Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

P. C. T.

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

04051012.

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 04051012

54. **TÍTULO** Combinaciones de Anticuerpos Selectivos para Receptor de Ligando que induce a Apoptosis Relacionada con factor de Necrosis Tumoral y otros Agentes terapeuticos.

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** C 12 N

71. **SOLICITANTE** UAB Research foundation.

DIRECCIÓN Birmingham, Alabama, Estados Unidos de Amér

74. **APODERADO** Emilio Ferrero Código Nº 1092

22. **BOGOTÁ, D. C.,** _____

(FORMA IP-100)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 04051012 00000000 Folios: 533
Fecha (AMD): 2004-06-01 17:36:20
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 **SOLICITUD DE:**

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.

2 **SOLICITANTE (71)**

Nombre: **UAB RESEARCH FOUNDATION** sociedad constituida y existente bajo las leyes del estado de Alabama, Estados Unidos de América
Dirección: 701 South 20th Street, Suite 1120G, Birmingham, Alabama 35294, Estados Unidos de América
Domicilio: Birmingham, Alabama, Estados Unidos de América

IDENTIFICACION
C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐ Cual_____
Número: _____

3 **REPRESENTANTE O APODERADO**

Nombre: EMILIO FERRERO
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax:: 217 92 11
E-mail: clientes@camyp.com.
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACION
C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐ Cual_____
Número: 438.019 T.P. 31.929

4 **INVENTOR (ES) (72)**

1. **Tong ZHOU**
332 West Stonebrook Place,
Birmingham, Alabama 35226,
Estados Unidos de América

2. **Kimihisa ICHIKAWA**
1-3-42-205, Teraya, Tsurumi-ku,
Yokohama-shi, Kanagawa-ken 230-0015,
Japón

3. **Robert P. KIMBERLY**
2045 Magnolia Ridge,
Birmingham, Alabama 35243,
Estados Unidos de América

4. **William J. KOOPMAN**
187 Wildwood Avenue,
Indian Springs, Alabama 35124,
Estados Unidos de América

5. **Jun OSHUMI**
21-38, Edahigashi-2-chome, Tuduki-ku,
Yokohama-shi, Kanagawa-ken 224-0006,
Japón

6. **Albert F. LOBUGLIO**
2204 Tanglewood Road,
Birmingham, Alabama 35216,
Estados Unidos de América

7. **Donald J. BUCHSBAUM**
140 Windwood Circle,
Montevallo, Alabama 35115,
Estados Unidos de América

5 **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US02/34420 Fecha: 25 de octubre de 2002

Publicación Interancional No. WO 03/038043 A2 Fecha: 08 de mayo de 2003

6 **Título (54)**

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

7 **Clasificación Internacional (51)** C12N

8

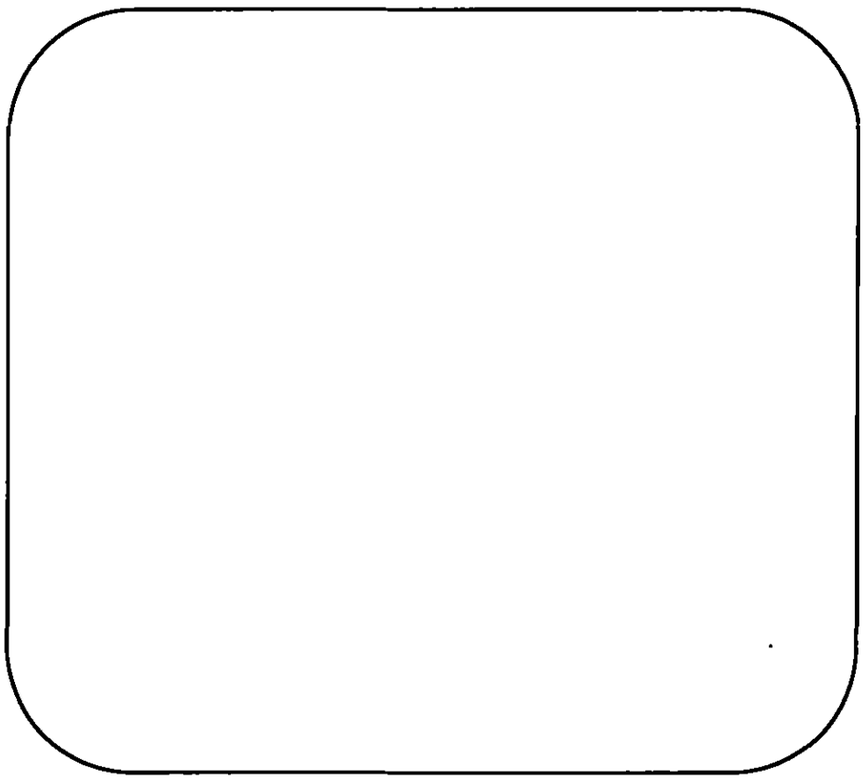
Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	US	01 de noviembre de 2001	60/346.402
	US	24 de junio de 2002	60/391.478

9 **Comprobante de pago No.:** 04 - 39.306 **Fecha:** 17 de mayo de 2004

10 **Anexos:**

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 422.000.oo.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

11 **FIGURA CARACTERISTICA:**



12 **Solicito la concesión de la patente,** **NOMBRE:** EMILIO FERRERO

FIRMA :

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DLM

D

18529
9480

STATE OF ALABAMA

OFFICE OF THE SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*

This public document

2. has been signed by Carol E Mayes

3. acting in the capacity of Notary Public

4. bears the seal/stamp of Carol E Mayes

State of Alabama

CERTIFIED

5. at Montgomery, Alabama

6. the 28TH day of February 2003

7. by Secretary of State, State of Alabama 8. No. 2003-0969

9. Seal/Stamp

10. Signature

CONSUL NOTARIO OCTAVO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE ME TUVIDO A LA VISTA

28 MAY 2004

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA NOTARIO

Nancy L. Worley Secretary of State

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, 8 - COLOMBIA

181

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned
UAB Research Foundation
domiciliado (s) en/or AB1120G, 1530 3rd Avenue South
Birmingham, Alabama 35294-0111 U.S.A., hereby ratify the
Patent application No. 02.108.186 filed on November 28, 2002, by Emilio Ferrero, and

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.
Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso- administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4a N° 72 35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said [illegible] before any authorities or persons, with or without jurisdiction, especially those administrative, administrative-contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits

[illegible] 26 MAY 2004

estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

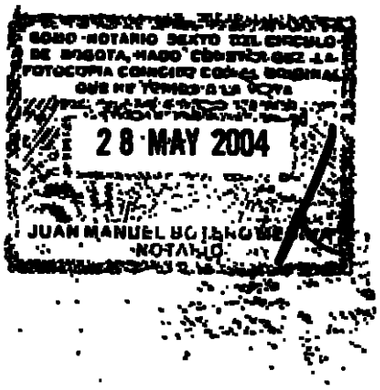
instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this X 12th of February 2003 (Date)

(Place) en/in X Birmingham, Alabama

(Print name) por/by X LUCY C. HICKS

Firma X [signature] Signature



CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____ de 200___ ante mí, Notario Público o Funcionario Autorizado de _____ compareció(eron) personalmente _____

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es) tiene(n) capacidad legal para otorgarlo

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this _____ day of _____ 200___ before me, a Notary Public or Attesting Official of _____ personally appeared _____

to me known, and known to me to be the person(s) who executed that foregoing document, and who has(have) legal capacity to execute it.

_____ Notario Público o Funcionario Autorizado –Notary Public or Attesting Oficial _____

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy 12 de febrero de 200 3
Compareció(eron) ante mí
LUCY C. HICKS
quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en representación de la Sociedad/compañía denominada THE UAB RESEARCH FOUNDATION

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

Los Artículos de Constitución de THE UAB RESEARCH FOUNDATION fechados el 12 de enero de 1987

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que THE UAB RESEARCH FOUNDATION

es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de 1 Estado de Alabama Estados Unidos

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es 1120 G Admin Bldg,701 20 stS. Birmingham, Alabama 35294-0111 Estados Unidos

2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) LUCY C. HICKS está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad Birmingham

Estado Alabama

Hoy 12 de febrero de 200 3

X NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 12th day of February 2003 appeared before me
LUCY C. HICKS
who(m) I know personally and who(m) signed this document as representative(s) of the Corporation/Company named
THE UAB RESEARCH FOUNDATION

I certify:

1. That I have seen the following documents:*
X THE ARTICLES OF INCORPORATION OF THE UAB RESEARCH FOUNDATION DATED JANUARY 12, 1987
2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That X THE UAB RESEARCH FOUNDATION is a Corporation/Company legally constituted and in existence in accordance with the laws of the State of Alabama, USA

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is
X 1120 G Admin Bldg, 701 20th Street S. Birmingham, Alabama 35294-0111 USA

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) _____ is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

City BIRMINGHAM

State ALABAMA

This 12TH day of FEBRUARY 2003

_____ Notario Público o Funcionario Autorizado – Notary Public or Attesting Oficial Carol E. Mayes

CAROL E. MAYES
MY COMMISSION EXPIRES JUNE 20, 2003

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

* Documents must be identified with date and origin

© CAVELIER ABOGADOS
WPPODE01-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)

CAF & Accel. Foundation
COLD [illegible]

0302106

APOSTILLE

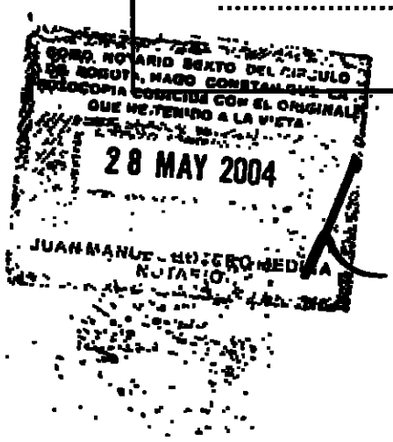
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: .....
   This public document
2. has been signed by .....
3. acting in the capacity of .....
4. bears the seal/stamp of .....

Certified

5. at ..... 6. the .....
7. by .....
8. No. .....
9. Seal/stamp 10. Signature

....

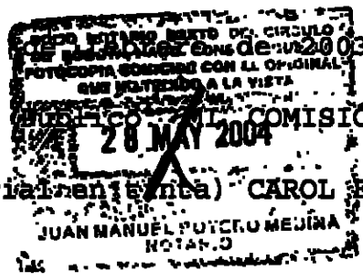


TRADUCCIÓN OFICIAL No. 32.03/03 preparada por María Elvira Martelo, traductora oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante Resolución No. 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento de Poder y Representación escrito en inglés y español, por el cual **UAB RESEARCH FOUNDATION**, domiciliada en AB1120G, 1530 3rd. Avenue South, Birmingham, Alabama 35294-0111, Estados Unidos, **ratifica** la solicitud de patente No. 02.108.186 presentada el 28 de noviembre de 2002 por Emilio Ferrero y otorga poder a **EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y GERMAN CAVELIER:**

Dado y firmado el 12 de febrero de 2003 en Birmingham, Alabama, por Lucy C. Hicks. (Firma ilegible).

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y español referente a la existencia legal de **UAB RESEARCH FOUNDATION**. Dado en la ciudad de Birmingham, Estado de Alabama, el 12 de febrero de 2003. (Firma ilegible) Carol E. Mayes, Notario Público. MI COMISIÓN EXPIRA EL 20 de junio DE 2003. (Sello notarial en tinta) CAROL E. MAYES, NOTARIO PÚBLICO. ESTADO DE ALABAMA.



APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. Ha sido firmado por Carol E. Mayes

3. Actuando en su capacidad de Notario Público

4. Lleva el sello/timbre de Carol E. Mayes, Estado de Alabama

CERTIFICADO

5. en Montgomery, Alabama

6. el 28 de febrero de 2003

7. Por: Secretario de Estado, Estado de Alabama

8. No. 2003-0969

9. Sello: Gran Sello, Alabama

10. Firma: (Firma) Nancy L. Worley, Secretario de Estado

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

COLO 13529-841-001-4

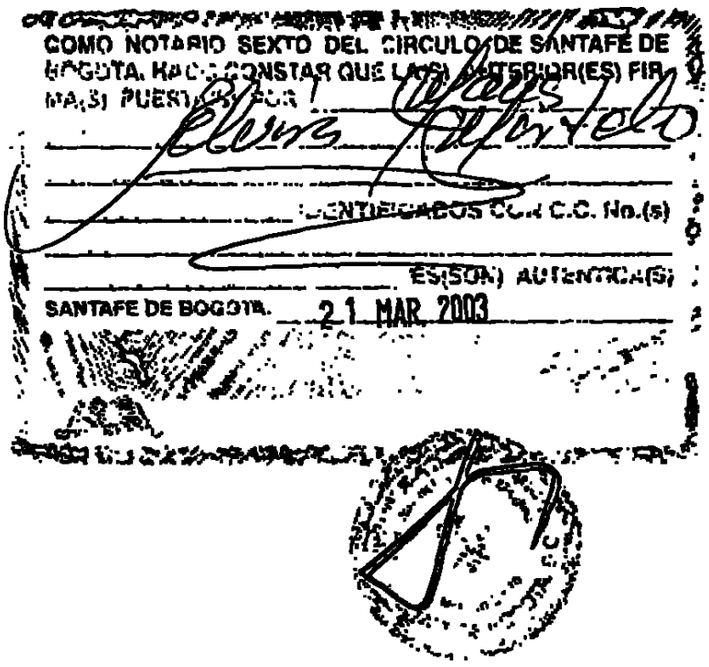
WPC 13529 - ID 5

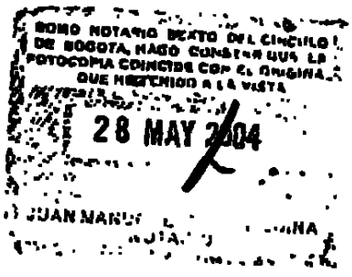
MAR 21/03

María E. Martelo.
TRADUCCION No.: 32.03/03
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

DECIMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CONCUERDA CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
28 MAY 2003


NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2003 MAR 21 P 12:50
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
209972
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS


COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIR
MA(S) PUESTA(S) POR
IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)
ES(SON) AUTENTICA(S)
SANTAFE DE BOGOTA. 21 MAR 2003


SEXTO NOTARIO DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HEMOS TENIDO A LA VISTA
28 MAY 2004
JUAN MANU

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
8 May 2003 (08.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/038043 A2

(51) International Patent Classification⁷: C12N

(21) International Application Number: PCT/US02/34420

(22) International Filing Date: 25 October 2002 (25.10.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/346,402 1 November 2001 (01.11.2001) US
60/391,478 24 June 2002 (24.06.2002) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: UAB RESEARCH FOUNDATION [US/US]; Suite 1120G, 701 South 20th Street, Birmingham, AL 35294 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: ZHOU, Tong [CH/US]; 332 West Stonebrook Place, Birmingham, AL 35226 (US). ICHIKAWA, Kimihisa [JP/JP]; 1-3-42-205, Terava, Tsurumi-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken 230-0015 (JP). KIMBERLY, Robert, P. [US/US]; 2045 Magnolia Ridge, Birmingham, AL 35243 (US). KOOPMAN, William, J. [US/US]; 187 Wildwood Avenue, Indian Springs, AL 35124 (US). OSHUMI, Jun [JP/JP]; 21-38, Edahigashi-2-chome, Tuduki-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken 224-0006 (JP). LOBUGLIO, Albert, F. [US/US]; 2204 Tanglewood Road, Birmingham, AL 35216 (US). BUCHSBAUM, Donald, J. [US/US]; 140 Windwood Circle, Montevallo, Alabama 35115 (US).

(74) Agents: MCKEON, Tina, Williams et al.; Needle & Rosenberg, P.C., The Candler Building, 127 Peachtree Street, N.E., Atlanta, GA 30303-1811 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: COMBINATIONS OF ANTIBODIES SELECTIVE FOR A TUMOR NECROSIS FACTOR-RELATED APOPTOSIS-INDUCING LIGAND RECEPTOR AND OTHER THERAPEUTIC AGENTS

(57) Abstract: An antibody of the invention interacts with human DR5 or with human DR4 to produce agonistic or antagonistic effects downstream of the receptor including inhibition of cell proliferation and apoptosis. Methods and uses for the antibodies, optionally in combination with various therapeutic agents, are detailed, including treatment of apoptosis-related disease and treatment of dysregulated cell growth.

WO 03/038043 A2

COMBINATIONS OF ANTIBODIES SELECTIVE FOR A TUMOR NECROSIS FACTOR-RELATED APOPTOSIS-INDUCING LIGAND RECEPTOR AND OTHER THERAPEUTIC AGENTS

Acknowledgements

This application claims the benefit of U.S. Provisional Application Number 60/391,478, filed June 24, 2002, and U.S. Provisional Application Number 60/346,402, filed on November 1, 2001, and claims priority to PCT/US01/14151, filed May 2001, which is currently pending. PCT/US01/14151 claims the benefit of U.S. Provisional Application Number 60/201,344, filed May 2, 2000. The applications to which the present application claims benefit are herein incorporated by reference in their entirety.

This invention was made with government support under Grant NCI P50 CA 89019-01 awarded by the National Cancer Institute and under NIH R03-AR44982 awarded by the National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases. The government has certain rights in the invention.

Field of the Invention

The present invention relates to an antibody capable of specifically binding a single type of tumor necrosis factor (hereinafter referred to as "TNF")-related apoptosis-inducing ligand (hereinafter referred to as "TRAIL") receptor, more particularly, to a monoclonal antibody that induces apoptosis in *in vivo* and in *vitro* cells expressing the single type receptor and therapies based thereon.

Background of the Invention

TRAIL is a member of the TNF family of proteins, which also includes TNF-α and Fas ligand (1). These proteins are potent inducers of apoptosis. To date, five receptors for TRAIL have been identified, two of which, DR4 (TRAIL-R1) and DR5 (TRAIL-R2) (2-7), are capable of transducing the apoptosis signal while the other three DcR1 (TRAIL-R3), DcR2 (TRAIL-R4), and osteoprotegerin (OPG) do not transduce the apoptosis signal (8-12). All five receptors for TRAIL share significant homology in their extracellular ligand binding domains. Similar to Fas

and TNF receptor I (hereinafter referred to as "TNFRI"), the intracellular segments of both DR4 and DR5 contain a death domain, and transduce an apoptosis signal through a pathway that involves the Fas-associated death domain protein (hereinafter referred to as "FADD") and caspase 8 (6,7). In addition to transducing the apoptosis signal, the DR4 and DR5 receptors can also activate a pathway involving NFκb (6,7).

The biological functions of TRAIL that have been demonstrated include the capability of TRAIL to selectively induce apoptosis of transformed tumor cells, with normal cells being relatively resistant to TRAIL-mediated apoptosis (13-15). This selectivity suggests that, in contrast to Fas ligand, the administration of TRAIL is associated with very low levels of toxicity as demonstrated by systemic administration of TRAIL in an animal model without inducing significant toxicity (13). Thus, TRAIL has been proposed as a potent apoptosis inducing agent that would be a suitable therapeutic agent for the treatment of cancer and other diseases associated with abnormal cell proliferation. TRAIL also has been proposed to be a potent apoptosis-inducing agent that would be suitable for the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. It has been demonstrated that TRAIL-mediated apoptosis is involved in activation-induced cell death of T cells, thereby serving as an alternative mechanism to Fas ligand (16,17). TRAIL-mediated apoptosis may also function in the induction of apoptosis of T cells and other inflammatory cells (18), and plays a role in the killing activity of NK cells (19-21), and in the immunomodulatory function of dendritic cells (22,23). Thus, TRAIL-mediated apoptosis may also function in immunoprivilege and immunosurveillance.

The TRAIL receptor system is complex, and includes at least two death receptors, DR4 and DR5, and at least two non-apoptotic receptors, DcR1 and DcR2. All of these receptors not only share a high amino acid sequence homology, but also exhibit a similar binding affinity to TRAIL (2-12). The ability of the DcR1 and DcR2 receptors to compete for binding of TRAIL without inducing apoptosis suggests that they may act as decoy receptors that block or modulate the activity of

the TRAIL ligand. Moreover, it has been reported that untransformed cells express higher levels of decoy receptors than do transformed cells. Thus, it has been proposed that the differential modulation of the expression of the death and decoy receptors may represent a key regulatory mechanism that determines the susceptibility of cells to TRAIL-mediated apoptosis, but due to the lack of receptor-specific antibodies (2). Although the expression and function of DR4 and DR5 have been studied extensively, progress has been impeded by the lack of receptor-specific monoclonal antibodies. The cell surface expression of DR5 has not been documented. It has been reported that a panel of anti-TRAIL receptor antibodies have been generated that are capable of inducing apoptosis of melanoma cells *in vitro* but only upon immobilization of the antibodies, to promote cross-linking, and, in some cases, the cells require culturing with actinomycin D (24). Several anti-DR5 antibodies have been generated (24). However, these previously generated anti-DR5 monoclonal antibodies have low apoptosis-inducing activity *in vitro*, even under the conditions of crosslinking. No *in vivo* activity has been reported. These antibodies have not been used for examining cell surface expression of TRAIL receptors (24). Thus, there exists a need for a mopoclonal antibody selective for each specific TRAIL receptor that is not only able to bind to cell surface receptor but also to strongly induce apoptosis of various types of abnormal cells, including tumor cells, both *in vivo* and *vitro* without the requirement for crosslinking or immobilization. Such an antibody would not only provide potential therapeutic agent but also a diagnostic tool for functional analysis of TRAIL receptor. There exists a particular need for an antibody specific against each of the death inducing receptors DR4 and DR5.

In the development, or progression, of many diseases it is often the case that cells are not deleted. In many autoimmune diseases and inflammatory conditions, the surviving activated cells attack normal tissues or cells. Further, progression of tumorigenesis and the proliferative panus formation of rheumatoid arthritis are characterized by the unchecked proliferation of cells. Thus, insufficient apoptosis

leads to the development of disease, and the uses of apoptosis-inducing ligand or agonistic monoclonal antibody to enhance apoptosis are considered as a potential therapeutic strategy for eliminating those unwanted cells.

For example, rheumatoid arthritis (hereinafter referred to as "RA") is a common human autoimmune disease. The current understanding of the pathophysiology of RA is that autoimmune T cells and B cells initiate an inflammatory response in the joints, which drives hyperproliferation of the synoviocytes. As a consequence of the hyperproliferation of synovial cells, metalloproteinases (hereinafter referred to as "MMPs") are over-produced, which further leads to the erosive destruction of the cartilage and bone that is characteristic of RA (25). Thus, the control of hyperproliferation of inflammatory synovial cells is a key step in the treatment of RA. The molecular mechanisms leading to the hyperproliferation of synovial cells are still unknown. Although the hyperproliferative synovial cells are non-malignant and non-transformed, many studies have suggested that they share some common features with transformed cells (46). These cells, the so-called, "transformed-appearing synoviocytes", are characterized by a dense rough endoplasmic reticulum, numerous irregular nuclei, and changes in the normally spindle-shaped cell skeleton. It has been proposed that the incorporation of the oncogenes and virus-derived genes might be the primary triggers for the transformed appearance of RA synovial cells (46).

At least two aspects of RA suggest that dysregulated apoptosis may contribute to the disease process and that therapeutic elicitation of apoptosis may be an effective treatment: the failure of the deletion of the activated T cells suggests that there is defective activation-induced cell death of these T cells, which is a process that involves Fas-mediated apoptosis and TRAIL-mediated apoptosis, and the hyperproliferative nature of the RA synovial cells is a contributing factor in the later stages of RA pathophysiology. Indeed, it has been shown that the administration of anti-Fas antibody into the inflammatory joint inhibits the development of chronic arthritis in *tax* transgenic mice, which are an animal model

for human RA (26). Moreover, localized transduction with the *fas ligand* gene by an adenoviral vector is effective in prevention of collagen-induced arthritis (27). Inhibition of the proliferation of inflammatory synovial cells by enhancement of Fas-mediated apoptosis is observed in both cases. Although Fas ligand is a strong apoptosis inducer in RA synovial cells, the application of Fas ligand-mediated apoptosis as a therapy for humans has been limited by lethal liver toxicity. Thus, TRAIL receptor induced apoptosis represents a safer and more effective therapeutic for the treatment of RA than Fas-ligand induced apoptosis.

TRAIL receptor induced apoptosis also represents a safer and more effective therapeutic for the treatment of cancer than Fas-ligand induced apoptosis. TRAIL-mediated apoptosis is known to specifically induce apoptosis of transformed tumor cells without affecting normal cells. It has been shown that the systemic administration of the trimerized soluble TRAIL did not cause toxicity in experimental animals yet was able to induce regression of implanted tumors (13,28). Its potential as an adjunctive therapy for traditional treatments was underscored by the recent finding that the expression of DR5 and susceptibility to TRAIL-induced apoptosis of breast cancer cells is enhanced by the radiation, suggesting that combined with radiation, the efficiency of TRAIL would be increased in cancer therapy (29).

In addition, the gene encoding the TRAIL receptor DR5 has been mapped to chromosome 8p21-22, loci with a high frequency of mutation in some cancer cells (30). It has been reported that at least two kinds of tumor cells, small lung cancer (31) and head and neck cancer (32) exhibit mutations in the death domain of the DR5 gene. Thus, there exists a need for an anti-DR5 antibody in cancer research to determine the effect of receptor epitope variation on the development and progression of cancers. Further, the functionality of TRAIL receptor mutations would prove a useful clinical diagnostic tool when used in conjunction with other biomarkers in the early detection of cancers and as a predictor of the tumor aggressiveness.

Summary of the Invention

In one embodiment, the invention relates to an antibody which recognizes a TRAIL receptor DR5 and which induces apoptosis in a DR5-expressing cell *in vivo* or *in vitro*. Further disclosed is an antibody that recognizes DR5 but not DR4, DcR1, or DcR2. Specifically detailed is a monoclonal antibody to DR5 produced by a hybridoma.

In another embodiment, the invention relates to an antibody which recognizes a TRAIL receptor DR4 and which induces apoptosis in a DR4-expressing cell *in vivo* or *in vitro*. Further disclosed is an antibody that recognizes DR4 but not DR5, DcR1, or DcR2. Specifically detailed is a monoclonal antibody to DR4 produced by a hybridoma.

A method provided is induction of apoptosis in target cells or inhibition of target cell proliferation by contacting a cell with a therapeutic quantity of an antibody capable of binding to DR5 or DR4. In various embodiments of the method, the apoptosis can be induced or the cell proliferation inhibited by contacting the target cells with antibodies against other death receptors.

Also disclosed is a pharmacological composition that includes a therapeutic amount of monoclonal antibody active against a DR5, a pharmaceutically acceptable carrier and, optionally, a container enclosing the antibody and the carrier. Further provided by the invention is the use of an antibody recognizing DR5 or an antibody recognizing DR4 for preparing a therapeutic for selective apoptosis of abnormal or dysregulated cells.

An antibody of the present invention interacts with a tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand receptor such as DR4, DR5, DrR1, DrR2 and OPG, inducing apoptosis in a cell expressing such a receptor. Disclosed is an antibody of the invention capable of selectively binding an agonistic or antagonistic tumor necrosis factor ligand receptor epitope.

The present invention provides a treatment for an apoptosis related disease, cancer, inflammatory disease, or an autoimmune disease by a method that includes

contacting a target tissue having the disease to a therapeutic quantity of an antibody of the invention, singly or in combination with other apoptosis inducing antibodies, and/or other therapeutic agents or treatments.

Further described is a fusion protein that includes an antigenic TRAIL receptor amino acid sequence having at least ten bases, coupled to an immunoglobulin protein or fragment thereof capable of eliciting an immune response within a subject.

The present invention provides a method of gene therapy in which a target cell is transfected with a TRAIL receptor nucleic acid sequence in an expression vector so that the TRAIL receptor is expressed on the target cell. The target cell is then exposed to an antibody that selectively binds the TRAIL receptor.

Provided are nucleic acid sequences and amino acid sequences encoding the heavy and light chain immunoglobulins of an antibody selective for DR5. Sequences are also provided for an antibody that selectively binds DR4. Also detailed are vectors that include a nucleic acid sequence of the invention and host cells transformed with a vector of the invention.

The present invention provides a humanized DR5 antibody (e.g.,TRA-8) and a humanized DR4 (e.g., 2E12), as well as a transfected cell producing the humanized DR5 antibody and a transfected cell producing the humanized DR4 antibody.

A process for producing a humanized DR5 antibody or DR4 antibody is described in which a host is transformed with nucleic acid sequences encoding a humanized immunoglobulin light chain and a humanized immunoglobulin heavy chain after which the transformed host is incubated for a predetermined period of time.

Also described is a process for inducing apoptosis in target cells or for inhibiting cell proliferation that includes contacting a target cell with a pharmaceutically effective amount of a humanized DR5 antibody, a humanized DR4 antibody, or a combination of a DR5 antibody and an antibody to another death

receptor(e.g., an antibody to DR4), in the presence or absence of other therapeutic agents and treatments.

A commercial kit is provided for inducing apoptosis that includes a humanized TRA-8 antibody selective for DR5 or a humanized antibody for DR4 (e.g., humanized 2E12), packaged in a suitable container, and optionally with instructions for use.

Brief Description of the Drawings

Figure 1. Characterization of TRA-8. (a.) Binding specificity of TRA-8: Western blot analysis (upper panel): Recombinant fusion proteins of the TNFR family probed with TRA-8 or anti-human IgG. Lane 1: DR5/hIgG1 fusion protein (immunogen); Lane 2: DR4/hIgG1 (TRAIL-R1); Lane 3: DR5/hIgG1; Lane 4: TRAIL-R3 (DcR-1)/hIgG1; Lane 5: TRAIL-R4 (DcR-2)/hIgG1; Lane 6, CD95/hIgG1; Lane 7: soluble TNFRI. ELISA analysis (lower panel): The well numbers match those of the Western blot except well 8 which is a murine DR5/hIgG1 fusion protein. (b.) Binding activity of soluble TRAIL and TRA-8 to DR5 and DR4: ELISA plates were coated with DR5/hIgG1 (left panel) or DR4/hIgG1 (middle panel) and then incubated with TRAIL or TRA-8. (c.) Flow cytometry analysis of the surface expression of DR5. Cos-7 cells transfected with pcDNA3 expression vector containing the full-length DR5 cDNA (solid histogram), DR4 cDNA (open histogram, solid line) or empty vector (open histogram, dashed line). Forty-eight hours after transfection, cells were stained with TRA-8 followed by PE-conjugated anti-mouse IgG1. (d.) in situ immunohistochemistry reactivity for DR5: Cytospin slides of Cos-7 cells transfected with DR5 expression or control vector were stained with TRA-8 at 48 hours after transfection, (e.) Killing activity of TRA-8: Jurkat cells were incubated with the indicated concentrations of TRA-8. Cell viability was determined by ATPLite, MTT, and PI exclusion assays after overnight culture. The results of ATPLite and MTT assays are presented as percent of medium control, and PI assay are presented as percent of PI negative cells (f.)

Western blot analysis of caspase activation: Jurkat cells were incubated with 500 ng/ml TRA-8 for indicated time. Cell lysates were separated by 15% SDS-PAGE, blotted, and probed with anti-caspase antibodies. The arrows indicate the cleaved subunits of each caspase. g. Caspase inhibition assay: Jurkat cells were incubated with 50 ng/ml TRA-8 overnight in the presence of various concentrations of indicated caspase inhibitors. Cell viability was determined by the ATPLite assay.

Figure 2. Cell surface expression of DR5 and susceptibility to DR5-mediated apoptosis. Normal T and B cells, freshly isolated from peripheral blood, T cell (a and a′), glioma (b and b′), prostate cancer cell (c) and B cell (d) cell lines were incubated with TRA-8 or murine IgG1 isotype control antibody followed by PE-conjugated goat anti-mouse IgG1. The open histograms represent the isotype control antibody control while the solid histograms represent TRA-8 staining. Apoptosis was determined by the ATPLite assay after overnight incubation with soluble TRAIL (open circles) or TRA-8 (closed circles) as shown in a, b′ and d.

Figure 3a′ T cell line U937 was incubated with TRA-8 or murine IgG1 isotype control antibody. Apoptosis was determined by the ATPLite assay after overnight incubation with soluble TRAIL (open circles) or TRA-8 (closed circles).

Figure 3 Glioma (b) and prostate cancer (c) cell lines were incubated with TRA-8 or murine IgG1 isotype control antibody. Apoptosis was determined by the ATPLite assay after overnight incubation with soluble TRAIL (open circles) or TRA-8 (closed circles)

Figure 4 is a series of graphs showing cell viability for human Jurkat cells after exposure to indicated concentrations of (A) antibody strains TRA-1, -8 and -10 and (B) TRAIL in the presence of a fixed concentration of the inventive antibody strains depicted in Figure 4A;

Figure 5. Expression of DR5 in normal and cancer tissues: Normal and cancer tissue homogenates were probed with TRA-8 and developed by chemiluminescence. (a.) Western blot analysis of DR5 protein in normal tissues: lane 1: liver, lane 2: brain, lane 3: lung, lane 4: kidney, lane 5: spleen, lane 6: testes.

Lane 7: ovary, lane 8: heart, lane 9: pancreas. b. Western blot analysis of DR5 protein in cancer tissues. The cancer tissue blot containing cancers from the ovary (lane 1), lung (lane 2), liver (lane 3), rectum (lane 4), cervix (lane 5), skin (lane 6), testes (lane 7), thyroid (lane 8), uterus (lane 10), stomach (lane 11), laryngopharynx (lane 12), and pancreas (lane 13) was probed. *In situ* immunohistochemistry of normal human tissues(c.) and of cancer tissues (d.). Frozen sections were immunostained with TRA-8.

Figure 6. Tumoricidal activity of TRA-8. SCID mice were inoculated subcutaneously with 1321N1 cells. Mice were injected intravenously with a single dose of 100 μg TRA-8 on the second day after tumor inoculation (a.), or with three doses of 100 μg TRA-8 beginning 7 days after tumor inoculation (b). Tumor growth was determined by the weight and examined histologically with H&E staining. The photographs show viable tumor growth in control mice but not in TRA-8 treated mice (c., upper panel), and H&E staining of tumor (c., lower panel). SCID mice were injected intravenously with 10^6 Jurkat cells and treated with a single dose of TRA-8 on the second day after injection. Seven days later, spleen cells were harvested, stained with anti-human CD3 antibody and analyzed by flow cytometry (d.), or by immunohistochemistry (e).

Figure 7 shows expression of cell surface DR5 in RA (A) and OA (B) synovial cells. 1 X 10^6 primary cultured synovial cells were stained with affinity-purified TRA-8 and followed by PE-conjugated goat anti-mouse IgG1 antibody. 10,000 viable cells analyzed by FACSvantage.

Figure 8 is a series of graphs showing cell viability as a function of TRAIL and TRA-8 concentration induced apoptosis of representative strains of RA (A) and OA (B) synovial cells with various concentrations of the recombinant soluble TRAIL (the open circles) or affinity-purified TRA-8 (the closed circles). Cell viability is the percentage of the cpm of treated cells versus the cpm of untreated cells.

Figure 9 is a series of graphs showing the caspase dependence of DR5-mediated apoptosis of RA synovial cells. RA synovial cells (RA512) are incubated with 50 ng/ml of soluble Fas ligand (open squares), anti-Fas antibody (CH-11) (closed squares), soluble TRAIL (open circles), or anti-DR5 antibody (TRA-8) (closed circles) in the presence of variable concentrations of caspase inhibitors. After overnight culture, cell viability is determined by ATPLite.

Figure 10A is an electrophoretic gel-shift assay indicating NFkb activation. RA1016 cells are incubated with 20 ng/ml TNF-a, 50 ng/ml soluble TRAIL or 50 ng/ml TRA-8 for indicated time points before being subjected to electrophoresis. Figures 10B and C are graphs showing the production of MMP-1 and MMP-3. 1 X 10^6/ml of indicated RA synovial cells are incubated with the indicated concentrations of TNF-a (the open circles), TRAIL (the open triangles) or TRA-8 (the closed circle). After overnight culture, the culture supernatants are collected. The levels of MMPs in culture supernatants are determined by ELISA.

Figure 11. TRA-8 does not induce hepatocellular toxicity. (a.) Normal liver tissues do not express DR5. The paraffin sections of two normal liver tissues, one hepatocellular carcinoma tissue, and the cytospin preparation of HepG2 cells were prepared for H&E staining, and corresponding frozen sections were stained with TRA-8. (b.) Flow cytometry analysis of cell surface expression of DR5. Hepatocytes, isolated from two normal liver tissues and from a case of hepatocellular carcinoma tissue, and HepG2 cells were stained with TRA-8, anti-Fas antibody (DX2) or an isotype control antibody. The solid histograms indicate TRA-8 or DX2 staining, and the open histograms are the corresponding isotype controls.

Figure 12. TRAIL but not TRA-8 induces hepatocellular toxicity. Fresh normal human hepatocytes were maintained in Hepatocyte Culture Medium. (a.) Apoptosis of hepatocytes was induced with 1 μg/ml soluble TRAIL plus crosslinker or TRA-8 for the indicated time points. Cell viability was determined by ATPLite. The results are presented as percent viable cells compared to the medium control. The shaded bars indicate TRAIL and the black bars indicate TRA-8. (b.) The

condensed nuclei of hepatocytes were stained with Hoechst 33352 and analyzed by flow cytometry. (c.) Effect of cycloheximide on hepatocytes apoptosis. Hepatocytes were cultured in control medium or with 1 μg/ml TRAIL or TRA-8 in the presence (closed bars) or absence (open bars) of 1 μg/ml cycloheximide for 8 hours. Cell viability was determined by ATPLite. The results are presented as mean±SEM of triplicate cultures of two experiments. d. A comparison of the susceptibility of normal hepatocytes to DR5 and Fas-mediated apoptosis. Freshly isolated hepatocytes were incubated with indicated concentrations of soluble TRAIL, TRA-8, soluble FasL or the anti-Fas mAb CH11 for 6 hours. Cell viability was determined by ATPLite assay. The results are presented as the percentage of viable cells compared to medium control. For normal hepatocytes, the mean ± SEM of four normal individuals is presented. The results of hepatocellular carcinoma cells from one patient and HepG2 cells are presented as the average of triplicate cultures.

Figure 13. TRAIL induces hepatitis. B6 mice were intravenously inoculated with 10^9 pfu of adenoviral vector encoding the full length of human TRAIL under the control of the "Tet-on" transcriptional element. TRAIL expression was induced by the indicated dose of tetracycline. (a.) Northern blot analysis of human TRAIL expression in the liver. 24 hours after inoculation of vector and induction with tetracycline, total RNA was isolated from the livers and probed with human TRAIL cDNA or β-actin. (b.) Serum levels of AST. 24 hours after transduction of TRAIL, serum levels of AST were determined. (c.) TRAIL-mediated cell death of adenoviral vector infected hepatocytes: B6 mice were intravenously inoculated with tetracycline-inducible adenoviral vector. 48 hours after inoculation, hepatocytes from inoculated and non-inoculated control mice were isolated and incubated with indicated concentrations of TRAIL for 8 hours (left panel). Cell viability of hepatocytes was determined by the ATPLite assay. Mice, inoculated with adenoviral vector as above, were intravenously injected with 10 μg of soluble human TRAIL 48 hours later. Serum levels of AST were measured at 24 hours after

TRAIL injection (right panel). (d. and e.) Histology analysis of liver damage induced by TRAIL. The livers were collected at 24 hours (d.) or 7 days (e.) after transduction with TRAIL. The paraffin sections were H&E stained, and photographed at 100X (top panel) and 400X (lower panel).

Figure 14 is a series of graphs showing that activated T cells and B cells purified from human PBMC express increased levels of DR5 as determined by flow cytometry for resting (unfilled) and activated (shaded) cells.

Figure 15 is viability graphs as a function of TRA-8 concentration for the purified T cells and B cells depicted in Figure 14 that have been stimulated for 48 hours with anti-CD3 or anti-μ, with activated and blast cells collected by different density of Ficoll-Paque. Viability is determined by ATPLite assay.

Figure 16 is a histogram and flow cytometry plots showing CD3 expression in a gated lymphocyte population for NK cell depleted NOD/SCID mice injected with human PBMC and TRA-8 or IgG (control).

Figure 17 shows CD3 and TUNEL stained cellular micrographs for mouse spleen tissue as detailed in Example 13.

Figure 18 shows cycotoxicity plots for chronic lympholytic leukemia (CCL) and normal B cell humans in the presence of TRA-8, BISVIII, and the combination thereof.

Figure 19(a). Specific binding of 2E12 to DR4. ELISA plates were coated with the soluble form of human TRAIL receptor-human IgG1 Fc fusion proteins as indicated and incubated with indicated concentration of mAb 2E12, followed by HRP-conjugated anti-mouse IgG1. The reaction was developed with TMB substrate buffer and OD values were measured at 450/650nM.

Figure 19(b). 2E12 binds cell surface DR4. Cos-7 cells were transfected with the vector containing the full length cDNA for DR4 (solid histogram) or control vector (open histogram). The transfected cells were stained with 10μg/ml 2E12 and PE-conjugated anti-mouse IgG1. Cells were analyzed by flow cytometry.

Figure 19(c). Apoptosis-inducing activity of 2E12. Human Ramos B lymphoma cells were incubated overnight with the indicated concentrations of 2E12 in the presence of 2μg/ml of anti-mouse IgG1. Cell viability was determined by the ATPLite assay. (d) Caspase activation induced by 2E12. Ramos cells were treated with 2E12 and anti-mouse IgG antibody for the indicated time points. Caspase activation and PARP cleavage were determined by Western blot analysis using specific anti-caspase or PARP antibodies.

Figure 20. The effect of 2E12 and adriamycin in athymic nude mice bearing breast cancer xenografts. 2LMP cells ($3X10^7$) were injected subcutaneously into athymic nude mice on day 0. Two groups of mice were injected intraperitoneally with 200 μg 2E12 on days 7, 10, 14, 17, 21, and 24. Two groups of mice received *i.v.* adriamycin (6mg/kg) on days 8, 12, and 16. One group of mice received no antibody. Data are expressed as the average change in tumor size relative to size on day 7 (n=8 mice/group).

Figure 21. The effect of TRA-8, 2E12 and adriamycin in athymic nude mice bearing breast cancer xenografts. 2LMP cells ($3X10^7$) were injected *s.c.* into athymic nude mice on day 0. Two groups of mice were injected *i.p.* with 200 μg TRA-8 and 2E12 on days 7, 10, 14, 17, 21, and 24. Two groups of mice received *i.v.* adriamycin (6mg/kg) on days 8, 12, and 16. One group of mice received no antibody. Data are expressed as the average change in tumor size relative to size on day 7 (n=8 mice/group).

Detailed Description of the Invention

The failure to delete cells is due to defects in the apoptosis inducing system which are associated with defects illustratively including expression or function of the ligand, the receptor, or the intracellular regulatory and effector molecules. The present invention affords a method to correct a deficient apoptosis inducing system as well as to elucidate the specific defects inherent in a given defective apoptosis inducing system.

The present invention relates to a new class of monoclonal antibodies that have selective *in vivo* and *in vitro* apoptosis inducing activity against specific TRAIL receptors, including DR5, DR4, DcR1 and DcR2. Thus, the antibodies of the present invention specifically bind one of the TRAIL receptors. By "selectively binding" or "specifically recognizing" means that the antibody binds only one TRAIL receptor and shows little or no binding to other types of TRAIL receptors using traditional Western blot analysis. A DR5 antibody of the present invention binds DR5 selectively and shows no binding above about 1.5 times background for DR4, DcR1 or DcR2. Similarly, a DR4 antibody of the present invention binds DR4 selectively and shows no binding above about 1.5 times background for DR5, DcR1 or DcR2. The present invention has utility as a reagent for apoptosis signaling research, as well as utility as a therapeutic effective against cells expressing TRAIL receptors, illustratively including broad classes of cancer cells, cells showing disregulation of the apoptosis system, activated lymphocytes or other activated immune cells (e.g., lymphoid cells and myeloid cells), virally infected cells, and abnormally proliferating synovial cells (e.g., rheumatoid arthritis synovial cells, including inflammatory synovial cells, activated lymphoid and myeloid cells in the synovium, macrophage-like synoviocytes, and fibroblast-like synoviocytes) of autoimmune diseases. Antibodies according to the present invention are specific in binding particular types of TRAIL receptors in spite of the homology there between. The inventive antibodies afford targeted apoptosis of only those cells expressing a target TRAIL receptor or alternatively, blocking TRAIL apoptosis of cells expressing a target receptor.

A DR5 monoclonal antibody or a DR4 monoclonal antibody of the present invention serves as a potent inducer of apoptosis in cells expressing DR5 or DR4, respectively, *in vitro* and as a potent inducer of apoptosis *in vivo*. Humanized fragmentary CDR sequences engrafted on humanized antibody backbones and fusion protein DR5 or DR4 antibodies of the present invention exhibit similar apoptotic properties.

To date, no monoclonal antibody is available which binds to cell surface DR5 and which, even at low concentrations, induces apoptosis of cells expressing DR5 both *in vitro* and *in vivo* in the absence of a crosslinker. The present invention includes a DR5 antibody operative as a therapeutic agent in the treatment of a variety of diseases. Although soluble TRAIL has been shown to be effective in induction of apoptosis of tumor cells *in vivo*, the killing activity appeared to be very low with the large and repeated doses often being required (13). The present invention provides a purified antibody which binds a TRAIL receptor DR5, wherein said antibody, in its soluble form at low concentrations, has in vivo and in vitro apoptosis-inducing activity in target cells expressing DR5. In a preferred embodiment, the purified antibody binds the TRAIL receptor DR5 in the absence of antibody crosslinking. Preferably, the antibody does not induce significant apoptosis of normal fibroblast cells. Preferably, the apoptosis-inducing activity is characterized by less than 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% viability, or any percentage in between, of the target cells at antibody concentrations of less than about 0.1, 1, 5, 10, or 20 μg/ml or any concentration in between. The purified antibody specifically binds TRAIL receptor DR5 and does not bind TRAIL receptors DR4, DcR1, or DcR2 upon routine Western blot analysis. In a preferred embodiment, the antibody is a monoclonal antibody, preferably having the same epitope specificity as mouse-mouse hybridoma TRA-8 having ATCC Accession Number PTA-1428.

TRA-8, one of a series of DR5 antibodies according to the present invention, is pharmaceutically effective in animals carrying a human DR5 transgene and also has utility in establishing a model for the investigation of the role of DR5 and TRAIL.

Various embodiments of the invention provide antibodies that induce apoptosis in the presence or absence of crosslinking. For example, a preferred embodiment of DR5 antibody (e.g., TRA-8) induces apoptosis in the absence of crosslinking. "Crosslinking" includes, for example, crosslinking by a secondary

antibody. Other embodiments provide antibodies that induce apoptosis in the presence of crosslinkers, including, for example, a preferred embodiment of the DR4 antibody (2E12).

Thus, the invention provides a purified antibody which specifically binds a TRAIL receptor DR4, wherein said antibody, in its soluble form, has in vivo and in vitro apoptosis-inducing activity in target cells expressing DR4. As one embodiment, the antibody is a monoclonal antibody having the same epitope specificity as hybridoma 2E12 having ATCC Accession Number PTA-3798, deposited on October 24, 2001, having designated name "2E12 Hybridoma Clone Against Human DR4," on behalf of The UAB Research Foundation. 2E12, one of a series of DR4 antibodies of the present invention, is pharmaceutically active in reducing tumor size, as compared to untreated control animals or compared to the tumor size before treatment, *in vivo* in animals with DR4 expressing cancers.

