensayo para drogas/interacciones químicas: definiciones e interferencia, pp.457-468, 2000). Un término de interacción significativo fue clasificado y sea que hubiera dependencia sinergística o antagonística en si el término de interacción era negativo con citotoxicidad más que aditiva, o positivo con citotoxicidad menos que aditiva. Si el término de interacción no era significativo, entonces la relación entre el TRA-8 y la adriamicina o el TRA-8 y el paclitaxel sería considerado

aditivo, siempre que los términos aditivos fueran significantes.

(B) Análisis de la Terapia de TRA-8, Quimioterapia, Radiación y Terapia de Combinación de Experimentos Animales Individuales

Los datos de 6 experimentos independientes fueron analizados por experimentos individuales. Las combinaciones de tratamiento fueron comparadas con respecto a eficacia anti-tumor in vivo, es decir, la inhibición del crecimiento de tumor, que fue medida como tres puntos de extremo; extensión del tumor de doble vez, porcentaje de regresiones de tumor, y ratas de crecimiento en el tiempo. El número real de días en el cual el tumor dobló en su área superficial (producto de dos diámetros) con relación a la línea base en 7 días después de la inyección de la célula tumoral fue usado en el análisis de tiempo de doblado. El ensayo no paramétrico Kruskal-Wallis fue usado como comparaciones del tiempo doble del tumor medio entre tratamientos. El ensayo exacto de Fisher fue usado para comparar las proporciones de las regresiones de tumor y las regresiones libres de relapso a través de grupos de

tratamiento. Para determinar si cualquiera de las terapias de combinación produjo inhibición sinergística significativa de crecimiento de tumor, es decir, más que aditivo, las curvas de crecimiento desde las medidas de área serial fueron comparadas usando un modelo mezclado lineal durante las tres primeras semanas después de iniciada la terapia (Lindsay, J.K. Models for Repeated Measurements, pp. 100-142, Oxford, 1993). Para ensayar los efectos sinergísticos de las terapias de combinación, un término de interacción fue incluido en el modelo. Si el término interacción era significativo y el efecto fue la inhibición del crecimiento a una rata mayor que la adición entonces la interacción se consideraba sinergística.

(C) Agregado de Efectos de Terapia

Un total de 166 animales, 10 grupos de tratamiento y 6 experimentos independientes fueron incluidos en el análisis agregado. Las combinaciones de tratamiento fueron comparadas con respecto a eficacia antitumor in vivo. El doblado del tumor medio fueron analizados usando el ensayo Kruskal-Wallis y el ensayo exacto de Fisher fue usado para comparar las

proporciones de las regresiones de tumor y las regresiones libres de relapso a través de grupos de tratamiento.

Todos los análisis estadísticos fueron conducidos usando SAS® (Sas/Stat User's Guide, SAS OnlineDoc, Versión 8, Cary NC: SAS Institute Inc., 1999).

(6) Expresión de DR5 y citotoxicidad inducida por el TRA-8 en líneas de células de cáncer de pecho

Como se ilustró en la figura 22A, todas las nueve líneas de células de cáncer de pecho fueron positivas en DR5 con grados variables de expresión desde fuertemente positivo (LCC6 y MDA-MB-453) a débilmente positivo (MDA-MB-468 y SK-BR-3). La figura 22B ilustra la citotoxicidad inducida del TRA-8 de las nueve líneas de células. 4 líneas de células fueron sensibles a la citotoxicidad inducida por el TRA-8 con concentraciones IC_{50} de 17 a 299 ng/ml (LCC6, 2LMP, MDA-MB-231, MDA-MB-468), mientras que las otras fueron bastantes resistentes (DY36T2, BT-474, MDA-MB-453). No hubo una buena correlación de la expresión del DR5 y grado de citotoxicidad inducida de TRA-8

como se ilustró por las líneas celulares MDA-MB-453 y MDA-MB-468.

Los efectos de TRA-8 en citotoxicidad inducida por quimioterapia fueron entonces examinados con adriamicina (figura 23[a]) y paclitaxel (figura 23B). Un análisis para ensayar la interacción entre el anticuerpo y los efectos de la droga se resume en la tabla 5. No hubo interacciones sinergísticas significativas entre el TRA-8 y el paclitaxel, con la mayoría de las interacciones siendo aditivas. Cuatro de las nueve líneas celulares cumplieron el criterio para una interacción sinergística entre el TRA-8 y la adriamicina. La línea celular 2LMP demostró buena sensibilidad al TRA-8, lo mismo que sensibilidad sea a la adriamicina o al paclitaxel. Esta línea celular fue escogida para explorar in vivo la eficacia del anticuerpo y/o de las drogas.