Antibodies to DR5 are effective in soluble form at low doses, by low doses is meant at doses or concentrations of less than about 0.01 to about 1 μg/ml *in vitro* and less than about 1-10 mg/kg *in vivo*. A preferred feature of the antibodies of the present invention is that they induce apoptosis selectively to cells expressing DR5 receptors, without inducing apoptosis in normal, non-activated, non-transformed hepatocytes, fibrocytes, synoviocytes, etc. An antibody according to the present invention raised against a TRAIL receptor is harvested according to the present invention from an experimental animal but can be made by any methods of antibody production or synthesis known in the art. By humanizing the antibody according to the present invention to maintain receptor binding activity while eliciting a diminished and therapeutically tolerable immune response within a human subject, a humanized anti-TRAIL receptor antibody according to the present invention is used as therapeutic agonist or antagonist for a given TRAIL receptor. The present invention being operative as an *in vivo* therapeutic since secondary crosslinking of the anti-TRAIL receptor antibody, optionally, is not required.

The present invention extends beyond a single anti-TRAIL receptor antibody having agonist or antagonistic apoptotic effects. Rather, two or more anti-TRAIL receptor antibodies are brought into contact with a cell culture *in vitro* or a subject body tissue *in vivo* to create an enhanced treatment. By "enhanced treatment" is meant any additive, synergistic, or potentiating effect. For example, glioma cell line U87 and hematopoietic cell lines U937 and Molt-4 are responsive to exposure to a synergistic exposure to agonistic anti-DR4 and anti-DR5 antibodies whereas exposure to agonisticDR5 antibody alone shows only limited success in inducing apoptosis.

Additionally, antagonistic anti-TRAIL receptor antibodies have particular utility in the present invention when an antibody is specific to binding one of the decoy receptors DcR1, DcR2 or OPG. Selective blocking of a decoy receptor with an antibody according to the present invention has the effect in cell types expressing decoy receptors of shifting the TRAIL binding equilibrium towards those TRAIL receptors capable of transducing the apoptosis signal. Thus, in another combined therapy according to the present invention, a decoy receptor binding antibody sensitizes an expressing cell towards agonistic apoptosis signal transducing TRAIL receptor binding.

In another embodiment, the present invention affords a method of elucidating agonistic and antagonistic epitopes of a given TRAIL receptor. Further, polymorphisms between individuals associated with a given TRAIL receptor are elucidated according to the present invention through the use of a panel of monoclonal antibodies each having a differing variable or CDR region. A characterized panel of monoclonal antibodies provides the ability to define agonistic and antagonistic epitopes and polymorphisms. Thus, a panel of monoclonal antibodies according to the present invention has utility in drug discovery and/or subject screening for disease proclivity.

Still another embodiment of the present invention involves fusion proteins including an antigenic fragment of a TRAIL receptor coupled to an immunoglobulin

In the context of cancer therapy, TRA-8, is able to induce apoptosis of most TRAIL-sensitive tumor cells in a caspase-dependent fashion in the absence of the secondary crosslinking. TRA-8 or 2E12, alone or in combination with other antibodies, exhibits a strong tumoricidal activity *in vivo*. The ability of TRA-8 or 2E12 to induce apoptosis of most TRAIL-sensitive cells confirms that either DR5 or DR4 alone is sufficient to trigger apoptosis. The majority of tumor cells detailed herein express cell surface DR5 and their susceptibility to TRA-8 induced cell death paralleled their susceptibility to TRAIL, indicating that DR5 is a primary death receptor for TRAIL-mediated apoptosis in most tumor cells. Similar results were obtained with antibodies specific for DR4 (e.g., 2E12). Thus, differential expression of DR5 or DR4 by normal and cancer cells is operative in the selectivity of TRAIL-mediated apoptosis. TRA-8 bypasses the decoy receptors to induce TRAIL-mediated apoptosis. Only a minority of TRAIL resistant tumor cells are sensitive to TRA-8, however, indicating that the decoy receptors do not appear to play a major role in the resistance of tumor cells to TRAIL-mediated apoptosis.

Although previous studies have indicated that systemic administration of the soluble form of TRAIL in animals does induce tumor regression without causing toxicity[3,4,22], the membrane-bound form of human TRAIL induces liver damage in mice as shown herein. However, the hepatic toxicity of TRAIL is much less potent than that of Fas ligand as demonstrated by the lesser susceptibility of normal hepatocytes to TRAIL-induced injury compared to Fas ligand and by the lack of lethality of TRAIL *in vivo*. Thus, titration of TRAIL has utility in cancer therapy.

As detailed herein, the absence of significant levels of DR5 protein expression by normal hepatocytes is shown and is associated with hepatocyte resistance to TRA-8 induced apoptosis. Crosslinking of DR5 with monoclonal antibody is insufficient to organize the homopolymeric forms of the death receptor able to trigger apoptosis. Experiments in marmoset indicate no evidence of hepatic toxicity of TRA-8 administration. Thus, an agonistic monoclonal DR5 antibody is likely to be more selective and safer than soluble TRAIL as a therapeutic agent.

protein, polypeptide or fragment thereof. A TRAIL receptor fragment being defined as containing a sufficient number of bases to elicit an immunogenic response to a native TRAIL receptor expressed on a subject cell surface. A TRAIL receptor fusion fragment including at least ten amino acids. An immunoglobulin fusion protein or fragment thereof is defined herein to include a native or synthetic protein or polypeptide segment having a sufficient number of amino acid bases to activate an immunogenic cascade response within a subject. An immunogen of the present invention including a fusion of a TRAIL receptor fragment coupled to an immunoglobin fragment has utility as an *in vivo* therapeutic to elicit an anti-TRAIL receptor antibody in situ within a subject.

In still a further embodiment, the present invention is operative as a gene-therapy. The invention thus provides a method of selectively inducing apoptosis in target cells comprising the steps of transfecting the target cells with a vector comprising an expressible TRAIL receptor nucleic acid sequence; expressing on said cells a TRAIL receptor encoded by said TRAIL receptor nucleic acid sequence; and contacting said cells with an apoptosis-inducing antibody selective for binding said TRAIL receptor. In a gene therapy aspect of the present invention, targeted cells are transfected with a vector carrying an expressible sequence corresponding to a TRAIL receptor, the vector being conventional and chosen on the basis of the targeted cell susceptibility to the vector. Gene therapy vectors illustratively include adenovirus, pAdCMV5. Upon the targeted cells or tissue expressing the transfected TRAIL receptor, the cells or tissue are exposed to an antibody according to the present invention specific for binding the transfected TRAIL receptor. It is appreciated that the anti-TRAIL receptor antibody is either agonistic or antagonistic thereto consistent with the desired therapeutic result.

The antibodies of the present invention are also operative in conjunction with a sensitizer. A sensitizer as used herein is defined to include any stimulus that induces apoptosis, including ultraviolet light, organic molecules specifically including the class of bisindolmaleimides, heavy metals and free radical species.

Similarly, DR4 is expressed by transformed or activated cells and is not expressed in appreciable amounts or only at much lower amounts by normal cells, e.g., fibroblasts. DR4 of the present invention thereof induces apoptosis of certain target cells without appreciable cell death in non-target cells, like fibroblasts, etc. As used herein the absence of an effect or the lack of an appreciable or significant effect refers to and includes the complete absence of the effect or an effect that is less than or equal to background or control levels and does not exceed background and control levels by more than 1.5 times the background or control level.

As a screening assay or imaging tool, the present invention is well suited for detecting small clusters of DR4 or DR5 cells which may still exhibit normal cell morphology. For example, *in situ* cell section staining of human cancer cells including lung, prostate and liver cancers with labeled antibodies according to the present invention readily identifies cancerous cells. The antibodies of the present invention are also useful in screening for other disease manifestations, including, for example, various inflammatory and autoimmune diseases, like rheumatoid arthritis. Such screening may be useful even before the onset of other clinical symptoms and could be used to screening subjects at risk for disease, so that prophylactic treatment can be started before the manifestation of other signs or symptoms. Specifically, cancer cells are observed to express very high levels of DR5 as compared to normal cells of the same type. Thus, the present invention has utility as a sensitive screening method for early stage malignancies within tissue including at least lung, prostate, colon, blood, cervix, breast, and liver. A therapeutic process is detailed herein for the inhibition of abnormal cell proliferation associated with diseases illustratively malignant cancers and lymphatic leukemias among others.

The present invention is detailed herein with particularity to an anti-human DR5 monoclonal antibody designated as TRA-8, having ATCC Accession Number PTA-1428. It is appreciated that the techniques and results detailed with regard to the agonistic anti-human DR5 monoclonal antibody TRA-8 are wholly extendable and applicable to antagonistic DR5 antibodies, as well as antibodies raised against

DR4, DcR1 and DcR2 acting in both agonistic and antagonistic manners. Thus, the present invention is detailed herein with respect to an apoptosis-inducing antibody specific for human DR4. In one embodiment, the antibody has the same epitope specificity as hybridoma 2E12, which was deposited on October 24, 2001, to procure an accession number on behalf of The UAB Research Foundation, with the American Type Culture Collection, Rockville, Md. The description of the deposited material was "2E12 Hybridoma Clone Against Human DR4," with the strain designation 2E12 and the reference docket number as PCT/US01/14151. The levels of expression of an apoptosis receptor, such as Fas, do not necessarily correlate with the susceptibility of the cells to apoptosis. For TRAIL-mediated apoptosis, it has been suggested that the expression of the decoy receptors for TRAIL influences the susceptibility of the cells. Moreover, it has been suggested that DR5 must be associated with DR4 for effective transduction of the apoptosis signal through FADD and the caspase 8 pathway. The availability of agonistic monoclonal anti-DR5 antibody allowed evaluation of the regulation of DR5 signaling and its relative role in TRAIL-mediated apoptosis. Comparison of the susceptibility of the cells to TRA-8-mediated apoptosis with their susceptibility to TRAIL-mediated apoptosis offers insight into the role of DR5 in TRAIL-mediated apoptosis and the mechanisms that may affect susceptibility. Similar advantages are provided by the DR4 antibody.

This advantage generally extends to humanized DR5 and DR4 antibodies of the present invention. A molecular clone of an antibody to DR-5, for example, is prepared by known techniques as detailed with respect to the following Examples. Recombinant DNA methodology (33) is operative herein to construct nucleic acid sequences which encode a monoclonal antibody molecule or antigen binding region thereof.

The present invention allows the construction of humanized TRAIL receptor antibodies that are unlikely to induce a human anti-mouse antibody (hereinafter referred to as "HAMA") response (34), while still having an effective antibody effector function. Fully human antibodies can also be made by immunizing mice

capable of making a fully human antibody (e.g., mice genetically modified to produce human antibodies), screening clones that bind DR5 or DR4, induce apoptosis, and compete for TRA-8 or 2E12 epitope. See, e.g., Lonberg and Huszar (1995) Human antibodies from transgenic mice, Int. Rev. Immunol. 13:65-93, which is incorporated herein by reference in its entirety for methods of producing fully human antibodies. As used herein, the terms "human" and "humanized," in relation to antibodies, relate to any antibody which is expected to elicit a therapeutically tolerable weak immunogenic response in a human subject.

The present invention provides for a DR5 antibody, a humanized anti-DR5 antibody, TRA-8 heavy and light chain immunoglobulins and humanized heavy and light chain immunoglobulins. The invention also provides a DR4 antibody, a humanized DR4 antibody, heavy and light chain immunoglobulins of the DR4 antibody and humanized heavy and light chain immunoglobulins, nucleic acids that encode the antibodies and heavy and light chains, vectors comprising those nucleic acids, and cells comprising the vectors. Certain truncations of these proteins or genes perform the regulatory or enzymatic functions of the full sequence protein or gene. For example, the nucleic acid sequences coding therefor can be altered by substitutions, additions, deletions or multimeric expression that provide for functionally equivalent proteins or genes. Due to the degeneracy of nucleic acid coding sequences, other sequences which encode substantially the same amino acid sequences as those of the naturally occurring proteins may be used in the practice of the present invention. These include, but are not limited to, nucleic acid sequences including all or portions of the nucleic acid sequences encoding the above polypeptides, which are altered by the substitution of different codons that encode a functionally equivalent amino acid residue within the sequence, thus producing a silent change. It is appreciated that the nucleotide sequence of an immunoglobin according to the present invention tolerates sequence homology variations of up to 25% as calculated by standard methods ("Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," *Macromolecule* Sequencing and Synthesis, Selected Methods and

Applications, pp. 127-149, 1998, Alan R. Liss, Inc.) so long as such a variant forms an operative antibody which recognizes a TRAIL receptor DR5. For example, one or more amino acid residues within a polypeptide sequence can be substituted by another amino acid of a similar polarity which acts as a functional equivalent, resulting in a silent alteration. Substitutes for an amino acid within the sequence may be selected from other members of the class to which the amino acid belongs (i.e., a conservative substitution). For example, the nonpolar (hydrophobic) amino acids include alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, phenylalanine, tryptophan and methionine. The polar neutral amino acids include glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine, and glutamine. The positively charged (basic) amino acids include arginine, lysine and histidine. The negatively charged (acidic) amino acids include aspartic acid and glutamic acid. Also included within the scope of the present invention are proteins or fragments or derivatives thereof which are differentially modified during or after translation, e.g., by glycosylation, proteolytic cleavage, linkage to an antibody molecule or other cellular ligands, etc. In addition, the recombinant vector encoding nucleic acid sequences of the antibodies of the present invention may be engineered so as to modify processing or expression of a vector. Other modifications can be made in either the nucleic acid or amino acid sequence without reducing or without substantially reducing apoptosis activity in the antibody. Such modifications can occur in the CDRs or non-CDR regions using techniques routine in the art. See, e.g., Yang et al. (1995), J. Mol. Biol. 254:392-403, which is hereby incorporated by reference in its entirety for methods of CDR walking mutagenesis.

Additionally, an inhibitor encoding nucleic acid sequence can be mutated *in vitro* or *in vivo* to create and/or destroy translation, initiation, and/or termination sequences or to create variations in coding regions and/or form new restriction endonuclease sites or destroy pre-existing ones, to facilitate further *in vitro* modification. Any technique for mutagenesis known in the art can be used,

including but not limited to *in vitro* site directed mutagenesis, *J. Biol. Chem.* 253:6551, use of Tab linkers (Pharmacia), and the like.

X-ray crystallography data indicate that the antibody immunoglobulin fold generally forms a long cylindrical structure comprising two layers of antiparallel b-sheets, each consisting of three or four b-chains. In a variable region, three loops from each of the V domains of H and L chains cluster together to form an antigen-binding site. Each of these loops is termed a complementarity determining region (CDR). The CDRs have the highest variability in amino acid sequence with the antibody. The portions of the variable region that are not part of a CDR are called "framework regions" ("FR" regions) and generally play a role in maintaining CDR structure. Preferably, all the CDRs from a given antibody are grafted into an acceptor antibody, in order to preserve the binding region for the TRAIL receptor epitope region. It is appreciated that grafting a portion of the total amount of CDRs into a donor is operative herein. It is understood that grafting generally entails the replacement, residue for residue, of one amino acid or region, for another. However, occasionally, especially with the transfer of a region, one or more residues may be added or omitted or substituted therefor, as desired, and that such deletions and insertions, as well as appropriate replacements and inversions, are within the skill of those in the art.

An antibody of the present invention is obtained by, for example, grafting each CDR of L chain and H chain subunit of an anti-TRAIL receptor monoclonal antibody into a corresponding CDR region of a human antibody, thereby humanizing a mouse monoclonal antibody effective against a TRAIL-receptor.

Antibody fragments which contain the idiotype of the molecule are also generated and operative herein using known techniques. For example, such fragments illustratively include the anti-TRAIL receptor (AB')2 fragment which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule, the TRAIL receptor antibody AB' fragments generated through reduction of the disulfide bridges of the

TRAIL receptor (AB')2 fragment, and the antibody fragment which are generated by treating the antibody molecule with papain and a reducing agent.

The antibodies of the present invention can be made using numerous techniques known in the art. By way of example, the anti-DR5 monoclonal antibody TRA-8 may be obtained by culturing a hybridoma which, in turn, may be obtained by immunizing a mouse with human DR5 and subsequently fusing the spleen cells or lymph node cells from the mouse with mouse myeloma cells.

Preparation of a monoclonal antibody illustratively involves the following steps:

a) purification of a biomacromolecule for use as an antigen;

b) preparation of antibody producing cells, after first immunizing an animal using injections of the antigen, bleeding the animal and assaying the antibody titer, in order to determine when to remove the spleen;

c) preparation of myeloma cells;

d) fusing the antibody producing cells and myeloma cells;

e) selecting a hybridoma producing a desired antibody;

f) preparing a single cell clone (cloning);

g) optionally, culturing the hybridoma cells, or growing animals into which the hybridoma cells have been transplanted, for large scale preparation of the monoclonal antibody; and

h) testing the biological activities and the specificity, or assaying marker agent properties, of the monoclonal antibody thus prepared.

The procedure for the preparation of a monoclonal antibody is detailed below with reference to the above-described steps. This method for preparing an antibody of the present invention is intended only to be illustrative of the methods of preparation and is not limited thereto. Other known procedures may be followed, or the following method modified, for instance by using antibody producing cells other than spleen cells and myeloma.

(a) Preparation of antigen

A recombinant protein (hereinafter referred to as "recombinant human DR5" or "recombinant human DR4"), effective as the antigen, is obtained by transfecting QBI-293A cells with the expression vector pAdDR5-IgG for a fusion protein comprising the extracellular domain of human DR5 or DR4 and the Fc region of human IgG1 antibody (hereinafter referred to as "IgG"), (cf. PTA-1428) to express it by using the ADENO-Quest kit (Quantum Biotechnologies Inc., Canada), and collecting and partially purifying the expression product. The plasmid pAdDR5-IgG is constructed by inserting DNA encoding a human DR5 or DR4 and human IgG fusion protein into pAdCMV5, which is an expression vector for animal cells. Other materials, such as the DNA encoding DR5 or DR4, the vector, and the host, are operative herein.

The human DR5 or DR4 and IgG fusion protein produced in the culture supernatant of the QBI-293A cells transfected with the vector pAdDR5-IgG may be partially purified by ProteinA-Sepharose affinity chromatography or ProteinG-Sepharose affinity chromatography, or ion-exchange chromatography using a Resource Q column (trade name; Pharmacia).

Alternatively, purified DR5 or DR4 obtained from the cell membranes of human cell lines is used as the antigen. Further, since the primary structures of DR4 and DR5 are known (cf. PTA-1428), a peptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO. 1, may be chemically synthesized by a known method such as the Sanger method, and used as the antigen.

(b) Preparation of antibody producing cells

A mouse is immunized with the immunogen produced in step (a), mixed with an adjuvant, such as Freund's complete or incomplete adjuvant or alum. Other suitable experimental animals illustratively include rats, guinea pigs, rabbits, dogs, chickens, horses, pigs, cows and sheep.

Suitable administration routes to immunize an experimental animal include the subcutaneous, intraperitoneal, intravenous, intradermal, and intramuscular injection routes, with subcutaneous and intraperitoneal injections being preferred.

Immunizations are optionally performed by a single dose or, by several repeated doses at appropriate intervals (preferably 1 to 5 weeks). Immunized animals are monitored for antibody titer in their sera, and an animal with a sufficiently high antibody titer is selected as the source of antibody producing cells. Selecting an animal with a high titer makes the subsequent process more efficient. Cells for the subsequent fusion are generally harvested from the animal 3 to 5 days after the final immunization.

Methods for assaying antibody titer include various well known techniques such as radioimmunoassay (hereinafter, referred to as "RIA"), solid-phase enzyme immunoassay (hereinafter, referred to as "ELISA"), fluorescent antibody assay and passive hemagglutination assay, with RIA and ELISA preferred for reasons of detection sensitivity, rapidity, accuracy and potential for automation.

Determination of antibody titer may be performed, for example, by ELISA, as follows. First, purified or partially purified DR5 or DR4 is adsorbed onto the surface of a solid phase, such as a 96-well ELISA plate, followed by blocking any remaining surface, to which DR5 or DR4 has not been bound, with a protein unrelated to the antigen, such as bovine serum albumin (BSA). After washing, the well surfaces are contacted with serially diluted samples of mouse sera to enable binding of the DR5 or DR4 antibody in the samples to the antigen. A labeled, anti-mouse antibody, as the secondary antibody, is added to be bound to the mouse antibody. The label can include an enzymatic label, a fluorescent label or other labels known in the art. After washing, the enzyme substrate is added, and antibody titer is estimated by determining absorbance change due to color development caused by the alteration of the substrate or the like.

(c) Preparation of myeloma cells

Cells from established mouse cell lines serve as the source of myeloma cells, including for example 8-azaguanine resistant mouse, derived from BALB/c myeloma strains P3X63Ag8U.1 (P3-U1) (35), P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1) (36). Sp2/0-Ag14 (SP-2) (37), P3X63Ag8.653 (653) (38) and P3X63Ag8 (X63) (39). The cell line selected is serially transferred into an appropriate medium, such as 8-azaguanine medium. 8-azaguanine medium includes Iscove's Modified Dulbecco's Medium (hereinafter referred to as "IMDM") or Dulbecco's, Modified Eagle Medium (hereinafter referred to as "DMEM"). RPMI-1640 medium supplemented with glutamine, 2-mercaptoethanol, gentamicin, fetal calf serum (hereinafter referred to as "FCS"), and 8-azaguanine. The cells are then transferred to a normal medium, such as ASF104 medium (Ajinomoto, K. K.) containing 10% FCS, 3 to 4 days prior to fusion, in order to ensure that at least 2×10^7 cells are available on the day of fusion.

(d) Cell fusion

Lymphocytes and plasma cells obtained from any suitable part of the animal are precursor cells to produce the antibody. Lymphocyte or plasma cell sources illustratively include spleen, lymph nodes, peripheral blood, or any appropriate combination thereof, with spleen cells being the most common source.

After the last booster injection, tissue in which antibody producing cells are present is removed from a mouse having the predetermined antibody titer. The currently favored technique for fusion of spleen cells with myeloma cells prepared in step c), employs polyethylene glycol.

The fusion technique includes washing spleen and myeloma cells with serum-free medium (such as RPMI 1640) or phosphate buffered saline (hereinafter referred to as "PBS") so that the number ratio of spleen cells to myeloma cells is approximately between 5:1 and 10:1, and then centrifuged. After the supernatant has been discarded and the pelleted cells sufficiently loosened, 1 ml of serum-free medium containing 50%(w/v) polyethylene glycol (m.w. 1,000 to 4,000) is added

dropwise with mixing. Subsequently, 10 ml of serum-free medium is slowly added and then centrifuged. The supernatant is discarded again, and the pelleted cells are suspended in an appropriate amount of HAT medium containing a solution of hypoxanthine, aminopterin and thymidine (hereinafter referred to as "HAT") and mouse interleukin-2 (hereinafter referred to as "IL-2"). The suspension is then dispensed into the wells of culture plates (also referred herein simply as "plates") and incubated in the presence of 5% v/v CO_2 at 37°C for about 2 weeks, with the supplementary addition of HAT medium as appropriate.

e) Selection of hybridomas

When the myeloma strain used is resistant to 8-azaguanine, i.e., it is deficient in the hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) enzyme, any unfused myeloma cells and any myeloma-myeloma fusions are unable to survive in HAT medium. On the other hand, fusions of antibody producing cells with each other, as well as hybridomas of antibody producing cells with myeloma cells can survive, the former only having a limited life. Accordingly, continued incubation in HAT medium results in selection of only the desired hybridomas.

The resulting hybridomas grow into colonies that are then transferred into HAT medium lacking aminopterin (HT medium). Thereafter, aliquots of the culture supernatant are removed to determine anti-Fas antibody titer by, for example, ELISA. When the above-mentioned fusion protein is used as the ELISA antigen, it is also necessary to eliminate clones producing an antibody which is specifically bound to the Fc region of human IgG1. The presence or absence of such a clone may be verified, for example, by ELISA using Fas-IgG1or IgG1, as the antigen.

(f) Cloning

Hybridomas which have been shown to produce specific antibodies, using a method similar to that described in step b) to determine antibody titer, are then transferred to another plate for cloning. Suitable cloning methods include: the limiting dilution method, in which hybridomas are diluted to contain one cell per well of a plate and then cultured; the soft agar method in which colonies are

recovered after culturing in soft agar medium; a method of using a micromanipulator to separate a single cell for culture; and "sort-a-clone," in which single cells are separated by a cell sorter.

The cloning procedure according to, for example, the limiting dilution method is repeated 2 to 4 times for each well demonstrating an antibody titer, and clones having stable antibody titers are selected as anti-DR5 monoclonal antibody producing hybridomas. Hybridomas producing an anti mouse DR5 antibody are selected by a similar method to obtain an anti-DR5 monoclonal antibody producing cell line.

The mouse-mouse hybridoma TRA-8 which is a basis for antibodies of the present invention was deposited with American Type Culture Collection on March 1, 2000, and has the accession number PTA-1428. The 2E12 hybridoma was deposited with American Type Culture Collection on October 24, 2001, as described above and has the accession number ATCC No. PTA-3798. Accordingly, when preparing an antibody using the mouse-mouse hybridoma TRA-8 or any other established hybridoma, the preparation may be performed by following a procedure starting from the step (g) below, with the steps (a) to (f) omitted.

(g) Culture of hybridoma to prepare monoclonal antibody

The hybridoma obtained by the cloning is then cultured in normal medium, not in HT medium. Large-scale culture is performed by roller bottle culture, using large culture bottles, or by spinner culture. The supernatant from the large-scale culture is then harvested and purified by a suitable method, such as gel filtration, which is well known to those skilled in the art, to obtain an DR5 or DR4 monoclonal antibody which is a basis for antibodies of the present invention. The hybridoma may also be grown intraperitoneally in a syngeneic mouse, such as a BALB/c mouse or a nu/nu mouse, to obtain ascites containing a DR5 or DR4 monoclonal antibody in large quantities. Commercially available monoclonal antibody purification kits (for example, MAbTrap GII Kit; Pharmacia) are conveniently used to purify the harvested antibodies.

Monoclonal antibodies prepared as above have a high specificity for human DR5 or DR4, respectively.

(h) Assay of monoclonal antibody

Suitable identification methods of the isotype and the subclass of the monoclonal antibody include the Ouchterlony method, ELISA and RIA. Preferably, a commercial kit is used for identification, such as a Mouse Typer Kit (trade name; BioRad).

Quantification of protein may be performed by the Folin-Lowry method, or by calculation based on the absorbance at 280 nm (1.4 (OD280) = Immunoglobulin 1 mg/ml).

Identification of the epitope that the monoclonal antibody recognizes is performed as follows. First, various partial structures of the molecule that the monoclonal antibody recognizes are prepared. The partial structures are prepared by the method wherein various partial peptides of the molecule are synthetically prepared by known oligopeptide synthesis technique, or the method wherein DNA encoding the desired partial polypeptide is incorporated in a suitable expression plasmid, and is expressed in a suitable host, such as *E. coli*, to produce the peptides. Generally, both methods are frequently used in combination for the above object. For example, a series of polypeptides having appropriately reduced lengths, working from the C- or N-terminus of the antigen protein, can be prepared by established genetic engineering techniques. By establishing which fragments react with the antibody, an approximate idea of the epitope site is obtained.

The epitope is more closely identified by synthesizing a variety of smaller oligopeptides corresponding thereto or mutants of the peptide using established oligopeptide synthesis techniques to determine a binding property of the peptides to the anti-DR5 monoclonal antibody, for example, which is a basis for preparation of the antibody of the present invention and a competitive inhibition of binding of the peptide to an antigen with the monoclonal antibody. Commercially available kits, such as the SPOTs Kit (Genosys Biotechnologies, Inc.) and a series of multipin

peptide synthesis kits based on the multipin synthesis method (Chiron Corp.) may be conveniently used to obtain a large variety of oligopeptides.

An antibody of the present invention has the various functional properties a) to f) described below, each of which is verified by, for example, a method described herein below.

a) Specific binding of TRA-8 to cells expressing human DR5.

A unique feature of the present invention is the ability to bind cell surface DR5. This is demonstrated by flow cytometry analysis of cells expressing DR5. First, specific cell surface binding of DR5 is confirmed by the COS-7 cells transfected with the full-length cDNA encoding human DR5. Specifically, TRA-8 only recognizes COS-7 cells transfected with DR5 but not empty control vector or vector encoding DR4. Second, three different origins: hematopoietic, glioma, and prostate cancer of human malignant tumor cells are tested. The majority of these transformed tumor cells expressed significant levels of cell surface DR5, although expression levels varied largely. Third, two panels of human primary synovial fibroblast cells from RA and OA patients are examined. All RA synovial cells expressed significantly higher levels of DR5 compared to OA cells.

b) Induction of apoptosis of human malignant tumor cells *in vitro* in the absence of crosslinking.

The ability of an antibody raised according to the present invention to recognize TRAIL receptor and to directly induce apoptosis of malignant human tumor cells is determined by cell viability assay (ATPLite) during *in vitro* culture of cells with various concentrations of an antibody, specifically TRA-8. The majority of tumor cells are susceptible to TRA-8 induced apoptosis. For some cells, TRA-8 exhibited a strong apoptosis-inducing activity, for example, TRA-8 is able to induce apoptosis of human Jurkat cells within the pg/ml levels. Importantly, TRA-8 induced apoptosis did not require crosslinking, and in most cells, TRA-8 exhibited a stronger apoptosis-inducing activity than the recombinant soluble TRAIL in the presence of the enhancer.

c) Tumoricidal activity of TRA-8 *in vivo*.

Tumoricidal activity of TRA-8 is evaluated in two SCID/human tumor cell models. First, SCID mice are intravenously inoculated with human leukemia Jurkat cells, and treated with a single dose (100 μg) of TRA-8. The results show that the majority of implanted Jurkat cells are eliminated from the peripheral blood and spleen by the treatment with TRA-8, as determined by flow cytometry analysis and in situ immunohistochemical straining of Jurkat cells. Second, human astrocytoma cells, 1321N1, are subcutaneously inoculated in SCID mice, and the tumor-bearing mice are treated with a single dose of TRA-8. The growth of implanted 1321N1 cells is significantly inhibited in TRA-8 treated mice as determined by the sizes of tumor and histological analysis.

d) Identification of RA synovial cells by TRA-8

The primary synovial cells isolated from 8 RA and 4 OA patients are tested for cell surface expression of DR5. TRA-8 is able to positively strain all RA cells but negatively stain all OA cells. Thus, RA is differentiated from OA by the surface expression of DR5 as detected by TRA-8.

e) Induction of apoptosis in RA synovial fibroblast cells by TRA-8

The ability of TRA-8 to induce apoptosis of RA synovial cells is determined by cell viability assay during *in vitro* culture in the presence of various concentrations of TRA-8. All RA cells exhibited high to intermediate levels of susceptibility to 100 ng/ml of TRA-8. In contrast, all OA cells are essentially resistant to TRA-8 induced apoptosis. Importantly, TRA-8 exhibited a better apoptosis-inducing activity to RA synovial cells than soluble TRAIL with the enhancer. Moreover, compared to anti-Fas antibody (CH-11), TRA-8 exhibited a better selectivity to RA synovial cells.

f) TRA-8 does not induce production of MMPs in RA synovial cells

Since TRA-8 is able to induce NF-kb activation in RA synovial cells as TNF-a, the effect of TRA-8 on the production of MMP1 and MMP3 of synovial cells is determined. While TNF-a induced a dose-dependent increase of MMPs,

TRA-8 is unable to induce any production of MMPs, and in some concentrations, TRA-8 slightly decreased the production of MMPs in RA synovial cells.

g) TRA-8 induces multiple caspase activation.

Since caspases play a crucial role in induction of apoptosis. The ability of TRA-8 to induce caspase activation is determined in human Jurkat cells. When Jurkat cells are incubated with a low dose (50 ng/ml) of TRA-8, the activation of caspase 8, caspase 9, and caspase 3 is observed as early as 15 minutes after incubation as demonstrated by Western blot analysis and caspase cleavage analysis. In term of timing, number and strength of caspase activation, antibodies of the present invention including the demonstrative antibody TRA-8 exhibited a much better activity than any other known apoptosis-inducing antibodies, such as anti-human Fas antibody (CH-11).

The 2E12 antibody specifically binds DR4 in its soluble form, has *in vivo* and *in vitro* apoptosis-inducing activity in target cells expressing DR4 (including for example, cancer cells, rheumatoid arthritis synovial cells, activated immune cells like activated lymphocytes, and virally infected cells), has tumoricidal activity *in vivo* (preferably, in the absence of toxicity to non-tumor cells). Preferably the DR4 antibody of the invention has apoptosis-inducing activity characterized by less than about 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, or10% target cell viability at antibody concentrations of less than 30 μg/ml, 3 μg/ml, .3 μg/ml, or .03 μg/ml and tumoricidal activity characterized by 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, or 100% reduction in tumor size. Thus, aAn antibody of the present invention is a substance having a property to selectively induce apoptosis in pathogenic cells as shown in effect (a) and (g). Accordingly, it is useful as a prophylactic and therapeutic agent for diseases associated with inappropriate survival of cells or inappropriate proliferation of cells, such as those attributable to dysregulation of apoptosis systems including the Fas/Fas ligand system.

The ability of an antibody of the present invention to induce apoptosis is confirmed by culturing cells such as the human leukemia cell line Jurkat (American

Type Culture No. TIB-152) and astrocytoma cell line 1321N1 in medium in which the test sample has been added, and determining the survival rate by, for example, an ATPLite assay.

Antibody of the present invention, especially DR5 and DR4 antibodies having almost the same immunogenicity to human as that of human antibodies, is used as an agent for prophylaxis or treatment of diseases associated with inappropriate survival or proliferation of cells, including those attributable to dysregulation of the apoptosis systems in inflammatory and autoimmune diseases illustratively including systemic lupus erythematosus, Hashimoto's disease, rheumatoid arthritis, graft-versus-host disease, Sjögren's syndrome, pernicious anemia, Addison disease, scleroderma, Goodpasture's syndrome, Crohn's disease, autoimmune hemolytic anemia, sterility, myasthenia gravis, multiple sclerosis, Basedow's disease, thrombopenia purpura, insulin-dependent diabetes mellitus, allergy; asthma, atopic disease; arteriosclerosis; myocarditis; cardiomyopathy; glomerular nephritis; hypoplastic anemia; rejection after organ transplantation and numerous malignancies of lung, prostate, liver, ovary, colon, cervix, lymphatic and breast tissues. The antibodies of the present invention can be used to target and selectively induce apoptosis in activated immune cells including activated lymphocytes, lymphoid cells, myeloid cells, and rheumatoid synovial cells (including inflammatory synoviocytes, macrophage-like synoviocytes, fibroblast-like synoviocytes) and in virally infected cells (including those infected with HIV, for example) so long as those targeted cells express or can be made to express the specific TRAIL receptors (i.e., DR4 or DR5).

Such a prophylactic or therapeutic agent may be administered in various forms. Suitable modes of administration include oral administration, such as by tablets, capsules, granules, powders and syrups, or parenteral administration, such as by injection or suppositories.

The antibody or therapeutic agent may be administered orally, rectally, intracisternally, intraventricular, intracranial, intrathecal, intra-articularly,

intravaginally, parenterally (intravenously, intramuscularly, or subcutaneously), locally (powders, ointments, or drops), intraperitoneally, transdermally, by inhalation or as a buccal or nasal spray. The exact amount of the antibody or therapeutic agent required will vary from subject to subject, depending on the age, weight and general condition of the subject, the severity of the disease that is being treated, the location and size of the tumor, the particular compounds used, the mode of administration, and the like. An appropriate amount may be determined by one of ordinary skill in the art using only routine experimentation given the teachings herein. Typical single dosages of antibody range from 0.1-10,000 micrograms, preferably between 1 and 100 micrograms. Typical antibody concentrations in a carrier range from 0.2 to 2000 nanograms per delivered milliliter. For injection into a joint, volumes of antibody and carrier will vary depending upon the joint, but approximately 0.5-10 ml, and preferably 1-5ml, is injected into a human knee and approximately 0.1 –5ml, and preferably 1-2 ml into the human ankle.

Depending on the intended mode of administration, the antibody or therapeutic agent can be in pharmaceutical compositions in the form of solid, semi-solid or liquid dosage forms, such as, for example, tablets, suppositories, pills, capsules, powders, liquids, or suspensions, preferably in unit dosage form suitable for single administration of a precise dosage. The compositions will include an effective amount of the selected substrate in combination with a pharmaceutically acceptable carrier and, in addition, may include other medicinal agents, pharmaceutical agents, carriers, or diluents. By "pharmaceutically acceptable" is meant a material that is not biologically or otherwise undesirable, which can be administered to an individual along with the selected substrate without causing significant undesirable biological effects or interacting in a deleterious manner with any of the other components of the pharmaceutical composition in which it is contained.

Compositions suitable for parenteral injection may comprise physiologically acceptable sterile aqueous or nonaqueous solutions, dispersions, suspensions or

emulsions, and sterile powders for reconstitution into sterile injectable solutions or dispersions. Examples of suitable aqueous and nonaqueous carriers, diluents, solvents or vehicles include water, ethanol, polyols (propyleneglycol, polyethyleneglycol, glycerol, and the like), suitable mixtures thereof, vegetable oils (such as olive oil) and injectable organic esters such as ethyl oleate. Proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersions and by the use of surfactants.

These compositions may also contain adjuvants such as preserving, wetting, emulsifying, and dispensing agents. Prevention of the action of microorganisms can be ensured by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, and the like. It may also be desirable to include isotonic agents, for example, sugars, sodium chloride, and the like. Prolonged absorption of the injectable pharmaceutical form can be brought about by the use of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Solid dosage forms for oral administration include capsules, tablets, pills, powders, and granules. In such solid dosage forms, the active compound is admixed with at least one inert customary excipient (or carrier) such as sodium citrate or dicalcium phosphate or (a) fillers or extenders, as for example, starches, lactose, sucrose, glucose, mannitol, and silicic acid, (b) binders, as for example, carboxymethylcellulose, alignates, gelatin, polyvinylpyrrolidone, sucrose, and acacia, (c) humectants, as for example, glycerol, (d) disintegrating agents, as for example, agar-agar, calcium carbonate, potato or tapioca starch, alginic acid, certain complex silicates, and sodium carbonate, (e) solution retarders, as for example, paraffin, (f) absorption accelerators, as for example, quaternary ammonium compounds, (g) wetting agents, as for example, cetyl alcohol, and glycerol monostearate, (h) adsorbents, as for example, kaolin and bentonite, and (i) lubricants, as for example, talc, calcium stearate, magnesium stearate, solid

polyethylene glycols, sodium lauryl sulfate, or mixtures thereof. In the case of capsules, tablets, and pills, the dosage forms may also comprise buffering agents.

Solid compositions of a similar type may also be employed as fillers in soft and hard-filled gelatin capsules using such excipients as lactose or milk sugar as well as high molecular weight polyethiyleneglycols, and the like.

Solid dosage forms such as tablets, dragees, capsules, pills, and granules can be prepared with coatings and shells, such as enteric coatings and others well known in the art. They may contain opacifying agents, and can also be of such composition that they release the active compound or compounds in a certain part of the intestinal tract in a delayed manner. Examples of embedding compositions which can be used are polymeric substances and waxes. The active compounds can also be in micro-encapsulated form, if appropriate, with one or more of the above-mentioned excipients.

Liquid dosage forms for oral administration include pharmaceutically acceptable emulsions, solutions, suspensions, syrups, and elixirs. In addition to the active compounds, the liquid dosage forms may contain inert diluents commonly used in the art, such as water or other solvents, solubilizing agents and emulsifiers, as for example, ethyl alcohol, isopropyl alcohol, ethyl carbonate, ethyl acetate, benzyl alcohol, benzyl alcohol, benzyl benzoate, propyleneglycol, 1,3-butyleneglycol, dimethylformamide, oils, in particular, cottonseed oil, groundnut oil, corn germ oil, olive oil, castor oil and sesame oil, glycerol, tetrahydrofurfuryl alcohol, polyethyleneglycols and fatty acid esters of sorbitan or mixtures of these substances, and the like.

Besides such inert diluents, the composition can also include adjuvants, such as wetting agents, emulsifying and suspending agents, sweetening, flavoring, and perfuming agents.

Suspensions, in addition to the active compounds, may contain suspending agents, as for example, ethoxylated isostearyl alcohols, polyoxyethylene sorbitol and

sorbitan esters, microcrystalline cellulose, aluminum metahydroxide, bentonite, agar-agar and tragacanth, or mixtures of these substances, and the like.

Compositions for rectal administrations are preferably suppositories which can be prepared by mixing the compounds of the present invention with suitable non-irritating excipients or carriers such as cocoa butter, polyethyleneglycol or a suppository wax, which are solid at ordinary temperatures but liquid at body temperature and therefore, melt in the rectum or vaginal cavity and release the active component.

Dosage forms for topical administration of a compound of this invention include ointments, powders, sprays, and inhalants. The active component is admixed under sterile conditions with a physiologically acceptable carrier and any preservatives, buffers, or propellants as may be required. Ophthalmic formulations, ointments, powders, and solutions are also contemplated as being within the scope of this invention.

The term "pharmaceutically acceptable salts, esters, amides, and prodrugs" as used herein refers to those carboxylate salts, amino acid addition salts, esters, amides, and prodrugs of the compounds of the present invention which are, within the scope of sound medical judgment, suitable for use in contact with the tissues of patients without undue toxicity, irritation, allergic response, and the like, commensurate with a reasonable benefit/risk ratio, and effective for their intended use, as well as the zwitterionic forms, where possible, of the compounds of the invention. The term "salts" refers to the relatively non-toxic, inorganic and organic acid addition salts of compounds of the present invention. These salts can be prepared *in situ* during the final isolation and purification of the compounds or by separately reacting the purified compound in its free base form with a suitable organic or inorganic acid and isolating the salt thus formed. Representative salts include the hydrobromide, hydrochloride, sulfate, bisulfate, nitrate, acetate, oxalate, valerate, oleate, palmitate, stearate, laurate, borate, benzoate, lactate, phosphate, tosylate, citrate, maleate, fumarate, succinate, tartrate, naphthylate mesylate,

glucoheptonate, lactobionate, methane sulphonate and laurylsulphonate salts, and the like. These may include cations based on the alkali and alkaline earth metals, such as sodium, lithium, potassium, calcium, magnesium, and the like, as well as non-toxic ammonium, quaternary ammonium and amine cations including, but not limited to ammonium, tetramethylammonium, tetraethylammonium, methylamine, dimethylamine, trimethylamine, triethylamine, ethylamine, and the like. (See, for example, S.M. Berge et al., "Pharmaceutical Salts," *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66:1-19 which is incorporated herein by reference.)

The term "prodrug" refers to compounds that are rapidly transformed *in vivo* to yield the parent compounds of the above formula, for example, by hydrolysis in blood. A thorough discussion is provided in T. Higuchi and V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, and in *Bioreversible Carriers in Drug Design*, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

A target cell is a cell of an animal illustratively including human, non-human primate, cats, dogs, rat, mouse, guinea pig, rabbit, goat, sheep, cow, horse, chicken, pig, marmoset and ferret.

In addition, the antibody or therapeutic agent of the present invention can exist in unsolvated as well as solvated forms with pharmaceutically acceptable solvents such as water, ethanol, and the like. In general, the solvated forms are considered equivalent to the unsolvated forms for the purposes of the present invention.

Antibody molecules are purified by known techniques illustratively including amino absorption or amino affinity chromatography, chromatographic techniques such as high pressure liquid chromatography, or a combination thereof.

Another aspect of the present invention includes a pharmaceutical product for use in delivering biologically active anti-TRAIL receptor antibody or humanized anti-TRAIL receptor antibody to a vertebrate. The pharmaceutical product includes a pharmaceutically effective quantity of anti-TRAIL receptor antibody or fragment

thereof, a pharmaceutically acceptable carrier, and a container enclosing the carrier and the antibody in a sterile fashion.

In a preferred embodiment of the invention, a pharmaceutically effective amount of an antibody of the invention inhibits cell proliferation or induces apoptosis by contact with a target cell or with target cells. A pharmaceutically effective amount or quantity of an antibody recognizing either DR5 or DR4 or a humanized antibody recognizing either DR5 or DR4 is an amount administered to an individual sufficient to cause a desired effect. As used herein, the terms "pharmaceutically effective amount" and "therapeutic quantity" are synonymous. Desired effects of administration of a pharmaceutically effective amount of DR5 or DR4 recognizing antibodies include death of one or more target cells, growth inhibition of one or more target cells, stimulation of DR5 or DR4, respectively, binding to DR5 or DR4, respectively, and increased NFkB levels or activity in a target cell. A target cell is a cell that expresses DR5 or DR4 and illustratively includes abnormally growing cells and tumor cells such as papillomas and warts; breast cancer, colon cancer, hepatomas, leukemias, lung cancer, melanoma, myelomas, osteosarcomas, ovarian cancer, pancreatic cancer, prostate cancer, cancer of the head and neck, thyroid cancer, uterine cancer, tumors of the brain such as astrocytomas, activated immune cells (e.g., activated lymphocytes, lymphoid and myeloid cells), inflammatory cells, rheumatoid arthritis synovial cells, and virally infected cells. In vivo, the target cell is a cell of an individual with a pathological condition, including those where cell proliferation is abnormal or dysregulated such as malignant or benign cancer and rheumatoid arthritis.

In another preferred embodiment, the target cell is also contacted by a therapeutic agent. Thus, the antibodies and compositions of the present invention can be administered alone or in combination with one or more therapeutic agents. The therapeutic agents include but are not limited to other members of the TNF family, chemotherapeutic agents, antibodies, antivirals, steroidal and non-steroidal anti-inflammatories, conventional immunotherapeutic agents, cytokines,

chemokines, and/or growth factors. Combinations may be administered either concomitantly (e.g., as an admixture), separately but simultaneously (e.g., via separate intravenous lines into the same subject), or sequentially (e.g., one of the compounds or agents is given first followed by the second). Thus, the term "combination" or "combined" is used to refer to either concomitant, simultaneous, or sequential administration of two or more agents.

In one embodiment the combination therapy includes administration of members of the TNF family. TNF, TNF related or TNF-like molecules that may be administered with the antibody of the invention include but are not limited to soluble forms of TNF-α, lymphotoxin-α (LT-α, also known as TNF-β), LT-β (found in complex heterotrimer 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), endokine-α (WO98/07880), TR6 (WO 98/30694), OPG and nerve growth factor (NGF), and soluble forms of Fas, CD30, CD27, CD40 and 4-IBB, TR2 (WO 96/34095), DR3 (WO97/33904), DR4 (WO 98/32856), TR5 (WO 98/30693), TRANK, TR9 (WO 98/56892), TRIO (WO 98/54202), 312C2 (WO 98/06842), and TR12, and soluble forms of CD154, CD70, and CD153.

In another embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with naturally occurring, synthetic or engineered CD40 ligands (CD40L), including, for example, a soluble form of CD40L (e.g., AVREND), biologically active fragments, variants or derivatives of CD40L, CD40L antibodies (e.g., agonistic or antagonistic antibodies), and/or CD40 antibodies (e.g., agonistic or antagonistic).

In yet another embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with one, two, three, four, five, or more of the following: tacrolimus (Fujisawa), thalidomide (e.g., Celgene), anti Tac (Fv)-PE40 (e.g., Protein Design Labs), inolimomab (Biotest), MAK-195F (Knoll), ASM-981 (Novartis), interleukin-1 receptor (e.g., Immunex), interleukin-4 receptor (e.g., Immunex), ICM3 (ICOS), BMS-188667 (Bristol Myers Squibb), anti-TNF Ab (e.g., Therapeutic Antibodies),

CG-1088 (Celgene), anti-B7 monoclonal antibody (e.g., Imogetics), MEDI-507 (BioTransplant), and ABX-CBL (Abgenix).

According to the invention, the antibody of the invention can be administered with Fas ligand (Fas-L) or a Fas antibody that binds Fas and transduces the biological signal that results in apoptosis. Preferably, the Fas antibodies employed according to this method are monoclonal antibodies.

In certain embodiments, antibodies of the invention are administered in combination with anti-retroviral agents, nucleoside reverse transcriptase inhibitors, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, and/or protease inhibitors. Nucleoside reverse transcriptase inhibitors that may be administered in combination with the antibodies of the invention, include but are not limited to 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-Myers Squibb). Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors that may be administered in combination with the antibody of the present invention include but are not limited to VIRAMUNE® (nevirapine) (Boehringer Ingelheim/Roxanne, Columbus, Ohio), RESCRIPTOR® (delavirdine) (Pharmacia & Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan), and SUSTIVA® (efavirenz) (Bristol-Myers Squibb).

Protease inhibitors that may be administered in combination with the antibodies of the invention include but are not limited to CRIXIVAN® (indinavir sulfate)(Merck & Company, Whitehouse Station, NJ), NORVIR® (ritonavir)(Abbott Laboratories, Chicago, IL), INVIRASE® (saquinavir)(Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ), and VIRACEPT® (nelfinavir)(Agouron Pharmaceuticals, SanDiego, CA). In a specific embodiment, antiretroviral agents, nucleoside reverse transcriptase inhibitors, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, and /or protease inhibitors may be used in any combination with compositions of the invention to treat AIDS and/or prevent or treat HIV infection.

In other embodiments, the antibody of the invention may be administered in combination with anti-opportunistic infection agents. Anti-opportunistic agents that may be administered in combination with the compositions of the invention include, but are not limited to, trimethoprim- pentamidine, sulfamethoxazole, DAPSONE® (Jacobus Pharmaceuticals, Princeton, NJ), ATOVAQUONE® (GlaxoSMithKline, Research Triangle Park, NC), ISONIAZID® (CIBA Pharmaceuticals, Summit, NJ), RIFADIN® (rifampin)(Hoechst-Marrion-Roussel, Kansas City, MO), PYRAZINAMIDE® (Ledelrle, Pearl River, NY), BIAXIN® (clarithromycin) (Abbott Laboratories, Chicago, IL), ETHAMBUTOL® (Ledelrle, Pearl River, NY), RIFABUTIN® (Pharmacia & Upjohn Company, Kalamazoo, MI), AZITHROMYCIN® (Pfizer Inc., NewYork, NY), GANCICLOVIR (Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ), FOSCARNET® (Astra, Westborough, MA), CIDOFOVIR® (Gilead Sciences, Foster City, CA), KETOCONAZOLE® (Janssen, Titusville, NJ), FLUCONAZOLE® (Pfizer Inc., NewYork, NY), ITRACONAZOLE® (Janssen, Titusville, NJ), ACYCLOVIR® (Glaxo-Wellcome, Research Triangle Park, NC), FAMCICOLCIR® (SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Pittsburgh, PA), pyrimethamine, leucovorin, NEUPOGEN® (filgrastim/GM-CSF) (Amgen, Thousand Oaks, CA), and LEUKINE® (sargramostim/GM-CSF) (Immunex, Seattle, WA).

In a specific embodiment, the antibody of the invention is used in any combination with trimethoprim-sulfamethoxazole and/or Atovaquone, Dapsone, Pentamidine, to prophylactically treat and/or prevent an opportunistic *Pneumocystis carinii* pneumonia infection.

In another specific embodiment, the antibody of the invention is used in any combination with Isoniazid, RIFADIN® (Merrell Dow Pharmaceuticals, Cincinnati, Ohio), Pyrazinamide, and/or Ethambutol to prophylactically treat and/or prevent an opportunistic *Mycobacterium avium* complex infection. In another specific embodiment, the antibody of the invention is used in any combination with Rifabutin, Clarithromycin, and/or Azithromycin to prophylactically treat and/or

prevent an opportunistic Mycobacterium tuberculosis infection. In another specific embodiment, the antibody of the invention is used in any combination with Ganciclovir, Foscarnet, and/or Cidofovir, to prophylactically treat and/or prevent an opportunistic cytomegalovirus infection. In another specific embodiment, the antibody of the invention is used in any combination with Fluconazole, Traconazole, and/or ketoconazole to prophylactically treat and/or prevent an opportunistic fungal infection. In another specific embodiment, the antibody of the invention is used in any combination with Acyclovir and/or Famcicolvir to prophylactically treat and/or prevent an opportunistic herpes simplex virus type I and/or type II infection. In another specific embodiment, the antibody of the invention is used in any combination with pyrimethamine and/or leucovorin to prophylactically treat and/or prevent an opportunistic *Toxoplasma gondii* infection. In another specific embodiment, the antibody of the invention is used in any combination with leucovorin and/or NEUPOGEN® (Amgen, Thousand Oaks, CA) to prophylactically treat and/or prevent an opportunistic bacterial infection.

In a further embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with an antiviral agent. Antiviral agents that may be administered include, but are not limited to, acyclovir, ribavirin, amantadine, and remantidine.

In a further embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with an antibacterial agent. Antibacterial agents that may be administered with the compositions of the invention include, but are not limited to, amoxicillin, aminoglycosides, beta-lactam (glycopeptide), betalactamases, clindamycin, chloramphenicol, cephalosporins, ciprofloxacin, erythromycin, fluroquinolones, macrolides, metronidazole, penicillins, quinolones, ritampin, streptomycin, sulfonamide, tetracyclines, trimethoprim, trimethoprim-sulfamthoxazole, and vancomycin.

Conventional nonspecific immunosuppressive agents, that may be administered in combination with the antibody of the invention include, but are not limited to steroids, cyclosporine, cyclosporine analogs, cyclophosphamide

methylprednisone, prednisone, azathioprine, FK-506 (Fujisawa Pharmaceuticals, Deerfield, IL),15 deoxyspergualin, and other immunosuppressive agents that act by suppressing the function of responding immune cells (including, for example, T cells), directly (e.g., by acting on the immune cell) or indirectly (by acting on other mediating cells).

In specific embodiments, the antibody of the invention is administered in combination with immunosuppressants. Immunosuppressants preparations that may be administered with the antibody of the invention include, but are not limited to, ORTHOCLONE® (OKT3) (Ortho Biotech, Raritan, NJ), SANDIMMUNE® ORAL (cyclosporine) (Sandoz Pharmaceuticals, Hanover, NJ), PROGRAF® (tacrolimus) (Fujisawa Pharmaceuticals, Deerfield, IL), CELLCEPT® (mycophenolate) (Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ), azathioprine, glucorticosteroids, and RAPAMUNE® (sirolimus) (Wyeth, Collegeville, PA). In a specific embodiment, immunosuppressants in combination with the antibody may be used to prevent rejection of organ or bone marrow transplantation.

In an additional embodiment, the antibody of the invention is administered alone or in combination with one or more intravenous immunoglobulin preparations. Intravenous immunoglobulin preparations that may be administered with the antibody of the invention include, but not limited to, GAMMARE® (Centeon, Kankakee, IL), IVEEGAM® (Immuno-US Inc., Rochester, MI), SANDOGLOBULFN® (Sandoz Pharmaceuticals, Hanover, NJ), GAMMAGARD (Baxter Healthcare, Glendale, CA), and GAMIMUNE® (Bayer Biological, West Haven, CT). In a specific embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with intravenous immunoglobulin preparations in transplantation therapy (e.g., bone marrow transplant).

In an additional embodiment, the antibody of the invention is administered alone or in combination with an anti-inflammatory agent. Anti-inflammatory agents that may be administered with the compositions of the invention include, but are not limited to, glucocorticoids and the nonsteroidal anti-inflammatories,

aminoarylcarboxylic acid derivatives, arylacetic acid derivatives, arylbutyric acid derivatives, arylcarboxylic acids, arylpropionic acid derivatives, pyrazoles, pyrazolones, salicylic acid derivatives, thiazinecarboxamides, e-acetamidocaproic acid, S-adenosylmethionine, 3-amino4-hydroxybutyric acid, amixetrine, bendazac, benzydamine, bucolome, difenpiramide, ditazol, emorfazone, guaiazulene, nabumetone, nimesulide, orgotein, oxaceprol, paranyline, perisoxal, pifoxime, proquazone, proxazole, and tenidap.

In one embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with steroid therapy. Steroids that may be administered in combination include methylprednisolone (e.g., IV methylprednisolone). In a specific embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with prednisone. In a further specific embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with prednisone and an immunosuppressive agent. Immunosuppressive agents that may be administered and prednisone are those described herein, and include, but are not limited to, azathioprine, cyclophosphamide, and cyclophosphamide IV. In a specific embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with methylprednisolone. In a further specific embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with methylprednisolone and an immunosuppressive agent. Immunosuppressive agents that may be administered with methylprednisolone are those described herein, and include, but are not limited to, azathioprine, cyclophosphamide, and cyclophosphamide IV.

In another embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with an antimalarial. Antimalarials that may be administered with the compositions of the invention include, but are not limited to, hydroxychloroquine, chloroquine, and/or quinacrine.

In yet another embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with an NSAID. Optionally, the antibody of the invention is administered in combination with one, two, three, four, five, ten, or more of the

following drugs: NRD-101 (Hoechst Marion Roussel, Kansas City, MO), diclofenac (Dimethaid, Ontario, CN), oxaprozin potassium (Monsanto), mecasermin (Chiron, Emeryville, CA), T-614 (Toyama), pemetrexed disodium (Eli Lilly, Indianapolis, IN), atreleuton (Abbott, Chicago, IL), valdecoxib (Monsanto), eltenac (Byk Gulden, Melville, NY), campath, AGM-1470 (Takeda, Lincolnshire, IL), CDP-571 (Celltech, Rochester, NY), CM-101 (CarboMed, Nashville, TN), ML-3000 (Merck), CB-2431 (KS Biomedix, Surrey, UK), CBF, BS2 (KS Biomedix, Surrey, UK), IL-Ira gene therapy (Valentis, Burlingame, CA), JTE-522 (Japan Tobacco, Tokyo, Japan), paclitaxel (Angiotech, Vancouver, BC), DW-166HC (Dong Wha, Seoul, Korea), darbufelone mesylate (Pfizer Inc., NewYork, NY), soluble TNF receptor 1 (synergen; Amgen, Thousand Oaks, CA), IPR 6001 (Institute for Pharmaceutical Research), trocade (Hoffman-La Roche, Nutley, NJ), EF5 (Scotia Pharmaceuticals), BIIL-284 (Boehringer Ingelheim, Ridgefield, CT), BIIF-1149 (Boehringer Ingelheim, Ridgefield, CT), LEUKOVAX® (Inflammatics, Malvern, PA), MK-663 (Merck, Whitehouse Station, NJ), ST-1482 (Sigma-Tau, Gaithersburg, MD), and butixocort propionate (Pfizer Inc., NewYork, NY).

In yet another embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with one or more DMARDs. Thus, one, two, three, four, five or more of the following drugs can be used: methotrexate, leflunomide, edatrexate, epiroprim, iometrexol, pyritrexim, trimetrexate, brodimoprim, MX-68, N-[4-[3-(2,4-diamino-6,7-dihydro-5H-cyclopenta[d]-pyrimidin-5-yl)propyl]benzoyl]-L-glutamic acid, N-[[5-[2-(2-amino-1,4,5,6,7,8-hexahydro-4-oxypyryrido[2.3-d]pyrimidim-6-yl)ethyl]-2-thienyl]carbonyl]-L-glutamic acid, (R)N-[[5-[2-(2-amino-1,4,5,6,7,8-hexahydro-4-oxopyrido[2,3-d]prrimidin-6-yl)ethyl]-2-thienyl]-carbonyl]L-glutamic acid, N-((2,4-diamino-3,4,5,6,7,8-hexahydropyrido[2,3-d]pyrimidin-6-yl)ethyl)-2-thienylcarbonyl-L-glutamic acid, (S)-2-[[[4-carboxy-4-[[4-[[(2,4-diamino-6-pteridinyl)methyl]amino]benzoyl]amino]butyl]amino]carbonyl]benzoic acid, N-[4-[3-(2,4-diamino-1-H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)proply]benzoyl]-L-glutamic acid, 2,4-diamino-6-(N-(4-(phenylsulfonyl)benzyl)methylamino)quinazoline, 2,4-

diamino-5-[4-[3-(4-aminophenyl-4-sulfonylphenylamino)propoxy]-3,5-dimethoxybenzyl]pyrimidine, N-[4-4-(2,4-diamino-5-pyrimidinyl)butyl]benzoyl]-L-glutamic acid, N-[4-[3-(2,4-diamino-5-pyrimidinyl)propyl]benzoyl]-L-glutamic acid, N-[4-[2-(2,4-diamino-6-pteridinyl)ethyl]-benzoyl]-4-methylene-DL-glutamic acid and N-(1-methylethyl)-N'[3-(2,4,5-trichlorophenoxy)propoxy] imidodicarbonimidic diamide hydrochloride (PS15), sulfasalazine, sodium aurothiomalate, auranofin, cyclosporine, penicillamine, azathioprine, an antimalarial drug (e.g., as described herein), cyclophosphamide, chlorambucil, gold, Enbrel (etanercept) (Wyeth-Ayerst Laboratories, Philadelphia, PA), anti TNF antibody, and prednisolone. In a more preferred embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with an antimalarial, methotrexate, anti-TNF, Enbrel and/or sulfasalazine.

In one embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with methotrexate. In another embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with anti-TNF antibody. In another embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with methotrexate and anti-TNF antibody or anti-Fas antibody. In another embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with sulfasalazine.

In another specific embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with methotrexate, anti-TNF antibody, anti-Fas antibody and sulfasalazine. In another embodiment, the antibody of the invention is administered in combination Enbrel. In another embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with Enbrel and methotrexate. In another embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with Enbrel, methotrexate, sulfasalazine, leflunomide, etoricoxib, misoprostol/diclofenac sodium, valdecoxib, tiracoxib, rofecoxib, celecoxib, galantamine, darbufelone mesilate, aceclofenac, ML-3000, anakinra, hyaluronate sodium, nimesulide, mycophenolate mofetil, diacerein, sivelestat sodium, deflazacort, nalmefene hydrochloride, samarium-153 lexidronam pentasodium, pentostatin, T-614,

amiprilose hydrochloride, rocepafant, ampiroxicam, prednisolone famesylate, meloxicam, diclofenac sodium, lomoxicam, salazosulfapyridine, etodolac, flupirtine maleate, ebselen, tacrolimus hydrate, nabumetone, cloprednol, piroxicam cinnamate, proquazone, rimexolone, fenretinide, imidazole hydroxybenzoate, droxicam, fentiazac, alfacalcidol, halopredone diacetate, gusperimus hydrochloride, inosine pranobex, actarit, indometacin farnesil, mizoribine, tolfenamic acid, diflunisal, piroxicam, oxaprozin, hyaluronate sodium, bucillamine, ciclosporin, floctafenine, tenoxicam, dexamethasone palmitate, amfenac sodium, acemetacin, auranofin, lobenzarit disodium, or any combination thereof.

In another embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with Enbrel, methotrexate and sulfasalazine. In other embodiments, one or more antimalarials are combined with one of the above-cited combinations. In a specific embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with an antimalarial (e.g., hydroxychloroquine), Enbrel, methotrexate and sulfasalazine. In another specific embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with an antimalarial (e.g. hydroxychloroquine), sulfasalazine, anti-TNF antibody, and methotrexate.

In another embodiment, antibody of the invention is administered in combination with a chemotherapeutic agent. Chemotherapeutic agents that may be administered with the compositions of the invention include, but are not limited to, antibiotic derivatives (e.g. doxorubicin, bleomycin, daunorubicin, and dactinomycin); antiestrogens (e.g., tamoxifen); antimetabolites (e.g., fluorouracil, 5-FU, methotrexate, floxuridine, interferon alpha-2B, glutamic acid, plicamycin, mercaptopurine, and 6-thioguanine); cytotoxic agents (e.g., carmustine, BCNU, lomustine, CCNU, cytosine arabinoside, cyclophosphamide, estramustine, hydroxyurea, procarbazine, mitomycin, busulfan, cis-platin, and vincristine sulfate); hormones (e.g., medroxyprogesterone, estramustine phosphate sodium, ethinyl estradiol, estradiol, megestrol acetate, methyltestosterone, diethylstilbestrol diphosphate, chlorotrianisene, and testolactone); nitrogen mustard derivatives (e.g.,

mephalen, chorambucil, mechlorethamine (nitrogen mustard) and thiotepa); steroids and combinations (e.g., bethamethasone sodium phosphate); and others (e.g., dicarbazine, asparaginase, mitotant, vincristine sulfate, vinblastine sulfate, and etoposide). Others chemotherapeutics include, e.g., CPT-11, deflunomide, cycloheximide, and mitomycin.

In a specific embodiment, antibody of the invention is administered in combination with CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone) or any combination of the components of CHOP. In another embodiment, antibody of the invention is administered in combination with Rituximab. In a further embodiment, antibody of the invention is administered with Rituxmab and CHOP, or Rituxmab and any combination of the components of CHOP.

In an additional embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with cytokines. Cytokines that may be administered with the compositions of the invention include, but are not limited to, GM-CSF, G-CSF, IL-1alpha, IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, anti-CD40, CD40L, IFN-alpha, IFN-beta, IFN-gamma, TNF-alpha, and TNFbeta.

In an additional embodiment, the antibody of the invention is administered in combination with hematopoietic growth factors. Hematopoietic growth factors that may be administered with the compositions of the invention included, but are not limited to, LEUKINE® (sargramostim) and NEUPOGEN® (filgrast).

In additional embodiments, the antibody of the invention is administered in combination with one or more other therapeutic or prophylactic regimens, such as, for example, radiation therapy.

As used throughout, a "therapeutic agent" is a compound or composition effective in ameliorating a pathological condition. Illustrative example of a therapeutic agent include an anti-cancer compound, members of the TNF family, anti-inflammatory agents, anti-viral agents, anti-retroviral agents, anti-opportunistic

agents, antibiotics, immunosuppressive agents, immunoglobulins, antimalarial agents, disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs), cytokines, chemokines, growth factors, and second antibodies that promotes apoptosis of the target cells.

An anti-cancer compound or chemotherapeutic agent is a compound or composition effective in inhibiting or arresting the growth of an abnormally growing cell. Thus, such an agent may be used therapeutically to treat cancer as well as other diseases marked by abnormal cell growth. A pharmaceutically effective amount of an anti-cancer compound is an amount administered to an individual sufficient to cause inhibition or arrest of the growth of an abnormally growing cell. Illustrative examples of anti-cancer compounds include: bleomycin, carboplatin, chlorambucil, cisplatin, colchicine, cyclophosphamide, daunorubicin, dactinomycin, diethylstilbestrol doxorubicin, etoposide, 5-fluorouracil, floxuridine, melphalan, methotrexate, mitomycin, 6-mercaptopurine, teniposide, 6-thioguanine, vincristine and vinblastine. Further examples of anti-cancer compounds and therapeutic agents are found in The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15th Ed., Berkow et al., eds., 1987, Rahway, N.J. and Sladek et al. Metabolism and Action of Anti-Cancer Drugs, 1987, Powis et al. eds., Taylor and Francis, New York, N.Y.

Antibody of the present invention can be further combined with other therapies, such as chemotherapy and/or radiotherapy in the treatment of malignancy, and therapeutic efficacy can be enhanced by apoptosis-inducing compounds, such as bisindolylmaleimide VIII (BisVIII) or other sensitizing agents like SN-50 or LY294002. Thus, in one embodiment, the antibody or antibodies of the present invention can be combined with BisVIII or other sensitizing agent and a chemotherapeutic (e.g., adriamycin, etoposide, topetecan, taxotere, or paclitaxel). In another embodiment, the antibody or antibodies of the present invention can be combined with a non-steroidal anti-inflammatory drug (e.g., sulindac sulfide or other COX-1 or COX-2 inhibitors) a chemotherapeutic (e.g., adriamycin, etoposide, topetecan, taxotere, or paclitaxel). In the treatment of other diseases, e.g., autoimmune and inflammatory diseases, combinations of treatment can also be used.

For example, an antibody can be administered in conjunction with other therapeutic agents like anti-inflammatory agents, DMARDs, chemotherapeutic agents, methotrexate, bisindolylmaleimide VIII or other sensitizing agents, and the like. Radiotherapy can also be combined with other therapeutic agents in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases. One skilled in the art would adapt the form of radiotherapy to the specific inflammatory or autoimmune disease (e.g., radiation synovectomy in the treatment of arthritis).

Therapy using an antibody of the present invention can also be combined with therapy using another antibody. For example, an antibody to DR5 can be administered to a subject in need thereof along with, prior to, or following administration of an antibody to DR4, TNF, B7, CD40 ligand, CD40, CD20 (e.g., rituximab), Fas, or a combination thereof. Such combined antibody therapy can be further combined with administration of one or more therapeutic agents (e.g., chemotherapeutics, doxorubicin, and/or methotrexate), radiotherapy, or both.

Thus, the invention provides a method of selectively inducing apoptosis or inhibiting proliferation in target cells expressing DR5, comprising the steps of (a) contacting the target cells with a therapeutic quantity of an antibody that specifically binds a TRAIL receptor DR5, wherein said antibody, in its soluble form, has in vivo and in vitro apoptosis-inducing activity in target cells expressing DR5 and (b) contacting the target cells with a therapeutic quantity of one or more therapeutic agents. In one embodiment, one or both of the contacting steps are optionally performed *in vivo*. In another embodiment, one or both contacting steps are performed *in vitro*. The target cells can be selected from cells showing disregulation of the apoptosis system, neutrophils, activated lymphocytes or other activated immune cells (e.g., lymphoid cells and myeloid cells), virally infected cells, and abnormally proliferating synovial cells (e.g., rheumatoid arthritis synovial cells, including inflammatory synovial cells, activated lymphoid and myeloid cells in the synovium, macrophage-like synoviocytes, and fibroblast-like synoviocytes) of autoimmune diseases. Compared to previously published anti-DR5 antibody (24),

the apoptosis-inducing activity of the demonstrative TRA-8 antibody of the present invention is very strong, and is able to induce apoptosis of Jurkat cells with the pg/ml levels *in vitro* and demonstrates superior *in vivo* tumoricidal activity as compared to previously reported soluble TRAIL. The intravenous administration of a single dose of TRA-8 is sufficient to inhibit the growth of both solid tumor and hematopoietic tumor cells, whereas induction of *in vivo* tumor regression with the soluble TRAIL requires much high dose (500 μg every day for 10 days). The anti-TRAIL receptor antibodies of the present invention appear to be as safe as soluble TRAIL since exemplary antibody TRA-8 does not induce apoptosis of non-transformed fibroblast cells. Similar results have been observed with DR4 antibodies.

Vectors of the present invention include a nucleic acid sequence encoding a heavy or light chain immunoglobulin of a DR5 or DR4 antibody operably linked to a regulatory element such as a promoter or enhancer. "Operably linked" refers to an arrangement of nucleotide sequences configured so as to perform their usual function. Thus, a regulatory element operably linked to a nucleotide sequence encoding a polypeptide is capable of directing the transcription, replication and/or translation of the polypeptide. It will be recognized by those skilled in the art that a single vector optionally includes coding sequences for both a heavy and a light chain immunoglobulin of a DR5 or DR4 antibody. In one embodiment the vectors encode humanized light or heavy chain immunoglobulins.

The following examples are set forth below to illustrate the methods and results according to the present invention. These examples are not intended to be inclusive of all aspects of the present invention, but rather to illustrate representative methods and results. These examples are not intended to exclude equivalents and variations of the present invention which are apparent to one skilled in the art.

Example 1. Preparation of DR5 antigen

1.1 Cloning of DR5 cDNA

DNA encoding the human DR5 protein is cloned by the following RT-PCR method using:

a) Template

The total RNA of HeLa cells is extracted by using TRIzol Reagent (GIBCO BRL). The template for the PCR reaction used cDNA that is obtained by using the First-Strand cDNA synthesis kit (Amersham Pharmacia Biotech) according to the instruction manual provided with the kit.

b) PCR Primers

The following oligonucleotide primers are synthesized for the PCR:

5'-gacgatgcccgatctactttaaggg-3' (DR5p1: SEQ ID No. 1);

5'- ccactgggtgatgttggatggg-3' (DR5p2: SEQ ID No. 2);

Unless otherwise specified, all oligonucleotides in these Examples are synthesized by Lifetechnologies. All oligonucleotides are stored at –20°C after being dissolved in distilled water.

c) PCR reaction

Composition of the PCR reaction solution:

template cDNA, 5 µl of total 33 µl reaction

primer DR5p1, 10 pmol;

primer DR5p2, 10 pmol;

10 x concentrated PCR buffer (provided with the kit), 10 µl;

dNTPs (each 2.5 mM), 4 µl; and

Taq polymerase (Promega), 5 units.

Sterile distilled water is added to the solution to a total volume of 100 µl. Unless otherwise specified, dNTPs are an equimolar mixture of dATP, dCTP, dGTP and dTTP (2.5 mM each).

The PCR reaction is conducted as follows. The solution is first heated at 94°C for 2 minutes, after which a cycle of heating to 94°C for 30 sec, 52°C for 1

minute and 72°C for 3 minutes, is repeated 40 times. After completion of this procedure, the reaction solution is heated at 72°C for 10 minutes.

The amplified DNA fragments, thus obtained, are separated on a 1% agarose gel containing 0.25 ug/ml ethidium bromide. The bands determined to contain the desired DNA fragments are cut out using a razor blade and the DNA is recovered therefrom using the Gene Clean kit (BIO101). The DNA fragment is cloned using the TA Cloning Kit (Invitrogen, CA). This is performed as follows.

The DNA fragment recovered from the PCR reaction solution, together with 50 ng of pCR2.1 vector which is provided with the TA Cloning kit, is mixed with 1 µl of 10 X ligase reaction buffer (6 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 mM magnesium chloride, 5 mM sodium chloride, 7 mM β-mercaptoethanol, 0.1 mM ATP, 2 mM DTT, 1 mM spermidine, and 0.1 mg/ml bovine serum albumin), to which 4 units of T4 DNA ligase (1 µl) has been added. The total volume of the mixture is adjusted to 10 µl with sterile deionized water, and the resulting ligase solution is incubated at 14°C for 15 hours. After this time, 2 µl of the ligase reaction solution is added to 50 µl of competent *E. coli* strain TOP10F', which is provided with the TA cloning kit and brought to competence in accordance with the instruction manual, to which 2 µl of 0.5 M β-mercaptoethanol has been added, and the resulting mixture is kept on ice for 30 minutes, then at 42°C for 30 seconds, and again on ice for 5 minutes. Next, 500 µl of medium containing 2% v/v tryptone, 0.5% w/v yeast extract, 0.05% w/v sodium chloride, 2.5 mM potassium chloride, 1 mM magnesium chloride, and 20 mM glucose (hereinafter referred to as "SOC" medium) is added to the culture, and the mixture is incubated for 1 hour at 37°C with shaking. After this time, the culture is spread on an L-broth agar plate (1% v/v tryptone, 0.5% w/v yeast extract, 0.5% w/v sodium chloride, 0.1% w/v glucose, and 0.6% w/v bacto-agar (Difco)), containing 100 µg/ml Ampicillin resistant colonies appearing on the plate are selected and scraped off with a platinum transfer loop, and cultured in L-broth medium containing 100 µg/ml ampicillin at 37°C, overnight, with shaking at 200

r.p.m. After incubation, the cells are harvested by centrifugation, from which plasmid DNA is prepared by the alkali method. EcoRI-EcoRI DR5cDNA fragment from the thus obtained plasmid is subcloned into pcDNA3 plasmid (Invitrogen, CA). The full length of the DR5 gene in pcDNA3 are sequenced and matched the published sequence. The thus obtained plasmid is designated as plasmid pcDNA3-DR5.

1.2 Construction of DR5-IgG expression vector

In order to obtain a soluble form of human DR5 lacking the transmembrane domain, an expression plasmid vector is constructed. This vector is designed to encode a fusion protein comprising the extracellular domain of human DR5 fused to the human IgG1 Fc DNA (41). DNA encoding the human DR5 lacking the transmembrane domain is obtained by the following PCR reaction.

a) Template

The template for the PCR reaction used pcDNA3-DR5.

b) PCR Primers

The following oligonucleotide primers are synthesized for the PCR:

5'-gacgatgcccgatctactttaaggg-3' (DR5p1: SEQ ID No. 1);

5'-ggatccgtggacacattcgatgtc-3' (DR5p3: SEQ ID No. 3);

Unless otherwise specified, all oligonucleotides in these Examples are synthesized by Lifetechnologies. All oligonucleotides are stored at -20°C after being dissolved in distilled water.

c) PCR reaction

The PCR reaction is conducted and amplified DNA isolated as per Example 1.1(c).

The thus obtained plasmid is designated as plasmid pCR-ΔDR5. The BamHI-EcoRI fragment encoded human Fc fragment which is recovered from pmFas-hIgG1Fc is subcloned into BamHI and EcoRI multi-cloning sites of pcDNA3. The plasmid thus obtained is designated pcDNAFc. Furthermore, the BamHI-BamHI fragment encoding the human soluble DR5 region which is

recovered from pCR-ΔDR5 is subcloned into the BamHI site of pcDNAFc plasmid. The thus obtained plasmid is designated as plasmid pcDNAΔDR5-Fc. The EcoRI fragment encoding the human soluble DR5-human IgG Fc region which is recovered from the pcDNAΔDR5-Fc plasmid is blunt ended by using the DNA polymerase Klenow fragment (GIBCO BRL) and then subcloned into the shuttle vector pAdCMV5 (Quantum Biotechnologies Inc., Canada) which is blunt ended after cutting by BamHI. The plasmid thus obtained is designated pAdΔDR5-Fc.

1.3 Expression and purification of the human DR5-IgG1 fusion protein

QBI-293A cells (provided with the ADENO-Quest Kit) are co-transfected with pAdΔDR5-Fc and QBI-viral DNA (provided with the ADENO-Quest Kit) using the ADENO-Quest kit (Quantum Biotechnologies Inc., Canada) according to the instruction manual. The recombinant virus plaques are cultured and screened for expression of DR5-IgG fusion protein by ELISA analysis of the supernatant. The positive plaques are amplified in QBI-293A cells and stored at –80°C as virus stock. Fifty dishes (150 mm) of QBI-293A cells are transfected with pAdΔDR5-Fc recombinant virus at 10 m.o.i. (Multiplicity of Infection). The culture media are harvested after transfection for 48 hours.

The transfected cells having the DR5-IgG gene are grown to a cell density of 1×10^6 cells/ml by incubation in 500 ml of DMEM (GIBCO) medium, containing 10% v/v FCS, at 37°C in an atmosphere of 5% v/v CO_2 for 2 days. The culture is then centrifuged (1,000 r.p.m., 5 minutes) and the supernatant collected. The purification of DR5-IgG from the supernatant is achieved using ProteinA-Sepharose CL-4B affinity chromatography (Pharmacia) under the following conditions:

column: ProteinA-Sepharose CL-4B column (column size 2 ml; Pharmacia);
elution buffer: 0.1 M glycine (pH 2.4), 0.15 M NaCl;
neutralization buffer: 1M Tris-HCl (pH 8.5).

After all of the supernatant is applied to the column, it is washed three times with 20 ml of PBS and then 1 ml of elution buffer is added 10 times. The optical density of each eluted fraction (1 ml) is measured. The second fraction through the fifth fraction (with $OD_{280} \geq 0.1$) are collected and after addition of 100 µl of neutralization buffer, the eluates are placed separately in dialysis tubing, and the eluates dialyzed against 1 liter of PBS (pH 7.5) at 4°C. The dialysis buffer being changed twice.

The eluates are then assayed for expression of the DR5-IgG gene product by ELISA. First, 100 µl of each fraction are placed separately into wells of a 96-well microplate (Costar) and incubated at 37°C for 1 hour. After this time, the solution in the wells is removed, and the plate is washed 3 times with 100 µl/well of PBS containing 0.1% v/v Tween 20 (hereinafter referred to as "PBS-Tween"). After washing, PBS containing 2% w/v bovine serum albumin (hereinafter referred to as "BSA") is added in quantities of 100 µl/well, and the plate is then incubated at 37°C for 1 hour. After this time, the wells are washed a further 3 times with 100 µl/well of PBS-Tween, after which 100 µl/well of a solution of anti-human IgG1 monoclonal antibody diluted 1000-fold with PBS-Tween is added to each well, and the plate is once again incubated at 37°C for 1 hour. The wells are then washed 3 times with 100 µl/well of PBS-Tween. 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine (hereinafter referred to as "TMB") liquid substrate system (Sigma) is then added in an amount of 100 µl/well and the plate is allowed to stand at room temperature for 5 minutes and then the reaction stopped by adding 100 µl/well of 0.2N H_2SO_4. The absorbance of each well is read at 450 nm to estimate the concentration of the bound antibody, using the absorbance at 650 nm as the control reading. The absorbance is measured using a microplate reader (Molecular Devices). The production of DR5-IgG1 is confirmed using this ELISA method. The molecular weight of the expressed DR5-IgG1 fusion protein is determined using western blotting analysis in which anti-human IgG1 mAb (Sigma) is used to detect the antibody on the gel. The molecular

weight of the expressed DR5-IgG1 fusion protein has an approximate molecular weight of 50 kDa. The purity achieved being greater than 90% as evaluated by analysis on SDS-PAGE and detection of the protein by Coomassie blue staining.

Example 2. Generation of monoclonal antibodies against human DR5

2.1 Immunization

Female, Balb/c mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) of 6-8 weeks of age, are immunized with the affinity-purified human DR5/hIgG1 fusion protein. For the initial foot-pad immunization, the fusion protein (50 μg) is emulsified in Freund's complete adjuvant (Difco, Detroit, MI). The mice are then boosted with four injections of 50 μg of fusion protein administered without adjuvant every other day. Three days after the last injection, lymphocytes from the local lymph nodes are fused with NS-1 myeloma cells, and the hybridomas are cultured in F104 media supplemented with 10% fetal calf serum. Positive hybridomas are selected by ELISA in which the plates are coated either with 1 μg/ml DR5/hIgG1 or the same amount of Fas/hIgG1 as a control. The isotype of the hybridomas is determined by ELISA using a panel of mouse Ig isotype-specific goat antibodies (Southern Biotechnology, Birmingham, AL). Monoclonal antibodies are purified by affinity chromatography using immobilized anti-mouse IgG1 or protein G (Sigma).

2.2 Cell fusion

On the third day after the booster injection, the local lymph nodes are removed from the mouse and placed into 10 ml of serum-free RPMI 1640 medium (GIBCO BRL) containing 50 units/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin, and 300 μg/ml L-glutamic acid, and disrupted by passing the organ through a mesh (Cell Strainer; Falcon) using a spatula. The resulting cell suspension is centrifuged to pellet the local lymph nodes cells which are then washed twice with serum-free RPMI medium. The washed cells are then resuspended in serum-free RPMI medium and counted.

In the meantime, myeloma NS1 cells (American Type Culture Collection TIB-18) had been grown to a cell density not exceeding 1 x 10^8 cells/ml in ASF104 medium (Ajinomoto, K. K.) containing 10% v/v FCS (Gibco BRL) ("ASF medium with serum") at 37°C under 5% v/v CO_2, and these are likewise disrupted, washed, resuspended and counted.

An amount of the NS1 cell suspension calculated to contain 3 x 10^7 cells is mixed with an amount of the spleen cell suspension calculated to contain 3 x 10^8 cells. The resulting mix is centrifuged and the supernatant discarded. The following steps of the cell fusion are performed whilst at all times keeping the plastic tube containing the pellet at 37°C in a beaker of warm water.

One ml of 50%(w/v) polyethylene glycol 1500 (Boehringer Manheim) is then slowly added to the tube, all the while stirring the pellet using the tip of a pipette. Subsequently, 1 ml of serum-free RPMI medium, prewarmed to 37°C, is slowly added in 2 portions, followed by the addition of a further 7 ml of serum-free RPMI medium. The resulting mix is then centrifuged, the supernatant discarded and 10 ml of HAT medium containing 10% v/v FCS are added while stirring gently with the tip of a pipette. A further 20 ml of HAT medium containing 10% v/v FCS is added, and the suspension is dispensed into 96-well cell culture microplates at 100 µl/well and incubated at 37°C in an atmosphere of 5% v/v CO_2. After 7 or 8 days, 100 µl/well of fresh HAT medium are used to replace medium in any wells exhibiting a yellowish hue. The fusion cells from these wells are cloned by limiting dilution as described below.

2.3 Cloning by limiting dilution

Thymuses from 4 to 10 week-old female BALB/c mice (from Japan SLC, Inc.) are removed, disrupted on a mesh (Cell Strainer; Falcon) as described above, and the disrupted cells are washed twice with HT medium containing 10% v/v FCS. An amount of thymus cells corresponding to those from one mouse is suspended in 30 ml of HT medium containing 10% v/v FCS to produce a feeder cell suspension. The fusion cell preparation obtained above in Example 2.2 is diluted with this feeder

cell suspension 10- to 100-fold, and further diluted serially with the feeder cell suspension to make suspensions having fusion cell densities of 5, 1 and 0.5 cells/ml. The thus prepared samples are dispensed into wells of 96-well cell culture microplates at 100 µl/well and incubated for 5 days at 37°C under 5% v/v CO_2.

2.4 Screening

The culture supernatants from the growing hybridomas are screened by ELISA using plates coated either with 1 µg/ml DR5/hIgG1 or the same amount of Fas/hIgG1 (41) as a control. The bound antibodies are detected using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse immunoglobulins (Southern Biotechnology. Birmingham, AL) with TMB (Sigma, St Louis, MI) as the substrate. Purified DR5-IgG1 at a concentration of 1 µg/ml or the same amount of Fas-hIgG1 are introduced into a well of a 96-well ELISA/RIA STRIP PLATE (Costar, NY). The plate is kept standing at 4°C overnight to allow adsorption of the protein onto the well surface. After this time, the solution in the wells is discarded and each well is washed 3 times with PBS-Tween. Then, 100 µl of PBS containing 1% (w/v) bovine serum albumin (A3803; Sigma Chemicals Co.) is added to each well and the plate is incubated at 37°C for 1 hour. The wells are then washed a further 3 times with PBS-Tween, and then 50 µl of each culture supernatants from the growing hybridomas is added to each well. The plate is then incubated at 37°C for 1 hour, and the wells are again washed 4 times with PBS-Tween. After washing, 50 µl of horseradish peroxidase labeled goat anti-mouse immunoglobulin antibody (Southern Biotechnology; Birmingham, AL), diluted 1000-fold with PBS, is added per well, and the plate is again incubated at 37°C for 1 hour, after which the wells are washed 4 times with PBS-Tween. 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine (TMB) liquid substrate system (Sigma) is then added in an amount of 100 µl/well and the plate is allowed to stand at room temperature for 5 minutes and then the reaction stopped by addition of 100 µl/well of 0.2N H_2SO_4. The absorbance of each well at 450 nm (control 650 nm) is measured using a microplate reader (Molecular Devices) and fusion cells are selected from the sample which had the absorbance (450 nm-650 nm, OD values; >

0.5) clearly higher than those to which no fusion cells supernatant had been added (OD values; ≈ 0.03). Furthermore, the culture supernatants from the growing hybridomas are also functionally screened by measuring the apoptosis-inducing activity using Jurkat cell. Fifty μl of RPMI medium containing Jurkat cells (1000 cells per well) and 5 uM Bisindolylmaleimide VIII (BisVIII, Alexis, San Diego, CA) are added in 96-well plates in the presence of 50 μl of the culture supernatants from the growing hybridomas. The cells are cultured in a humidified incubator at 37°C overnight. Apoptosis is determined by cell viability using the ATPLite kit as instructed by the manufacturer (Packard Instruments), and the samples are counted using the TopCounter (Packard Instruments).

2.5 ELISA binding of TRAIL and TRA-8 to the receptors

ELISA plates are coated with 2 μg/ml of DR4-Ig or DR5-Ig fusion protein overnight. After blocking with 3% BSA, the soluble TRAIL-FLAG or TRA-8 is added at indicated concentrations and incubated at 37°C for one hour. The binding of TRAIL or TRA-8 is detected by HRP-conjugated anti-Flag antibody (Alexis) or HRP-conjugated anti-murine IgG1 (Southern Biotechnology), respectively. The reactions are developed by TMB substrate buffer and measured by the Benchmark Microplate Reader (BioRad). The Kd values are estimated by the one-site binding model of non-linear regression using GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA). For competitive ELISA, 100 ng/ml TRAIL-FLAG is added and incubated in the presence of various concentrations of TRA-8. The binding of TRAIL is determined as above.

2.6 Cloning

The steps described in Examples 2.3 and 2.4 above are repeated 5 times for the cells selected in 2.4, thereby enabling the selection of several hybridoma clones each of which produced a single antibody that bound DR5-IgG but did not bind Fas-IgG. As a result of this selection procedure, a mouse-mouse hybridoma, designated TRA-8 and producing an antibody binding to DR5-IgG, but not Fas-IgG, is

obtained. This hybridoma, TRA-8, was deposited with the American Type Culture Collection on March 1, 2000, and has been assigned accession No. PTA-1428.

The subclass of the antibody produced by the mouse-mouse hybridoma TRA-8 (hereinafter referred to simply as "TRA-8") is demonstrated to be IgG1, κ, after testing with a monoclonal antibody isotyping kit (Pierce).

Using our human DR5-IgG1 fusion protein as immunogen, seven hybridoma clones are obtained by initial ELISA screening, all of which are strongly positive for DR5-IgG but not the Fas-IgG fusion protein, indicating that the obtained hybridomas produce antibodies that recognize the extracellular portion of DR5 but not the Fc portion of IgG1 (data not shown).

2.7 Western blot analysis

Filters for Western blot analysis of normal human and cancer tissue homogenates are purchased from Geno Technology (St Louis, MO). Each lane is loaded with an equal amount of protein as determined by an anti-β-actin antibody. The blots are probed with 1 μg/ml TRA-8 overnight, and followed by HRP-conjugated goat anti-mouse IgG1 (Southern Biotechnology) at room temperature for one hour, and developed by chemiluminescence.

2.8 *In situ* immunohistochemistry

Human tissues are obtained from the Tissue Procurement Center of UAB. Frozen sections are fixed in 70% ethanol, blocked with 10% horse serum in PBS, and then incubated with 10 μg/ml of affinity-purified TRA-8 at room temperature for 60 minutes. The anti-mouse IgG ABC kit with diaminobenzidine (Vector, Burlingame, CA) as the colorimetric substrate is used to visualize the reactivity.

2.9 Analysis of caspase activation

Jurkat cells ($1x10^6$/ml) are incubated with 500 ng/ml TRA-8. Aliquots (30 μg of protein) of the cell lysate are separated on 15% SDS-PAGE, blotted onto a nylon membrane, and the blots are probed with anti-caspase 8, 9, and 3 antibodies (BD Pharmingen, San Diego, CA) followed by HRP-conjugated secondary antibody and chemiluminescence visualization of cleaved products. The caspase inhibitor set

is purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Each caspase inhibitor is added into culture at indicated concentrations.

Example 3. Purification of TRA-8 Monoclonal Antibody

The mouse-mouse hybridoma, TRA-8, is grown to a cell density of 1×10^6 cells/ml by incubation in 500 ml of ASF medium, containing 10% v/v FCS, at 37°C under 5% v/v CO_2 for 5 days. The culture is then centrifuged (1,000 r.p.m., 5 minutes) and the supernatant collected. The purification of TRA-8 from the supernatant is achieved using ProteinG-Sepharose CL-4B affinity chromatography (Pharmacia) under the following conditions:

column: ProteinG-Sepharose CL-4B column (column size 2 ml; Pharmacia);

elution buffer: 0.1 M Glycine (pH 2.4), 0.15 M NaCl;

neutralization buffer: 1M Tris-HCl (pH 8.5).

After all of the supernatant is applied to column, 20 ml of PBS is washed three times and then elution buffer is added in 1 ml volumes for 10 times. The optical density of each eluted fraction (1 ml) is measured. The fractions from No. 2 to No. 5 ($> OD_{280} = 0.1$) are collected separately.

After adding 100 µl of neutralization buffer, the eluates are placed in dialysis tubing separately, and the eluates dialyzed against 1 liter of PBS (pH 7.5) at 4°C. The dialysis buffer being changed twice. This sample is assayed for anti-DR5 antibody activity by ELISA using the human DR5-IgG fusion protein prepared above using the technique described above.

Example 4. Preparation of DR4 antigen, DR4-IgG expression vector and anti-DR4 monoclonal antibody

The procedures of Examples 1-3 are repeated with DR4 template cDNA and primers in place of those detailed in Example 1 to obtain a DR4 antigen which is utilized as per Examples 1.2-3 to obtain a monoclonal antibody specific against DR4.

Example 5. Monoclonal antibodies against DcR1 and DcR2

Monoclonal antibodies are raised against decoy receptors DcR1 and DcR2 by substituting the corresponding cDNA and primers to create the respective antigens as per Example 1. Expression vectors for DcR1 or DcR2-fusions with immune globulin G and resulting purified monoclonal antibodies are created as per Examples 2 and 3.

Example 6. The specificity of a monoclonal antibody

As all of the receptors for TRAIL and other proteins of the TNFR family share significant homology, the specificity of exemplary antibody TRA-8 for DR5 is determined by western blot analysis using two different human DR5-IgG fusion proteins and soluble, recombinant forms of other related proteins. A first DR5-Ig fusion protein is constructed by fusing cDNA from residues 1-180 of the extracellular portion of DR5 and cDNA encoding the constant region of human IgG1. The fused cDNA is cloned into a recombinant adenoviral vector (Quantum Biotechnogies, Inc., Montreal, Canada). The expressed DR5/hIgG1 fusion protein, which had a relative molecular weight of 50 kDa, is purified using an anti-human IgG affinity column (Sigma, St Louis, MO). For western blot analysis of specificity, a second recombinant human DR5/IgG1 fusion protein (aa. 52-212), as well as TRAIL-R1, R3 and R4 fusion proteins, are purchased from Alexis. The soluble forms of human Fas and TNFR1 are kindly provided by Dr. Carl Edwards of Amgen, Inc., Thousands Oaks, CA, USA. The soluble recombinant human DR4, DcR1, DcR2, TNFR1, R4, and Fas molecules used are human IgG1 fusion proteins. 0.5 μg of each protein is separated by 10% SDS-PAGE and blotted onto a nitrocellulose membrane. The blots are blocked with 5% dry milk in PBS at room temperature for one hour, and probed with 1 μg/ml of purified monoclonal anti-DR5 antibody (clone: TRA-8) or 0.1 μg/ml of HRP-conjugated goat anti-human IgG at 4°C overnight. Horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG is used as secondary antibody to detect bound TRA-8. The blots are developed by chemiluminescence.