Tabla 5. Efectos de Interacción In Vitro para tratamientos de combinación

	TRA-8 + Adriamicina		TRA-8 + Paclitaxel	
Línea celular	Interacción	Valor[a] p	Interacción	Valor[a] p

885

LCC6	Sinergístico	<0,001	Aditivo	0,624
MDA-MB-453	Sinergístico	<0,001	No hay Respuesta[c]	0,615
2LMP	Aditivo	0,153	Aditivo	0,937
MDA-MB-231	Aditivo	0,663	Aditivo	0,064
BT-474	Sinergístico	<0,001	ND[b]	0,992
ZR-75-1	Sinergístico	0,013	Aditivo	0,172
DY36T2	ND[b]	0,808	ND[b]	0,798
MDA-MB-468	Aditivo	0,814	Aditivo	0,724
SK-BR-3	Aditivo	0,361	No hay Respuesta[c]	0,871

[a] el valor p se refiere a la significancia del término de interacción sinergística. Si ambos TRA-8 y los efectos de la droga fueron significativos y el término de interacción fue significativo, entonces los efectos de la combinación se consideraron sinergísticos. Si el valor p de la interacción no es menor de 0,05 entonces los efectos de combinación fueron considerados aditivos.

[b] no se determinó porque el efecto del TRA-8 no era significativo pero el efecto de la adriamicina/paclitaxel

fue significativo.

[c] no hubo una respuesta a la dosis significativa para ningún agente.

(7) Efectos antitumor in vivo del TRA-8 solo oen combinación con quimioterapia y/o radiación

El TRA-8 a dosis de 200 µg y 600 µg doble vez una semana para 6 dosis produjo una inhibición similar del crecimiento de tumor para los tumores de 2LMP s.c. bien establecidos (figura 24). En tres experimentos independientes adicionales, la dosis de 200 µg/programación produjo inhibición estadísticamente significativa del crecimiento del tumor ($p<0,004$, ensayo Kruskal-Wallis), en tumor de crecimiento doble comparado con controles no tratados y esta dosis y programación fue seleccionada para estudios adicionales. La figura 25 ilustra los efectos del TRA-8, adriamicina, o una combinación de TRA-8 y adriamicina en eficacia antitumor. Como se comparó con controles no tratados, la terapia con TRA-8 sola o TRA-8 más adriamicina produjo una inhibición significativa del crecimiento del tumor ($p = 0,002$ ensayo

Kruskal-Wallis), mientras que la adriamicina no difirió de los controles. La combinación de TRA-8 más adriamicina produjo una inhibición de crecimiento mayor que cualquiera de los agentes solos (p = 0,002), lo mismo que unas regresiones significativamente más completas del tumor (4) que cualquier agente solo en donde las regresiones completas no fueron vistas (p < 0,001, ensayo exacto de Fisher). El sinergismo in vivo del TRA-8 y la adriamicina fue evaluado usando un análisis de curva de crecimiento temprana. El término de interacción fue significativo (p < 0,001) y sinergístico. La interacción sinergística fue corroborada en un segundo experimento independientemente.

Los efectos del TRA-8 y el paclitaxel fueron estudiados en este mismo modelo con observaciones similares (figura 26). Comparado con controles no tratados, el TRA-8 y el TRA-8 más paclitaxel produjeron inhibición significativa de crecimiento de tumor (p < 0,001, ensayo Kruskal-Wallis). El crecimiento del tumor en animales tratados con TRA-8 más paclitaxel fue significativamente diferente que el paclitaxel solo (p = 0,008) y produjo 3/8 regresiones completas cuando se compararon a ninguna por los agentes solos. El análisis de

las curvas de crecimiento de tumor temprano demostraron que los efectos sinergísticos eran cercanamente significativos (p = 0,063) mientras que los efectos aditivos fueron significativos (p < 0,001).