Cos-7 cells transfected with the pcDNA3 vector (Clontech, Palo Alto, CA) containing the full-length DR5 or DR4 or empty vector are used for flow cytometry analysis. The full-length cDNA encoding human TRAIL or murine Fas ligand is cloned into the pTRE vector down-stream of the tetracycline-controllable promoter (Clontech). The XhoI-HindIII fragments of pTRE-hTRAIL or pTRE-mFasL are further cloned into the adenoviral shuttle vector pAdBN (Quantum Biotechnologies, Inc.). The 293 host cells are co-transfected with the linear pTRE-hTRAIL or pAd-TRE-mFasL and the large fragment DNA of adenovirus. The expression of functional human TRAIL or murine Fas ligand from the recombinant virus plaques is screened using a ^{51}Cr-release assay with Jurkat as the targets.

TRA-8 reacted strongly with the DR5-IgG fusion protein (~50 kDa), which is used for immunization as shown in Figure 1a, DR5, #1, and weakly with the second DR5-IgG fusion protein (~60 kD) as shown in Figure 1a, DR5, #2. There is no significant binding of TRA-8 to DR4, DcR1, DcR2, Fas (CD95) or TNFRI. These results indicate that TRA-8 recognizes the epitopes that are specific for DR5 but not shared by the other members of the family.

TRA-8 does not react with other members of the TNF receptor superfamily, such as Fas (CD95) and TNF receptor I, nor does TRA-8 cross-react with the murine homologue of DR5 as shown by optical absorbance ratios for 450 nm and 650 nm, wherein lower panel numbers 1-7 (Fig. 1a, the column 8 of lower panel). Soluble TRAIL and TRA-8 bound comparably to immobilized DR5 (Fig. 1b, left panel). In contrast, TRAIL bound to DR4, but TRA-8 did not exhibit any binding activity to DR4 (Fig. 1b, middle panel). The Kd values for the binding of TRAIL and TRA-8 to DR5 are estimated at 59 nM and 3 nM, respectively. Importantly, TRA-8 efficiently competing with TRAIL for binding to DR5 but not for binding to DR4, as shown in competitive ELISA (Fig. 1b, right panel). These results establish the specificity of TRA-8 for human DR5.

TRA-8 is able to detect cell surface expression of DR5, with flow cytometric analysis indicating specific binding to the cell surface of Cos-7 cells transfected with

full-length human DR5, but not of Cos-7 cells transfected with DR4 or empty vector (Fig. 1c). Similarly, *in situ* immunohistochemistry with TRA-8 demonstrated reactivity with Cos-7 cells transfected with full-length DR5 DNA but not with those transfected with control vector (Fig. 1d). TRA-8 does not induce apoptosis of untransfected Cos-7 cells, and RT-PCR of RNA from Cos-7 cells using paired primers encoding human DR5 showed that no specific PCR products. Further functional analysis using human Jurkat cells as targets showed that, in the absence of crosslinking, TRA-8 strongly induces cell death, demonstrated by three different assays for cell viability including ATPLite, MTT and PI exclusion (Fig. 1e). Greater than 50% of Jurkat cells are killed by nanogram levels of TRA-8 as shown by ATPLite assay. The killing activity of TRA-8 is specific for DR5 as it could be blocked by DR5-Ig but not DR4-Ig fusion protein (data not shown). Cleavage of caspases 8, 9, and 3 could be detected by western blot analysis as early as 30 minutes after TRA-8 treatment of Jurkat cells (Fig. 1f), and cell death of Jurkat cells is completely inhibited by the general caspase inhibitor (Z-VAD) (Fig. 1g). Individual caspase inhibitors for caspase 8, 3, 9, and 10 partially inhibited cell death, further indicating that TRA-8-mediated cell death is primarily through a caspase-dependent apoptotic mechanism.

Example 7. Flow cytometric analysis of the expression of cell surface DR5: A major death receptor on many tumor cells but not on normal cells

The ability of TRA-8 to bind DR5 expressed on the cell surface and the specificity of this reaction is then assessed using COS-7 (American Type Culture Collection No. CRL-1651) cells transfected with the expression vector containing the full-length human DR5 or DR4 cDNA or empty vector as control. Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-mouse IgG1 (Pharmingen) is used as the second antibody to detect the bound TRA-8. The fluorescence of 1 X 10^4 cells is measured, using a flow cytometer (FACSVantage) under the following conditions:

Excitation wave length: 488 nm;

Detection wave length; 600 nm.

Flow cytometry analysis showed that TRA-8 stained approximately 30% of COS-7 cells transfected with the DR5 vector as shown in the solid histogram of Figure 1c. This percentage parallels the transfection efficiency as determined by analysis of transfection using green fluorescent protein (GFP) (data not shown). TRA-8 did not significantly stain cells transfected with either DR4 (the open histogram) or control vector (the dotted histogram), indicating that TRA-8 is specific for cell surface DR5.

Although DR5 expression in tumor cells has been studied extensively at the mRNA level (REFERENCE please insert), the surface expression of DR5 has not been documented. Thus, the availability of monoclonal anti-DR5 antibody allows us to examine the surface levels of DR5, and to correlate the expression with the susceptibility of the cells to TRAIL-mediated apoptosis. The following panel of cells (1×10^6) is incubated with 10 μg/ml of affinity purified TRA-8 at room temperature for 30 min, and then stained with PE-conjugated anti-mouse IgG1 (Pharmingen) for another 30 min. 10,000 viable cells are analyzed using the FACS vantage flow cytometer under the following conditions:

Excitation wave length: 488 nm;

Detection wave length: 600 nm.

The five hematopoietic cell lines tested are Jurkat, CEM-6, Molt-4, H-9 and U937 cells. DR5 expression is detectable on the surface of Jurkat, CEM-6, H-9, and U937 cells but is almost undetectable on Molt-4 cells as shown in Figure 2a and 2a'. Although high levels of DR5 RNA expression has been described previously (43), the FACs analysis indicated that these cells do not express high levels of the surface DR5. These results indicate that cell surface expression of DR5 does not correlate with the transcriptional expression of DR5, which is not unexpected for such a receptor. The level of cell surface expression of DR5 may be cell lineage-specific since most of the cells of hematopoietic origin expressed low levels whereas most glioma and prostate cells expressed high levels of DR5.

TRA-8 monoclonal antibody is used determine the role of DR5 in induction of TRAIL-mediated apoptosis by examining its cell surface expression among a panel of different types of human tumor cells as well as the susceptibility of these cells to both TRAIL and TRA-8-mediated apoptosis. Primary peripheral blood T cells did not express significant levels of cell surface DR5 and are resistant to both TRAIL and TRA-8-mediated apoptosis (Figs. 2*a*, 2*a'* and 3*a'*). Although all five of the human T-leukemia cell lines tested expressed detectable albeit relatively low levels of cell surface DR5, two of them (Jurkat and CEM-6) are highly susceptible to both TRAIL-mediated and TRA-8-mediated apoptosis, indicating that DR5 alone is sufficient to induce apoptosis of these cells. Molt-4 and U937 cells are partially susceptible to TRAIL-mediated apoptosis but are relatively resistant to TRA-8-mediated apoptosis, suggesting that other TRAIL receptors might be involved in transduction of an apoptosis signal. H-9 cells are resistant to both TRAIL and TRA-8-mediated apoptosis, implicating a block mediated by an intracellular anti-apoptosis pathway.

The panel of cells included the human malignant glioma cell lines, Hs683, U251MG, D37MG, D54MG, U373MG, CH235MG, U87 and normal human astrocytes, which were provided by Dr. Yancey Gillespie of the Neurosurgery Department of the University of Alabama at Birmingham. The human prostate cancer cell lines, Du154, PC3 and LnCap, were provided by Dr. William Grizzle of the Pathology Department of the University of Alabama at Birmingham who had obtained the cell lines from the American Type Culture Collection. The human leukemia T cell lines, B-cell lymphoma, HepG2 Jurkat (American Type Culture Collection TIB-152) and CCRF-CEM CEM-6 (American Type Culture Collection CCL-119); monocyte cell lines, U937 (American Type Culture Collection CRL-2367); were purchased from the American Type Culture Collection. All above cell lines are cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS. The human astrocytoma cell line, 1321N1, was kindly provided by Dr. Richard Jope of

Psychiatry Department of the University of Alabama at Birmingham, and cultured in DMEM supplemented with 5% FCS.

Soluble recombinant human TRAIL, purchased from Alexis Corporation (San Diego, CA), is a fusion protein comprised of the extracellular domain of human TRAIL (aa residues 95 to 281) fused at N-terminus to a FLAF-tag and an 8 amino acid linker peptide. Unlike previously reported His-tagged TRAIL, this preparation of TRAIL alone does not induce a strong apoptotic response in Jurkat cells and requires an anti-FLAG antibody as a crosslinker to enhance apoptosis. The anti-FLAG antibody was also purchased from Alexis.

All of the 10 human malignant glioma cells tested expressed detectable levels of DR5 at the cell surface. Most expressed intermediate to high levels of DR5 as shown in Figure 2b. Three lines, D-54MG, U373MG and CH-235MG expressed high levels of DR5 while six lines, Hs-683, U251-MG, D37-MG, U87, SMK1 and 1321N1, expressed intermediate levels of DR5. Only one cell line, H-465 expressed low levels of DR5. All three prostate cancer cell lines expressed high levels of DR5 as shown in Figure 2c.

Like the normal primary T cells, primary B cells did not express significant levels of DR5 and did not undergo apoptosis after treatment with either TRAIL or TRA-8 (Fig. 2*d*). Three (SKW6.4, EB-3, and Raji) out of the four B lymphoma cell lines tested expressed relatively high levels of DR5 and are very susceptible to both TRAIL and TRA-8-mediated apoptosis. The fourth cell line, Daudi, expressed very low levels of DR5 and is much less susceptible to either TRAIL or TRA-8-mediated apoptosis. Although primary astrocytes did not express detectable levels of cell surface DR5 (Fig. 2*b'*), all four glioma cell lines tested expressed high levels of DR5. The higher level of expression of DR5 on glioma cells than on T and B cells is not accompanied by a significantly greater susceptibility to TRAIL and DR5-mediated apoptosis, suggesting that the level of cell surface expression of DR5 is not necessarily correlated with the level of apoptosis of tumor cells. RT-PCR, performed to determine message levels of DR4, DR5 and DCR2, detected message

in all cells tested (Table 1). However, in general, primary normal cells expressed relatively low levels of DR5 compared to transformed tumor cells.

Table 1: RT-PCR analysis of TRAIL receptor expression*

Cells	DR5	DR4	DcR2
Primary T cells	<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
Primary B cells	<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
Normal Astrocytes	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

* Total RNA was isolated from cells and RT-PCR was performed as described in Methods. The PCR products were separated in 3% agarose gel and analyzed by the Fluor-S MAX MultiImager System (BioRad). The values are presented as a ratio relative to β-actin.

Example 8. Induction of apoptosis in vitro in malignant cells

To determine whether TRA-8 induces apoptosis in transformed cells *in vitro*, all DR5-positive tumor cells are examined for their susceptibility to apoptosis induced either by TRA-8 or TRAIL.

Target cells (1 x 10^3 per well) are cultured in 96-well plates in the presence of the indicated concentrations of soluble TRAIL plus crosslinker (Alexis) or TRA-8 at 37°C overnight. Cell viability is determined using (1) the ATPLite kit according to the manufacturer's instructions (Packard Instruments, Meriden, CT); (2) the MTT Cell proliferation/viability kit (Sigma); or (3) PI staining of dead cells and analyzed by flow cytometry. At end of culture, cells are stained with 10 μg/ml PI and PI

negative cells are gated as viable cells. For analysis of condensed nuclei of hepatocytes, cells are stained with 10 ng/ml Hoechst 33352 (Molecular Probes) and analyzed by flow cytometry.

The TRA-8 antibody is capable of inducing apoptosis in the majority of the malignant human glioma cell lines (9/10), in 2 of the 3 prostate cancer cell lines, and in 2 of the 4 DR5-positive hematopoietic cell lines. It did not induce apoptosis in the Molt-4 cell line, which expressed almost undetectable cell surface levels of DR5. The levels of susceptibility of the cells to TRA-8-mediated apoptosis varied considerably among the cell lines, however.

The variability of the susceptibility of the cells to TRA-8 antibody induced apoptosis suggests that although a minimal level of cell surface expression of DR5 is required, the level of cell surface expression of DR5 is not necessarily the primary determinant of susceptibility and other factors influence this process. Although all of the glioma cells generally expressed significantly higher levels of the surface DR5 than did the hematopoietic cells, glioma cell susceptibility to apoptosis induced by TRA-8 is not proportionally increased compared to the hematopoietic cells. The susceptibility of five of the glioma cell lines, D-37MG, D54-MG, U373-MG, CH235-MG and 1321N1 to TRA-8-induced apoptosis is high and is equivalent to their susceptibility to TRAIL-mediated apoptosis as shown in Figure 3b. Two of the glioma cell lines, H-456 and SMK1, are much less susceptible to apoptosis induced by TRA-8. In the case of the H-456 cells, the surface expression of DR5 is low; however, the surface expression of DR5 on SMK1 is similar to the more susceptible cell lines, suggesting that other mechanisms might play a role in the determining the susceptibility to TRAIL-mediated apoptosis. Although all three prostate cancer cell lines expressed high levels of DR5, the Du145 cells are most sensitive to TRA-8-induced apoptosis, the PC3 cells are partially sensitive while LnCAP cells are completely resistant as shown in Figure 3c. Among the hematopoietic cells, it is found that Jurkat and CEM-6 are very susceptible to TRA-8- apoptosis as shown in Figure 2a although both these cell lines had been found to express low levels of

DR5. Although DR5 is detectable on U937 cells, these cells are resistant to TRA-8-induced apoptosis. Similarly, although the H-9 cells expressed detectable levels of DR5, H-9 cells are resistant to apoptosis induced by TRA-8. These results implicated the existence of regulatory mechanisms that influence DR5-mediated apoptosis.

Additional surface binding anti-DR5 antibodies are produced as per the procedures of Examples 1-3. Two additional anti-DR5 antibodies designated TRA-1 and TRA-10 are studied along with TRA-8 to determine comparative ability induce apoptosis and thereby act as an agonist or conversely block TRAIL-mediated apoptosis, thereby acting as an antagonist. Human Jurkat cells are used as a target to determine the agonist and/or antagonist activity of the three anti-DR5 antibodies denoted TRA-1, TRA-8 and TRA-10. As shown in Figure 4, cell viability is about 90%, 70% and 20% for TRA-10, TRA-1 and TRA-8, respectively upon overnight incubation with 2.5 μg per ml. TRA-8 induced a strong apoptotic response in a dose dependent fashion while TRA-1 induced only a moderate apoptotic response and TRA-10 only induced a weak response. TRA-8 is therefore classified as an agonist anti-DR5 antibody. In Figure 4, the viability of human Jurkat cells is shown as a dose dependent function of TRAIL-induced apoptosis. TRA-10 blocked apoptosis of human Jurkat cells to a significant extent in a low dose TRAIL-induced apoptosis study. Thus, TRA-10 is classified as an antagonist anti-DR5 antibody.

The susceptibility of five of the glioma cell lines, D-37MG, D54-MG, U373-MG, CH235-MG and 1321N1 to TRA-8-induced apoptosis is equivalent to their susceptibility to TRAIL-mediated apoptosis as shown in Figure 3b, indicating that TRAIL-induced apoptosis in these cells is mediated primarily through DR5. Moreover, two of the glioma cell lines, Hs683 and U251-MG, are resistant to TRAIL-induced apoptosis but partially sensitive to TRA-8-induced apoptosis, indicating that the decoy receptors function in these cells and that use of the TRA-8 antibody bypassed this regulatory mechanism. In the prostate cancer cell lines, despite the varying sensitivity to apoptosis induced by TRA-8, this paralleled the

sensitivity of the cells to apoptosis induced by TRAIL, again suggesting that DR5 plays a major role of TRAIL-mediated apoptosis in the prostate cancer cells. Among the hematopoietic cells, it is found that Jurkat and CEM-6 are very susceptible to both TRA-8 and TRAIL-mediated apoptosis. The level of apoptosis induced by TRA-8 is comparable to that induced by TRAIL as shown in Figures 2a and 3a'. Only one of the glioma cell lines, U87, and two hematopoietic cell lines, U937 and Molt-4, exhibited sensitivity to TRAIL-induced apoptosis but are less sensitive or resistant to TRA-8-induced apoptosis. One cell line, the H-9 cell line, expressed detectable levels of DR5 but are resistant to apoptosis induced by either TRA-8 or TRAIL. While minimal levels of expression of DR5 are required for TRA-8-induced apoptosis, the level of expression of DR5 does not necessarily predict the susceptibility of the cells to TRA-8 mediated apoptosis; decoy receptors play a role in modulating TRAIL-mediated apoptosis in some cells, but does not appear to play a major role in most of the cells tested to date; as anticipated the TRA-8 antibody bypasses the effects of the decoy receptors; functional mutations of the DR5 receptor may occur in transformed cells; and, finally, intracellular regulatory mechanisms may be as important, or more important than the decoy-receptors in defining the susceptibility of the cells to TRAIL and DR5-mediated apoptosis.

Previous studies have shown that the mRNA for DR5 is distributed widely in normal tissues[7]. To evaluate the expression of DR5 at the protein level, a panel of normal human tissue homogenates (Geno Technology, St. Louis, MO) is probed with the TRA-8 antibody in western blot analysis. Among nine normal human tissues, brain tissue is weakly positive (Fig. 5*a*, lane 2). DR5 protein is not detectable by TRA-8 reactivity in liver (lane 1), lung (lane 3), kidney (lane 4), spleen (lane 5), testes (lane 6), ovary (lane 7), heart (lane 8), or pancreas (lane 9). In contrast, all thirteen human cancer tissues stained positively with TRA-8 (Fig. 5*b*), including cancers of the ovary (lane 1), lung (lane 2), liver (lane 3), rectum (lane 4), cervix (lane 5), skin (lane 6), testes (lane 7), thyroid (lane 8), uterus (lane 10),

stomach (lane 11), laryngopharynx (lane 12), and pancreas (lane 13). Moreover, *in situ* immunohistochemistry of normal and cancer tissues with TRA-8 confirmed that aside from a few scattered positive cells in spleen, DR5 expression in normal breast, lung and spleen tissues is not detectable (Fig. 5*c*). The corresponding cancer tissues including breast infiltrating ductal carcinoma, small cell lung cancer, and lymphoma reacted positively with TRA-8 (Fig. 5*d*). Among a total of 22 cancer tissues examined, 5 of 6 breast cancers, 2 of 2 cancers of the cervix, 4 of 5 liver cancers, 5 of 8 lymphomas, 2 of 2 lung cancers, and 2 of 2 prostate cancers reacted positively with TRA-8. These results are consistent with those of the flow cytometry analysis and indicate that cancerous tissues express higher levels of DR5 protein than do normal tissues.

Example 9. Tumoricidal activity of TRA-8 *in vivo*

For various reasons, many agents that show promise in *in vitro* studies do not show efficacy *in vivo*. It is therefore important to test the efficacy of TRA-8 in an *in vivo* animal model. To accomplish this the TRA-8 anti-human DR5 antibody is administered to mice bearing human xenografts that express the human DR5 molecule. The mice used are 6 to 8 week-old NOD/SCID mice (Jackson Laboratory), which are inoculated subcutaneously with human astrocytoma 1321N1 cells ($1x10^7$), or inoculated intravenously with human leukemia Jurkat cells ($1x10^6$). At day 2 after tumor inoculation, mice are inoculated intravenously with TRA-8 (100 μg). Five days after the treatment with TRA-8, 1321N1 tumor growth is determined by the size and weight of the tumor mass. The growth of Jurkat cells is determined by the weight of the spleen and the percentage of human CD3-positive Jurkat cells in the spleen of inoculated animals. Biopsies of tumor tissues are taken and examined histologically.

Early treatment with a single intravenous dose of 100 μg of TRA-8 at one day after tumor inoculation completely inhibited the 1321N1 cells from forming a solid tumor of (Fig. 6*a*). Late treatment with three doses of 100 μg TRA-8 at one week after tumor inoculation reduced tumor weight 4-fold or more (Fig. 6*b*). Tumor

formation is not visible in animals treated with TRA-8 at an early time point (Fig. 6*c*, upper panel). Histologic analysis revealed dramatically degenerated tumor tissue in animals treated with TRA-8 (Fig. 6*c*, lower panel). Similarly, TRA-8 treatment inhibited population of the spleen by Jurkat cells as demonstrated by the scarcity of CD3-positive Jurkat cells in the spleen (Fig. 6*d*, 6*e*). Histological analysis of the implanted tumor showed a few tumor cells scattered in the soft tissue in TRA-8-treated animals while controls showed the formation of a solid tumor as shown in Figure 6c. In the Jurkat cell model, the number of Jurkat cells in the spleens of TRA-8 treated animals is less than 2% compared to nearly 10% in the spleen of control animals as demonstrated by flow cytometry analysis as shown in Figure 6a and in situ CD3 staining of Figure 6c.

These results confirm the recent demonstration that systemic administration of cross-linked recombinant TRAIL inhibits growth of tumor *in vivo* (13). These results indicate that a single dose of TRA-8 is highly effective in the elimination of tumor cells *in vivo*.

As an anti-human antibody is used in a murine model, the toxicity of the TRA-8 treatment could not be assessed. However, the study of administration of TRAIL *in vivo* indicated that no significant toxicity is associated with this treatment (13).

Example 10. RA synovial cells are susceptible to TRAIL and TRA-8-induced apoptosis

Most of the prior art studies of TRAIL-mediated apoptosis have focused on malignant cells. TRAIL-mediated apoptosis according to the present invention is also therapeutic in autoimmune and inflammatory conditions, such as RA.

10.1 Flow cytometric analysis of the expression of cell surface DR5 in RA synovial cells

The expression of DR5 on a panel of eight primary cultured synovial cells from patients with RA is compared with that on eight primary cultured synovial cells from patients with osteoarthritis (hereinafter referred to as "OA"). The eight

human primary RA synovial cell cultures RA-1014, RA-1016, RA-1021, RA-512, RA-707, RA-811, RA-716, and RA-929 are kindly provided by Dr. M. Ohtsuki (Sankyo Co. Ltd., Tokyo, Japan) and cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, penicillin, streptomycin, and glutamine. The seven OA synovial cell primary cell cultures are isolated from the synovial tissues of OA patients by a standard collagenase method and cultured under the same conditions. The passage number of all primary cells is under 10. The expression of DR5 is determined by FACs analysis as described in Example 5.

All of the primary cultures of RA cells expressed high levels of surface DR5, and there is little variation in the expression levels among these synovial cells isolated from different patients as shown in Figure 7a. In contrast, the expression of surface DR5 on the surface of synovial cells isolated from the OA patients is very low or undetectable as per Figure 7b. SV40-transformed synovial cell are found to express high levels of DR5 comparable with those exhibited by the RA cells. In contrast, non-transformed fibroblast cells expressed low levels of DR5 comparable to those exhibited by the OA cells in Figure 7b.

10.2 Susceptibility of RA synovial cells to apoptosis mediated by TRA-8 or TRAIL

In general, all synovial cells isolated from the RA patients are susceptible to both TRAIL and anti-DR5 antibody induced apoptosis, and all OA cells are resistant to TRAIL and anti-DR5 antibody induced apoptosis as per Figure 8a, b. These studies indicate that the TRA-8 antibody targets altered cells in preference to normal cells. Moreover, the pattern of the susceptibility or resistance to apoptosis induced by TRAIL is correlated with that induced by anti-DR5 antibody, indicating that the synovial cells primarily utilize DR5 to trigger TRAIL apoptosis.

As described for the malignant cells, the susceptibility to apoptosis induced by TRAIL or anti-DR5 antibody varied among the RA synovial cells although expressing similar levels of DR5. RA-512 and RA-707 are the most susceptible as over 80% cells are killed by concentrations of TRAIL or TRA-8 below 20 ng/ml.

RA-1014, RA-811, RA-716, and RA929 are among those with the intermediate susceptibility to TRAIL or TRA-8, with nearly 100% cell death occurring in the presence of high concentrations (>50 ng/ml) of TRAIL or TRA-8. In RA-1016 and RA1021 cells, although the majority (over 60%) of cells are killed by a low dose of TRAIL or TRA-8, a portion of cells survived in the presence of high concentrations of TRAIL or TRA-8, indicating that a sub-population of cells are resistant to TRAIL-mediated apoptosis. In contrast, all OA cells are much less susceptible to TRAIL and TRA-8 induced apoptosis. No greater than 60% cells are killed in the OA52F and OA69F even in the presence of high concentration of TRAIL or TRA-8. OA72M cells are completely resistant to TRAIL, or TRA-8 induced apoptosis. The SV40 transformed synovial cells are also susceptible to TRAIL and TRA-8 induced apoptosis (data not shown). In contrast, the non-transformed fibroblast cells appeared to be resistant to TRAIL and TRA-8.

It has been shown previously that DR5 utilizes a FADD/caspase 8 dependent pathway to trigger apoptosis (44). To determine the caspase-dependence of DR5-mediated apoptosis of RA synovial cells, RA cells are cultured with TRAIL or anti-DR5 antibody in the presence of specific caspase inhibitors. Among eight caspase inhibitors tested, caspase 6, 8 and 10 inhibitors are able to inhibit apoptosis of RA synovial cells induced by both TRAIL and DR5 as shown in Figure 9, indicating that these three caspases are involved in DR5-mediated apoptosis.

10.3 TRA-8 or TRAIL induce NF-κb activation in RA synovial cells without increased release of MMPs

There is considerable evidence to support the concept that there are close links between the signaling of apoptosis and the signaling of proliferation (45). It has been established that DR5 is able to activate a NF-kb pathway in addition to apoptosis signaling transduction, and that NF-κb activation may be able to transduce an anti-apoptosis signal. Therefore a gel-shift assay is carried out. Cells are stimulated with 50 ng/ml of the recombinant soluble TRAIL, Fas ligand in the presence of the 1 mg/ml enhancer, or 50 ng/ml of TRA-8 for the indicated time. The

nuclear extracts are prepared and incubated with the double-stained [^{32}P]-labeled oligo-DNA probe. The results are analyzed using the cyclone phospha-imager (TopCount NXT, Packard Instrument Company, CT). After RA synovial cells are incubated with TNF-α or TRAIL, NF-κb is activated in a time-dependent fashion. The TRA-8 antibody is able to strongly activate NF-κb. In contrast, Fas ligand is unable to induce NF-κb activation as per Figure 10a.

Thus, although TRAIL and TRA-8 antibody induce a strong apoptosis response in RA synovial cells, they also activate NF-κb, and NF-κb activation has been believed to contribute to the proinflammatory role of TNF-α in RA. Thus, it is possible that TRAIL, like TNF-α, may serve as a pro-inflammatory cytokine. To determine whether there is a similar biological consequence of NF-kb activation induced by TRAIL and TNF-α, the production of MMPs is determined by ELISA. Synovial cells are cultured in medium alone or with 50 ng/ml interleukin 1b, 10 ng/ml TNF-a, 50 ng/ml TRAIL, or 50 ng/ml TRA-8 overnight. The levels of the MMP-1 and MMP-3 in the culture supernatants are determined by the ELISA kits.

When RA synovial cells are incubated with a proinflammatory cytokine, TNF-α or IL-1b, the production of MMP-1, 3, and 13 is increased compared to the medium control as shown in Figure 10 b,c. In contrast, treatment with TRAIL or anti-DR5 antibody is not associated with increased release of these MMPs.

Example 11A. Failure to induce hepatocellular toxicity

For 24-hour cell viability assays, fresh normal human hepatocytes in 96-well plates were purchased from In Vitro Technology (Baltimore, MD). The hepatocytes are cultured in the Hepatocyte Culture Medium containing 1 μg/ml of either soluble TRAIL or TRA-8. For 6-hour viability assays, normal hepatocytes or hepatocellular cancer cells are isolated from fresh surgical specimens collected from UAB Tissue Procurement Center. All reagents for isolation of human hepatocytes including hepatocytes perfusion buffer, digest medium, washing medium, and attachment medium were purchased from Gibco. The tissue slides are digested in the

Hepatocyte Digest Medium at 37°C with shaking (50 rpm) for one hour. The isolated hepatocytes are harvested by low speed centrifugation (50 g, 3 min), and washed with the Hepatocyte Washing Medium six times. Single cell suspension of hepatocytes are cultured in the Attachment Medium containing 10% FCS in 96-well Matrigel plates (BD) for six hours. Non-attached hepatocytes are removed by twice washing with pre-warmed attachment medium. Attached hepatocytes are further incubated with various concentrations of soluble TRAIL or FasL in the presence of crosslinker, or TRA-8 or CH11 for 6 hours.

TRAIL has at least two receptors (DR4 and DR5) that are capable of inducing apoptosis. TRA-8 is used to determine whether crosslinking of DR5 alone is sufficient to induce apoptosis of normal hepatocytes. DR5 expression at the protein level is examined initially in five normal human liver tissues and five liver cancer tissues by *in situ* immunohistochemistry using TRA-8. Sections from the normal liver tissues showed normal architecture and cell morphology on H&E staining.(Fig. 11*a*, left upper panels) in the absence of positive reactivity with TRA-8 for DR5 (Fig. 11*a*, left lower panels). In contrast, the human hepatocellular carcinoma tissue reacted positively with TRA-8 in a pattern consistent with both cell membrane and cytoplasmic presence of DR5 on the cancerous cells. The human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 is also positive for DR5. These results are consistent among the five normal liver tissues, and only one (liver adenoma) out of five liver cancer tissues is DR5-negative. These results are consistent with the Western blot data, shown in Figure 5a, that, as with other normal tissues, normal human liver tissue does not express significant levels of DR5 protein. Furthermore, Western blot analysis of isolated, normal human hepatocytes probed with TRA-8 does not reveal detectable levels of DR5.

Cell surface expression of DR5 on human hepatocytes by flow cytometry analysis demonstrated that freshly prepared normal hepatocytes did not express detectable levels of cell surface DR5 (Fig. 11*b*, top left panels). Neither is it detected on normal human hepatocytes that had been cryopreserved or placed in

51

short-term culture. In contrast, freshly isolated hepatocellular carcinoma cells as well as HepG2 cells express cell surface DR5. Using Fas as a comparison, the normal hepatocytes, hepatocellular carcinoma cells, and HepG2 cells all expressed equivalent levels of Fas (Fig. 11*b*, lower panels). These results are consistent with those obtained using *in situ* immunohistochemistry and Western blot and indicate that cell surface DR5 is highly expressed in cancerous liver cells but not normal hepatocytes. The presence of mRNA levels for DR4, DR5, DcR1 and DcR2 in human hepatocytes, demonstrated by RT-PCR[23], suggests that human hepatocytes might express very low levels of DR5 protein that are below the threshold for detection by TRA-8.

To determine whether TRA-8 induces hepatocellular toxicity, the susceptibility of normal human hepatocytes to apoptosis induced by TRA-8 and by soluble TRAIL plus crosslinker is examined. When normal hepatocytes are cultured in the presence of a high concentration of TRAIL, a time-dependent decrease in cell viability is observed by ATPLite (Fig. 12a) and MTT assays. TRAIL-mediated cell death of normal hepatocytes could be seen as early as four hours after addition of TRAIL. At end of a 24-hour culture, more than 80% of the hepatocytes are killed by TRAIL. In contrast, during the same culture period, TRA-8 did not induce significant cell death in normal hepatocytes. The condensed nuclei stained with Hoechst, a characteristic of apoptosis, are increased in TRAIL-treated but not TRA-8-treated hepatocytes (Fig. 12b). The number of apoptotic hepatocytes is well correlated with decreased cell viability as determined by ATPLite assay, suggesting that TRAIL-induced cell death of hepatocytes is mediated by apoptosis. This is confirmed by the ability of Z-VAD to inhibit TRAIL-mediated toxicity of hepatocytes. As cycloheximide is a potent apoptosis enhancer, the effect of this compound on TRAIL and TRA-8-treated hepatocytes is investigated. During a four-hour culture, cycloheximide significantly enhanced the cell death of hepatocytes induced by TRAIL, with greater than 70% hepatocytes being killed by TRAIL in the presence of cycloheximide (Fig. 12c). However, cycloheximide treatment is unable

to enhance TRA-8-mediated cell death in hepatocytes. To compare the characteristics of apoptosis induced by TRA-8 with that induced by TRAIL in hepatocytes, normal hepatocytes as well as cancer cells are incubated with variable concentrations of soluble TRAIL with crosslinker or TRA-8. During a 6-hour culture period, TRAIL induced a moderate apoptotic response in normal hepatocytes. Over 20% of hepatocytes are killed in the presence of 500 ng/ml TRAIL (Fig. 12*d*, upper left). TRA-8-treatment of normal hepatocytes did not elicit any significant cell death over the same time period. In contrast to normal hepatocytes, primary hepatocellular carcinoma cells (Fig. 12*d*, upper middle) and HepG2 cells (Fig. 12*d*, upper right) are highly susceptible to apoptosis mediated by either TRAIL or TRA-8. Over 80% of hepatocellular carcinoma cells and nearly 100% of HepG2 cells are killed during the 8-hour culture period. These results indicate that normal hepatocytes are completely resistant to TRA-8-mediated apoptosis, and are much less susceptible to TRAIL-mediated apoptosis than are liver cancer cells. Using Fas ligand and anti-Fas antibody (CH-11), there is no significant difference in the susceptibility to Fas-mediated apoptosis among normal hepatocytes, hepatocellular carcinoma cells, and HepG2 cells (Fig. 12*d*, lower panels).

Comparative Example 11B. Human membrane-bound TRAIL induction of hepatitis *in vivo*

8-10 week-old female B6 mice are intravenously injected with 10^9 pfu of Ad/hTRAIL with the equal number of Ad/Tet-on. Mice are fed with different concentrations of tetracycline in their drinking water immediately after inoculation of adenoviral vectors. Liver injury is determined by serum levels of AST using an AST diagnostic kit (Sigma). Expression of TRAIL is determined by Northern blot analysis.

To determine whether the membrane bound form of TRAIL induces liver damage *in vivo*, a recombinant adenoviral vector encoding the full length human TRAIL (Ad/hTRAIL) is constructed, the expression of which is under the control of

the tetracycline-inducible promoter. Twenty-four hours after intravenous inoculation of B6 mice with Ad/hTRAIL, tetracycline-induced expression of human TRAIL is observed in the liver in a dose-dependent fashion as demonstrated by Northern blot analysis (Fig. 13*a*). The expression levels of TRAIL correlated well with liver damage as shown by a tetracycline-dependent increase in serum levels of transaminases, again in a dose-dependent fashion (Fig. 13*b*). As the inoculation with adenoviral vector *per se* might increase the susceptibility of hepatocytes to TRAIL-mediated apoptosis, the hepatocytes from mice inoculated with Ad/TRAIL are isolated and tested for TRAIL-mediated cell death. There is no significantly increased cell death of Ad/TRAIL infected hepatocytes compared to those from control mice (Fig. 13c, left panel). Moreover, Ad/TRAIL inoculated mice did not exhibit increased liver injury after intravenous injection of soluble human TRAIL. Thus, it follows that hepatitis induced by Ad/TRAIL is mediated by high levels of TRAIL expression in its membrane form. Histologic analysis of liver sections revealed that damage to the hepatocytes is apparent as early as 24 hours after vector inoculation (Fig. 13d), and persisted for at least 7 days (Fig. 13*e*). These pathologic alterations in the liver also are tetracycline-dependent and occurred in a dose-dependent manner. The early phase, within 24 hours of treatment, of TRAIL-induced liver damage is characterized by foci of necrosis. Infiltration of inflammatory cells is not observed at this stage, but hemorrhage had occurred. By day 7 after inoculation, diffuse liver damage is apparent with marked lobular disarray, severe degeneration of hepatocytes with irregularly clumped cytoplasm and large clear spaces, and prominent apoptosis and necrosis. An extensive infiltrate of mononuclear cells is a characteristic feature at this stage. These results indicate that human TRAIL in its membrane-bound form is able to induce liver damage *in vivo*. Despite the propensity of human TRAIL to cause severe hepatitis in mice, it did not induce a lethal response. In contrast, mice inoculated with similar tetracycline-controlled vectors encoding Fas ligand developed fulminant hepatitis with massive apoptosis and necrosis of hepatocytes accompanied by severe hemorrhage and by

mortality occurring in a tetracycline dose-dependent within 72 hours of inoculation. The mortality rate reached 100% within 48 hours in those subgroups receiving 3 mg/ml or more of tetracycline. In contrast, all of the mice that received Ad/hTRAIL, regardless of the dose of tetracycline, are still alive four weeks after inoculation. Thus, it follows that, *in vivo*, the membrane-bound form of TRAIL is a less potent inducer of hepatocellular damage than Fas ligand. They further suggest that TRAIL might induce liver damage through a mechanism that differs from the mechanism underlying the toxicity of Fas ligand.

Example 12. Activated human T and B cells express increased levels of DR5.

To determine whether DR5 plays a role in TRAIL-mediated apoptosis of activated T cells and B cells, surface expression of DR5 on resting and activated T and B cells using TRA-8 is examined. The unstimulated human T cells in PBMC did not express significant levels of DR5 (Fig. 14). At 48 hours after either anti-CD3 or Con-A stimulation, cell surface DR5 expression is significantly increased. Similarly, the unstimulated B cells expressed very low levels of DR5. Stimulation with anti-μ but not LPS resulted in increased cell surface expression of DR5. These results indicate that both activated T and B cells express higher levels of cell surface DR5. Cells are stained with 20 μg/ml TRA-8 and PE anti-mouse IgG1.

Example 13. Activated T and B cells become susceptible to TRA-8 mediated apoptosis

To determine whether activated T and B cells are susceptible to TRA-8-mediated apoptosis, the T cells and B cells of human PBMC are stimulated with anti-CD3 or anti-μ in vitro for 48 hours, respectively. The viable cells and proliferating blast cells are collected by gradient centrifugation, and incubated with various concentrations of TRA-8. Unstimulated T cells and B cells are not susceptible to TRA-8-mediated apoptosis (Fig. 15). Total stimulated T cells and B cells showed a moderately increased susceptibility to TRA-8-mediated apoptosis, with 20% cells being killed by TRA-8 after overnight culture. The highly proliferating blast T cells are even more susceptible to TRA-8 mediated apoptosis.

More than 70% of the blast T cells could be killed by TRA-8. The blast B cells are also more susceptible to TRA-8 mediated apoptosis compared to others. These results indicate that activated T and B cells are susceptible to DR5-mediated apoptosis.

Example 14. TRA-8 depletes activated T cells in human/SCID mice

To determine the *in vivo* anti-T cell efficacy of TRA-8, NOD/SCID mice are intravenously injected with $1x10^8$ human PBMC. Normally, the human T cells in SCID mice are quickly activated in response to xenogeneic stimulation. The human PBMC/SCID mice are intraperitoneally injected with 100 μg TRA-8 or control IgG1 from the day of transfer, repeated daily for three days. Five days after transfer, the mononuclear cells are isolated from the spleen and stained with anti-human CD3 antibody, and the lymphocyte population is gated by flow cytometry analysis, and CD3 positive human T cells are analyzed. Approximately 30% of splenic lymphocytes are human T cells as determined by anti-human CD3 staining in control treated mice. However, only a few human T cells (less than 3%) are observed among the splenic lymphocytes in TRA-8 treated mice (Fig. 16). *In situ* histological study revealed that in the spleen of control mice, the human T cells are repopulated in the spleen with only a few apoptotic cells observed as demonstrated by TUNEL staining. In contrast, repopulation with viable human T cells is not observed in the spleen of TRA-8 treated mice, rather many apoptotic cells are observed (Fig. 17). These results demonstrate that TRA-8 has anti-T cell activity *in vivo*, and indicate the utility of the inventive antibodies for the treatment of GVH disease.

Example 15. Anti-cancer therapeutic activity of TRA-8

15.1 DR5 expression and function in human cancer tissues and cell lines

i) DR5 expression in human cancer tissues by in situ staining with TRA-8. To determine whether cancer cells and tissues differentially express higher levels of DR5, a panel of human cancer tissues including over 20 breast cancers, 6

ovarian cancers, 5 colon cancers and 5 prostate cancers are stained with TRA-8 for immunohistochemistry. The majority of these cancer tissues expressed detectable DR5. The expression levels of DR5 in these cancer tissues varied. In general, cancer tissues expressed higher levels of DR5 than uninvolved tissues. In addition, DR5 expression is apparently not correlated with the mutation of p53.

ii) DR5 expression and function in human cancer cell lines (Table 2). Nine human breast cancer cell lines, three ovarian cancer lines, three colon cancer lines and three prostate cancer lines are examined for cell surface expression of DR5 and susceptibility to TRA-8-induced apoptosis *in vitro*. 7 of 9 breast cancer lines, 3 of 3 ovarian cancer lines, 3 of 3 colon cancer lines and 3 of 3 prostate cancer lines expressed variable levels of cell surface DR5. Of 9 breast cancer lines, three are very susceptible, three are intermediate and three are resistant to TRA-8-mediated apoptosis. All three ovarian cancer lines are very susceptible. One of three colon cancer lines is very susceptible, while two have intermediate sensitivity. Two of three prostate cancer lines have intermediate sensitivity and one is resistant.

Table 2. Expression and function of DR5 in human cancer cells.

Cell line	Origin	Expression[1]	Susceptibility[2]
2LMP	breast	+	++++
LCC6	breast	+++	++++
MB468	breast	+++	+++
MB231	breast	++	+++
ZR-75-1	breast	+++	++
SKBR3	breast	+	++
MB453	breast	++	+
BT474	breast	+	-
DY36T2	breast	-	-
Caov-3	ovary	+	++++
OVCAR-3	ovary	++	++++
Skov-3	ovary	+	+++
WiDR	colon	+++	++++
HST29	colon	++	+++
T84	colon	+	++
PC3	prostate	+++	++
LnCap	prostate	+++	+

Cell line	Origin	Expression[1]	Susceptibility[2]
Du-145	prostate	+++	+

Note: [1]determined by flow cytometry, cells are stained with 20 μg/ml TRA-8 and compared to control antibody. [2]determined by ATPLite assay. ++++: over 80% killing, +++: killing between 60-80%, ++: killing between 40-60%, +: killing between 20-40%, - no killing.

iii) Combined cytotoxicity of TRA-8 with adriamycin. In several breast cancer lines, the effect of adriamycin on TRA8-induced apoptosis is examined. High doses of adriamycin exhibited an additive effect. However, in some of TRA-8 resistant lines, low doses of adriamycin synergistically enhance TRA-8-induced apoptosis.

iv) In vitro and in vivo binding activity of TRA-8 to human cancer cells. Using radioisotope labeled TRA-8. The binding activity of TRA-8 to a breast cancer line is examined *in vitro* and *in vivo* in SCID mice implanted with tumor. The *in vitro* binding activity to cancer cells is estimated as a Kd value of 3 nM, which is constant with our previous estimation using ELISA, and at least 50-fold higher than soluble TRAIL. *In vivo*, TRA-8 localized to implanted tumor tissues.

15.2. Therapy of chronic lympholytic leukemia in NOD/SCID mice with TRA-8

Chronic lympholytic leukemia (CLL) is a common form of B cell malignancy. Most malignant B cells in CLL are of the mature phenotype and are resistant to many apoptosis stimuli. DR5 expression and function in the B cells of five patients with CLL is examined. All patients had high counts of peripheral B cells as shown by more than 95% CD19+ B cells in PBMC. Compared to normal primary B cells, the CLL B cells of all patients had higher levels of cell surface DR5 and are more susceptible to TRA-8 induced apoptosis *in vitro*. Interestingly, the CLL B cells are also sensitive to bisindolemaleimide VIII (BisVIII) induced cytotoxicity. Following combined treatment with TRA-8 and BisVIII, nearly 50% of CLL B cells are killed while normal B cells remained unresponsive (Fig. 18).

Transfer of CLL B cells into NOD/SCID mice resulted in about 25%-30% CD19+ B cells repopulated in the spleen of recipient mice at five days after transfer. However, three doses of 100 μg TRA-8 treatment completely eliminated CLL B cells of four out of five patients in the spleen of the recipient SCID mice. Thus, TRA-8 alone or in concert with other substances is active as a therapeutic agent for chronic lympholytic leukemia.

Example 16. cDNA Cloning

(1) Determination of the N-terminal amino acid sequences of the heavy and light chains of TRA-8

In order to obtain cDNAs of the heavy and light chains of TRA-8, the N-terminal amino acid sequences of the heavy and light chains of TRA-8 and cloned TRA-8 genes are determined by known techniques.

Ten μg of the solution containing the anti-human DR5 antibody TRA-8 is subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ("SDS-PAGE"), using a gel concentration of 12% w/v, 100 V constant voltage, for 120 minutes. After electrophoresis, the gel is immersed in transfer buffer 25 mM Tris-HCl (pH 9.5), 20% methanol, 0.02% v/v SDS for 5 minutes. After this time, the protein content of the gel is transferred to a polyvinylidene difluoride membrane ("PVDF membrane"; pore size 0.45 um; Millipore, Japan), presoaked in transfer buffer, using a blotting apparatus (KS-8451; Marysol) under conditions of 10 V constant voltage, 4°C, for 14 hours.

After this time, the PVDF membrane is washed with washing buffer 25 mM NaCl, 10 mM sodium borate buffer (pH 8.0), then stained in a staining solution (50% v/v methanol, 20% v/v acetic acid and 0.05% w/v Coomassie Brilliant Blue) for 5 minutes to locate the protein bands. The PVDF membrane is then destained with 90% v/v aqueous methanol, and the bands corresponding to the heavy chain, the band with the lower mobility and light chain, the band with the higher mobility previously located on the PDVF membrane are excised and washed with deionized water.

The N-terminal amino acid sequence of the heavy and light chains are determined by the Edman automated method (Edman, P., et al., (1967), Eur. J. Biochem., 1, 80) using a gas-phase protein sequencer (PPSQ-10; Shimadzu Seisakusyo, K. K.).

The N-terminal amino acid sequence of the band corresponding to the heavy chain is determined to be:

Glu-Val-Met-Leu-Val-Glu-Ser-Gly-Gly-Gly-Leu-Val-Lys-Pro-Gly-Gly-Ser-Leu-Lys-Leu (SEQ ID No. 4 of the Sequence Listing);

and that of the band corresponding to the light chain is determined to be:

Asp-Ile-Val-Met-Thr-Gln-Ser-His-Lys-Phe-Met-Ser-Thr-Ser-Val-Gly-Asp-Arg-Val-Ser (SEQ ID No. 5 of the Sequence Listing).

Comparison of these amino acid sequences with the database of amino acid sequence of antibodies produced by Kabat et al. (Kabat E.A., et al., (1991), in "Sequences of Proteins of Immunological Interest Vol. II," U.S. Department of Health and Human Services) revealed that the heavy chain (γ1 chain) and the light chain (k chain) of TRA-8 belonged to subtypes 3d and 1, respectively.

(2) cDNA cloning

Based on above findings, oligonucleotide primers are synthesized which would be expected to hybridize with portions of the 5'-untranslated regions and the very ends of the 3'-translated regions of the genes belonging to these mouse subtypes. Then, cDNAs encoding the heavy and light chains of TRA-8 are cloned by the following combination of reverse transcription and PCR (RT-PCR):

a) Template

The total RNA of TRA-8 hybridoma (ATCC No. PTA-1428) is extracted by using TRIzol Reagent (GIBCO BRL). The template for the PCR reaction used cDNA that is obtained by using the First-Strand cDNA synthesis kit (Amersham Pharmacia Biotech) according to the instruction manual provided with the kit.

b) PCR Primers

The following oligonucleotide primers are synthesized for the PCR:

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'-ttaccagga 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).

Unless otherwise specified, all oligonucleotides in these Examples are synthesized by Pharmacia Biotech. All oligonucleotides are stored at –20°C after being dissolved in distilled water.

c) PCR reaction

Composition of the PCR reaction solution:

template cDNA, 5 µl of total 33 µl reaction

primer DR5p1, 10 pmol;

primer DR5p2, 10 pmol;

10 x concentrated PCR buffer (provided with the kit), 10 µl;

dNTPs (each 2.5 mM), 4 µl; and

Taq polymerase (Promega), 5 units.

Sterile distilled water is added to the solution to a total volume of 100 µl. Unless otherwise specified, dNTPs are an equimolar mixture of dATP, dCTP, dGTP and dTTP (2.5 mM each).

The PCR reaction is conducted as follows. The solution is first heated at 94°C for 2 minutes, after which a cycle of heating to 94°C for 30 sec, 52°C for 1 minute and 72°C for 3 minutes, is repeated 40 times. After completion of this procedure, the reaction solution is heated at 72°C for 10 minutes.

The amplified DNA fragments, thus obtained, are separated on a 1% agarose gel containing 0.25 µg/ml ethidium bromide. The bands determined to contain the desired DNA fragments are cut out using a razor blade and the DNA is recovered therefrom using the Gene Clean kit (BIO101). The DNA fragment is cloned using pGEM-T Easy vector (Promega). This is performed as follows.

The DNA fragment recovered from the PCR reaction solution, together with 50 ng of pGEM-T Easy vector (provided with the kit), is mixed with 1 µl of 10 X ligase reaction buffer (6 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 mM magnesium chloride, 5 mM sodium chloride, 7 mM β-mercaptoethanol, 0.1 mM ATP, 2 mM DTT, 1 mM spermidine, and 0.1 mg/ml bovine serum albumin), to which 4 units of T4 DNA ligase (1 µl) has been added. The total volume of the mixture is adjusted to 10 µl

with sterile deionized water, and the resulting ligase solution is incubated at 14°C for 15 hours. After this time, 2 µl of the ligase reaction solution is added to 50 µl of competent *E. coli* strain JM109 (provided with the kit and brought to competence in accordance with the instruction manual) to which 2 µl of 0.5 M β-mercaptoethanol had been added, and the resulting mixture is kept on ice for 30 minutes, then at 42°C for 30 seconds, and again on ice for 5 minutes. Next, 500 µl of medium containing 2% v/v tryptone, 0.5% w/v yeast extract, 0.05% w/v sodium chloride, 2.5 mM potassium chloride, 1 mM magnesium chloride, and 20 mM glucose (hereinafter referred to as "SOC" medium) is added to the culture, and the mixture is incubated for 1 hour at 37°C with shaking. After this time, the culture is spread on an L-broth agar plate (1% v/v tryptone, 0.5% w/v yeast extract, 0.5% w/v sodium chloride, 0.1% w/v glucose, and 0.6% w/v bacto-agar (Difco)), containing 100 µg/ml. Ampicillin resistant colonies appearing on the plate are selected and scraped off with a platinum transfer loop, and cultured in L-broth medium containing 100 µg/ml ampicillin at 37°C, overnight, with shaking at 200 r.p.m. After incubation, the cells are harvested by centrifugation, from which plasmid DNA is prepared by the alkali method. The obtained plasmid is designated as plasmid pH62 for heavy chain of TRA-8 or pL28 for light chain of TRA-8. The transformant *E coli* strains harboring these plasmid, designated as *E. coli* JM109/pH62 and *E. coli* JM109/pL28 were deposited with International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japan on April 20, 2001, in accordance with the Budapest Treaty for the Deposit of Microorganisms, and were accorded the accession numbers FERM BP-7560 and FERM BP-7561, respectively. The nucleotide sequences of these DNAs encoding the heavy chain and the light chain of TRA-8 are confirmed by the dideoxy method (Sanger, F. S., et al., (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467) using 3700 DNA Analyzer (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems, Japan).

57

The nucleotide sequences of the heavy and light chains of TRA-8 are given as SEQ ID No. 21 and No. 22 of the Sequence Listing, respectively. The amino acid sequences of the heavy and light chains of TRA-8 are given as SEQ ID No. 23 and No. 24 of the Sequence Listing, respectively. The N-terminal amino acid sequences of the heavy and light chains of TRA-8 established in above matched perfectly. Furthermore, when the amino acid sequences of the heavy and light chains are compared with the database of amino acid sequences of antibodies, it is established that, for the heavy chain, nucleotide Nos. 58 to 414 in SEQ ID No. 21 constituted the variable region, while nucleotide Nos. 415 to 1392 in SEQ ID No. 21 constituted the constant region. For the light chain, nucleotide Nos. 64 to 387 in SEQ ID No. 22 constituted the variable region, while nucleotide Nos. 388 to 702 in SEQ ID No. 22 constituted the constant region. The locations and sequences of the CDRs are also elucidated by comparing the homologies with the database. The amino acid sequences of CDR 1, CDR2, and CDR3 of heavy chain of TRA-8 are shown in SEQ ID No. 25, No. 26, and No. 27, respectively. The amino acid sequences of CDR1, CDR2, and CDR3 of light chain of TRA-8 are shown in SEQ ID No. 28, No. 29, and No. 30, respectively.

Example 17. Designing a Humanized Version of the TRA-8 Antibody

(1) Molecular modeling of a variable region of TRA-8

Molecular modeling of the variable region of TRA-8 is performed by the method generally known as homology modeling (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)). The primary sequences of variable regions of human immunoglobulin registered in the Protein Data Bank (Nuc. Acid Res. 28, 235-242 (2000)), for which the three-dimensional structures derived from x-ray crystallography are available, are compared with the framework regions of TRA-8 determined above. As a result, 1NCD and 1HIL are selected as having the highest sequence homologies to the framework regions for the light and heavy chains of TRA-8, respectively. Three-dimensional structures of the framework regions are generated by combining the coordinates of 1NCD and 1HIL which correspond to the

light and heavy chains of TRA-8, to obtain the "framework model". Using the classification defined by Chothia et al., the CDRs of TRA-8 are classified as follows; $CDRL_1$, $CDRL_2$, $CDRH_1$ and $CDRH_2$ belong to canonical classes 2,1,1,3, respectively, while $CDRL_3$ does not belong to any specific canonical classes. The CDR loops of $CDRL_1$, $CDRL_2$, $CDRH_1$, $CDRH_2$ are fixed to the conformations inherent to their respective canonical classes, and integrated into the framework model. $CDRL_3$ is assigned the conformation of cluster 8A, according to the classification of Thornton et al. (J. Mol. Biol., 263, 800-815, (1996)), and $CDRH_3$ is classified into k(8)C using the H3 rule (FEBS letter 455,188-197(1999)). Then representative conformations for $CDRL_3$ and $CDRH_3$ are integrated into the framework model.

Finally, energy calculations are carried out to eliminate unfavorable inter-atomic contacts, in order to obtain a probable molecular model of TRA-8's variable region in terms of energy. The above procedure is performed using the commercially available common molecular modeling system ABM (Oxford Molecular Limited, Inc.). For the molecular model obtained, the accuracy of the structure is further evaluated using the software, PROCHECK (J. Appl. Cryst. (1993), 26, 283-291).

(2) Designing the amino acid sequences for humanized TRA-8.

Construction of humanized TRA-8 antibodies is performed by the method generally known as CDR grafting (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). The acceptor antibody is chosen based on the amino acid homology in the framework region. The sequences of framework region in TRA-8 are compared with all the human framework sequences in the Kabat database of amino acid sequences of antibodies (Nuc. Acid Res. 29, 205-206 (2001)). As a result, mAB58'CL antibody is selected as an acceptor due to the highest sequence homology of 80% for the framework region. The amino acid residues in the framework region for mAb58'CL are aligned with that for TRA-8 and the positions where different amino acids are used are identified. The location of those residues

are analyzed using the three dimensional model of TRA-8 constructed above and the donor residues which should be grafted on the acceptor are chosen by the criteria given by Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Humanized TRA-8 sequences are constructed as described in the following example by transferring several donor residues into acceptor antibody, mAb58'CL.

Example 18. Construction of an Expression Vector for the Heavy Chain of the Humanized Antibody

(1) Construction of plasmid carrying the heavy chain variable region DNA of Humanized TRA-8

In order to determine the activity of humanized TRA-8, the plasmid carrying the heavy chain of humanized TRA-8 is constructed as follows. However, it is appreciated the humanization of TRA-8 is not limited to these examples.

As shown in SEQ ID No. 31 of the Sequence Listing, humanization of the amino acid sequences of the heavy chain of the mouse anti-human DR5 antibody TRA-8 entailed replacing the 13th amino acid (lysine), the 19th amino acid (lysine), the 40th amino acid (threonine), the 42nd amino acid (glutamic acid), the 44th amino acid (arginine), the 84th amino acid (serine), the 88th amino acid (serine), the 93rd amino acid (methionine), the 114th amino acid (threonine), the 115th amino acid (leucine) with glutamine, arginine, alanine, glycine, glycine, asparagine, alanine, valine, leucine, and valine, respectively.

The plasmid carrying DNA encoding heavy chain variable region of humanized TRA-8 (SEQ ID No. 31 of the Sequence Listing) are constructed as follows.

PCR is used to construct the following DNA sequences, each of which comprised described above:

The following 12 oligonucleotides are synthesized:

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

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

5'- attcactttc agtagttatg taatgtcttg ggttcggcag gcaccagggg agggtctgga gtgggttgca accattagta -3' (C; SEQ ID No. 34);

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

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

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

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

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

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

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

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

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

The following 2 PCR primers are synthesized as described above:

5'- ttggataagc ttggcttgac -3' (P1; SEQ ID No. 44); and

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

The synthesis of DNA encoding a polypeptide chain comprising a secretion signal sequence, a variable region of humanized TRA-8 heavy chain and the 8 amino acid residues at the N-terminus of the IgG-CH1 region is performed using a combination of PCR respectively.

The DNA fragment is prepared as follows.

Composition of the PCR reaction solution:

oligonucleotide A, 10 pmol;
oligonucleotide B, 10 pmol;
oligonucleotide C, 10 pmol;
oligonucleotide D, 10 pmol;
oligonucleotide E, 10 pmol;
oligonucleotide F, 10 pmol;
oligonucleotide G, 10 pmol;
oligonucleotide H, 10 pmol;
oligonucleotide I, 10 pmol;
oligonucleotide J, 10 pmol;
oligonucleotide K, 10 pmol;
oligonucleotide L, 10 pmol;
oligonucleotide primer P1, 2 μM;
oligonucleotide primer P2, 2 μM;
10 X Pyrobest buffer II, 10 μl;
dNTP mix, 8 μl;
Pyrobest DNA polymerase, 0.5 μl; and
Redistilled water to a final volume of 50 μl.

The PCR reaction is conducted as follows. The solution is first heated at 94°C for 5 minutes, after which a cycle of heating to 98°C for 10 second, 55°C for 30 second and 72°C for 1 minute, is repeated 7 times. After completion of this procedure, the reaction solution is heated at 72°C for 15 minutes.

An equal volume of phenol-chloroform (50% v/v phenol saturated with water, 48% v/v chloroform, 2% v/v isoamyl alcohol) is added to 200 μl of each of the PCR products, and vigorously mixed for 1 minute. After this time, the mixture is centrifuged at 10,000 X g, and the aqueous layer is recovered and mixed with an equal volume of chloroform-isoamyl alcohol (96% v/v chloroform and 4% v/v

isoamyl alcohol), which is again vigorously at 10,000 X g and the aqueous layer is recovered. The series of steps recited in this paragraph is referred to, hereafter, as "phenol extraction").

Ethanol precipitation is then performed on the recovered aqueous layer. As used and referred to herein, "ethanol precipitation" consists of adding, with mixing, a one tenth volume of 3M sodium acetate (pH 5.2) and 2.5 volumes of 100% ethanol to the solution to be treated, and freezing the mixture using dry ice. The resulting mixture is then centrifuged at 10,000 X g to recover DNA as a precipitate.

After phenol extraction and ethanol precipitation, the resulting DNA precipitate is vacuum-dried, dissolved in a minimum of redistilled water, and separated by 3% agarose gel electrophoresis. After electrophoresis, the gel is stained with a 1 μg/ml aqueous solution of ethidium bromide to allow detection of DNA under UV light. The DNA band corresponding to humanized TRA-8 DNA is cut out using a razor blade and eluted from the gel using Geneclean Spin Kit (BIO 101, CA, USA). After phenol extraction, the eluted DNA is then concentrated by centrifugation at 7,500 X g, followed by ethanol precipitation, and finally dissolved in 5 μl of distilled water.

The resulting, each extracted DNA is cloned using pGEM-T Easy vector (Promega) as follows:

The DNA fragment recovered from the PCR reaction, 5 μl;
10 X Taq polymerase buffer, 1 μl;
dNTP mixture, 1 μl
Taq polymerase (5 unit/ml), 1 μl; and
redistilled water to a final volume of 10 μl.

After the above each solution is reacted at 70°C for 30 minutes, each DNA solution and pGEM-T Easy vector are ligated using a DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Shuzo Co., Ltd.) using the manufacturer's protocol.

After 4 hours incubation at 15°C, 2 μl of the incubated reaction solution is mixed with 100 μl of competent *E. coli* strain JM109 at a cell density of 1-2 x 10^9

cells/ml (Takara Shuzo Co., Ltd.), and the mixture is kept on ice for 30 minutes, then at 42°C for 30 seconds, and again on ice for 1 minutes. Then, 500 μl of SOC medium (2% v/v tryptone, 0.5% w/v yeast extract, 0.05% w/v sodium chloride, 2.5 mM w/v potassium chloride, 1 mM magnesium chloride, and 20 mM glucose) is added the mixture, which is incubated for a further hour, with shaking. Transformant strains are then isolated, and plasmid DNA is prepared from the strains as described in "Molecular Cloning A Laboratory Manual". The nucleotide sequences of these DNAs encoding the heavy chain of humanized TRA-8 are confirmed by the dideoxy method (Sanger, F. S., et al., (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467) using 3700 DNA Analyzer (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems, Japan).

The resulting plasmids are designated pHB14 (the plasmid carrying cDNA encoding the heavy chain of humanized TRA-8). The transformant *E coli* strain harboring these plasmid, designated as E. coli JM109/pHB14 was deposited with International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japan on April 20, 2001, in accordance with the Budapest Treaty for the Deposit of Microorganisms, and was accorded the accession number FERM BP-7556.

(2) Construction of expression plasmids carrying the heavy chain variable region DNA of Humanized TRA-8

Recombinant expression vectors for animal cells are constructed by inserting the DNA encoding the heavy chain of humanized TRA-8 (cloned in above) as follows.

One μg of plasmid pSRHHH3 (European patent application EP 0-909-816-A1) carrying the heavy chain variable region of humanized anti-Fas monoclonal antibody HFE7A and human IgG1 constant region genomic DNA, an expression vector for mammalian cells, is digested with the restriction enzymes HindIII and ApaI, and separated by 3% agarose gel electrophoresis. After electrophoresis, the gel is stained with a 1 μg/ml aqueous solution of ethidium bromide to allow

detection of DNA under UV light. The vector DNA bands containing human IgG1 constant region genomic DNA without the heavy chain variable region of humanized HFE7A are cut out using a razor blade and eluted from the gel using Geneclean Spin Kit (BIO 101, CA, USA). After phenol extraction, the eluted DNA is then concentrated by centrifugation at 7,500 X g, followed by ethanol precipitation, and finally dissolved in 5 µl of distilled water and then dephosphorylated using CIP. The resulting digested, dephosphorylated plasmid (100 ng) is ligated with 1 µg of the pHB14 DNA fragment containing the DNA encoding the heavy chain variable region of humanized TRA-8, which had also been digested with HindIII and ApaI, using a DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Shuzo Co., Ltd.). The ligation mixture is then used to transform E. coli JM109, which is then plated on LB agar plates containing 50 µg/ml ampicillin.

The transformants obtained by this method are cultured in 2 ml of liquid LB medium containing 50 µg/ml ampicillin at 37°C overnight, and plasmid DNA is subsequently extracted from the resulting culture by the alkaline-SDS method.

The extracted plasmid DNA is digested with HindIII and ApaI, and subjected to 3% w/v agarose gel electrophoresis to confirm the presence or absence of the insert of the DNA encoding the heavy chain variable region of humanized TRA-8. The insertion and orientation of the desired DNA fragment in the vector is confirmed by DNA sequencing using a gene sequence analyzer (ABI Prism 3700 DNA Analyzer; Applied Biosystems). The resulting expression plasmid carrying cDNA encoding the heavy chain of humanized TRA-8 is designated pHB14-1.

Example 19. Construction of an Expression Vector for the Light Chain of the Humanized Antibody

(1) Construction of vectors for the light chains of humanized versions of TRA-8 antibody

As shown in SEQ ID No. 46 of the Sequence Listing, in humanizing the amino acid sequence of the light chain of the mouse anti-human DR5 antibody TRA-8, 8th amino acid (histidine), 9th amino acid (lysine), 10th amino acid

(phenylalanine), 11th amino acid (methionine), 13th amino acid (threonine), 20th amino acid (serine), 42nd amino acid (glutamine), 43rd (serine), 60th amino acid (aspartic acid), 63rd amino acid (threonine), 77th amino acid (asparagine), 78th amino acid (valine), 80th amino acid (serine) 83rd amino acid (leucine), 85th amino acid (aspartic acid), 87th amino acid (phenylalanine),and 99th amino acid (glycine) 103rd amino acid (leucine) and 108th amino acid (alanine) from the N-terminus of the amino acid sequence of the TRA-8 light chain are replaced with proline, serine, serine, leucine, alanine, threonine, lysine, alanine, serine, serine, serine, leucine, proline, phenylalanine, threonine, tyrosine, glutamine, valine and threonine respectively. The resulting sequence is designated LM2.

Expression plasmids carrying this type of humanized light chain amino acid sequences of the anti-human DR5 antibody TRA-8 is constructed as follows.

1) Synthesis of primers for preparing the variable and constant regions of the light chain of humanized TRA-8

DNA coding for the LM2 polypeptide chain (SEQ ID No. 46 of the Sequence Listing), each of which is a fusion of the variable region of humanized anti-DR5 antibody TRA-8 light chain and the constant region of the human Ig light chain (κ chain), are respectively synthesized by using combinations of PCR.

Further to 7AL1P (SEQ ID No. 47) and 7ALCN (SEQ ID No. 48), the following oligonucleotide primers are synthesized for PCR:

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

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

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

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

5'- ataactacta tattgctgac agtaataggt tgcaaaatcc tccggctgca gactagagat ggt -3' (HKCDR22; SEQ ID No. 53); and

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

2) Construction of plasmid pCR3.1/M2-1 (cloning of humanized TRA-8 light chain)

LM2-DNA fragment as defined in SEQ ID No. 55 of the Sequence Listing coding for the amino acid sequence as defined in SEQ ID No. 46 of the same is prepared by performing 2-step PCR, inserted into a plasmid vector and cloned in *E. coli*.

a) First step PCR

LM2-F1-DNA fragment coding for a secretion signal sequence and a portion of FRL_1 region with a Hind III restriction enzyme cleavage site added at the 5'-end is prepared under the following conditions. The template plasmids, pHSGHM17 and pSRPDHH, are obtained by following the description in a European patent application EP 0 909 816 A1.

Composition of the reaction solution:

plasmid pHSGHM17 DNA (European patent application EP 0 909 816 A1), 25 ng

oligonucleotide primer 7AL1P, 50 pmol

oligonucleotide primer HKSPR11, 50 pmol

dNTPs cocktail, 5 µl

10×PCR buffer, 5 µl

ampliTaq DNA polymerase (PerkinElmer), 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 µl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

LM2-F2-DNA fragment coding for a portion of FRL_1, $CDRL_1$, FRL_2, and $CDRL_2$ and is prepared under the following conditions.

Composition of the reaction solution:

plasmid pL28 DNA, 25 ng

oligonucleotide primer HKCDF11, 50 pmol

oligonucleotide primer HKCDR12, 50 pmol

dNTPs cocktail, 5 µl

10×PCR buffer, 5 µl

ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 µl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

LM2-F3-DNA fragment coding for CDRL2, FRL_3, and a portion of $CDRL_3$ is prepared under the following conditions.

Composition of the reaction solution:

plasmid pSRPDHH DNA(European patent application EP 0 909 816 A1), 25 ng

oligonucleotide primer HKCDF22, 50 pmol

oligonucleotide primer HKCDR22, 50 pmol

dNTPs cocktail, 5 µl

10×PCR buffer, 5 µl

ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 µl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

LM2-F4-DNA fragment coding for $CDRL_3$, FRL_4 and the constant region with an EcoR I restriction enzyme cleavage site added at the 3'-end is prepared under the following conditions.

Composition of the reaction solution:

plasmid pSRPDHH DNA, 25 ng
oligonucleotide primer HKCF12, 50 pmol
oligonucleotide primer 7ALCN, 50 pmol
dNTPs cocktail, 5 µl
10×PCR buffer, 5 µl
ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 µl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

The amplified DNA fragments after PCR are separated by 5% polyacrylamide gel electrophoresis. The gel after electrophoresis is stained with 1 µg/ml of ethidium bromide to detect the produced DNA under UV light. The respective DNA bands thus detected are excised with a razor

b) Second step PCR

LM2-DNA in which above described LM2-F1-DNA, LM2-F2-DNA, LM2-F3-DNA and LM2-F4-DNA fragments are fused is prepared under the following conditions.

Composition of the reaction solution:

Gel fragment of LM2-F1-DNA prepared in the first step PCR,
Gel fragment of LM2-F2-DNA prepared in the first step PCR,
Gel fragment of LM2-F3-DNA prepared in the first step PCR,
Gel fragment of LM2-F4-DNA prepared in the first step PCR
oligonucleotide primer 7AL1P, 50 pmol

oligonucleotide primer 7ALCN, 50 pmol

dNTPs cocktail, 5.0 µl

10×PCR buffer, 5.0 µl

ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 µl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

The thus prepared LM2-DNA fragment is inserted into plasmid pCR3.1DNA using Eukaryotic TA cloning Kit (Invitrogen) following the manufacturer's protocol and introduced into the competent *E. Coli* TOP10F' contained in the kit. The nucleotide sequences of these DNAs encoding the light chain of humanized TRA-8 are confirmed by the dideoxy method (Sanger, F. S., et al., (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467) using 3700 DNA Analyzer (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems, Japan).

The resulting plasmids are designated pCR3.1/M2-1 (the plasmid carrying cDNA encoding the light chain variable region of humanized TRA-8 and a human Ig light chain constant region).

The obtained plasmid pCR3.1/M2-1 containing LM2-DNA fragment is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I.

One µg of cloning plasmid pHSG399 DNA is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I, and then dephosphorylated with CIP. The resulting dephosphorylated pHSG399 DNA and LM2-DNA fragment, that have been digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I, are ligated using DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Then, *E. coli* DH5α is transformed with the ligated DNA and spread onto LB agar medium containing 0.1 mM IPTG, 0.1% X-Gal and 50 µg/ml chloramphenicol (final concentrations). The white transformants obtained are cultured in liquid LB medium containing 50 µg/ml

chloramphenicol, and plasmid DNA is extracted from the resulting culture according to the alkaline-SDS method. The extracted plasmid DNA is digested with Hind III and EcoR I, and then a clone carrying LM2-DNA fragment is selected by 1% agarose gel electrophoresis.

As a result of the above procedure, plasmid pHSG/M2-1-4 carrying a fusion fragment of the variable region of the humanized LM2 TRA-8 light chain and the constant region of human Igκ chain is obtained. The transformant *E coli* strain harboring these plasmid, designated as *E. coli* DH5α/pHSG/M2-1-4 was deposited with International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japan on April 20, 2001, in accordance with the Budapest Treaty for the Deposit of Microorganisms, and was accorded the accession number FERM BP-7563.

3) Construction of plasmid pSR/M2-1 (expression plasmid for humanized LM2 TRA-8 light chain)

The obtained plasmid pHSG/M2-1-4 carrying a fusion fragment of the variable region of the humanized LM2 TRA-8 light chain and the constant region of human Igκ chain is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I.

One μg of cloning plasmid pSRPDHH DNA (European patent application EP 0-909-816-A1) is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I, and then dephosphorylated with CIP. The resulting dephosphorylated pSRPDHH DNA and HindIII-EcoRI DNA fragment obtained from pHSG/M2-1-4 are ligated using DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Then, *E. coli* DH5α is transformed with the ligated DNA and spread onto LB agar. The transformants obtained are cultured in liquid LB medium containing 100 μg/ml ampicillin, and plasmid DNA is extracted from the resulting culture according to the alkaline-SDS method. The insertion and orientation of the desired DNA fragment in pSRPDHH vector is confirmed by DNA sequencing using a gene sequence analyzer (ABI Prism 3700 DNA Analyzer; Applied Biosystems).

The resulting expression plasmid carrying cDNA encoding the light chain of humanized TRA-8 is designated pSR/M2-1.

Example 20. Production of Humanized Antibody

Transfection of COS-7 cells, i.e., a cell line derived from a monkey kidney, with the expression plasmids for the humanized TRA-8 heavy chain and the humanized TRA-8 light chain obtained above is conducted by FUGENE6 transfection reagent methods (Boehringer Mannheim Biochemica) according to the instruction manual provided with the kit.

COS-7 cells (American Type Culture Collection No. CRL-1651) are grown to semi-confluent (3×10^6 cells/dish) in a culture dish (culture area: 57 cm^2; Sumitomo Bakelite) containing Dulbecco's Modified Eagle medium (hereinafter referred to as "D-MED"; Gibco BRL) supplemented with 10% fetal calf serum (hereinafter abbreviated as "FCS"; Moregate).

In the meantime, 10 μg/dish (total 5 dishes) of the humanized DR5 heavy chain expression plasmid DNA (pHA15-1) and 10 μg/dish of the humanized DR5 light chain expression plasmid DNA prepared by the alkaline-SDS method and cesium chloride density gradient centrifugation are mixed, and then precipitated with ethanol, followed by suspending in 5 μl/dish of dH_2O.

After 15 μl/dish of FUGENE6 Transfection regent is mixed with 180 μl/dish D-MEM without FCS, this FUGENE solution (185 μl/dish) is mixed with 5 μl/dish DNA solution containing 10 μg/dish of the humanized DR5 heavy chain expression plasmid DNA and 10μg/dish of the humanized DR5 light chain expression plasmid DNA. After 15 minutes incubation at room temperature, the obtained plasmid suspension (200 μl) is added to the previously prepared COS-7 plates. After incubating in 5% CO_2 at 37°C for 24 hours, the culture medium is changed with D-MEM without FCS. After incubating in 5% CO_2 at 37°C for 72 hours, the culture supernatant is recovered to purify the expression products in the supernatant fluids. By the method as described above, COS-7 cells are transfected with each of the following plasmid combinations:

(A): no plasmid DNA

(B): cotransfection of pHB14-1 and pSR/M2-1

The culture is then centrifuged (1,000 r.p.m., 5 minutes) and collected the supernatant. The supernatant is centrifuged again (9,800 r.p.m., 15 minutes) and filtrated with 0.45 μm filter (ADVANTEC TOYO DISMIC-25cs, Cat # 25CS045 AS). The purification of IgG from the filtrates are achieved using Protein G-POROS affinity chromatography (Applied Biosystems) under the following conditions:

HPLC: BioCAD 700E (Applied Biosystems)

column: ProteinG-ID sensor cartridge (column size: 2.1 mmID x 30 mm LD, bed volume: 0.1 ml; Cat # 2-1002-00, Applied Biosystems)

elution buffer: 0.1M Glycine-HCl (pH 2.5)

neutralization buffer: 1M Tris-HCl (pH 8.5)

detection: 280 nm

flow rate: 1 ml/min

fraction size: 0.5 ml/0.5 min

fraction tube: 1.5 ml polypropylene microtube

temperature: 4°C

After all the filtrates are applied to column, 30 ml of PBS (Sigma, Cat # 1000-3) is used to wash column. When the elution buffer is applied, fraction collector started. Each fraction microtube previously contained 55 μl of 1M NaCl, 110 μl of neutralization buffer and 74 μl of 2 mg/ml bovine serum albumin (Sigma, Cat # A-7030) in PBS. The fractions from No. 8 through No. 10 are collected and dialyzed against 1 liter PBS (pH 7.5) at 4°C for 1 day using Slide-A lyzer (Pierce, Cat # 66450). The dialysis buffer is changed twice.

Verification of the expression of the humanized antibodies and quantitative assay of the expression products in the culture supernatant fluids prepared is performed by ELISA with an antibody against anti-human IgG.

65

To each well of a 96-well plate (MaxiSorp, Nunc), 100 µl of goat anti-human IgG Fc specific polyclonal antibody (Kappel) dissolved at the final concentration of 0.5 µg/ml in adsorption buffer (0.05 M sodium hydrogencarbonate, 0.02% sodium azide, pH 9.6) is added and the plate is incubated at 37°C for 2 hours to cause adsorption of the antibody. Then, the plate is washed with 350 µl of PBS(-) containing 0.05% Tween-20 (BioRad) (hereinafter referred to as "PBS-T") five times. To the wells after washing, the culture supernatant diluted with D-MEM containing 10% FCS is added and incubated at 37°C for 2 hours. After washing again with PBS-T, 100 µl of alkaline phosphatase-labeled goat anti-human IgG Fc specific polyclonal antibody (Jackson Immuno Research Lab.) diluted 10,000-fold with PBS-T is added to each well and incubated at 37°C for 2 hours. After washing again with PBS-T, a substrate solution of p-nitrophenyl phosphate obtained from Alkaline Phosphatase Substrate kit (Bio Rad) is added according to the instruction manual provided with the kit. After incubating at 37°C for 0.5 to 1 hour, the absorbance at 405 nm is measured. In the present experiments, human plasma immunoglobulin G subclass 1 (IgG1) (Biopure AG) diluted with D-MEM containing 10% FCS to certain concentrations is used as concentration reference samples of the humanized DR5 antibodies contained in the culture supernatant fluids.

As a result, the expression and purified products in the culture supernatant are detected specifically with the anti-human IgG antibody. The amount of human IgG antibody is 8.96 µg (800 µl).

Example 21. Apoptosis-inducing activity of Humanized Antibody

Jurkat cells (ATCC No. TIB-152), are used to examine the apoptosis-inducing activity of the purified humanized TRA-8 antibody.

Jurkat cells cultured in RPMI1640 medium with 10% FCS (Gibco BRL) at 37°C for 3 days in the presence of 5% CO_2 are dispensed into each well of a 96-well microplate (Sumitomo Bakelite) at 50 µl per well. The humanized TRA-8 prepared in Example 20 are adjusted to have the concentration of the final product of interest of 100 ng/ml with RPMI1640 medium containing 10% FCS by estimating their

concentrations in the fluids according to the method described in Example 20. Each of the solutions of the expression products thus adjusted to 100 ng/ml is used to produce serial dilutions by repeating serial 2-fold dilution with RPMI1640 containing 10% FCS. Each of the diluted humanized TRA-8 solution is added to each well at 50 µl per well. After reacting at 37°C for 12 hours, 50 µl of 25 µM PMS (phenazine methosulfate; Sigma Chemical Co.) containing 1 mg/ml XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyaniride inner salt; Sigma Chemical Co.) is added (final concentrations of 250 µg/ml for XTT and 5 µM for PMS). After incubating for 3 hours, the absorbance at 450 nm of each well is measured to calculate the cell viability by using the reduction ability of mitochondria as the index.

The viability of the cells in each well is calculated according to the following formula:

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

wherein "a" is the measurement of a test well, "b" is the measurement of a well with no cells, and "c" is the measurement of a well with no antibody added.

As a result, the expression product prepared in Example 20 (humanized TRA-8) is demonstrated to induce apoptosis in cells of T lymphoma cell line expressing human DR5 antigen.

Example 22. Reactivity of TRA-8 to various DR5 molecules

In order to determine the reactivity of TRA-8 to various DR5 molecules, the reactivity of TRA-8 is examined using activated lymphocytes as follows.

First, peripheral blood samples are taken from a human (30 ml), marmoset (3 ml), and cynomolgus monkey (20 ml). The blood samples had 1 ml of heparin (Novoheparin; Novo) added to them and the samples are then slowly layered over an equal volume of Ficoll-Paque PLUS solution ((Amersham Pharmacia Biotech.) specific gravity: 1.077 for all except cynomolgus monkey, which had a specific gravity of 1.072) and centrifuged at 1,700 r.p.m. for 30 minutes in order to obtain a fraction of peripheral blood mononuclear cells. This mononuclear cell fraction is

washed twice with Hanks' balanced salt solution and then suspended in RPMI 1640 medium with 10% v/v FCS to a cell density of 1 x 10^6 cells/ml. Phytohemagglutinin-P (PHA-P, Sigma Chemicals, Co.) is added to the resulting suspension to a final concentration of 5 μg/ml and the sample incubated at 37°C under 5% v/v CO_2 for 24 hours. After this time, the cells are recovered by centrifugation, washed and resuspended in RPMI 1640 medium containing 10% v/v FCS. Then, to activate the recovered cells, interleukin-2 (Amersham Pharmacia Biotech.) is added to the suspension to a final concentration of 10 units/ml, and this is incubated at 37°C under 5% v/v CO_2 for 72 hours.

An amount of the activated preparation calculated to contain 1 x 10^6 activated lymphocyte cells is placed in a test tube and either suspended in 50 μl of 0.5, 1, 5, 10 μg/ml of TRA-8 in PBS or 50 μl of PBS alone. The resulting suspension is allowed to stand on ice for 1 hour, after which the cells are washed 3 times with aliquots of 500 μl of PBS and then suspended in 50 μl of 20 μg/ml FITC-labeled anti-mouse IgG antibody (Bioresource) in PBS. Using the cells suspended in 500 μl of PBS as controls, the fluorescence intensities are measured, using a flow cytometer (FACSCalibur; Becton Dickinson).

Distributions of cell numbers by fluorescence intensity are obtained and the proportions of the numbers of the stained cells to those of total cells are calculated. Further, each Kd value is calculated using the concentration of TRA-8 and the proportions of the numbers of the stained cells to those of total cells. Each frequency of reactivity to activated lymphocytes of human, marmoset, and cynomologus monkey is almost same. Accordingly, TRA-8 is able to bind a wide range of primate DR5 including human against which TRA-8 is originally prepared.

Example 23. Escalating dose study of TRA-8 in marmosets

An escalating dose preliminary toxicity study of TRA-8 is performed using 1 male and 1 female marmoset. Three sets of single intravenous dosing, which are separated by a 7-day withdrawal period, are carried out. The dose of TRA-8 is set at 50, 250 and 1250 μg/body. Forty-eight hours after each treatment, blood is collected

from the femoral vein and the plasma is prepared. Plasma aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activities are measured using an analyzer (FUJI DRI-CHEM: Fuji Film Medical Co., Ltd.). All blood is taken without any anesthetization. As a result, no evidences indicating hepatic injury are noted in plasma biochemical examination after each treatment.

Example 24. *In vitro* and *in vivo* pharmacological studies of TRA-8 against cancer cells

In order to determine whether TRA-8 has the therapeutic efficacy in anti-cancer therapy, *in vitro* killing activity of TRA-8 using various cancer cell lines is examined as follows.

Various cancer cells (2-8 x 10^3 cells/50 µl) cultured in RPMI1640 medium (for Jurkat), DMEM medium (for HCT-116), MEM-R (for WiDr), or DMEM-F12 (for COL2-Jck) obtained from Gibco BRL with 10% FCS (Gibco BRL) at 37°C in the presence of 5% CO_2 are dispensed into each well of a 96-well microplate (Sumitomo Bakelite). TRA-8 are adjusted to have the concentration of the final product of interest of 100 ng/ml with medium containing 10% FCS. The TRA-8 solution (100 ng/ml) is used to produce serial dilutions by repeating serial 2-fold dilution with medium containing 10% FCS. Each of the diluted TRA-8 solution is added to each well at 50 µl per well and incubated at 37°C. After reacting at 37°C for 72 hours, 50 µl of 25 µM PMS (phenazine methosulfate; Sigma Chemical Co.) containing 1 mg/ml XTT is added (final concentrations of 250 µg/ml for XTT and 5 µM for PMS). After incubating for 3 hours, the absorbance at 450 nm of each well is measured to calculate the cell viability by using the reduction ability of mitochondria as the index.

The viability of the cells in each well is calculated according to the following formula:

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

wherein "a" is the measurement of a test well, "b" is the measurement of a well with no cells, and "c" is the measurement of a well with no antibody added.

The results are shown in Table 3, below.

Table 3

Cells	ED50 (μg/ml)
Jurkat	0.001 - 0.01
HCT-116	0.004 - 0.02
WiDr	0.007 - 0.03
COL2-Jck	2.28

Various cancer cell lines are strongly induced apoptosis by TRA-8 under the *in vitro* conditions.

Furthermore, the *in vivo* anti-tumor effect of TRA-8 in nude mice transplanted with WiDr cells is determined, because TRA-8 is not cross-reactive with murine DR5.

TRA-8 anti-human DR5 antibody is administered to nude mice bearing human xenografts that express the human DR5 molecule. The mice used were 6 week-old BALb/c nude/nude mice (female, from Clea Japan Inc.), which were transplanted with human colon cancer cell lines WiDr (5 mm^3). At one day after tumor transplantation, these transplanted mice are daily treated with the intra-articular injection of TRA-8 (5 μg/body) to 14 times. WiDr tumor growth is daily determined by the size of the tumor mass. The results are shown in Table 4, below.

Table 4

	8 days	11 days	15 days	18 days	22 days	25 days
Control (PBS)	196	249	469	584	833	1193
SD	±55	±77	±149	±230	±274	±419
TRA-8	158	97	155	195	365	530
SD	±78	±30	±60	±58	±91	±135

In this model, while all untreated animals exhibited visible tumor growth, tumor growth in TRA-8 treated animals is inhibited as demonstrated by the size of tumor. This result indicated that TRA-8 is effective in the elimination of tumor cells *in vivo*.

Example 25. Combination study of TRA-8

Human prostate cancer cell line PC-3 is obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC) and maintained in F-12K Nutrient Mixture (21127-022, Gibco BRL) containing 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone), 1% L-Glutamine-200 mM (25030-149, Gibco BRL) and 0.5% Penicillin Streptomycin Solution (P-7539, Sigma). RPMI1640 medium (MED-008, IWAKI) supplemented with 10% FBS and 0.5% Penicillin Streptomycin Solution is used in the following experiment. Exponentially growing PC-3 cells are collected by trypsinization and washed twice with fresh medium. The cells are then counted, resuspended in fresh medium at a density of 5×10^4 cells/ml and distributed in triplicate into flat-bottomed 96 well plates (3598, Corning-Coster) in a total volume of 100 µl/well one day before the start of the experiment. A representative anti-cancer drug, Paclitaxel (169-18611, Wako) dissolved in dimethylsulfoxide (10 mg/ml) is diluted in fresh medium and then added to the 96-well plates containing the cells at 50 µl/well. The final concentrations of dimethylsulfoxide are less than 0.1%. After incubation for 24 hr at 37°C in 5% CO_2 atmosphere, TRA-8 diluted in fresh medium is added to the wells. After incubation for a further 24 hr, 50 µl of Minimum Essential Medium (11095-098, Gibco BRL) containing 1 mg/ml of XTT and 25 mM of PMS is added to the wells and the plates are incubated for 6 hr. OD450 is then measured by SPECTRA MAX 250 (Molecular Devices) and the cell viability is calculated as follows.

Cell viability (%) = (OD450 for the well containing cells treated with Taxol and/or TRA-8 (agent(s)) - OD450 for the well containing neither cells nor agent) x 100 / (OD450 for the well containing cells with no agent –OD450 for the well containing neither cells nor agent)

The result of the above assay for TRA-8 combined with a representative anti-cancer drug, Paclitaxel, is followed. Paclitaxel reduced the cell viability of PC-3 cells but more than 40% of the signals indicating viable cancer cells still remained at concentrations of up to 200 nM. Notably, the addition of 0.1 ng/ml of TRA-8 greatly decreased the cell viability of the cancer cells, up to 10%, even though no

reduction in cell viability is seen after a single application of TRA-8 at this concentration. This result clearly indicates that TRA-8 exhibited anti-cancer activity synergistically when combined with other anti-cancer drugs.

Example 26. Analysis of Other Type Humanized Antibodies of TRA-8

(1) Designing Humanized Antibodies

Construction of a humanized version of TRA-8 is performed by the method generally known as CDR grafting. mAB58'CL antibody is used as an acceptor as described in Reference Example 2 and the CDR regions of TRA-8 antibody is grafted on the acceptor. In the framework region, some amino acids are grafted on the acceptor from either TRA-8 or human consensus sequences by the criteria given by Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033, (1989)) and humanized TRA-8 sequences are constructed as described hereinbelow.

(2) Construction of Plasmid Carrying the Heavy Chain Variable Region DNA of Other Types Humanized or Mouse TRA-8

As shown in SEQ ID No. 56 of the Sequence Listing, H1 type-humanization of the amino acid sequences of the heavy chain of the mouse anti-human DR5 antibody TRA-8 entailed replacing the 3rd amino acid (methionine), the 13th amino acid (lysine), the 19th amino acid (lysine), the 40th amino acid (threonine), the 42nd amino acid (glutamic acid), the 44th amino acid (arginine), the 84th amino acid (serine), the 88th amino acid (serine), the 93rd amino acid (methionine), the 114th amino acid (threonine), the 115th amino acid (leucine) with glutamine, glutamine, arginine, alanine, glycine, glycine, asparagine, alanine, valine, leucine, and valine, respectively.

As shown in SEQ ID No. 59 of the Sequence Listing, H3 type-humanization of the amino acid sequences of the heavy chain of the mouse anti-human DR5 antibody TRA-8 entailed replacing the 13th amino acid (lysine), the 19th amino acid (lysine), the 40th amino acid (threonine), the 42nd amino acid (glutamic acid), the 44th amino acid (arginine), the 88th amino acid (serine), the 93rd amino acid (methionine), the 114th amino acid (threonine), the 115th amino acid (leucine) with

glutamine, arginine, alanine, glycine, glycine, alanine, valine, leucine, and valine, respectively.

As shown in SEQ ID No. 60 of the Sequence Listing, H4 type-humanization of the amino acid sequences of the heavy chain of the mouse anti-human DR5 antibody TRA-8 entailed replacing the 13th amino acid (lysine), the 19th amino acid (lysine), the 88th amino acid (serine), the 93rd amino acid (methionine), the 114th amino acid (threonine), the 115th amino acid (leucine) with glutamine, arginine, alanine, valine, leucine, and valine, respectively.

As shown in SEQ ID No. 61 of the Sequence Listing, the plasmid carrying the heavy chain variable region DNA of chimeric TRA-8 is designated as "M type". In addition, humanized TRA-8 described in Example 17 and 18 is designated as "H2 type".

The plasmids carrying DNA encoding heavy chain variable region of humanized or chimeric TRA-8 are constructed as follows.

PCR is used to construct the following DNA sequences, each of which comprised described above:

The following 24 oligonucleotide are synthesized:

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

5'- tctgaagtaa tgctggtgga gtctgggggga ggcttagtac agcctggagg gtccctgaga ctctcctgtg cagcctctgg -3' (B; SEQ ID No. 33);

5'- tctgaagtac agctggtgga gtctgggggga ggcttagtac agcctggagg gtccctgaga ctctcctgtg cagcctctgg -3' (B2; SEQ ID No. 57);

5'- tctgaagtaa tgctggtgga gtctgggggga ggcttagtaa agcctggagg gtccctgaaa ctctcctgtg cagcctctgg -3' (B3; SEQ ID No. 66);

5'- attcacttic agtagttatg taatgtcttg ggttcggcag gcaccagggga agggtctgga gtgggttgca accattagta -3' (C; SEQ ID No. 34);

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5'- gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtgaga gtggtcccct ggccccagta gtccgtcgta atcatagagt cacc -3' (L2; SEQ ID No. 71).

The following 2 PCR primers are synthesized as described above:

5'- ttggataagc ttggcttgac -3' (P1; SEQ ID No. 44); and

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

The synthesis of H1 type DNA encoding a polypeptide chain comprising a secretion signal sequence, a variable region of humanized TRA-8 heavy chain and the 8 amino acid residues at the N-terminus of the IgG-CH1 region is performed using a combination of PCR respectively.

The H1 type-DNA fragment is prepared as follows.

Composition of the PCR reaction solution:

oligonucleotide A, 10 pmol;
oligonucleotide B2, 10 pmol;
oligonucleotide C, 10 pmol;
oligonucleotide D, 10 pmol;
oligonucleotide E, 10 pmol;
oligonucleotide F, 10 pmol;
oligonucleotide G, 10 pmol;
oligonucleotide H2, 10 pmol;
oligonucleotide I, 10 pmol;
oligonucleotide J, 10 pmol;

oligonucleotide K, 10 pmol;
oligonucleotide L, 10 pmol;
oligonucleotide primer P1, 2 μM;
oligonucleotide primer P2, 2 μM;
10 X Pyrobest buffer II, 10 μl;
dNTP mix, 8 μl;
Pyrobest DNA polymerase, 0.5 μl; and
Redistilled water to a final volume of 50 μl.

The PCR reaction is conducted as follows. The solution is first heated at 94°C for 5 minutes, after which a cycle of heating to 98°C for 10 second, 55°C for 30 second and 72°C for 1 minute, is repeated 7 times. After completion of this procedure, the reaction solution is heated at 72°C for 15 minutes.

After phenol extraction and ethanol precipitation, the resulting DNA precipitate is vacuum-dried, dissolved in a minimum of redistilled water, and separated by 3% agarose gel electrophoresis. After electrophoresis, the gel is stained with a 1 μg/ml aqueous solution of ethidium bromide to allow detection of DNA under UV light. The DNA bands corresponding to H1 type-DNA is cut out using a razor blade and eluted from the gel using Geneclean Spin Kit (BIO 101, CA, USA). After phenol extraction, the eluted DNA is then concentrated by centrifugation at 7,500 X g, followed by ethanol precipitation, and finally dissolved in 5 μl of distilled water.

The synthesis of H3 type DNA encoding a polypeptide chain comprising a secretion signal sequence, a variable region of humanized TRA-8 heavy chain and the 8 amino acid residues at the N-terminus of the IgG-CH1 region is performed using a combination of PCR respectively.

The H3 type-DNA fragment is prepared as follows.

Composition of the PCR reaction solution:

oligonucleotide A, 10 pmol;

oligonucleotide B, 10 pmol;
oligonucleotide C, 10 pmol;
oligonucleotide D, 10 pmol;
oligonucleotide E2, 10 pmol;
oligonucleotide F, 10 pmol;
oligonucleotide G, 10 pmol;
oligonucleotide H, 10 pmol;
oligonucleotide I, 10 pmol;
oligonucleotide J, 10 pmol;
oligonucleotide K2, 10 pmol;
oligonucleotide L, 10 pmol;
oligonucleotide primer P1, 2 μM;
oligonucleotide primer P2, 2 μM;
10 X Pyrobest buffer II, 10 μl;
dNTP mix, 8 μl;
Pyrobest DNA polymerase, 0.5 μl; and
Redistilled water to a final volume of 50 μl.