Finalmente, los efectos de TRA-8, adriamicina, y radiación ^{60}CO fueron analizados como agentes únicos y en barias combinaciones como se ilustró en la figura 27. hubo diferencias significativas generales con respecto al doblado de los tumores (p < 0,001) y comparaciones múltiples indicaron que la triple terapia con TRA-8, adriamicina, y ^{60}CO produjo inhibición del crecimiento de tumor que fue significativamente diferente que todos los otros grupos tratados, aunque ambos grupos de terapia duales (adriamicina más TRA-8 o ^{60}co más TRA-8 fueron diferentes que el grupo de agentes únicos (p < 0,001). Los ^{60}CO animales tratados con radiación solamente no difiere de poscontroles no tratados (p = 0,926). Todas las combinaciones de tratamiento de doble vía tenían efectos sinergísticos significativos (p < 0,001). Las regresiones fueron vistas en 6/8 animales que recibieron la terapia triple y cuatro animales que no tenían recurrencia de tumor durante 180 días del seguimiento.

(8) Análisis agregado de efectos de terapia.

Los estudios antitumor in vivo fueron comprendidos en 166 animales, y el doblado de los tumores y la frecuencia de la regresión de tumor completa para todos los animales en cada grupo de tratamiento fue analizado (tabla 6). El análisis ANOVA para el doblado medio de tumor diferencias significativas entre los grupos de tratamiento ($p < 0,01$), con comparaciones múltiples que produjeron que el TRA-8 más paclitaxel, TRA-8 más adriamicina, y TRA-8 más adriamicina más ^{60}CO tenían un doblado de tumor medio significativamente más largo que cualquier grupo de tratamiento que careciera del TRA-8. La adición del TRA-8 a cualquier modalidad de tratamiento produjo un tiempo de doblado más largo que la modalidad sola. Similarmente, el ensayo Kruskal-Wallis en el tiempo medio del doblado de tumor resultó en que las medias fueron significativamente diferentes en general ($p < 0,001$). Comparaciones inteligentes de pares usando ensayos de rankeo firmado Wilcoxin produjo patrones similares para el tiempo medio del doblado de tumor como en las comparaciones múltiples ANOVA. Este análisis subestimó la inhibición de

crecimiento producida por el tratamiento más efectivo en aquellos grupos que no alcanzaron un doblado del tumor para el final del experimento y fueron asignados como el día de terminación del experimento. La tabla 6 también suministra la frecuencia de la regresión completa de tumor y la frecuencia de la persistencia en que la regresión al final del experimento. No hubo regresiones completas de tumor vistas en animales tratados sea con régimen de quimioterapia o radiación atestiguando el crecimiento de tumor bien establecido y la agresividad del tumor. Del ensayo exacto de Fisher, hubo diferencias significativas en la frecuencia de las regresiones completas de tumor entre los grupos de tratamiento ($p < 0,001$). 30 de 166 animales lograron regresión completa, y 28 de estos recibieron TRA-8 solo o en combinación con otras modalidades. La regresión completa ocurrió en 1/42 animales de control: 1/54 animales recibieron quimioterapia, radiación, o una combinación; y 28/68 de DRA-8 solo o TRA-8 en regimenes de combinación. Los grupos tratados con TRA-8 tenían una frecuencia significativamente mayor ($p < 0,001$) de regresión completa. Similarmente, 14/68 animales recibieron TRA-8 o TRA-8 en combinación no tuvieron un recrecimiento del tumor comparado 1/42 controles y 0/52

animales tratados con quimioterapia y/o radiación. Las regresiones de relapso libre tuvieron periodos de observación de 99 a 171 días (146 ± 24 días).

Tabla 6. Resultados del agregado del tiempo de doblado y regresión completa de los tumores 2LMP

Tratamiento	# de Animales	Tiempo de doblado de tumor (días) (medio/ mediano)	Regresiones Completas Total (%)	Regresiones Completas Sin relapso (%)	Periodo Observación media (días)
Controles no tratados	44(42)[a]	12/8	1(2%)	1(2%)	177
^{60}CO	8(7)	14/10	0	0	186
Adriamicina	31(28)	17/18	0	0	197
Paclitaxel	7(5)	25/20	0	0	-
Adriamicina + ^{60}CO	8(8)	39/36	1(13%)	0	197
TRA-8	30(26)	47/23	6(20%)	5(17%)	159
TRA-8 +	8(8)	65/50	3(38%)	1(13%)	186

^{60}CO					
TRA-8 + paclitaxel	8(8)	71/62	3(38%)	1(13%)	148
TRA-8 + adriamicina	14(12)	81/64	10(71%)	3(21%)	185
TRA-8 + adriamicina + ^{60}CO	8(6)	<140/179	6(75%)	4(50%)	192

[a] Los números en paréntesis son el número de animales no censados.