The PCR reaction is conducted as follows. The solution is first heated at 94°C for 5 minutes, after which a cycle of heating to 98°C for 10 second, 55°C for 30 second and 72°C for 1 minute, is repeated 7 times. After completion of this procedure, the reaction solution is heated at 72°C for 15 minutes.

After phenol extraction and ethanol precipitation, the resulting DNA precipitate is vacuum-dried, dissolved in a minimum of redistilled water, and separated by 3% agarose gel electrophoresis. After electrophoresis, the gel is stained with a 1 μg/ml aqueous solution of ethidium bromide to allow detection of DNA under UV light. The DNA bands corresponding to H3 type-DNA is cut out using a razor blade and eluted from the gel using Geneclean Spin Kit. After phenol

extraction, the eluted DNA is then concentrated by centrifugation at 7,500 X g, followed by ethanol precipitation, and finally dissolved in 5 μl of distilled water.

The synthesis of H4 type DNA encoding a polypeptide chain comprising a secretion signal sequence, a variable region of humanized TRA-8 heavy chain and the 8 amino acid residues at the N-terminus of the IgG-CH1 region is performed using a combination of PCR respectively.

The H4 type-DNA fragment is prepared as follows.

Composition of the PCR reaction solution:

oligonucleotide A, 10 pmol;
oligonucleotide B, 10 pmol;
oligonucleotide C2, 10 pmol;
oligonucleotide D, 10 pmol;
oligonucleotide E2, 10 pmol;
oligonucleotide F, 10 pmol;
oligonucleotide G, 10 pmol;
oligonucleotide H, 10 pmol;
oligonucleotide I2, 10 pmol;
oligonucleotide J, 10 pmol;
oligonucleotide K2, 10 pmol;
oligonucleotide L, 10 pmol;
oligonucleotide primer P1, 2 μM;
oligonucleotide primer P2, 2 μM;
10 X Pyrobest buffer II, 10 μl;
dNTP mix, 8 μl;
Pyrobest DNA polymerase, 0.5 μl; and
Redistilled water to a final volume of 50 μl.

The PCR reaction is conducted as follows. The solution is first heated at 94°C for 5 minutes, after which a cycle of heating to 98°C for 10 second, 55°C for

30 second and 72°C for 1 minute, is repeated 7 times. After completion of this procedure, the reaction solution is heated at 72°C for 15 minutes.

After phenol extraction and ethanol precipitation, the resulting DNA precipitate is vacuum-dried, dissolved in a minimum of redistilled water, and separated by 3% agarose gel electrophoresis. After electrophoresis, the gel is stained with a 1 μg/ml aqueous solution of ethidium bromide to allow detection of DNA under UV light. The DNA bands corresponding to H4 type-DNA is cut out using a razor blade and eluted from the gel using Geneclean Spin Kit. After phenol extraction, the eluted DNA is then concentrated by centrifugation at 7,500 X g, followed by ethanol precipitation, and finally dissolved in 5 μl of distilled water.

The synthesis of M type DNA encoding a polypeptide chain comprising a secretion signal sequence, a variable region of chimeric TRA-8 heavy chain and the 8 amino acid residues at the N-terminus of the IgG-CH1 region is performed using a combination of PCR respectively.

The M type-DNA fragment is prepared as follows.

Composition of the PCR reaction solution:

oligonucleotide A, 10 pmol;
oligonucleotide B3, 10 pmol;
oligonucleotide C2, 10 pmol;
oligonucleotide D, 10 pmol;
oligonucleotide E3, 10 pmol;
oligonucleotide F2, 10 pmol;
oligonucleotide G, 10 pmol;
oligonucleotide H3, 10 pmol;
oligonucleotide I2, 10 pmol;
oligonucleotide J, 10 pmol;
oligonucleotide K3, 10 pmol;
oligonucleotide L2, 10 pmol;
oligonucleotide primer P1, 2 μM;

oligonucleotide primer P2, 2 μM;

10 X Pyrobest buffer II, 10 μl;

dNTP mix, 8 μl;

Pyrobest DNA polymerase, 0.5 μl; and

Redistilled water to a final volume of 50 μl.

The PCR reaction is conducted as follows. The solution is first heated at 94°C for 5 minutes, after which a cycle of heating to 98°C for 10 second, 55°C for 30 second and 72°C for 1 minute, is repeated 7 times. After completion of this procedure, the reaction solution is heated at 72°C for 15 minutes.

After phenol extraction and ethanol precipitation, the resulting DNA precipitate is vacuum-dried, dissolved in a minimum of redistilled water, and separated by 3% agarose gel electrophoresis. After electrophoresis, the gel is stained with a 1 μg/ml aqueous solution of ethidium bromide to allow detection of DNA under UV light. The DNA bands corresponding to M type-DNA is cut out using a razor blade and eluted from the gel using Geneclean Spin Kit. After phenol extraction, the eluted DNA is then concentrated by centrifugation at 7,500 X g, followed by ethanol precipitation, and finally dissolved in 5 μl of distilled water.

The resulting, each extracted DNA (H1 type, H3 type, H4 type, and M type) is cloned using pGEM-T Easy vector (Promega) as follows:

The DNA fragment recovered from the PCR reaction (H1, H3, H4 or M), 5 μl;

10 X Taq polymerase buffer, 1 μl;

dNTP mixture, 1 μl

Taq polymerase (5 unit/ml), 1 μl; and

redistilled water to a final volume of 10 μl.

After the above each solution is reacted at 70°C for 30 minutes, each DNA solution and pGEM-T Easy vector are ligated using a DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Shuzo Co., Ltd.) using the manufacturer's protocol.

After 4 hours incubation at 15°C, 2 µl of the incubated reaction solution is mixed with 100 µl of competent *E. coli* strain JM109 at a cell density of 1-2 x 10^9 cells/ml (Takara Shuzo Co., Ltd.), and the mixture is kept on ice for 30 minutes, then at 42°C for 30 seconds, and again on ice for 1 minute. Then, 500 µl of SOC medium (2% v/v tryptone, 0.5% w/v yeast extract, 0.05% w/v sodium chloride, 2.5 mM w/v potassium chloride, 1 mM magnesium chloride, and 20 mM glucose) is added the mixture, which is incubated for a further hour, with shaking. Transformant strains are then isolated, and plasmid DNA is prepared from the strains as described in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". The nucleotide sequence of this DNA encoding the heavy chain of humanized or mouse TRA-8 is confirmed by the dideoxy method, respectively (Sanger, F. S., et al., (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467) using 3700 DNA Analyzer (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems, Japan).

The resulting plasmid is designated pHA15 (the plasmid carrying cDNA encoding the H1-type heavy chain of humanized TRA-8), pHC10 (the plasmid carrying cDNA encoding the H3-type heavy chain of humanized TRA-8), pHD21 (the plasmid carrying cDNA encoding the H4-type heavy chain of humanized TRA-8), and pM11 (the plasmid carrying cDNA encoding the heavy chain of chimeric TRA-8). The transformant *E coli* strains harboring these plasmid, designated as *E. coli* JM109/pHA15, *E. coli* JM109/pHC10, *E. coli* JM109/pHD21, and *E. coli* JM109/pM11 were deposited with International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japan on April 20, 2001, in accordance with the Budapest Treaty for the Deposit of Microorganisms, and was accorded the accession number FERM BP-7555, FERM BP-7557, FERM BP-7558, and FERM BP-7559, respectively.

(3) Construction of Expression Plasmids Carrying the Heavy Chain Variable Region DNA of Several Types Humanized or Mouse TRA-8

Recombinant expression vector for animal cells are constructed by inserting the DNA encoding the heavy chain of H1 type, H3 type, and H4 type humanized or M type chimeric TRA-8 (cloned in above) as follows.

One μg of plasmid pSRHHH3 (European patent application EP 0 909 816 A1) carrying the heavy chain variable region of humanized anti-Fas monoclonal antibody HFE7A and human IgG1 constant region genomic DNA, an expression vector for mammalian cells, is digested with the restriction enzymes HindIII and ApaI, and separated by 3% agarose gel electrophoresis. After electrophoresis, the gel is stained with a 1 μg/ml aqueous solution of ethidium bromide to allow detection of DNA under UV light. The vector DNA bands containing human IgG1 constant region genomic DNA without the heavy chain variable region of humanized HFE7A are cut out using a razor blade and eluted from the gel using Geneclean Spin Kit. After phenol extraction, the eluted DNA is then concentrated by centrifugation at 7,500 X g, followed by ethanol precipitation, and finally dissolved in 5 μl of distilled water and then dephosphorylated using CIP. The resulting digested, dephosphorylated plasmid (100 ng) is ligated with 1 μg of the DNA fragment of pHA15, pHC10, pHD21, or pM11 containing the DNA encoding the heavy chain variable region of humanized or chimeric TRA-8, which had also been digested with HindIII and ApaI, using a DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Shuzo Co., Ltd.). The ligation mixture is then used to transform *E. coli* JM109, which is then plated on LB agar plates containing 50 μg/ml ampicillin.

The transformants obtained by this method are cultured in 2 ml of liquid LB medium containing 50 μg/ml ampicillin at 37°C overnight, and plasmid DNA is subsequently extracted from the resulting culture by the alkaline-SDS method.

The extracted plasmid DNA is digested with HindIII and ApaI, and subjected to 3% w/v agarose gel electrophoresis to confirm the presence or absence of the insert of the DNA encoding the heavy chain variable region of humanized or

chimeric TRA-8. The insertion and orientation of the desired DNA fragment in the vector is confirmed by DNA sequencing using a gene sequence analyzer (ABI Prism 3700 DNA Analyzer; Applied Biosystems). The resulting expression plasmids carrying cDNA encoding the heavy chain of humanized or chimeric TRA-8 were designated pHA15-1, pHC10-3, pHD21-1, and pM11-1, respectively.

(4) Construction of Vectors for the Humanized Light Chains

(4.1) Construction of an Expression Vector for the Light Chain of the Humanized Antibody (LM1 type)

As shown in SEQ ID No. 72 of the Sequence Listing, other humanization (LM1 type) of the amino acid sequences of the light chain of the mouse anti-human DR5 antibody TRA-8 entailed replacing the 3rd amino acid (valine), 8th amino acid (histidine), 9th amino acid (lysine), 10th amino acid (phenylalanine), 11th amino acid (methionine), 13th amino acid (threonine), 20th amino acid (serine), 42nd amino acid (glutamine), 43rd (serine), 60th amino acid (aspartic acid), 63rd amino acid (threonine), 77th amino acid (asparagine), 78th amino acid (valine), 80th amino acid (serine) 83rd amino acid (leucine), 85th amino acid (aspartic acid), 87th amino acid (phenylalanine),and 99th amino acid (glycine) 103rd amino acid (leucine) and 108th amino acid (alanine) from the N-terminus of the amino acid sequence of the TRA-8 light chain are replaced with glutamine, proline, serine, serine, leucine, alanine, threonine, lysine, alanine, serine, serine, serine, leucine, proline, phenylalanine, threonine, tyrosine, glutamine, valine and threonine respectively. The resulting sequence is designated LM1.

Expression plasmids carrying this type of humanized light chain amino acid sequences of the anti-human DR5 antibody TRA-8 (LM1 type, SEQ ID No. 72 of the Sequence Listing) are constructed as follows.

1) Synthesis of primers for preparing the variable and constant regions of the light chain of humanized TRA-8 (LM1 type)

DNA coding for the LM1 polypeptide chain (SEQ ID No. 72 of the Sequence Listing), each of which is a fusion of the variable region of humanized

anti-DR5 antibody TRA-8 light chain (LM1 type) and the constant region of the human Ig light chain (κ chain), are respectively synthesized by using combinations of PCR.

Further to 7AL1P (SEQ ID No. 47), 7ALCN (SEQ ID No. 48), HKCDF11 (SEQ ID No. 50), HKCDR12 (SEQ ID No. 51), HKCDF22 (SEQ ID No. 52), HKCDR22 (SEQ ID No. 53), and HKCF12 (SEQ ID No. 54).

The following oligonucleotide primers are synthesized for PCR:

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

2) Construction of plasmid pCR3.1/LM1-2 (cloning of humanized TRA-8 light chain type LM1)

LM1-DNA fragment coding for the amino acid sequence as defined in SEQ ID No. 72 of the same is prepared by performing 2-step PCR, inserted into a plasmid vector and cloned in *E. coli*.

a) First step PCR

LM1-F1-DNA fragment coding for a secretion signal sequence and a portion of FRL_1 region with a Hind III restriction enzyme cleavage site added at the 5'-end is prepared under the following conditions. The template plasmids, pHSGHM17 and pSRPDHH, are obtained by following the description in a European patent application EP 0 909 816 A1.

Composition of the reaction solution:

plasmid pHSGHM17 DNA, 25 ng
oligonucleotide primer 7AL1P, 50 pmol
oligonucleotide primer HKSPR12, 50 pmol
dNTPs cocktail, 5 μl
10×PCR buffer, 5 μl
ampliTaq DNA polymerase (PerkinElmer), 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 μl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

LM1-F2-DNA fragment coding for a portion of FRL_1, $CDRL_1$, FRL_2, and $CDRL_2$ is prepared under the following conditions.

Composition of the reaction solution:

plasmid pL28 DNA, 25 ng
oligonucleotide primer HKCDF11, 50 pmol
oligonucleotide primer HKCDR12, 50 pmol
dNTPs cocktail, 5 µl
10×PCR buffer, 5 µl
ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 µl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

LM1-F3-DNA fragment coding for CDRL2, FRL_3, and a portion of $CDRL_3$ is prepared under the following conditions.

Composition of the reaction solution:

plasmid pSRPDHH DNA, 25 ng
oligonucleotide primer HKCDF22, 50 pmol
oligonucleotide primer HKCDR22, 50 pmol
dNTPs cocktail, 5 µl
10×PCR buffer, 5 µl
ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 µl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

LM1-F4-DNA fragment coding for $CDRL_3$, FRL_4 and the constant region with an EcoR I restriction enzyme cleavage site added at the 3'-end is prepared under the following conditions.

Composition of the reaction solution:

plasmid pSRPDHH DNA, 25 ng

oligonucleotide primer HKCF12, 50 pmol

oligonucleotide primer 7ALCN, 50 pmol

dNTPs cocktail, 5 µl

10×PCR buffer, 5 µl

ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 µl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

The amplified DNA fragments after PCR are separated by 5% polyacrylamide gel electrophoresis. The gel after electrophoresis is stained with 1 µg/ml of ethidium bromide to detect the produced DNA under UV light. The respective DNA bands thus detected are excised with a razor

b) Second step PCR

LM1-DNA in which above described LM1-F1-DNA, LM1-F2-DNA, LM1-F3-DNA and LM1-F4-DNA fragments are fused is prepared under the following conditions.

Composition of the reaction solution:

Gel fragment of LM1-F1-DNA prepared in the first step PCR,

Gel fragment of LM1-F2-DNA prepared in the first step PCR,

Gel fragment of LM1-F3-DNA prepared in the first step PCR,
Gel fragment of LM1-F4-DNA prepared in the first step PCR
oligonucleotide primer 7AL1P, 50 pmol
oligonucleotide primer 7ALCN, 50 pmol
dNTPs cocktail, 5.0 µl
10×PCR buffer, 5.0 µl
ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 µl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

The thus prepared LM1-DNA fragment is inserted into plasmid pCR3.1DNA using Eukaryotic TA cloning Kit (InVitrogen) following the manufacturer's protocol and introduced into the competent *E. Coli* TOP10F' contained in the kit. The nucleotide sequences of these DNAs encoding the light chain of humanized TRA-8 (LM1 type) are confirmed by the dideoxy method (Sanger, F. S., et al., (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467) using 3700 DNA Analyzer (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems, Japan).

The resulting plasmids are designated pCR3.1/LM1-2 (the plasmid carrying cDNA encoding the light chain variable region of humanized TRA-8 (LM1 type) and a human Ig light chain constant region).

The obtained plasmid pCR3.1/LM1-2 containing LM1-DNA fragment is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I.

One µg of cloning plasmid pHSG399 DNA is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I, and then dephosphorylated with CIP. The resulting dephosphorylated pHSG399 DNA and LM1-DNA fragment, that had been digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I, are ligated using DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Then, *E. coli* DH5α is transformed with

the ligated DNA and spread onto LB agar medium containing 0.1 mM IPTG, 0.1% X-Gal and 50 μg/ml chloramphenicol (final concentrations). The white transformants obtained are cultured in liquid LB medium containing 50 μg/ml chloramphenicol, and plasmid DNA is extracted from the resulting culture according to the alkaline-SDS method. The extracted plasmid DNA is digested with Hind III and EcoR I, and then a clone carrying LM1-DNA fragment is selected by 1% agarose gel electrophoresis.

As a result of the above procedure, plasmid pHSG/M1-2-2 carrying a fusion fragment of the variable region of the humanized LM1 TRA-8 light chain and the constant region of human Igκ chain is obtained. The transformant *E coli* strain harboring these plasmid, designated as *E. coli* DH5α/pHSG/M1-2-2 was deposited with International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japan on April 20, 2001, in accordance with the Budapest Treaty for the Deposit of Microorganisms, and was accorded the accession number FERM BP-7562.

3) Construction of plasmid pSR/LM1-2 (expression plasmid for humanized LM1 TRA-8 light chain)

The obtained plasmid pHSG/M1-2- carrying a fusion fragment of the variable region of the humanized LM1 TRA-8 light chain and the constant region of human Igκ chain is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I.

One μg of cloning plasmid pSRPDHH DNA (European patent application EP 0 909 816 A1) is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I, and then dephosphorylated with CIP. The resulting dephosphorylated pSRPDHH DNA and HindIII-EcoRI DNA fragment obtained from pHSG/M1-2-2 are ligated using DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Then, *E. coli* DH5α is transformed with the ligated DNA and spread onto LB agar. The transformants obtained are cultured in liquid LB medium containing 100 μg/ml ampicillin, and plasmid DNA is extracted from the resulting culture according to the alkaline-SDS

method. The insertion and orientation of the desired DNA fragment in pSRPDHH vector is confirmed by DNA sequencing using a gene sequence analyzer.

The resulting expression plasmid carrying cDNA encoding the light chain of humanized LM1 TRA-8 is designated pSR/LM1-2.

(4.2) Construction of an Expression Vector for the Light Chain of the Humanized Antibody (LM3 type)

As shown in SEQ ID No. 73 of the Sequence Listing, other humanization (LM3 type) of the amino acid sequences of the light chain of the mouse anti-human DR5 antibody TRA-8 entailed replacing the 8th amino acid (histidine), 9th amino acid (lysine), 10th amino acid (phenylalanine), 11th amino acid (methionine), 13th amino acid (threonine), 20th amino acid (serine), 42nd amino acid (glutamine), 43rd amino acid (serine), 77th amino acid (asparagine), 78th amino acid (valine), 80th amino acid (serine) 83rd amino acid (leucine), 85th amino acid (aspartic acid), 87th amino acid (phenylalanine), 99th amino acid (glycine) 103rd amino acid (leucine) and 108th amino acid (alanine) from the N-terminus of the amino acid sequence of the TRA-8 light chain are replaced with proline, serine, serine, leucine, alanine, threonine, lysine, alanine, serine, leucine, proline, phenylalanine, threonine, tyrosine, glutamine, valine and threonine, respectively. The resulting sequence is designated LM3.

Expression plasmids carrying this type of humanized light chain amino acid sequences of the anti-human DR5 antibody TRA-8 (LM3 type, SEQ ID No. 73 of the Sequence Listing) are constructed as follows.

1) Synthesis of primers for preparing the variable and constant regions of the light chain of humanized LM3 TRA-8

DNA coding for the LM3 polypeptide chain (SEQ ID No. 73 of the Sequence Listing), each of which is a fusion of the variable region of humanized anti-DR5 antibody TRA-8 light chain and the constant region of the human Ig light chain (κ chain), are respectively synthesized by using combinations of PCR.

Further to 7AL1P (SEQ ID No. 47) and 7ALCN (SEQ ID No. 48), the following oligonucleotide primers are synthesized for PCR:

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

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

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

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

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

5'- tacagcagta cccacatcct gactggcctt gcaggtgatg gtgaccctgt cccccacaga tgcagacaaa ga -3' (MOD1R3; SEQ ID No. 83);

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

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

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

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

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

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

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

5'- gaagatgaag acagatggtg cagccacagt ccgtttgatt tccaccttgg tgccttgacc gaa -3' (MOD1R7; SEQ ID No. 91); and

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

2) Construction of plasmid pCR3.1/LM3-3-44 (cloning of humanized TRA-8 light chain type LM3)

LM3-DNA fragment coding for the amino acid sequence as defined in SEQ ID No. 73 of the same is prepared by performing 2-step PCR, inserted into a plasmid vector and cloned in *E. coli*.

a) First step PCR

LM3-F31B-DNA fragment coding for a secretion signal sequence region with a Hind III restriction enzyme cleavage site added at the 5'-end, FRL_1 $CDRL_1$, FRL_2, and $CDRL_2$, FRL_3, $CDRL_3$, FRL_4 and a portion of the constant region is prepared under the following conditions.

Composition of the reaction solution:

oligonucleotide primer MOD1F1, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1R1, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1F22, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1R22, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1F3, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1R3, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1F42, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1R4, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1F5, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1R52, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1F6, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1R6, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1F7, 50 pmol
oligonucleotide primer MOD1R7, 5 pmol
oligonucleotide primer 7AL1P, 50 pmol

oligonucleotide primer LR17, 50 pmol

dNTPs cocktail, 5 µl

10× PCR buffer, 5 µl

ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 µl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

LM3-F31C-DNA fragment coding for a portion of the constant region with an Eco R I restriction enzyme cleavage site added at the 3'-end is prepared under the following conditions.

The template plasmids, pSRPDHH, is obtained by following the description in a European patent application EP 0 909 816 A1.

Composition of the reaction solution:

plasmid pSRPDHH DNA, 25 ng

oligonucleotide primer MOD1F7, 50 pmol

oligonucleotide primer 7ALCN, 50 pmol

dNTPs cocktail, 5 µl

10×PCR buffer, 5 µl

ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 µl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

The amplified DNA fragments after PCR are separated by 5% polyacrylamide gel electrophoresis. The gel after electrophoresis is stained with 1

μg/ml of ethidium bromide to detect the produced DNA under UV light. The respective DNA bands thus detected are excised with a razor.

b) Second step PCR

LM3-DNA in which above described LM3-F31B-DNA, and LM3-F31C-DNA fragments are fused is prepared under the following conditions.

Composition of the reaction solution:

Gel fragment of LM3-F31B-DNA prepared in the first step PCR,
Gel fragment of LM3-F31C-DNA prepared in the first step PCR,
oligonucleotide primer 7AL1P, 50 pmol
oligonucleotide primer 7ALCN, 50 pmol
dNTPs cocktail, 5.0 μl
10× PCR buffer, 5.0 μl
ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 μl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

The thus prepared LM3-DNA fragment is inserted into plasmid pCR3.1DNA using Eukaryotic TA cloning Kit (InVitrogen) following the manufacturer's protocol and introduced into the competent *E. Coli* TOP10F' contained in the kit. The nucleotide sequences of these DNAs encoding the light chain of humanized LM3 TRA-8 are confirmed by the dideoxy method (Sanger, F. S., et al., (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467) using 3700 DNA Analyzer (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems, Japan).

The resulting plasmids are designated pCR3.1/LM3-3-44 (the plasmid carrying cDNA encoding the light chain variable region of humanized LM3 TRA-8 and a human Ig light chain constant region).

The obtained plasmid pCR3.1/LM3-3-44 containing LM3-DNA fragment is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I.

One μg of cloning plasmid pHSG399 DNA is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I, and then dephosphorylated with CIP. The resulting dephosphorylated pHSG399 DNA and LM3-DNA fragment, that had been digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I, are ligated using DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Then, *E. coli* DH5α is transformed with the ligated DNA and spread onto LB agar medium containing 0.1 mM IPTG, 0.1% X-Gal and 50 μg/ml chloramphenicol (final concentrations). The white transformants obtained are cultured in liquid LB medium containing 50 μg/ml chloramphenicol, and plasmid DNA is extracted from the resulting culture according to the alkaline-SDS method. The extracted plasmid DNA is digested with Hind III and EcoR I, and then a clone carrying LM3-DNA fragment is selected by 1% agarose gel electrophoresis.

As a result of the above procedure, plasmid pHSG/M3-3-22 carrying a fusion fragment of the variable region of the humanized LM3 TRA-8 light chain and the constant region of human Igκ chain is obtained. The transformant *E coli* strain harboring these plasmid, designated as *E. coli* DH5α/pHSG/M3-3-22 was deposited with International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japan on April 20, 2001, in accordance with the Budapest Treaty for the Deposit of Microorganisms, and was accorded the accession number FERM BP-7564.

3) Construction of plasmid pSR/LM3-3-44-10 (expression plasmid for humanized LM3 TRA-8 light chain)

The obtained plasmid pHSG/M3-3-22 carrying a fusion fragment of the variable region of the humanized LM3 TRA-8 light chain and the constant region of human Igκ chain is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I.

One μg of cloning plasmid pSRPDHH DNA (European patent application EP 0 909 816 A1) is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I, and then dephosphorylated with CIP. The resulting dephosphorylated pSRPDHH DNA and HindIII-EcoRI DNA fragment obtained from pHSG/M3-3-22 are ligated using DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Then, *E. coli* DH5α is transformed with the ligated DNA and spread onto LB agar. The transformants obtained are cultured in liquid LB medium containing 100 μg/ml ampicillin, and plasmid DNA is extracted from the resulting culture according to the alkaline-SDS method. The insertion and orientation of the desired DNA fragment in pSRPDHH vector is confirmed by DNA sequencing using a gene sequence analyzer (ABI Prism 3700 DNA Analyzer; Applied Biosystems).

The resulting expression plasmid carrying cDNA encoding the light chain of humanized LM3 TRA-8 is designated pSR/LM3-3-44-10.

(4.3) Construction of an Expression Vector for the Light Chain of the Humanized Antibody (LM4 type)

As shown in SEQ ID No. 74 of the Sequence Listing, other humanization (LM4 type) of the amino acid sequences of the light chain of the mouse anti-human DR5 antibody TRA-8 entailed replacing the 8th amino acid (histidine), 9th amino acid (lysine), 10th amino acid (phenylalanine), 11th amino acid (methionine), 13th amino acid (threonine), 20th amino acid (serine), 42nd amino acid (glutamine), 43rd amino acid (serine), 77th amino acid (asparagine), 78th amino acid (valine), 80th amino acid (serine) 83rd amino acid (leucine), 85th amino acid (aspartic acid), 99th amino acid (glycine) 103rd amino acid (leucine) and 108th amino acid (alanine) from the N-terminus of the amino acid sequence of the TRA-8 light chain are replaced with proline, serine, serine, leucine, alanine, threonine, lysine, alanine, serine, leucine, proline, phenylalanine, threonine, glutamine, valine and threonine respectively. The resulting sequence is designated LM4.

80

Expression plasmids carrying this type of humanized light chain amino acid sequences of the anti-human DR5 antibody TRA-8 (LM4 type) (SEQ ID No. 74 of the Sequence Listing) are constructed as follows.

1) Synthesis of primers for preparing the variable and constant regions of the light chain of humanized LM4 TRA-8

DNA coding for the LM4 polypeptide chain (SEQ ID No. 74 of the Sequence Listing), each of which is a fusion of the variable region of humanized anti-DR5 antibody TRA-8 light chain and the constant region of the human Ig light chain (κ chain), are respectively synthesized by using combinations of PCR.

Further to 7AL1P (SEQ ID No. 47), 7ALCN (SEQ ID No. 48), MOD1F1 (SEQ ID No. 78), MOD1R1 (SEQ ID No. 79), MOD1F22 (SEQ ID No. 80), MOD1R22 (SEQ ID No. 81), MOD1F3 (SEQ ID No. 82), MOD1R3 (SEQ ID No. 83), MOD1F42 (SEQ ID No. 84), MOD1R4 (SEQ ID No. 85), MOD1F5 (SEQ ID No. 86), MOD1R52 (SEQ ID No. 87), MOD1F7 (SEQ ID No. 90), and MOD1R7 (SEQ ID No. 91), LR17 (SEQ ID No. 101), the following oligonucleotide primers are synthesized for PCR:

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

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

2) Construction of plasmid pCR3.1/LM4-5-3 (cloning of humanized TRA-8 light chain type LM4)

LM4-DNA fragment coding for the amino acid sequence as defined in SEQ ID No. 74 of the same is prepared by performing 2-step PCR, inserted into a plasmid vector and cloned in *E. coli*.

a) First step PCR

LM4-F41B-DNA fragment coding for a secretion signal sequence region with a Hind III restriction enzyme cleavage site added at the 5'-end, FRL_1, $CDRL_1$,

FRL_2, and $CDRL_2$, FRL_3, $CDRL_3$, FRL_4 and a portion of the constant region is prepared under the following conditions.

Composition of the reaction solution:

oligonucleotide primer MOD1F1, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1R1, 5 pmol.
oligonucleotide primer MOD1F22, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1R22, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1F3, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1R3, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1F42, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1R4, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1F5, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1R52, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1F62, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1R62, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1F7, 50 pmol
oligonucleotide primer MOD1R7, 5 pmol
oligonucleotide primer 7AL1P, 50 pmol
oligonucleotide primer LR17, 50 pmol
dNTPs cocktail, 5 μl
10×PCR buffer, 5 μl
ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 μl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

LM4-F41C-DNA fragment coding for a portion of the constant region with an Eco R I restriction enzyme cleavage site added at the 3'-end is prepared under the following conditions.

The template plasmids, pSRPDHH, are obtained by following the description in a European patent application EP 0 909 816 A1.

Composition of the reaction solution:

plasmid pSRPDHH DNA, 25 ng
oligonucleotide primer MOD1F7, 50 pmol
oligonucleotide primer 7ALCN, 50 pmol
dNTPs cocktail, 5 µl
10×PCR buffer, 5 µl
ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 µl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

The amplified DNA fragments after PCR are separated by 5% polyacrylamide gel electrophoresis. The gel after electrophoresis is stained with 1 µg/ml of ethidium bromide to detect the produced DNA under UV light. The respective DNA bands thus detected are excised with a razor blade.

b) Second step PCR

LM4-DNA in which above described LM4-F41B-DNA, and LM4-F41C-DNA fragments are fused is prepared under the following conditions.

Composition of the reaction solution:

Gel fragment of LM4-F41B-DNA prepared in the first step PCR,
Gel fragment of LM4-F41C-DNA prepared in the first step PCR,
oligonucleotide primer 7AL1P, 50 pmol
oligonucleotide primer 7ALCN, 50 pmol

dNTPs cocktail, 5.0 µl

10×PCR buffer, 5.0 µl

ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 µl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

The thus prepared LM4-DNA fragment is inserted into plasmid pCR3.1DNA using Bukaryotic TA cloning Kit (InVitrogen) following the manufacturer's protocol and introduced into the competent *E. Coli* TOP10F' contained in the kit. The nucleotide sequences of these DNAs encoding the light chain of humanized LM4 TRA-8 are confirmed by the dideoxy method (Sanger, F. S., et al., (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467) using 3700 DNA Analyzer (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems, Japan).

The resulting plasmids are designated pCR3.1/LM4-5-3 (the plasmid carrying cDNA encoding the light chain variable region of humanized LM4 TRA-8 and a human Ig light chain constant region).

The obtained plasmid pCR3.1/LM4-5-3 containing LM4-DNA fragment is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I.

One µg of cloning plasmid pHSG399 DNA is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I, and then dephosphorylated with CIP. The resulting dephosphorylated pHSG399 DNA and LM4-DNA fragment, that had been digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I, are ligated using DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Then, *E. coli* DH5α is transformed with the ligated DNA and spread onto LB agar medium containing 0.1 mM IPTG, 0.1% X-Gal and 50 µg/ml chloramphenicol (final concentrations). The white transformants obtained are cultured in liquid LB medium containing 50 µg/ml chloramphenicol, and plasmid DNA is extracted from the resulting culture according

to the alkaline-SDS method. The extracted plasmid DNA is digested with Hind III and EcoR I, and then a clone carrying LM4-DNA fragment is selected by 1% agarose gel electrophoresis.

As a result of the above procedure, plasmid pHSG/M4-5-3-1 carrying a fusion fragment of the variable region of the humanized LM4 TRA-8 light chain and the constant region of human Igκ chain is obtained. The transformant *E coli* strain harboring these plasmid, designated as *E. coli* DH5α/pHSG/M4-5-3-1 was deposited with International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japan on April 20, 2001, in accordance with the Budapest Treaty for the Deposit of Microorganisms, and was accorded the accession number FERM BP-7565.

3) Construction of plasmid pSR/LM4-5-3-3 (expression plasmid for humanized LM4 TRA-8 light chain)

The obtained plasmid pHSG/M4-5-3-1 carrying a fusion fragment of the variable region of the humanized LM4 TRA-8 light chain and the constant region of human Igκ chain is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I.

One μg of cloning plasmid pSRPDHH DNA (European patent application EP 0 909 816 A1) is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I, and then dephosphorylated with CIP. The resulting dephosphorylated pSRPDHH DNA and HindIII-EcoRI DNA fragment obtained from pHSG/M4-5-3-1 are ligated using DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Then, *E. coli* DH5α is transformed with the ligated DNA and spread onto LB agar. The transformants obtained are cultured in liquid LB medium containing 100 μg/ml ampicillin, and plasmid DNA is extracted from the resulting culture according to the alkaline-SDS method. The insertion and orientation of the desired DNA fragment in pSRPDHH vector is confirmed by DNA sequencing using a gene sequence analyzer (ABI Prism 3700 DNA Analyzer, Applied Biosystems).

The resulting expression plasmid carrying cDNA encoding the light chain of humanized LM4 TRA-8 is designated pSR/LM4-5-3-3.

(4.4) Construction of an Expression Vector for the Light Chain of the Humanized Antibody (LM5 type)

As shown in SEQ ID No. 75 of the Sequence Listing, other humanization (LM5 type) of the amino acid sequences of the light chain of the mouse anti-human DR5 antibody TRA-8 entailed replacing the 8th amino acid (histidine), 9th amino acid (lysine), 10th amino acid (phenylalanine), 11th amino acid (methionine), 13th amino acid (threonine), 20th amino acid (serine), 42nd amino acid (glutamine), 43rd amino acid (serine), 77th amino acid (asparagine), 78th amino acid (valine), 80th amino acid (serine) 83rd amino acid (leucine), 103rd amino acid (leucine) and 108th amino acid (alanine) from the N-terminus of the amino acid sequence of the TRA-8 light chain are replaced with proline, serine, serine, leucine, alanine, threonine, lysine, alanine, serine, leucine, proline, phenylalanine, valine and threonine respectively. The resulting sequence is designated LM5.

Expression plasmids carrying this type of humanized light chain amino acid sequences of the anti-human DR5 antibody TRA-8 (LM5 type) (SEQ ID No. 75 of the Sequence Listing) is constructed as follows.

1) Synthesis of primers for preparing the variable and constant regions of the light chain of humanized LM5 TRA-8

DNA coding for the LM5 polypeptide chain (SEQ ID No. 75 of the Sequence Listing), each of which is a fusion of the variable region of humanized anti-DR5 antibody TRA-8 light chain and the constant region of the human Ig light chain (κ chain), are respectively synthesized by using combinations of PCR.

Further to 7AL1P (SEQ ID No. 47), 7ALCN (SEQ ID No. 48), MOD1F1 (SEQ ID No. 78), MOD1R1 (SEQ ID No. 79), MOD1F22 (SEQ ID No. 80), MOD1R22 (SEQ ID No. 81), MOD1F3 (SEQ ID No. 82), MOD1R3 (SEQ ID No. 83), MOD1F42 (SEQ ID No. 84), MOD1R4 (SEQ ID No. 85), MOD1R52 (SEQ ID

No. 87), MOD1F7 (SEQ ID No. 90), and LR17 (SEQ ID No. 101), the following oligonucleotide primers are synthesized for PCR:

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

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

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

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

2) Construction of plasmid pCR3.1/LM5-3-42 (cloning of humanized TRA-8 light chain type LM5)

LM5-DNA fragment coding for the amino acid sequence as defined in SEQ ID No. 75 of the same is prepared by performing 2-step PCR, inserted into a plasmid vector and cloned in *E. coli*.

a) First step PCR

LM5-F51B-DNA fragment coding for a secretion signal sequence region with a Hind III restriction enzyme cleavage site added at the 5'-end, FRL_1, $CDRL_1$, FRL_2, $CDRL_2$, FRL_3, $CDRL_3$, FRL_4 and a portion of the constant region is prepared under the following conditions.

Composition of the reaction solution:

oligonucleotide primer MOD1F1, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1R1, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1F22, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1R22, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1F3, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1R3, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1F42, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1R4, 5 pmol

oligonucleotide primer MOD1F52, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1R52, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1F63, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1R63, 5 pmol
oligonucleotide primer MOD1F7, 50 pmol
oligonucleotide primer MOD1R72, 5 pmol
oligonucleotide primer 7AL1P, 50 pmol
oligonucleotide primer LR17, 50 pmol
dNTPs cocktail, 5 µl
10× PCR buffer, 5 µl
ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 µl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

LM5-F51C-DNA fragment coding for a portion of the constant region with an Eco R I restriction enzyme cleavage site added at the 3'-end is prepared under the following conditions. The template plasmids, pSRPDHH, is obtained by following the description in an European patent application EP 0 909 816 A1.

Composition of the reaction solution:

plasmid pSRPDHH DNA, 25 ng
oligonucleotide primer MOD1F7, 50 pmol
oligonucleotide primer 7ALCN, 50 pmol
dNTPs cocktail, 5 µl
10×PCR buffer, 5 µl
ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 µl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

The amplified DNA fragments after PCR are separated by 5% polyacrylamide gel electrophoresis. The gel after electrophoresis is stained with 1 µg/ml of ethidium bromide to detect the produced DNA under UV light. The respective DNA bands thus detected are excised with a razor blade.

b) Second step PCR

LM5-DNA in which above described LM5-F51B-DNA, and LM5-F51C-DNA fragments are fused is prepared under the following conditions.

Composition of the reaction solution:

Gel fragment of LM5-F51B-DNA prepared in the first step PCR,
Gel fragment of LM5-F51C-DNA prepared in the first step PCR,
oligonucleotide primer 7AL1P, 50 pmol
oligonucleotide primer 7ALCN, 50 pmol
dNTPs cocktail, 5.0 µl
10×PCR buffer, 5.0 µl
ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 µl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

The thus prepared LM5-DNA fragment is inserted into plasmid pCR3.1DNA using Eukaryotic TA cloning Kit (InVitrogen) following the manufacturer's protocol and introduced into the competent *E. Coli* TOP10F' contained in the kit. The nucleotide sequences of these DNAs encoding the light chain of humanized LM5 TRA-8 are confirmed by the dideoxy method (Sanger, F. S., et al., (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467) using DNA analyzer.

The resulting plasmids are designated pCR3.1/LM5-3-42 (the plasmid carrying cDNA encoding the light chain variable region of humanized LM5 TRA-8 and a human Ig light chain constant region).

The obtained plasmid pCR3.1/LM5-3-42 containing LM5-DNA fragment is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I.

One μg of cloning plasmid pHSG399 DNA is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I, and then dephosphorylated with CIP. The resulting dephosphorylated pHSG399 DNA and LM5-DNA fragment, that had been digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I, are ligated using DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Then, *E. coli* DH5α is transformed with the ligated DNA and spread onto LB agar medium containing 0.1 mM IPTG, 0.1% X-Gal and 50 μg/ml chloramphenicol (final concentrations). The white transformants obtained are cultured in liquid LB medium containing 50 μg/ml chloramphenicol, and plasmid DNA is extracted from the resulting culture according to the alkaline-SDS method. The extracted plasmid DNA is digested with Hind III and EcoR I, and then a clone carrying LM5-DNA fragment is selected by 1% agarose gel electrophoresis.

As a result of the above procedure, plasmid pHSG/M5-3-27 carrying a fusion fragment of the variable region of the humanized LM5 TRA-8 light chain and the constant region of human Igκ chain is obtained.

3) Construction of plasmid pSR/LM5-3-27-1 (expression plasmid for humanized LM5 TRA-8 light chain)

The obtained plasmid pHSG/M5-3-27 carrying a fusion fragment of the variable region of the humanized LM5 TRA-8 light chain and the constant region of human Igκ chain is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I.

One μg of cloning plasmid pSRPDHH DNA (European patent application EP 0 909 816 A1) is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I, and then dephosphorylated with CIP. The resulting dephosphorylated pSRPDHH DNA and HindIII-EcoRI DNA fragment obtained from pHSG/M5-3-27 are ligated using

DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Then, *E. coli* DH5α is transformed with the ligated DNA and spread onto LB agar. The transformants obtained are cultured in liquid LB medium containing 100 μg/ml ampicillin, and plasmid DNA is extracted from the resulting culture according to the alkaline-SDS method. The insertion and orientation of the desired DNA fragment in pSRPDHH vector is confirmed by DNA sequencing using a gene sequence analyzer (ABI Prism 3700 DNA Analyzer; Applied Biosystems).

The resulting expression plasmid carrying cDNA encoding the light chain of humanized LM5 TRA-8 is designated pSR/LM5-3-27-1.

(4.5) Construction of an Expression Vector for the Light Chain of the Humanized Antibody(chimera type)

The sequence shown in SEQ ID No. 76 of the Sequence Listing, the amino acid sequence of the light chain of chimera type TRA-8, is designated LM6.

Expression plasmids carrying this type of humanized light chain amino acid sequences of the anti-human DR5 antibody TRA-8 (LM6 type) (SEQ ID No. 75 of the Sequence Listing) is constructed as follows.

1) Synthesis of primers for preparing the variable and constant regions of the light chain of humanized LM6 TRA-8

DNA coding for the LM6 polypeptide chain (SEQ ID No. 75 of the Sequence Listing), each of which is a fusion of the variable region of mouse anti-DR5 antibody TRA-8 light chain (LM6 type) and the constant region of the human Ig light chain (κ chain), are respectively synthesized by using combinations of PCR.

Further to 7AL1P (SEQ ID No. 47) and 7ALCN (SEQ ID No. 48), the following oligonucleotide primers are synthesized for PCR:

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

5'- tgggttccag gctccactgg tgacattgtg atgacccagt ctcacaaatt c -3' (MVF11; SEQ ID No. 98);

5'- aagacagatg gtgcagccac agcccgtttg atttccagct tggtgcctc -3' (MVR11; SEQ ID No. 99); and

5'- aagctggaaa tcaaacgggc tgtggctgca ccatctgtct tcatc -3'(MCF11; SEQ ID No. 100).

2) Construction of plasmid pCR3.1/LM6-1-16 (cloning of humanized TRA-8 light chain type LM6)

LM6-DNA fragment coding for the amino acid sequence as defined in SEQ ID No. 75 of the same is prepared by performing 2-step PCR, inserted into a plasmid vector and cloned in *E. coli*.

a) First step PCR

LM6-F1-DNA fragment coding for a secretion signal sequence and a portion of FRL_1 region with a Hind III restriction enzyme cleavage site added at the 5'-end is prepared under the following conditions. The template plasmids, pHSGHM17 and pSRPDHH, are obtained by following the description in a European patent application EP 0 909 816 A1.

Composition of the reaction solution:

plasmid pHSGHM17 DNA, 25 ng
oligonucleotide primer 7AL1P, 50 pmol
oligonucleotide primer HKSPR13, 50 pmol
dNTPs cocktail, 5 µl
10× PCR buffer, 5 µl
ampliTaq DNA polymerase (PerkinElmer), 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 µl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

LM6-F2-DNA fragment coding for a portion of FRL_1, $CDRL_1$, FRL_2, $CDRL_2$, FRL_3, $CDRL_3$, FRL_4 and a portion of the constant region is prepared under the following conditions.

Composition of the reaction solution:

plasmid pL28 DNA, 25 ng
oligonucleotide primer MVF11, 50 pmol
oligonucleotide primer MVR12, 50 pmol
dNTPs cocktail, 5 µl
10× PCR buffer, 5 µl
ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 µl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

LM6-F3-DNA fragment coding for a portion of FRL_4 and the constant region with an EcoR I restriction enzyme cleavage site added at the 3'-end is prepared under the following conditions.

Composition of the reaction solution:

plasmid pSRPDHH DNA, 25 ng
oligonucleotide primer MCF11, 50 pmol
oligonucleotide primer 7ALCN, 50 pmol
dNTPs cocktail, 5 µl
10×PCR buffer, 5 µl
ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 µl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

The amplified DNA fragments after PCR are separated by 5% polyacrylamide gel electrophoresis. The gel after electrophoresis is stained with 1 μg/ml of ethidium bromide to detect the produced DNA under UV light. The respective DNA bands thus detected are excised with a razor blade.

b) Second step PCR

LM6-DNA in which above described LM6-F1-DNA, LM6-F2-DNA, and LM6-F3-DNA fragments are fused is prepared under the following conditions. Composition of the reaction solution:

Gel fragment of LM6-F1-DNA prepared in the first step PCR,
Gel fragment of LM6-F2-DNA prepared in the first step PCR,
Gel fragment of LM6-F3-DNA prepared in the first step PCR,
oligonucleotide primer 7AL1P, 50 pmol
oligonucleotide primer 7ALCN, 50 pmol
dNTPs cocktail, 5.0 μl
10×PCR buffer, 5.0 μl
ampliTaq DNA polymerase, 2.5 units

The reaction solution having the above composition is adjusted to a final volume of 50 μl by adding redistilled water and used in PCR.

PCR thermal conditions: Heating at 94°C for 2 minutes, after which a thermal cycle of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes, repeated 30 times, followed by heating at 72°C for 10 minutes.

The thus prepared LM6-DNA fragment is inserted into plasmid pCR3.1DNA using Bukaryotic TA cloning Kit (Invitrogen) following the manufacturer's protocol and introduced into the competent *E.Coli* TOP10F' contained in the kit. The nucleotide sequences of these DNAs encoding the light chain of humanized TRA-8 are confirmed by the dideoxy method using a DNA analyzer.

The resulting plasmids are designated pCR3.1/LM6-1-16 (the plasmid carrying cDNA encoding the light chain variable region of mouse TRA-8 and a human Ig light chain constant region).

The obtained plasmid pCR3.1/LM6-1-16 containing LM6-DNA fragment is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I.

One μg of cloning plasmid pHSG399 DNA is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I, and then dephosphorylated with CIP. The resulting dephosphorylated pHSG399 DNA and LM6-DNA fragment, that had been digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I, are ligated using DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Then, *E. coli* DH5α is transformed with the ligated DNA and spread onto LB agar medium containing 0.1 mM IPTG, 0.1% X-Gal and 50 μg/ml chloramphenicol (final concentrations). The white transformants obtained are cultured in liquid LB medium containing 50 μg/ml chloramphenicol, and plasmid DNA is extracted from the resulting culture according to the alkaline-SDS method. The extracted plasmid DNA is digested with Hind III and EcoR I, and then a clone carrying LM6-DNA fragment is selected by 1% agarose gel electrophoresis.

As a result of the above procedure, plasmid pHSG/M6-1-4-1 carrying a fusion fragment of the variable region of the mouse TRA-8 light chain and the constant region of human Igκ chain is obtained. The transformant *E coli* strain harboring these plasmid, designated as *E. coli* DH5α/pHSG/M6-1-4-1 was deposited with International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japan on April 20, 2001, in accordance with the Budapest Treaty for the Deposit of Microorganisms, and was accorded the accession number FERM BP-7566.

3) Construction of plasmid pSR/LM6-1-4-6(expression plasmid for chimera type LM6 TRA-8 light chain)

The obtained plasmid pHSG/LM6-1-4-1 carrying a fusion fragment of the variable region of the mouse TRA-8 light chain and the constant region of human Igκ chain is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I.

One μg of cloning plasmid pSRPDHH DNA is digested with the restriction enzymes Hind III and EcoR I, and then dephosphorylated with CIP. The resulting dephosphorylated pSRPDHH DNA and HindIII-EcoRI DNA fragment obtained from pHSG/LM6-1-4-1 are ligated using DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Then, *E. coli* DH5α is transformed with the ligated DNA and spread onto LB agar. The transformants obtained are cultured in liquid LB medium containing 100 μg/ml ampicillin, and plasmid DNA is extracted from the resulting culture according to the alkaline-SDS method. The insertion and orientation of the desired DNA fragment in the vector is confirmed by DNA sequencing using a gene sequence analyzer.

The resulting expression plasmid carrying cDNA encoding the light chain of TRA-8 (chimera type) is designated pSR/LM6-1-4-6.

(5) Production of several types-Humanized or chimeric TRA-8 Antibody

Transfection of COS-7 cells is conducted by FUGENE6 transfection reagent methods (Boehringer Mannheim Biochemica) according to the instruction manual provided with the kit.

COS-7 cells (American Type Culture Collection No. CRL-1651) are grown to semi-confluent (3×10^6 cells/dish) in a culture dish (culture area: 57 cm^2; Sumitomo Bakelite) containing Dulbecco's Modified Eagle medium (hereinafter referred to as "D-MEM"; Gibco BRL) supplemented with 10% fetal calf serum (hereinafter abbreviated as "FCS"; Moregate).

In the meantime, 10 μg/dish (total 5 dishes) of the humanized DR5 heavy chain expression plasmid DNA (pHA15-1) and 10 μg/dish of the humanized DR5 light chain expression plasmid DNA prepared by the alkaline-SDS method and

cesium chloride density gradient centrifugation are mixed, and then precipitated with ethanol, followed by suspending in 5 µl/dish of dH_2O.

After 15 µl/dish of FUGENE6 Transfection regent is mixed with 180 µl/dish D-MEM without FCS, this FUGENE solution (185 µl/dish) is mixed with 5 µl/dish DNA solution containing 10 µg/dish of the humanized DR5 heavy chain expression plasmid DNA and 10 µg/dish of the humanized DR5 light chain expression plasmid DNA. After 15 minutes incubation at room temperature, the obtained plasmid suspension (200 µl) is added to the previously prepared COS-7 plates. After incubating in 5% CO_2 at 37°C for 24 hours, the culture medium is changed with D-MEM without FCS. After incubating in 5% CO_2 at 37°C for 72 hours, the culture supernatant is recovered to purify the expression products in the supernatant fluids. By the method as described above, COS-7 cells are transfected with each of the following plasmid combinations:

(A): cotransfection of pHA15-1 and pSR/LM1-2 (H1L1)

(B): cotransfection of pHB14-1 and pSR/M2-1 (H2L2)

(C): cotransfection of pHB14-1 and pSR/LM3-3-44-10 (H2L3)

(D): cotransfection of pHB14-1 and pSR/LM4-5-3-3 (H2L4)

(E): cotransfection of pHC10-3 and pSR/M2-1 (H3L2)

(F): cotransfection of pHC10-3 and pSR/LM3-3-44-10 (H3L3)

(G): cotransfection of pHC10-3 and pSR/LM4-5-3-3 (H3L4)

(H): cotransfection of pHD21-1 and pSR/LM5-3-27-1 (H4L5)

(I): cotransfection of pM11-1 and pSR/LM6-1-4-6 (Chimera)

The culture is then centrifuged (3,500 r.p.m., 15 minutes) and collected the supernatant. The supernatant is filtrated with 0.45 µm filter (ADVANTEC TOYO DISMIC-25cs, Cat # 25CS045 AS). The purification of IgG from the filtrates are achieved using Protein G-POROS affinity chromatography (Applied Biosystems) under the following conditions:

HPLC system: BioCAD 700E (Applied Biosystems)

column: ProteinG-ID sensor cartridge

(column size: 2.1 mmID x 30 mm LD, bed volume: 0.1 ml; Applied Biosystems)
elution buffer: 0.1 M Glycine-HCl (pH 2.5)
neutralization buffer: 1 M Tris-HCl (pH 8.5)
detection: 280 nm
flow rate: 1 ml/min
fraction size: 0.5 ml/0.5 min
fraction tube: 1.5 ml polypropylene microtube
temperature: 4°C

After all the filtrates are applied to column, 50 ml of PBS (Sigma, Cat # 1000-3) is used to wash column. When the elution buffer is applied, fraction collector started. Each fraction microtube previously contained 55 µl of 1 M NaCl, 110 µl of neutralization buffer and 74 µl of 2 mg/ml bovine serum albumin (Sigma, Cat # A-7030) in PBS. The fractions from No. 7 through No. 8 are collected.

Verification of the expression of the humanized antibodies and quantitative assay of the expression products in the culture supernatant fluids prepared is performed by ELISA with an antibody against anti-human IgG.

To each well of a 96-well plate (MaxiSorp, Nunc), 100 µl of goat anti-human IgG Fc specific polyclonal antibody (Kappel) dissolved at the final concentration of 0.5 µg/ml in adsorption buffer (0.05 M sodium hydrogencarbonate, 0.02% sodium azide, pH 9.6) is added and the plate is incubated at 37°C for 2 hours to cause adsorption of the antibody. Then, the plate is washed with 350 µl of PBS-T five times. To the wells after washing, the culture supernatant diluted with D-MEM containing 10% FCS is added and incubated at 37°C for 2 hours. After washing again with PBS-T, 100 µl of alkaline phosphatase-labeled goat anti-human IgG Fc specific polyclonal antibody (Jackson Immuno Research Lab.) diluted 10,000-fold with PBS-T is added to each well and incubated at 37°C for 2 hours. After washing again with PBS-T, a substrate solution of p-nitrophenyl phosphate obtained from Alkaline Phosphatase Substrate kit (Bio Rad) is added according to the instruction manual provided with the kit. After incubating at 37°C for 0.5 to 1 hour, the

absorbance at 405 nm is measured. In the present experiments, human plasma immunoglobulin G subclass 1 (IgG1) (Biopure AG) diluted with D-MEM containing 10% FCS to certain concentrations is used as concentration reference samples of the humanized DR5 antibodies contained in the culture supernatant fluids.

As a result, the expression and purified products in the culture supernatant are detected specifically with the anti-human IgG antibody. The final concentration of human IgG antibody is 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) and 18.3 μg/ml (chimera), respectively.

(6) Apoptosis-inducing activity of several types Humanized Antibody or Chimeric Antibody

Jurkat cells (ATCC No. TIB-152), are used to examine the apoptosis-inducing activity of the purified humanized TRA-8 antibody.

Jurkat cells cultured in RPMI1640 medium with 10% FCS (Gibco BRL) at 37°C for 3 days in the presence of 5% CO_2 are dispensed into each well of a 96-well microplate (Sumitomo Bakelite) at 50 μl per well. The humanized TRA-8 prepared in this Example 26 are adjusted to have the concentration of the final product of interest of 100 ng/ml with RPMI1640 medium containing 10% FCS by estimating their concentrations in the fluids according to the method described in Example 26. Each of the solutions of the expression products thus adjusted to 100 ng/ml is used to produce serial dilutions by repeating serial 2-fold dilution with RPMI1640 containing 10% FCS. Each of the diluted humanized TRA-8 solution (H1L1, H2L2, H2L3, H2L4, H3L3, H3L4 or H4L5) is added to each well at 50 μl per well. After reacting at 37°C for 12 hours, 50 μl of 25 μM PMS containing 1 mg/ml XTT is added (final concentrations of 250 μg/ml for XTT and 5 μM for PMS). After incubating for 3 hours, the absorbance at 450 nm of each well is measured to calculate the cell viability by using the reduction ability of mitochondria as the index.

The viability of the cells in each well is calculated according to the following formula:

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

wherein "a" is the measurement of a test well, "b" is the measurement of a well with no cells, and "c" is the measurement of a well with no antibody added.

As a result, the tested humanized antibodies are demonstrated to induce apoptosis in cells of T lymphoma cell line expressing human DR5 antigen.

Furthermore, the apoptosis-inducing activity of humanized TRA-8 to PC-3 is examined by adding taxol according to the method described in Example 25.

Human prostate cancer cell line PC-3 (ATCC No. CRL-1435) is obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC) and maintained in F-12K Nutrient Mixture (21127-022, Gibco BRL) containing 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone), 1% L-Glutamine-200 mM (25030-149, Gibco BRL) and 0.5% Penicillin Streptomycin Solution (P-7539, Sigma). RPMI1640 medium (MED-008, IWAKI) supplemented with 10% FBS and 0.5% Penicillin Streptomycin Solution is used in the following experiment. Exponentially growing PC-3 cells are collected by trypsinization and washed twice with fresh medium. The cells are then counted, resuspended in fresh medium at a density of 5×10^4 cells/ml and distributed in triplicate into flat-bottomed 96 well plates (3598, Corning-Coster) in a total volume of 100 µl/well one day before the start of the experiment. A representative anti-cancer drug, Paclitaxel (169-18611, Wako) dissolved in dimethylsulfoxide (10 mg/ml) is diluted in fresh medium and then added to the 96-well plates containing the cells at 50 µl/well. The final concentrations of dimethylsulfoxide are less than 0.1%. After incubation for 24 hr at 37°C in 5% CO_2 atmosphere, humanized TRA-8 antibody (H1L1, H2L2, H2L3, H2L4, H3L2, H3L3, H3L4 or H4L5) diluted in fresh medium is added to the wells. After incubation for a further 24 hr, 50 µl of Minimum Essential Medium (11095-098, Gibco BRL) containing 1 mg/ml of XTT and 25 mM of PMS is added to the wells and the plates are incubated for 6 hr.

OD450 is then measured by ARVO HTS 1420 Multilabel Counter (Wallac Berthold) and the cell viability is calculated as follows.

Cell viability (%) = (OD450 for the well containing cells treated with Taxol and humanized TRA-8 (agent(s)) - OD450 for the well containing neither cells nor agent) x 100 / (OD450 for the well containing cells with no agent –OD450 for the well containing neither cells nor agent)

As a result, the tested humanized antibodies are demonstrated to induce apoptosis in human prostate cancer cells expressing human DR5 antigen.

Example 27. Production of DR4 Antibody

A fusion protein containing the extracellular domain of human DR4 (a.a. 1-236) and the Fc portion of human IgG1 was expressed in Cos-7 cells transfected with a recombinant adenoviral vector. The fusion protein was purified by protein A affinity column. Balb/c mice were immunized with the purified fusion protein as described above. One hybridoma clone, 2E12 (IgG1, κ), with specific binding to DR4 and the capability of inducing apoptosis of Ramos human B lymphoma cells was subcloned three times. The binding specificity of 2E12 was determined by ELISA and Western blot analysis using human DR5, DcR1 and DcR2 and IgG1 fusion protein as control antigens. The binding of 2E12 to cell surface DR4 was determined by flow cytometry analysis of Cos-7 cells transfected with the full-length cDNA encoding human DR4. Apoptosis-inducing activity was determined by incubating Ramos cells with 1μg/ml 2E12 in the presence of goat anti-mouse IgG1. Cell viability was determined by ATPLite assay as described above.

Example 28. Characterization of DR4 Antibody

DR4 monoclonal antibody (2E12) is specific for human DR4 as it did not bind to other TRAIL receptors such as DR5, DcR1 and DcR2 in ELISA (Figure 19a). 2E12 recognized cell surface DR4 as demonstrated by flow cytometry analysis of DR4 transfected Cos-7 cells (Figure 19b). 2E12 was able to induce apoptosis of Ramos lymphoma cells in the presence of second antibody crosslinking in a dose-dependent fashion (Figure 19c). In vitro treatment of Ramos cells with 2E12

resulted in a time-dependent activation of caspase 8, 9 and 3, and cleavage of PARP (Figure 19d). These results indicate that 2E12 is an agonistic anti-DR4 antibody, which induces apoptosis in a caspase-dependent fashion.

Using anti-DR4 (2E12), followed by PE-conjugated goat anti-mouse IgG1 antibody and flow cytometry, DR4 antibody was shown to bind to cells of a fibrosarcoma cell line (Hs 913T) and several breast cancer cell lines (2LMP. MDA-MB231, and MDA-MB 453), but showed little to no binding to a normal human skin fibroblast cell line (Malme-3).

Example 29. Tumoricidal activity of DR4 antibodies

The tumoricidal activity of 2E12 was tested using breast cancer tumor models. Nude mice were inoculated *s.c.* with the human breast cancer cell line, 2LMP. Treatment with *i.p.* doses of 200 μg of 2E12 occurred on days 7, 10, 14, 17, 21, and 24 after tumor cell injection. Animals received *i.v.* adriamycin (doxorubicin) (6mg/kg) on days 8, 12, and 16. Treatment with 2E12 and adriamycin (Figure 20) produced greater tumor growth inhibition than either 2E12 or adriamycin alone.

The tumoricidal activity of TRA-8 in combination with 2E12 was tested using the same breast cancer tumor models. Treatment with *i.p.* doses of 200 μg of TRA-8 and 2E12 occurred on days 7, 10, 14, 17, 21, and 24 after tumor cell injection. Animals received *i.v.* adriamycin (6mg/kg) on days 8, 12, and 16. Treatment with TRA-8 plus 2E12, or TRA-8 plus 2E12 and adriamycin produced 88% and100% complete tumor regression, respectively. (Figure 21.)

Example 30. Tumoricidal activity of DR4/DR5 antibodies in combination with other therapies

(1) Cell lines and Reagents

The 2LMP subclone of the human breast cancer cell line MDA-MB-231, the LCC6 subclone of MDA-MB-435, and the DY36T2 subclone of MDA-MB-361 were obtained from Dr. Marc Lipmann (Georgetown University, Washington, D.C.) and maintained in improved MEM supplemented with 10% FBS (Hyclone, Logan,

UT). The MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-468, BT-474, SK-BR-3, and ZR-75-1 human breast cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). MDA-MB-231, MDA-MB-453, and MDA-MB-468 cells were grown in DMEM supplemented with MEM vitamins, MEM nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate and 10% FBS. BT-474 cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10 µg/ml insulin, 4.5 g/l glucose, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate and 10% FBS. SK-BR-3 cells were grown in McCoy's medium with 15% FBS. ZR-75-1 cells were grown in Ham's F12K medium with 20% FBS. All cell lines were maintained in antibiotic-free medium at 37°C in a 5% CO2 atmosphere and routinely screened for mycoplasma contamination

Purified TRA-8 (IgG1) mAb was produced at UAB and also provided by Sankyo Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse IgG1 and isotype-specific IgG1 control antibody were obtained from Southern Biotechnology Associates (Birmingham, AL). Adriamycin and paclitaxel were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) and were prepared as 10 mM stock solutions in distilled H2O or DMSO, respectively. For animal studies, the clinical formulation of paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Co., Princeton, NJ) was obtained from the University of Alabama at Birmingham Hospital Pharmacy (Birmingham, AL). This preparation was diluted 1:5 in PBS immediately before use.

(2) Indirect Immunofluorescence and Flow Cytometry Analysis of DR5 Expression

Cells in exponential growth phase were washed once with Dulbecco's PBS (Ca2+ and Mg2+ deficient) and harvested with 4 mM EDTA/0.5% KCl at 37°C. Cells were collected by centrifugation at 4°C for 5 min at 1,000 rpm, washed once and resuspended in PBS containing 1% BSA and 0.01% sodium azide (FACS buffer) at 4°C. Cells were incubated with 10 µg/ml of purified TRA-8 or an isotype-specific IgG1 control antibody for 60 min at 4°C, washed once with buffer, then

incubated with 10 μg/ml of PE-conjugated goat anti-mouse IgG1 for 20 min at 4°C. After antibody staining, cells were washed once with FACS buffer and fixed in 1% paraformaldehyde for 15 min on ice. Samples were analyzed on a Becton Dickinson FACScan (San Jose, CA) and data was analyzed using CellQuest software.

(3) Cell Viability Assays Using ATPLite

Cells were trypsinized and resuspended in complete culture medium. One thousand cells per well were plated in optically clear 96-well black plates (Costar #3904, Corning, NY) and incubated overnight at 37°C before initiating treatments. Drugs and antibody were diluted in culture medium immediately before use, and the final concentration of DMSO was always ≤ 0.001%. Cell viability was assessed after 24 h exposure to TRA-8 alone. For combination treatments with cytotoxic drugs, cells were pretreated with the drug for 24 h before adding antibody, and incubated for an additional 24 h before assessing cell viability by measurement of cellular ATP levels using the ATPLite luminescence based assay (Packard Instruments, Meriden, CT). The manufacturer's recommended protocol was followed with the exception that all reaction volumes (culture medium and reagents) were reduced by one-half. All samples were assayed in triplicate and are reported as the mean ± SB from a minimum of 3 independent experiments.

(4) TRA-8 Therapy Studies Alone or in Combination with Chemotherapy or Radiation in Athymic Nude Mice Bearing Breast Cancer Xenografts

Athymic nude mice were injected s.c. with 3 x 107 2LMP cells. At 7 days after tumor cell injection, 200 or 600 μg (10 or 30 mg/kg) TRA-8 was administered i.p. followed by five additional injections on days 10, 14, 17, 21, and 24. The growth of tumors was monitored over time. In subsequent studies, animals bearing 2LMP s.c. tumors were injected i.p. with 200 μg of TRA-8 on days 7, 10, 14, 17, 21, and 24 alone or in combination with adriamycin (6 mg/kg i.v., days 8, 12, and 16) or paclitaxel (20 mg/kg i.p., on days 8, 12, 16, 20, and 24). Tumor size and regression rates were determined. In addition, a study was carried out with TRA-8 and

adriamycin using the same regimen described above in combination with 3 Gy ^{60}Co irradiation of 2LMP xenografts on days 9 and 17.

(5) Analysis of Apoptosis in Xenografts

Athymic nude mice injected s.c. with 3 x 10^7 2LMP cells on day 0 received 100 μg TRA-8 i.p. on days 7 and 10. Groups of 2 mice each received adriamycin (3 mg/kg) on days 8 and 11, paclitaxel (10 mg/kg) on days 8 and 11, or the combination of TRA-8 and adriamycin or paclitaxel with the same dose and schedule. One group of mice was untreated. The xenografts were dissected for the study of apoptosis on day 14 after tumor cell injection. The reason for the substantial reduction in treatment intensity compared to our standard treatment protocol was to allow adequate tumor tissue for analysis on day 14. Tunel assay for apoptosis in tumor xenografts was performed as follows. Five-micron paraffin sections of tissue were mounted on Superfrost/Plus slides and heated at 58°C for 1 h. Tissue sections were deparaffinized in three changes of xylene and rehydrated with one change of absolute ethanol, 95% ethanol, and 70% ethanol, each in 5-min increments. Then, the sections were placed in Tris-buffered saline (0.5M Tris base, 0.15 M NaCl, 0.0002% Triton X-100, pH 7.6). Apoptotic nuclei were detected using an Apop Tag Peroxidase kit (Intergen, Purchase, NY). Proteinase K (20 μg/ml in distilled deionized H_2O) was added to the tissue specimens and incubated at room temperature for 15 min. Endogenous peroxidases were quenched with an aqueous solution of 3% hydrogen peroxide for 5 min. Sections were treated with an equilibration buffer for 30 min and then incubated with the TdT/enzyme (diluted in labeling reaction mix) for 1 h at 37°C using parafilm covers. During this incubation, the TdT enzyme binds the 3'-OH ends of DNA fragments and catalyzes the addition of digoxigenin-labeled and unlabeled deoxynucleotides. Negative controls were incubated with distilled H_2O (diluted in labeling reaction mix) instead of the TdT enzyme. A stop buffer was added for 10 min at room temperature to terminate the labeling reaction. An anti-digoxigenin conjugate was added to each slide for 30 min. The chromagen 3,3' DAB was used to visualize the labeled 3' OH end of DNA

fragments. The slides were then rinsed in deionized water and lightly counterstained with hematoxylin, dehydrated using graded alcohols and xylene and coverlsipped using Permount. Approximately 10 random fields were evaluated for percentage of Tunel stained and percentage of intensely stained apoptotic bodies throughout the tissue.

(6) Statistical Analysis

(A) Analysis of TRA-8 Interaction with Drug Cytotoxicity In Vitro

The cytotoxicity data were evaluated to assess whether the combination cytotoxic effects were additive, less than additive (antagonistic), or greater than additive (synergistic). The dose response relationships for the agents alone and in combination were modeled using a second-order response surface model with linear, quadratic and interaction terms for each of the 9 cell lines (Montgomery, D.C. Design and Analysis of Experiments, New York:Wiley, 2001), as recommended by Gennings (On Testing for Drug/Chemical Interactions: Definitions and Inference, pp.457-468, 2000). A significant interaction term was classed as either synergistic or antagonistic depending on whether the interaction term was negative with more than additive cytotoxicity, or positive with less than additive cytotoxicity. If the interaction term was not significant, then the relationship between TRA-8 and adriamycin or TRA-8 and paclitaxel would be considered additive, provided the additive terms were significant.

(B) Analysis of TRA-8, Chemotherapy, Radiation and Combination Therapy of Individual Animal Experiments

Data from 6 independent experiments were analyzed by individual experiment. Treatment combinations were compared with respect to in vivo anti-tumor efficacy, i.e., inhibition of tumor growth, which was measured as three endpoints; extension of tumor doubling times, percentage of tumor regressions, and growth rates over time. The actual number of days at which the tumor doubled in surface area (product of two diameters) relative to baseline on day 7 after tumor cell

injection was used in the doubling time analysis. The nonparametric Kruskal-Wallis test was used for median tumor doubling time comparisons between treatments. Fisher's exact test was used to compare the proportions of tumor regressions and relapse-free regressions across treatment groups. To determine if any combination therapy produced significant synergistic inhibition of tumor growth, i.e., more than additive, the growth curves from the serial area measurements were compared using a linear mixed model approach over the first 3 weeks after start of therapy (Lindsey, J.K. Models for Repeated Measurements, pp. 100-142, Oxford, 1993). To test for synergistic effects of the combination therapies, an interaction term was included in the model. If the interaction term was significant and the effect was inhibition of growth at a rate greater than additive then the interaction was considered synergistic.

(C) Aggregate Analysis of Therapy Effects

A total of 166 animals, 10 treatment groups, and 6 independent experiments were included in the aggregate analysis. Treatment combinations were compared with respect to in vivo anti-tumor efficacy. The median tumor doubling times were analyzed using the Kruskal-Wallis test and Fisher's exact test was used to compare the proportions of tumor regressions and relapse-free regressions across treatment groups.

All statistical analyses were conducted using SAS® (Sas/Stat User's Guide, SAS OnlineDoc, Version 8, Cary NC: SAS Institute Inc., 1999).

(6) DR5 Expression and TRA-8 Induced Cytotoxicity in Breast Cancer Cell Lines

As illustrated in Figure 22A, all nine breast cancer cell lines were DR5 positive with varying degrees of expression from strongly positive (LCC6 and MDA-MB-453) to weakly positive (MDA-MB-468 and SK-BR-3). Figure 22B illustrates the TRA-8 induced cytotoxicity of the nine cell lines. Four cell lines were sensitive to TRA-8 induced cytotoxicity with IC_{50} concentrations of 17 to 299 ng/ml (LCC6, 2LMP, MDA-MB-231, MDA-MB-468), while others were quite resistant (DY36T2, BT-474, MDA-MB-453). There was not a good correlation of DR5

expression and degree of TRA-8 induced cytotoxicity as illustrated by cell lines MDA-MB-453 and MDA-MB-468.

TRA-8 effects on chemotherapy-induced cytotoxicity were then examined with adriamycin (Figure 23A) and paclitaxel (Figure 23B). An analysis to test for interaction between antibody and drug effects is summarized in Table 5. There were no significant synergistic interactions between TRA-8 and paclitaxel, with most of the interactions being additive. Four of nine cell lines fulfilled criteria for a synergistic interaction between TRA-8 and adriamycin. The cell line 2LMP demonstrated good sensitivity to TRA-8, as well as sensitivity to either adriamycin or paclitaxel. This cell line was chosen to explore in vivo efficacy of antibody and/or drugs.

Table 5. *In Vitro* Interaction Effects for Combination Treatments

	TRA-8 + Adriamycin		TRA-8 + Paclitaxel	
Cell Line	Interaction	p-value[a]	Interaction	p-value[a]
LCC6	Synergistic	<0.001	Additive	0.624
MDA-MB-453	Synergistic	<0.001	No response[c]	0.615
2LMP	Additive	0.153	Additive	0.937
MDA-MB-231	Additive	0.663	Additive	0.064
BT-474	Synergistic	<0.001	ND[b]	0.992
ZR-75-1	Synergistic	0.013	Additive	0.172
DY36T2	ND[b]	0.808	ND[b]	0.798
MDA-MB-468	Additive	0.184	Additive	0.724
SK-BR-3	Additive	0.361	No response[c]	0.871

[a] p-value refers to the significance of the synergistic interaction term. If both TRA-8 and drug effects were significant and the interaction term was significant, then the combination effects were considered synergistic. If the interaction p-value is not < 0.05 then the combination effects were considered additive.

[b] Not determined because the TRA-8 effect was not significant, but the adriamycin/paclitaxel effect was significant.

[c] There was no significant dose response for either agent.

(7) In Vivo Anti-Tumor Effects of TRA-8 Alone or in Combination with Chemotherapy and/or Radiation

TRA-8 at doses of 200 μg and 600 μg twice a week for 6 doses produced a similar inhibition of tumor growth for well-established 2LMP s.c. tumors (Figure 24). In three additional independent experiments, the 200 μg dose/schedule produced statistically significant inhibition of tumor growth ($p<0.004$, Kruskal-Wallis test on tumor doubling times) compared to untreated controls and this dose and schedule was selected for further studies. Figure 25 illustrates the effects of TRA-8, adriamycin, or a combination of TRA-8 and adriamycin on anti-tumor efficacy. As compared to untreated controls, therapy with TRA-8 alone or TRA-8 plus adriamycin produced significant inhibition of tumor growth ($p=0.002$ Kruskal-Wallis test), while adriamycin did not differ from controls. The combination of TRA-8 plus adriamycin produced greater growth inhibition than either agent alone ($p=0.002$), as well as significantly more complete regressions of tumor (four) than either agent alone where no complete regressions were seen ($p<0.001$, Fisher exact test). In vivo TRA-8 and adriamycin synergism was evaluated using an early growth curve analysis. The interaction term was significant ($p<0.001$) and synergistic. The synergistic interaction was corroborated in a second independent experiment.

The effects of TRA-8 and paclitaxel were studied in this same model with similar observations (Figure 26). As compared to untreated controls, TRA-8 and the TRA-8 plus paclitaxel produced significant inhibition of tumor growth ($p<0.001$, Kruskal-Wallis test). Tumor growth in animals treated with TRA-8 plus paclitaxel was significantly different than paclitaxel alone ($p=0.008$) and produced 3/8 complete regressions as compared to none for either agent alone. Analysis of the early tumor growth curves demonstrated that synergistic effect was nearly significant ($p=0.063$) while additive effects were significant ($p<0.001$).

Finally, the effects of TRA-8, adriamycin, and ^{60}Co radiation were analyzed as single agents and in various combinations as illustrated in Figure 27. There were significant differences overall with respect to tumor doubling times ($p<0.001$) and multiple comparisons indicated that the triple therapy with TRA-8, adriamycin, and ^{60}Co produced tumor growth inhibition that was significantly different than all other treated groups, while both dual therapy groups (adriamycin plus TRA-8 or ^{60}Co plus TRA-8) were different than either single agent group ($p < 0.001$). The ^{60}Co animals treated with radiation alone did not differ from untreated controls ($p=0.926$). All two-way treatment combinations had significant synergistic effects ($p<0.001$). Complete regressions were seen in 6/8 animals receiving triple therapy and 4 animals did not have tumor recurrence over 180 days of follow-up.

(8) Aggregate Analysis of Therapy Effects

The in vivo anti-tumor studies were comprised of 166 animals, and the tumor doubling times and frequency of complete tumor regression for all animals in each treatment group were analyzed (Table 6). ANOVA analysis for mean tumor doubling times indicated significant differences among treatment groups ($p<0.001$), with multiple comparisons yielding that TRA-8 + paclitaxel, TRA-8 + adriamycin, and TRA-8 + adriamycin + ^{60}Co had significantly longer mean tumor doubling times than any treatment group lacking TRA-8. The addition of TRA-8 to any treatment modality produced a longer tumor doubling time than that modality alone. Similarly, Kruskal-Wallis test on median time to tumor doubling yielded that the

medians were significantly different over-all ($p<0.001$). Pair-wise comparisons using Wilcoxin signed-rank test yielded similar patterns for median time to tumor doubling as the ANOVA multiple comparisons. This analysis underestimates the growth inhibition produced by the most effective treatments in that groups that did not reach a doubling of tumor by the end of the experiment were assigned the experiment termination day. Table 6 also provides the frequency of complete regression of tumor and the frequency of persistence of that regression to the end of the experiment. There were no complete regressions of tumor seen in animals treated with either chemotherapy regimen or radiation attesting to the well-established tumor growth and tumor aggressiveness. From Fisher's exact test, there were significant differences in the frequency of tumor complete regressions between treatment groups ($p<0.001$). Thirty of 166 animals achieved complete regression, and 28 of these received TRA-8 alone or in combination with other modalities. Complete regression occurred in 1/42 control animals: 1/54 animals receiving chemotherapy, radiation, or a combination; and 28/68 of TRA-8 alone or TRA-8 combination regimens. The TRA-8 treated groups had a significantly ($p<0.001$) greater frequency of complete regression. Similarly, 14/68 animals receiving TRA-8 or TRA-8 combinations did not have tumor re-growth compared to 1/42 controls and 0/52 animals treated with chemotherapy and/or radiation. The relapse-free regressions had observation periods of 99 to 171 days (146 ± 24 days).

Table 2. Aggregate Results of Doubling Time and Complete Regression of 2LMP Tumors

			Complete Regressions		
Treatment	# of Animals	Tumor Doubling Time (days) (mean/median)	Total (%)	No relapse (%)	Mean Obser Period (d
Untreated Controls	44 (42)[a]	12/8	1 (2%)	1 (2%)	177
^{60}Co	8 (7)	14/10	0	0	186
Adriamycin	31 (28)	17/18	0	0	197
Paclitaxel	7 (5)	25/20	0	0	-

Adriamycin + ^{60}Co	8 (8)	39/36	1 (13%)	0	197
TRA-8	30 (26)	47/23	6 (20%)	5 (17%)	159
TRA-8 + ^{60}Co	8 (8)	65/50	3 (38%)	1 (13%)	186
TRA-8 + Paclitaxel	8 (8)	71/62	3 (38%)	1 (13%)	148
TRA-8 + Adriamycin	14 (12)	81/64	10 (71%)	3 (21%)	185
TRA-8 + Adriamycin + ^{60}Co	8 (6)	>140/179	6 (75%)	4 (50%)	192

[a] The numbers in parentheses are the number of uncensored animals.

(9) Apoptosis in Treated Tumors

The induction of apoptosis in 2LMP xenografts following treatment with TRA-8, adriamycin, paclitaxel, TRA-8 + adriamycin, and TRA-8 + paclitaxel was assessed using the TUNEL technique. In untreated animals, tumors had 4% stained cells (1% intense), while treatment with adriamycin or paclitaxel had 8% (6% intense) and 7% (2% intense) stained cells. Animals treated with TRA-8 alone had striking apoptosis with 25% (15% intense) stained cells. TRA-8 plus adriamycin had 28% (22% intense) and TRA-8 plus paclitaxel had 26% (12% intense) stained cells.

Any patents or publications mentioned in the specification are indicative of the level of those skilled in the art to which the invention pertains. These patents and publications are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

The present invention is not limited in scope by the above-referenced deposit or the embodiments disclosed in the examples which are intended as illustrations of a few aspects of the invention and any embodiments which are functionally equivalent are within the scope of this invention. Various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art and are intended to fall within the scope of the appended claims.

References

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, 13th edition, volume 2, 979-992.

26. Fujisawa K, Asahara H, Okamoto K, Aono H, Hasumuma 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. Miiler-Ladner U, Gay RE, and Gay S, 1997 Arthritis and allied conditions, a textbook of rheumatology, 13th edition, Volume 1, 243-254.

What is claimed is:

1. A method of selectively inducing apoptosis in target cells expressing DR5, comprising the steps of (a) contacting the target cells with a therapeutic quantity of an antibody that specifically binds a TRAIL receptor DR5, wherein said antibody, in its soluble form, has *in vivo* and *in vitro* apoptosis-inducing activity in target cells expressing DR5 and (b) contacting the target cells with a therapeutic quantity of one or more therapeutic agents.
2. The method of claim 1, wherein at least one contacting step is performed *in vivo*.
3. The method of claim 1, wherein a least one contacting step is performed *in vitro*.
4. The method of claim 1, wherein the therapeutic agent or agents are chemotherapeutic agents.
5. The method of claim 4, wherein the chemotherapeutic agent or agents are selected from the group consisting of bleomycin, carboplatin, chlorambucil, cisplatin, colchicine, cyclophosphamide, daunorubicin, actinomycin, diethylstilbestrol, doxorubicin, etoposide, 5-fluorouracil, floxuridine, melphalan, methotrexate, mitomycin, 6-mercaptopurine, teniposide, 6-thioguanine, vincristine and vinblastine.
6. The method of claim 4, wherein the chemotherapeutic agent or agents are selected from the group consisting of leflunomide, dactinomycin, tamoxifen, interferon α-2b, glutamic acid, plicamycin, mercaptopurine, 6-thioguaninine, carmustine, BCNU, lomustine, CCNU, cytosine araboside, estramustine, hydroxyurea, procarbazine, busulfan, medroxyprogesterone, estramustine phosphate sodium, ethinyl estradiol, estradiol, megestrol acetate, methyltestosterone, diethylstilbestrol diphosphate, chlorotrianisene, testolactone, mephalen, chorambucil, mechlorethamine, thiotepa,

bethamethasone sodium phosphate, dicarbazine, asparaginase, mitotane, vincristine sulfate, and vinblastine sulfate.

7. The method of claim 4, wherein the chemotherapeutic agents are cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and predisone or a subset thereof.

8. The method of claim 7, further comprising administering rituximab.

9. The method of claim 1 wherein the therapeutic agent or agents are members of the TNF family.

10. The method of claim 9, wherein the member or members of the TNF family are CD40 ligands, or fragments or derivatives thereof.

11. The method of claim 9, wherein the member or members of the TNF family are Fas ligands, or a fragments or derivatives thereof.

12. The method of claim 1, wherein the therapeutic agent or agents are anti-inflammatory agents.

13. The method of claim 12, wherein the anti-inflammatory agent or agents are non-steroidal anti-inflammatory agents.

14. The method of claim 13, wherein non-steroidal anti-inflammatory agents are COX-1 inhibitors or COX-2 inhibitors.

15. The method of claim 12, wherein the anti-inflammatory agent or agents are steroidal anti-inflammatory agents.

16. The method of claim 1, wherein the therapeutic agent or agents are antiviral agents.

17. The method of claim 1, wherein the therapeutic agent or agents are anti-retroviral agents.

18. The method of claim 1, wherein the therapeutic agent or agents are anti-opportunistic agents.

19. The method of claim 1, wherein the therapeutic agent or agents are antibiotics.

20. The method of claim 1, wherein the therapeutic agent or agents are immunosuppressive agents.

21. The method of claim 1, wherein the therapeutic agent or agents are immunoglobulin preparations.

22. The method of claim 1, wherein the therapeutic agent or agents are antimalarial agents.

23. The method of claim 1, wherein the therapeutic agent or agents are disease modifying anti-rheumatic drugs.

24. The method of claim 1, wherein the therapeutic agent or agents are cytokines.

25. The method of claim 1, wherein the therapeutic agent or agents are chemokines.

26. The method of claim 1, wherein the therapeutic agent or agents are growth factors.

27. The method of claim 1, wherein the therapeutic agent is an apoptosis-inducing compound.

28. The method of claim 27, wherein the apoptosis-inducing compound is, bisindolylmaleimide VIII (BisVIII), SN-50 or LY294002.

29. The method of claim 1, wherein the therapeutic agent is a second antibody that promotes apoptosis or blocks proliferation of the target cells.

30. The method of claim 29, wherein the second antibody is selected from the group consisting of a DR4 antibody, a TNF antibody, a B7 antibody, a CD40 ligand antibody, a CD40 antibody, a CD20 antibody, and a Fas antibody.

31. The method of claim 1, wherein the therapeutic agent or agents are selected from the group consisting of chemotherapeutic agents, members of the TNF family, anti-inflammatory agents, anti-viral, anti-retroviral, anti-opportunistic agents, antibiotics, immunosuppressive agents, immunoglobulins, antimalarial agents, anti-rheumatoid arthritis agents, cytokines, chemokines, growth factors, and second antibody that promotes apoptosis or blocks proliferation of the target cells.

32. The method of claim 1, wherein the target cell is an abnormally proliferating synovial cell.

33. The method of claim 32, wherein the synovial cell is a rheumatoid arthritis synovial cell.

34. The method of claim 1, wherein the target cell is an activated immune cell.

35. The method of claim 34, wherein the activated immune cell is an activated lymphocyte.

36. The method of claim 1, wherein the target cell is a neutrophil.

37. The method of claim 1, wherein the target cell is a virally infected cell.

38. The method of claim 1, further comprising irradiating the target cells.

39. A method of inhibiting proliferation of target cells expressing DR5, comprising the steps of (a) contacting the target cells with a therapeutic quantity of an antibody that specifically binds a TRAIL receptor DR5, wherein said antibody, in its soluble form, has *in vivo* and *in vitro* apoptosis-inducing activity in cells expressing DR5 and (b) contacting the target cells with a therapeutic quantity of one or more therapeutic agents.

40. The method of claim 39, wherein at least one contacting step is performed *in vivo*.

41. The method of claim 39, wherein a least one contacting step is performed *in vitro*.

42. The method of claim 39, wherein the therapeutic agent or agents are chemotherapeutic agents.

43. The method of claim 42, wherein the chemotherapeutic agent or agents are selected from the group consisting of bleomycin, carboplatin, chlorambucil, cisplatin, colchicine, cyclophosphamide, daunorubicin, actinomycin, diethylstilbestrol, doxorubicin, etoposide, 5-fluorouracil, floxuridine, melphalan, methotrexate, mitomycin, 6-mercaptopurine, teniposide, 6-thioguanine, vincristine and vinblastine.

44. The method of claim 42, wherein the chemotherapeutic agent or agents are selected from the group consisting of dactinomycin, tamoxifen, interferon α-2b, glutamic acid, plicamycin, mercaptopurine, 6-thioguaninine, carmustine, BCNU, lomustine, CCNU, cytosine araboside, estramustine, hydroxyurea, procarbazine, busulfan, medroxyprogesterone, estramustine phosphate sodium, ethinyl estradiol, estradiol, megestrol acetate, methyltestosterone, diethylstilbestrol diphosphate, chlorotrianisene, testolactone, mephalen, chorambucil, mechlorethamine, thiotepa, bethamethasone sodium phosphate, dicarbazine, asparaginase, mitotane, vincristine sulfate, and vinblastine sulfate.

45. The method of claim 42, wherein the chemotherapeutic agents are cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and predisone or a subset thereof.

46. The method of claim 45, further comprising administering rituximab.

47. The method of claim 39, wherein the therapeutic agent or agents are members of the TNF family.

48. The method of claim 47, wherein the member or members of the TNF family are CD40 ligands, or fragments or derivatives thereof.

49. The method of claim 47, wherein the member or members of the TNF family are Fas liganda, or a fragments or derivatives thereof.

50. The method of claim 39, wherein the therapeutic agent or agents are anti-inflammatory agents.

51. The method of claim 50, wherein the anti-inflammatory agent or agents are non-steroidal anti-inflammatory agents.

52. The method of claim 51, wherein non-steroidal anti-inflammatory agents are COX-1 inhibitors or COX-2 inhibitors.

53. The method of claim 50, wherein the anti-inflammatory agent or agents are steroidal anti-inflammatory agents.

54. The method of claim 39, wherein the therapeutic agent or agents are antiviral agents.

55. The method of claim 39, wherein the therapeutic agent or agents are anti-retroviral agents.

56. The method of claim 39, wherein the therapeutic agent or agents are anti-opportunistic agents.

57. The method of claim 39, wherein the therapeutic agent or agents are antibiotics.

58. The method of claim 39, wherein the therapeutic agent or agents are immmunosuppressive agents.

59. The method of claim 39, wherein the therapeutic agent or agents are immunoglobulin preparations.

60. The method of claim 39, wherein the therapeutic agent or agents are antimalarial agents.

61. The method of claim 39, wherein the therapeutic agent or agents are anti-rheumatoid arthritis agents.

62. The method of claim 39, wherein the therapeutic agent or agents are cytokines

63. The method of claim 39, wherein the therapeutic agent or agents are chemokines.

64. The method of claim 39, wherein the therapeutic agent or agents are growth factors.

65. The method of claim 39, wherein the therapeutic agent is a second antibody that promotes apoptosis or blocks proliferation of the target cells.

66. The method of claim 65, wherein the second antibody is selected from the group consisting of a DR4 antibody, a TNF antibody, a B7 antibody, a CD40 ligand antibody, a CD40 antibody, a CD20 antibody, and a Fas antibody.

67. The method of claim 1, wherein the therapeutic agent is an apoptosis-inducing compound.

68. The method of claim 67, wherein the apoptosis-inducing compound is, bisindolylmaleimide VIII (BisVIII), SN-50 or LY294002.

69. The method of claim 39, wherein the therapeutic agent or agents are selected from the group consisting of chemotherapeutic agents, members of the TNF family, anti-inflammatory agents, anti-viral, anti-retroviral, anti-opportunistic agents, antibiotics, immunosuppressive agents, immunoglobulins, antimalarial agents, anti-rheumatoid arthritis agents, cytokines, chemokines, growth factors, and second antibody that promotes apoptosis or blocks proliferation of the target cells.

70. The method of claim 39, wherein the target cell is an abnormally proliferating synovial cell.

71. The method of claim 70, wherein the synovial cell is a rheumatoid arthritis synovial cell.

72. The method of claim 39, wherein the target cell is an activated immune cell.

73. The method of claim 39, wherein the target cell is an activated lymphocyte.

74. The method of claim 39, wherein the target cell is a neutrophil.

75. The method of claim 39, wherein the target cell is a virally infected cell.

76. The method of claim 39, further comprising irradiating the target cells.

77. A method of treating a subject having an inflammatory or autoimmune disease, comprising (a) administering to the subject a therapeutic amount of an antibody that specifically binds a TRAIL receptor DR5, wherein said antibody, in its soluble form, has *in vivo* and *in vitro* apoptosis-inducing activity in target cells expressing DR5 and (b) administering to the subject a therapeutic quantity of a therapeutic agent.

78. The method of claim 77, wherein the therapeutic agent or agents are chemotherapeutic agents.

79. The method of claim 78, wherein the chemotherapeutic agent or agents are selected from the group consisting of bleomycin, carboplatin, chlorambucil, cisplatin, colchicine, cyclophosphamide, daunorubicin, actinomycin, diethylstilbestrol, doxorubicin, etoposide, 5-fluorouracil, floxuridine, melphalan, methotrexate, mitomycin, 6-mercaptopurine, teniposide, 6-thioguanine, vincristine and vinblastine.

80. The method of claim 78, wherein the chemotherapeutic agent or agents are selected from the group consisting of dactinomycin, tamoxifen, interferon α-2b, glutamic acid, plicamycin, mercaptopurine, 6-thioguaninine, carmustine, BCNU, lomustine, CCNU, cytosine araboside, estramustine, hydroxyurea, procarbazine, busulfan, medroxyprogesterone, estramustine phosphate sodium, ethinyl estradiol, estradiol, megestrol acetate, methyltestosterone, diethylstilbestrol diphosphate, chlorotrianisene, testolactone, mephalen, chorambucil, mechlorethamine, thiotepa, bethamethasone sodium phosphate,

dicarbazine, asparaginase, mitotane, vincristine sulfate, and vinblastine sulfate.

81. The method of claim 78, wherein the chemotherapeutic agents are cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and predisone or a subset thereof.

82. The method of claim 81, further comprising administering rituximab.

83. The method of claim 77, wherein the therapeutic agent or agents are members of the TNF family.

84. The method of claim 83, wherein the member or members of the TNF family are CD40 ligands, or fragments or derivatives thereof.

85. The method of claim 83, wherein the member or members of the TNF family are Fas ligands, or a fragments or derivatives thereof.

86. The method of claim 77, wherein the therapeutic agent or agents are anti-inflammatory agents.

87. The method of claim 86, wherein the anti-inflammatory agent or agents are non-steroidal anti-inflammatory agents.

88. The method of claim 87, wherein non-steroidal anti-inflammatory agents are COX-1 inhibitors or COX-2 inhibitors.

89. The method of claim 86, wherein the anti-inflammatory agent or agents are steroidal anti-inflammatory agents.

90. The method of claim 77, wherein the therapeutic agent or agents are antiviral agents.

91. The method of claim 77, wherein the therapeutic agent or agents are anti-retroviral agents.

92. The method of claim 77, wherein the therapeutic agent or agents are anti-opportunistic agents.

93. The method of claim 77, wherein the therapeutic agent or agents are antibiotics.

94. The method of claim 77, wherein the therapeutic agent or agents are immunosuppressive agents.

95. The method of claim 77, wherein the therapeutic agent or agents are immunoglobulin preparations.

96. The method of claim 77, wherein the therapeutic agent or agents are antimalarial agents.

97. The method of claim 77, wherein the therapeutic agent or agents are anti-rheumatoid arthritis agents.

98. The method of claim 77, wherein the therapeutic agent or agents are cytokines

99. The method of claim 77, wherein the therapeutic agent or agents are chemokines.

100. The method of claim 77, wherein the therapeutic agent or agents are growth factors.

101. The method of claim 77, wherein the therapeutic agent is a second antibody that promotes apoptosis or blocks proliferation of the target cells.

102. The method of claim 101, wherein the second antibody is selected from the group consisting of a DR4 antibody, a TNF antibody, a B7 antibody, a CD40 ligand antibody, a CD40 antibody, a CD20 antibody, and a Fas antibody.

103. The method of claim 1, wherein the therapeutic agent is an apoptosis-inducing compound.

104. The method of claim 103, wherein the apoptosis-inducing compound is, bisindolylmaleimide VIII (BisVIII), SN-50 or LY294002.

105. The method of claim 77, wherein the therapeutic agent or agents are selected from the group consisting of chemotherapeutic agents, members of the TNF family, anti-inflammatory agents, anti-viral, anti-retroviral, anti-opportunistic agents, antibiotics, immunosuppressive agents, immunoglobulins, antimalarial agents, anti-rheumatoid arthritis agents, cytokines, chemokines, growth factors, and second antibody that promotes apoptosis or blocks proliferation of the target cells.