(9) Apoptosis en Tumores Tratados

La inducción de la apoptosis en xenoinjertos de 2LMP luego del tratamiento con TRA-8, adriamicina, paclitaxel, TRA-8 más adriamicina, y TRA-8 más paclitaxel fue logrado usando la técnica túnel. En los animales no tratados, los tumores tenían 4% de células marcadas (1% intenso), mientras que el tratamiento con adriamicina o paclitaxel tenía 8% (6% intenso) y 7% (2% itenso) de células marcadas. Los animales tratados con TRA-8 solo tenían un golpe de apoptosis con 25% (15% intenso) de las células marcadas. El TRA-8 más

adriamicina tuvo un 28% (22% intenso) y TRA-8 más paclitaxel tenía 26% más (12% intenso) de células marcadas.

Cualquier patentes o publicaciones mencionadas en la especificación son indicativas del nivel de aquellas muertes en la técnica a las cuales la invención pertenece. Estas patentes y publicaciones se incorporan aquí como referencia al grado mismo de que si publicaciones individuales fueran específicamente individualmente indicadas, incorporadas por referencia.

La presente invención no está limitada en alcance por aquellos depósitos o modalidades anteriormente referenciadas descritas en los ejemplos que solo tienen el propósito de ser ilustraciones de unos pocos aspectos de la invención y cualesquier modalidades que sean equivalentes funcionalmente están dentro del alcance de esta invención. Varias modificaciones de la invención en adición a aquellas mostradas y descritas aquí serán evidentes por aquellos versados en la técnica y tienen el propósito de caer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Referencias

1. 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

2. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM Science 1997 APR 4; 276 (5309): 111-3

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

4. MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, FERNANDES-ALNEMRI T, Cohen GM, Alnemri ES. J Biol Chem 1997 Oct 10; 272 (41): 25417-20.

5. Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. Immunity 1997 Dec; 7 (6): 813-20

6. Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. Immunity 1997 DEC ; 7 (6): 821-30

7. Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, Kataoka T, Holler N, Tschopp J. Immunity 1997 Dec; 7 (6): 831-6

8. 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

9. 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

10. Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. Science 1997 Aug 8; 277 (5327): 815-818

11. 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

12. 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

13. 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

14. Gazitt Y. Leukemia 1999 NOV ; 13 (11) : 1817-24

15. Rieger J, Naumann U, Glaser T, Ashkenazi A, Weller M. FEBS Lett 1998 May 1; 427 (1) : 124-8

16. Jeremias I, Herr I, Boehler T, Debatin KM. Eur J Immunol 1998 Jan; 28 (1) : 143- 52

17. 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

18. Phillips TA, Ni J, Pan G, Ruben SM, Wei YF, Pace JL, Hunt JS. J Immunol 1999 May 15; 162 (10): 6053-9

19. 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

20. Johnsen AC, Haux J, Steinkjer B, Nonstad U, EGEBERG K, Sundan A, Ashkenazi A, Espevik T. Cytokine 1999 Sep; 11 (9): 664-72

21. Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B. J Exp Med 1998 Dec 21; 188 (12): 2375-80

22. Fanger NA, Maliszewski CR, Schooley K, Griffith TS. J Exp Med 1999 Oct 18; 190 (8): 1155-64

23. Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR, Fanger NA. J Exp Med 1999 Apr 19; 189 (8): 1343-54

24. Griffith TS, Rauch CT, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Lynch DH, Smith CA, Goodwin RG, Kubin MZ. J. Immunology 1999 162: 2597-2605

25. Albani S and Carson DA, 1997 Arthritis and allied conditions, a textbook of rheumatology, 13"EDITION, volume 2,979-992.

26. 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.

27. 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.

28. 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

29. 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

30. Arai T, Akiyama Y, Okabe S, Saito K, IWAI T, Yuasa Y. Cancer Lett 1998 Nov 27; 133 (2): 197-204

31. 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

32. Pai SI, Wu GS, Ozoren N, Wu L, Jen J, Sidransky D, El-Deiry WS. 1998 Cancer Res Aug 15 ; 58 (16): 3513-3518

33. MANIATIS ET AL. , 1982, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, COLD SPRING Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

34. SCHROFF ET AL. , 1985 CANCER RES. , 45,879-885.

35. YELTON, D. E., ET AL., 1978 CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, 81,1-7

36. KOHLER, G., ET AL., 1976 EUROPEAN J. IMMUNOLOGY, 6,511-519

37. SHULMAN, M., ET AL. , 1978 NATURE, 276.269-270

38. KEARNEY, J. F., ET AL. , 1979 J. IMMUNOLOGY, 123,1548-1550

39. HORIBATA, K. AND HARRIS, A. W., 1975 NATURE, 256,495-497

40. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishinan, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, and Ashkenazi A, 1997 Science, 277,818-821.

41. Cheng J et al., 1994 Science, 263,1759-1762

42. BENDELE AM ET AL., 1999 CLIN EXP RHEUMATOL, 17 (5), 553-560

43. 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.

44. Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, Kataoka T, Holler N, TSCHOPP J., 1997 Immunity Dec; 7 (6): 831-836.

45. Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J, and Budd RC. 1999 J. Exp. Med. 1891- 1896.

46. Miller-Ladner U, Gay RE, and Gay S, 1997 Arthritis and allied conditions, a textbook of rheumatology, 13TH edition, Volume 1, 243-254.

902

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende (a) un anticuerpo que se enlaza específicamente a un receptor de DR5 de TRAIL, en donde dicho anticuerpo, en su forma soluble, tiene actividad de inducción de apoptosis in vivo e in vitro en células blanco que expresan DR5 y (b) uno o más agentes terapéuticos.

2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente o agentes terapéuticos son seleccionados del grupo que consisite de agentes quimioterapéuticos, miembros de la familia de TNF, agentes anti-inflamatorios, agentes anti-virales, anti-retrovirales, anti-oportunistas, antibióticos, agentes inmunosupresores inmunoglobulinas, agentes antimalaria, medicamentos anti-reumáticos que modifican enfermedad, citoquininas, quimioquinas, factores de crecimiento, y segundos anticuerpos que promueven la apoptosis o bloquea la proliferación de las células blanco.

3. La composición de acuerdo con la revindicación 1, que además comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente terapéutico es bisindolilmaleimida VIII (Bis VIII), SN-50 o LY294002.

5. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en dionde el agente o agentes terapéuticos son seleccionados del grupo de quimioterapéuticos que consisten de bleomicina, carboplatina, clorambucil, cisplatina, colchicina, ciclofosfamida, daunorubicina, actinomicina, dietilestilbestrol, doxorubicina, etoposida, 5-fluorouracilo, floxuridina, melfalan, metotrexato, mitomicina, 6-mercaptopurina, tenipopsida, 6-tioguanina, vincristina y vinblastina.

6. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el agente o agentes terapéuticos son seleccionados del grupo de

quimioterapéuticos que consiste de leflunomida, dactinomicina, tamoxifen, interferon α-2b, ácido glutámico, plicamicina, mercaptopurina, 6-tioguaninina, carmustina, BCNU, lomustina, CCNU, citosina arabosida, estramustina, hidroxiurea, procarbazina, busulfano, medroxiprogesterona, fosfato de sodio estramustina, etinil estradiol, estradiol, acetato de megestrol, metiltestosterona, difosfato de dietilstilbestrol, clorotrianisina, testolactona, mefalen, clorambucil, mecloretamina, tiotepa, fosfato de sodio de betametasona, dicarbazina, asparaginasa, mirotano, sulfato de vincristina, y sulfato de vinblastina.

COLO 13529 841 003 0
DLM/ID-00000014/WPC13529

905

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 04051012 00000001 Folios: 388
Fecha (AMD): 2004-06-02 16:44:28
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 329 COMPLEMEN
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 41,102
FECHA : MAYO 25 DE 2004

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	22156878	25/05/2004	49,398,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	30005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	87,000.00
		TOTAL : $	87,000.00

SON: OCHENTA Y SIETE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

C.C.b B529-841-003-0

384

906

2020
Bogotá D C

Doctor(a)
EMILIO FERRERO.
Apoderado(a)

Oficio N° 05617

ASUNTO:

Radicación N°	04-51012
Solicitud internacional	PCT/US02/34420
Fecha inicio fase nacional	01/06/2004
Trámite	011
Evento	379
Actuación	416
Oficio N°	
Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k) Decisión 486).

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, 16 JUL. 2004
202051