106. The method of claim 77, wherein the inflammatory or autoimmune disease is selected from the group consisting of systemic lupus erythematosus, Hashimoto's disease, rheumatoid arthritis, graft-versus-host disease, Sjögren's syndrome, pernicious anemia, Addison disease, scleroderma, Goodpasture's syndrome, Crohn's disease, autoimmune hemolytic anemia, sterility, myasthenia gravis, multiple sclerosis, Basedow's disease, thrombotic throbocytopenia, thrombopenia purpura, insulin-dependent diabetes mellitus, allergy; asthma, atopic disease; arteriosclerosis; myocarditis; cardiomyopathy; glomerular nephritis; hypoplastic anemia.

107. The method of claim 77, further comprising administering to the subject radiation therapy.

108. A composition comprising (a) an antibody that specifically binds a TRAIL receptor DR5, wherein said antibody, in its soluble form, has *in vivo* and *in vitro* apoptosis-inducing activity in target cells expressing DR5 and (b) one or more therapeutic agents.

109. The composition of claim 108, wherein the therapeutic agent or agents are selected from the group consisting of chemotherapeutic agents, members of the TNF family, anti-inflammatory agents, anti-viral, anti-retroviral, anti-opportunistic agents, antibiotics, immunosuppressive agents, immunoglobulins, antimalarial agents, disease modifying anti-rheumatic

drug, cytokines, chemokines, growth factors, and second antibodies that promotes apoptosis or blocks proliferation of the target cells.

110. The composition of claim 108, further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.

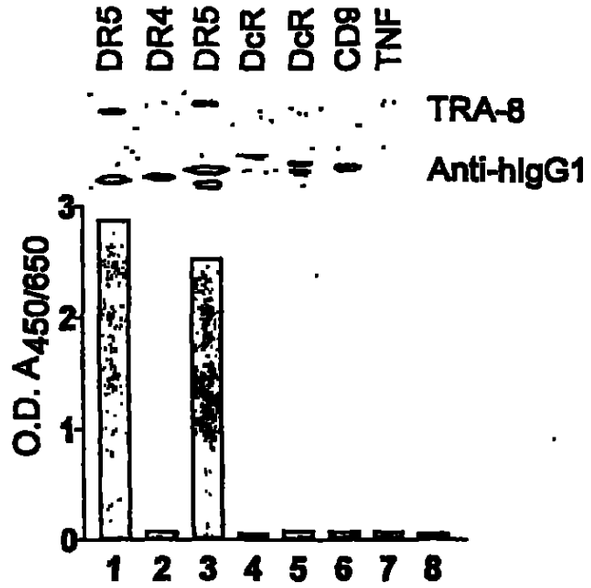


FIG.1A



FIG.1D

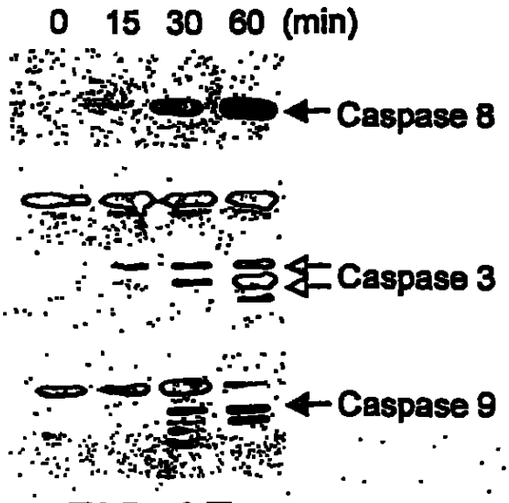


FIG.1F

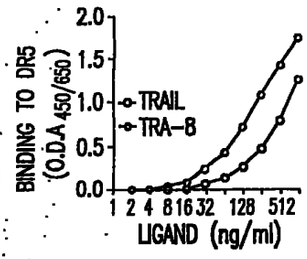


FIG. 1B1

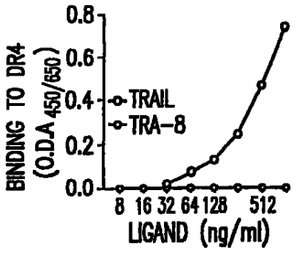


FIG. 1B2

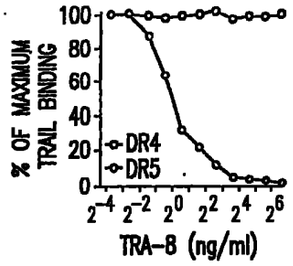


FIG. 1B3

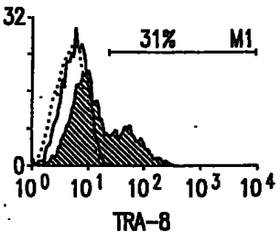


FIG. 1C

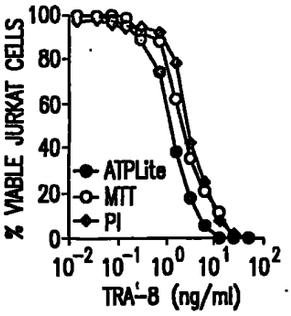


FIG. 1E

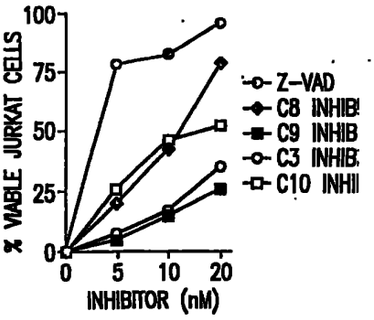


FIG. 1G

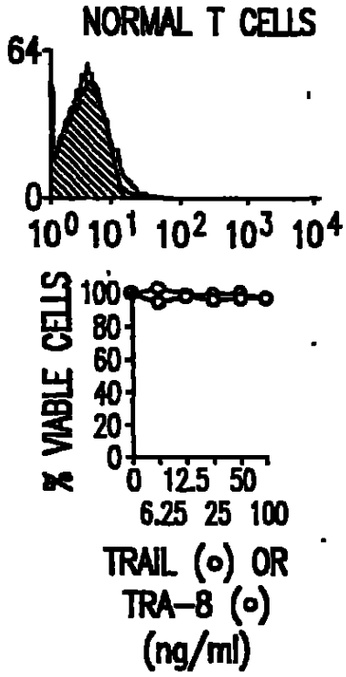


FIG. 2A1

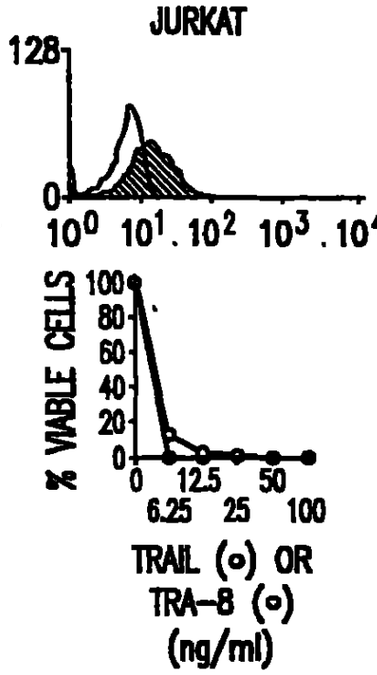


FIG. 2A2

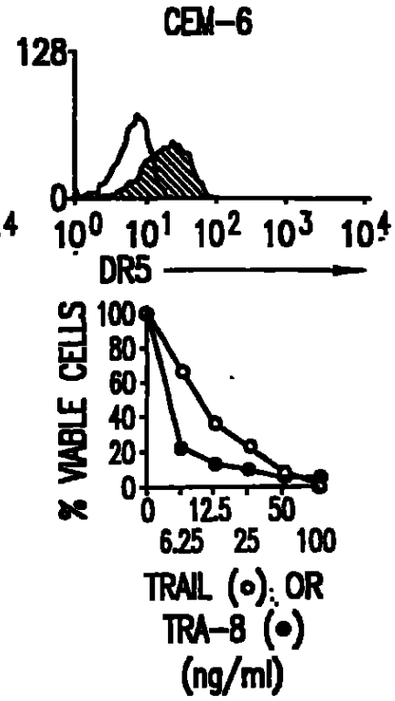


FIG. 2A3

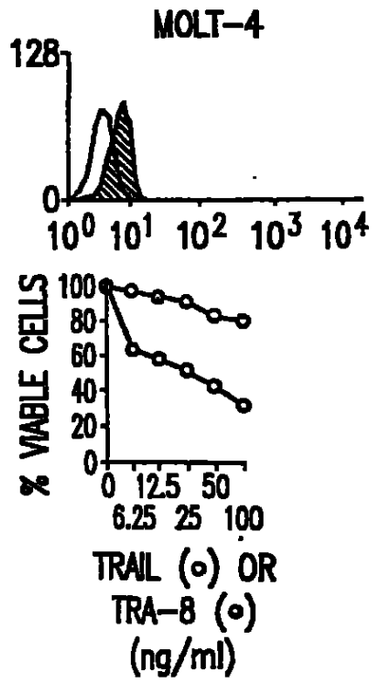


FIG. 2A4

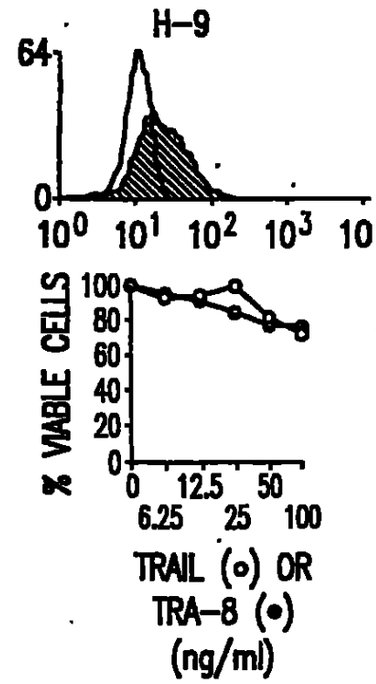


FIG. 2A5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

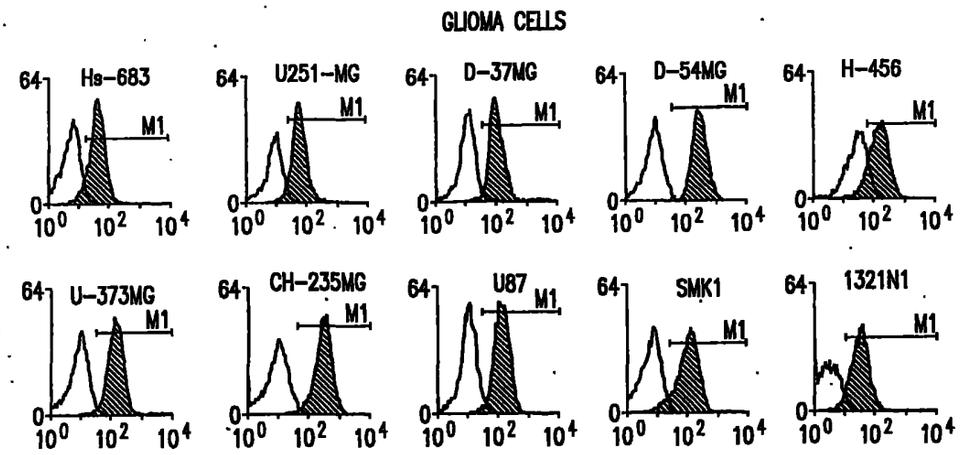


FIG. 2B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

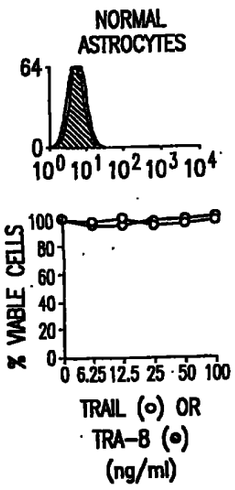


FIG. 2B 1

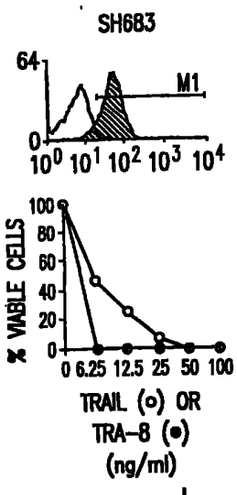


FIG. 2B 2

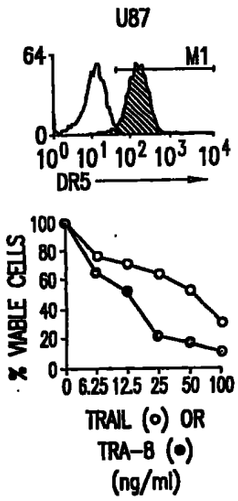


FIG. 2B 3

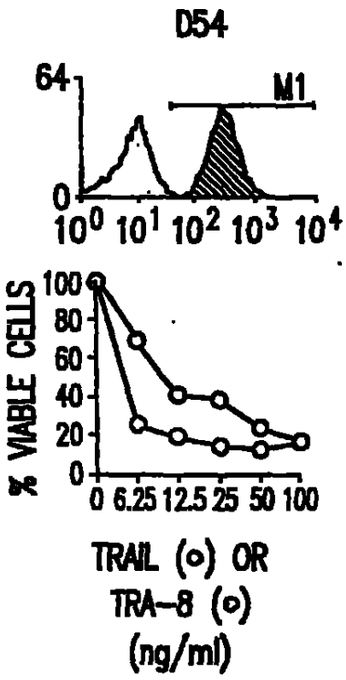


FIG. 2B'4

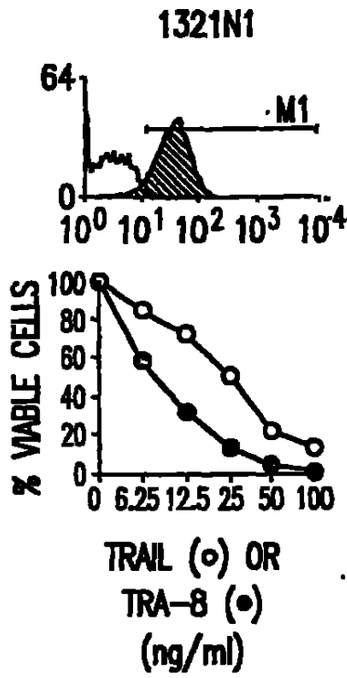


FIG. 2B'5

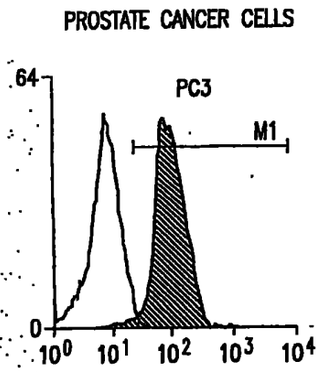


FIG. 2C1

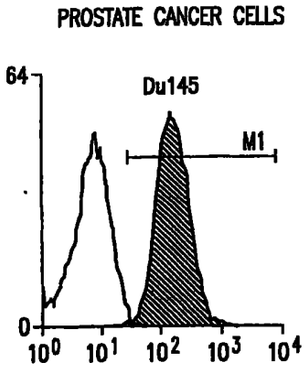


FIG. 2C2

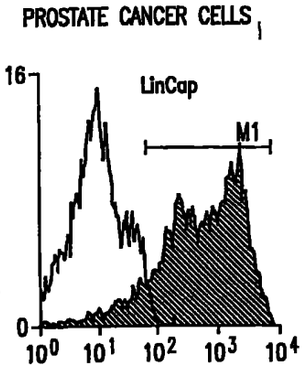


FIG. 2C3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG. 2D1

FIG. 2D2

FIG. 2D3

1/2

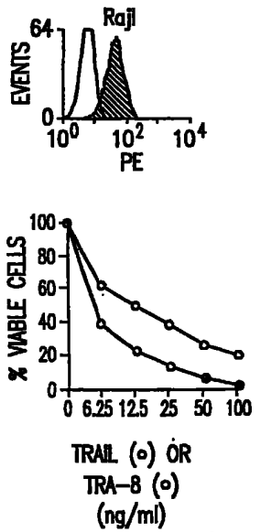


FIG. 2D4

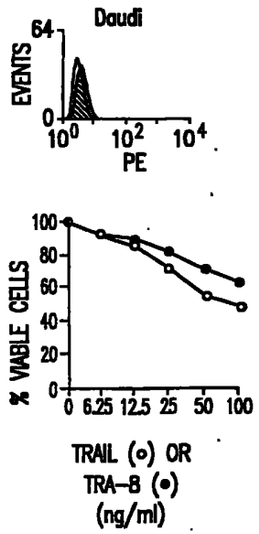


FIG. 2D5

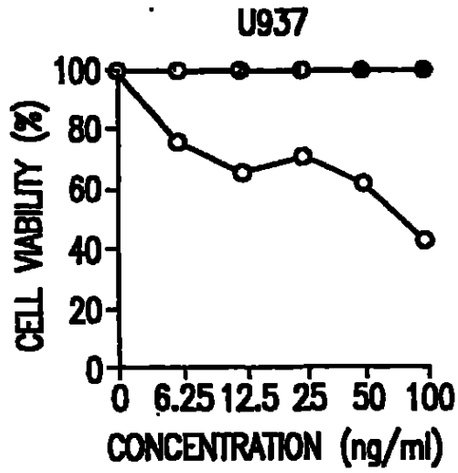

U937
CELL VIABILITY (%)
100
80
60
40
20
0
0 6.25 12.5 25 50 100
CONCENTRATION (ng/ml)

FIG. 3A

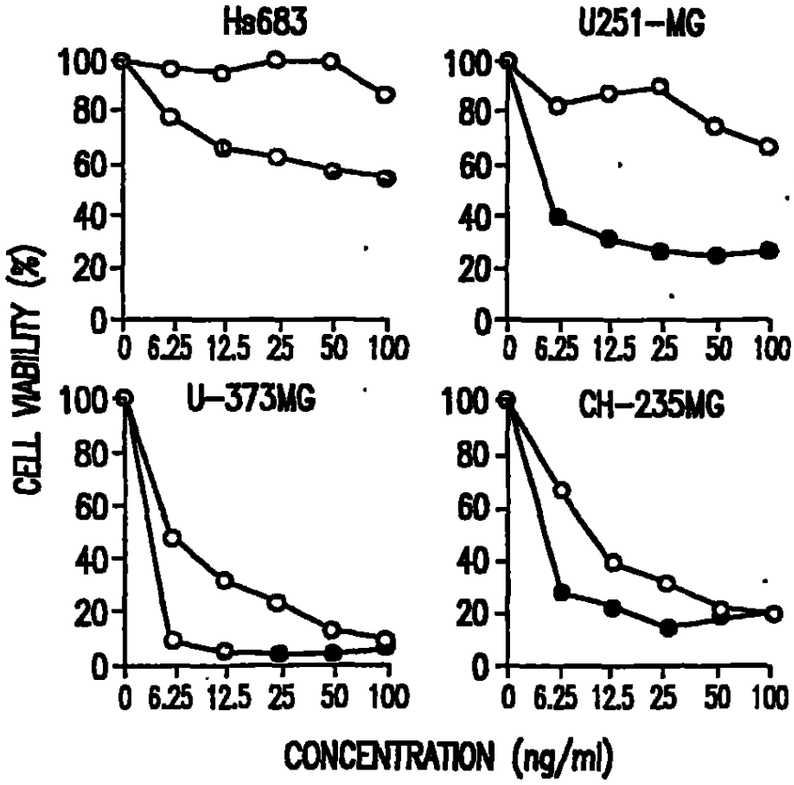

Hs683
U251-MG
U-373MG
CH-235MG
CELL VIABILITY (%)
100
80
60
40
20
0
0 6.25 12.5 25 50 100
CONCENTRATION (ng/ml)

FIG. 3B1

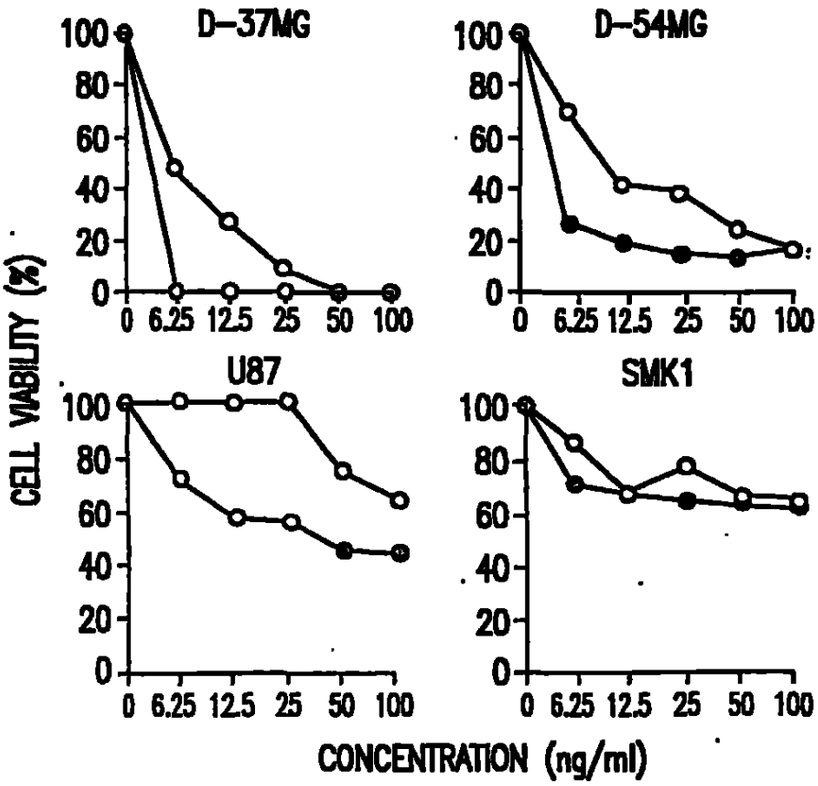

D-37MG
D-54MG
U87
SMK1
CELL VIABILITY (%)
100
80
60
40
20
0
0 6.25 12.5 25 50 100
CONCENTRATION (ng/ml)

FIG. 3B2

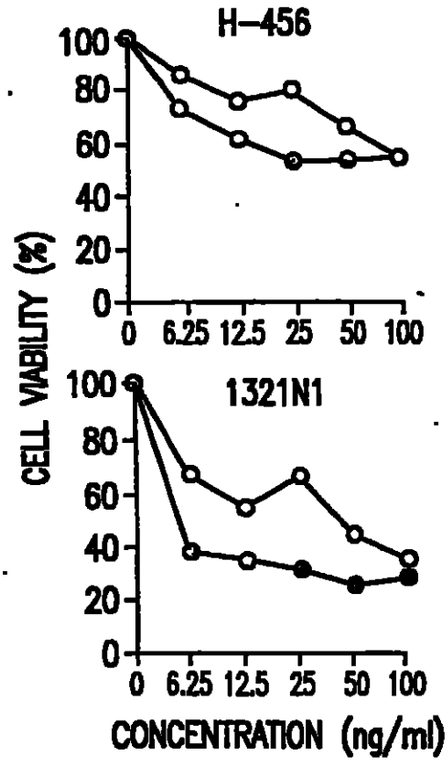

H-456
100
80
60
40
20
0
0 6.25 12.5 25 50 100
1321N1
100
80
60
40
20
0
0 6.25 12.5 25 50 100
CELL VIABILITY (%)
CONCENTRATION (ng/ml)

FIG. 3B3

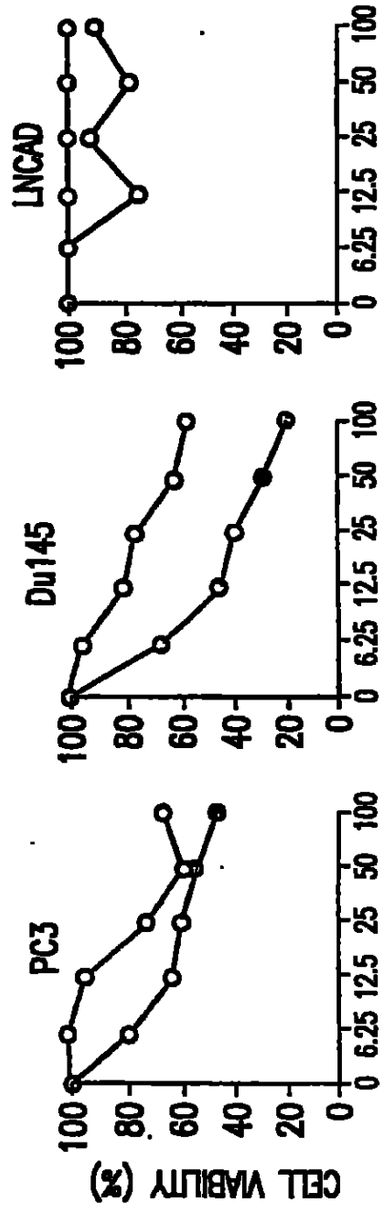

LNCAP
Du145
PC3
CELL VIABILITY (%)
100
80
60
40
20
0
0
6.25
12.5
25
50
100
CONCENTRATION (ng/ml)

FIG. 3C

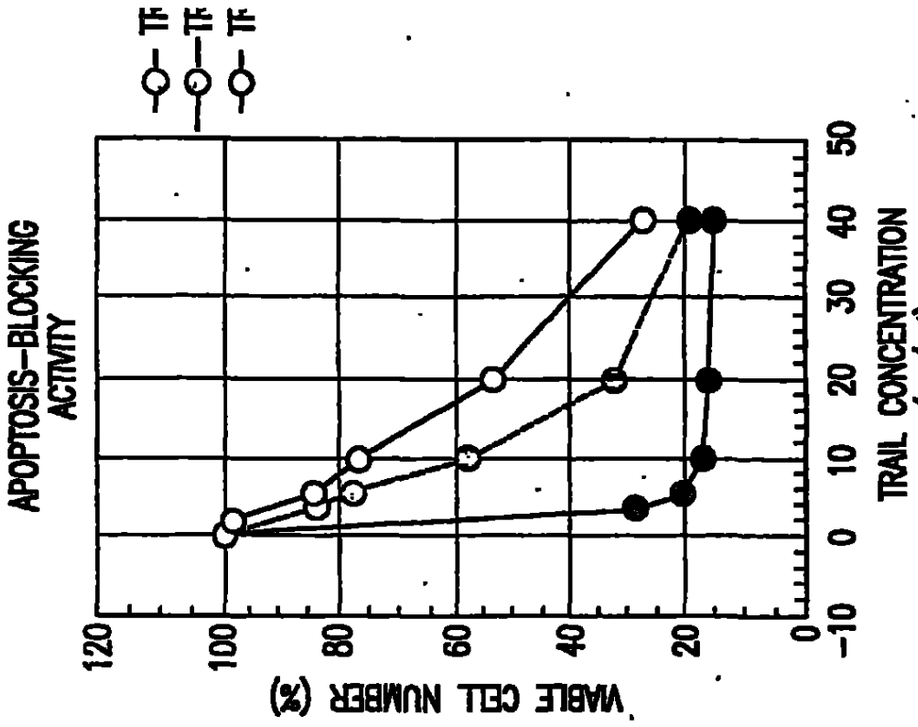

TRAIL
TRAIL
TRAIL
APOPTOSIS-BLOCKING ACTIVITY
VIABLE CELL NUMBER (%)
120
100
80
60
40
20
0
-10
0
10
20
30
40
50
TRAIL CONCENTRATION (ng/ml)

FIG. 4B

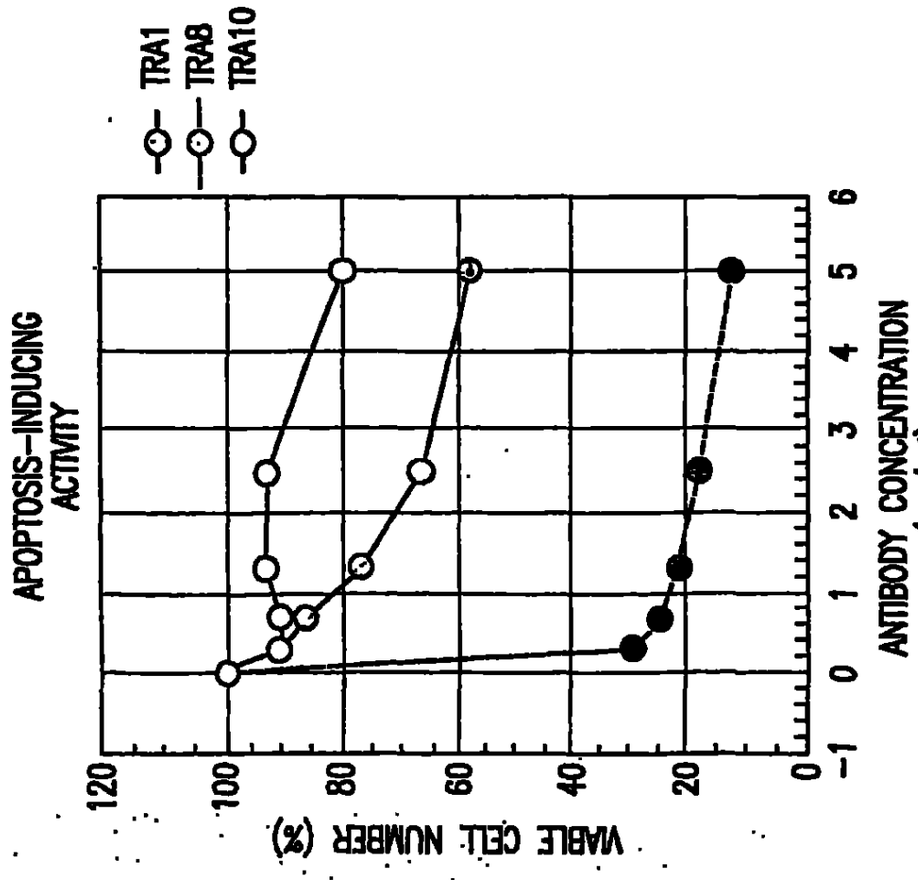

TRA1
TRA8
TRA10
APOPTOSIS-INDUCING ACTIVITY
VIABLE CELL NUMBER (%)
120
100
80
60
40
20
0
-1
0
1
2
3
4
5
6
ANTIBODY CONCENTRATION (μg/ml)

FIG. 4A

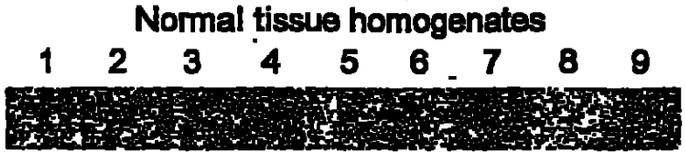


FIG.5A

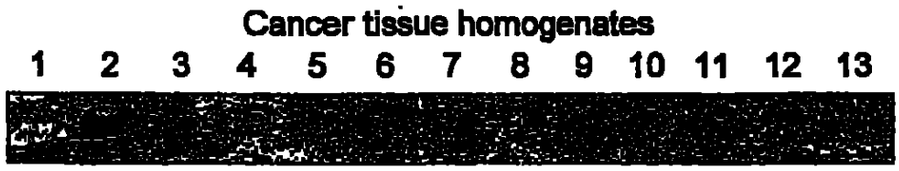


FIG.5B

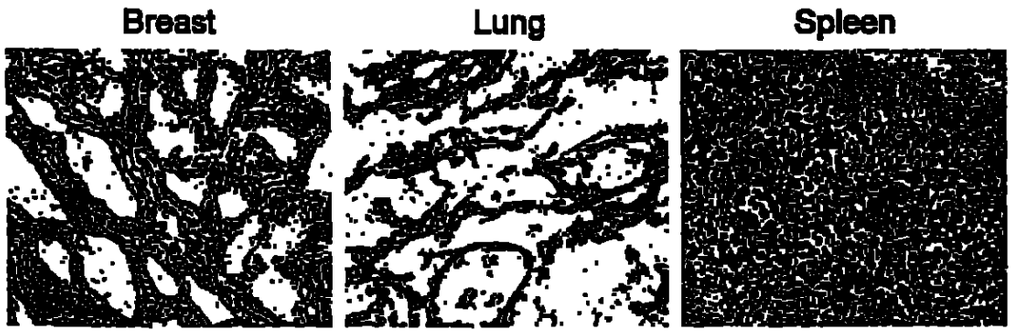


FIG.5C

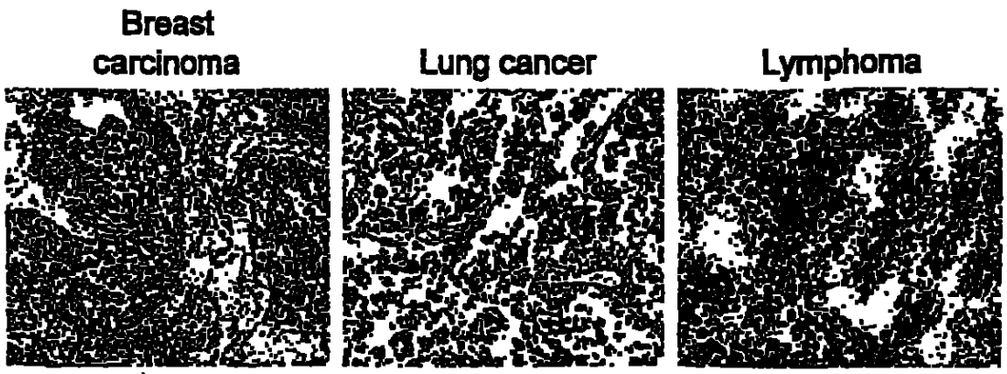


FIG.5D

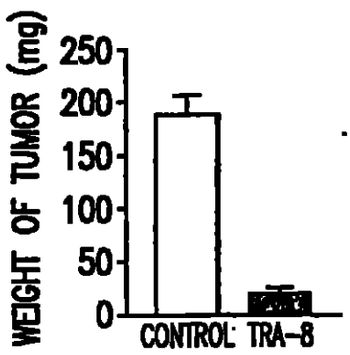


FIG. 6A

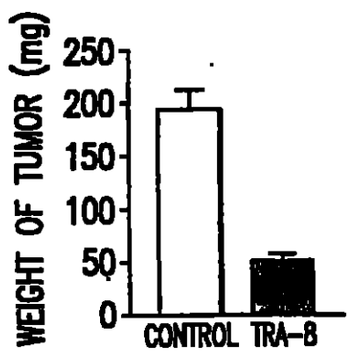


FIG. 6B

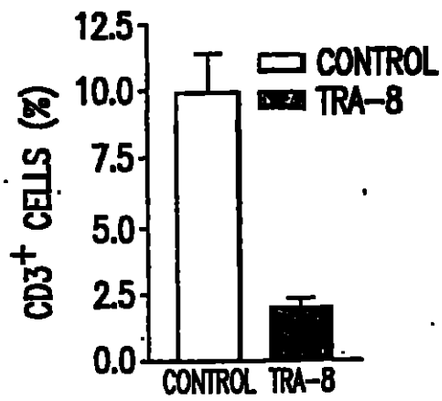


FIG. 6D

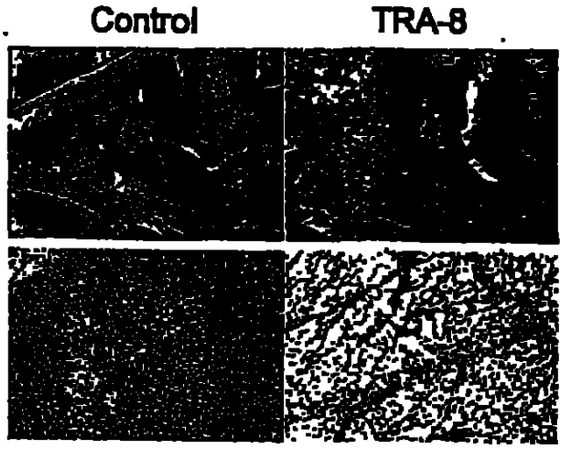


FIG.6C

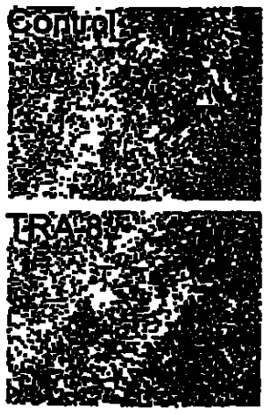


FIG.6E

122

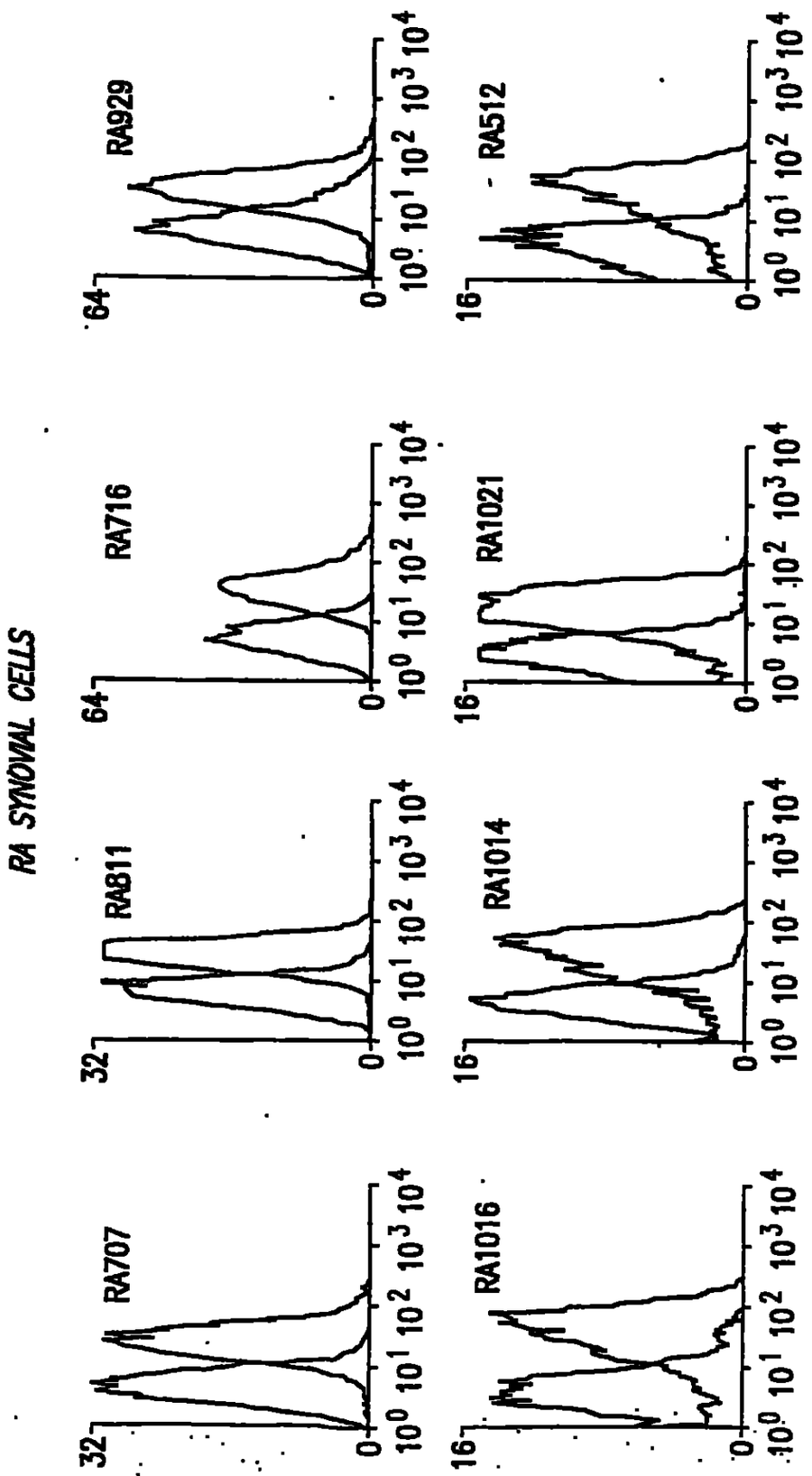

RA SYNOVIAL CELLS
RA707
RA811
RA716
RA929
RA1016
RA1014
RA1021
RA512
32
64
16
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4
DR5

FIG. 7A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

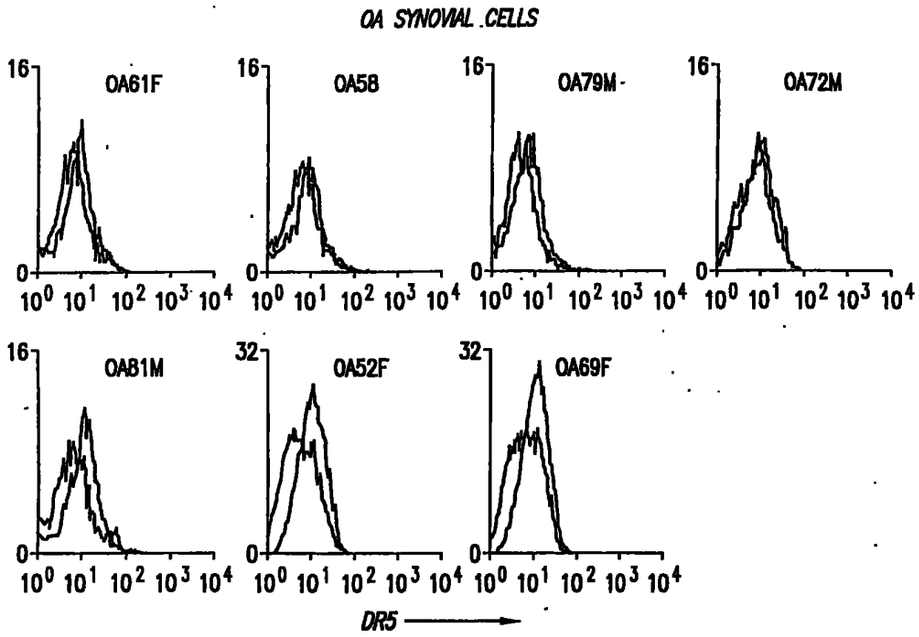


FIG. 7B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

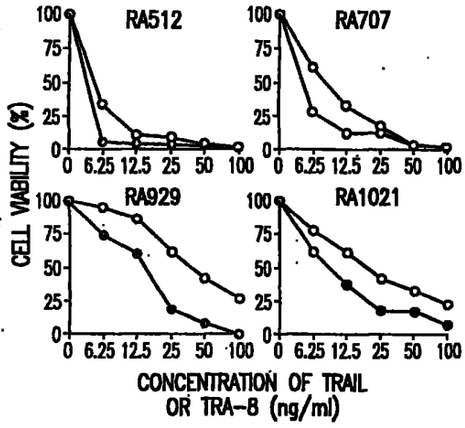


FIG. 8A1

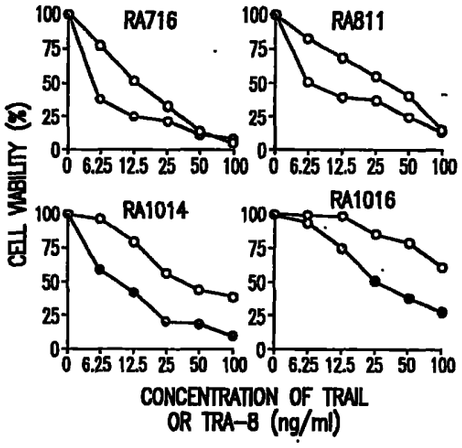


FIG. 8A2

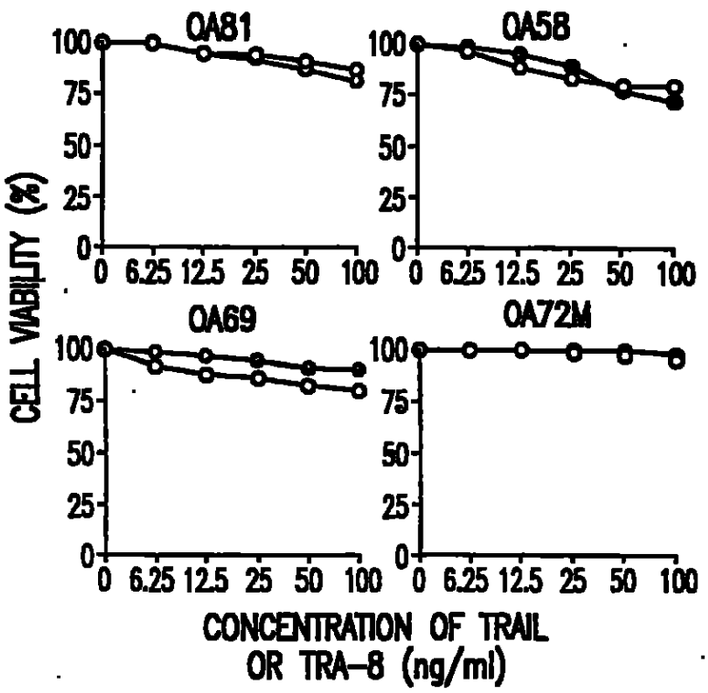

OA81
OA58
OA69
OA72M
CELL VIABILITY (%)
100
75
50
25
0
0 6.25 12.5 25 50 100
CONCENTRATION OF TRAIL
OR TRA-8 (ng/ml)

FIG. 8B

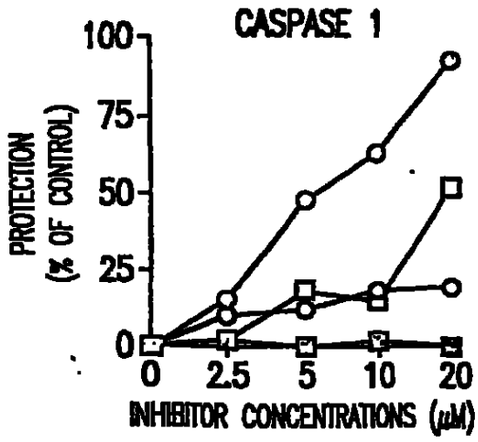


FIG. 9A

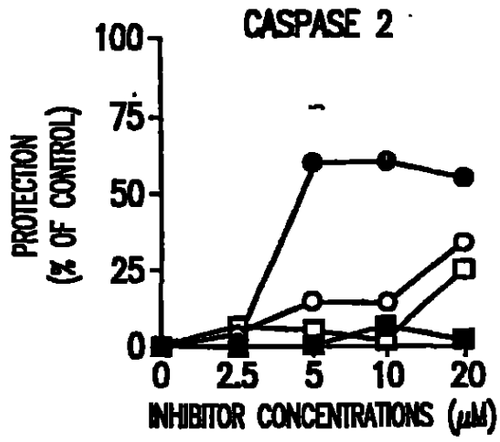


FIG. 9B

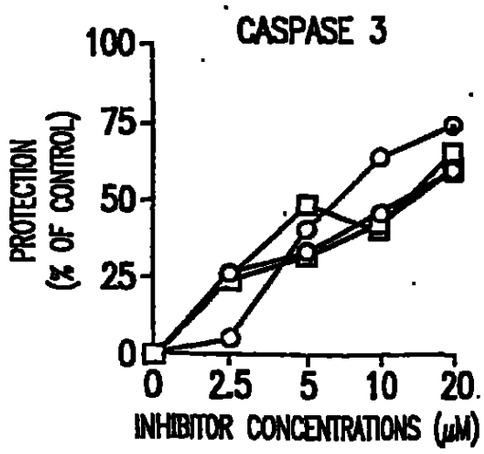


FIG. 9C

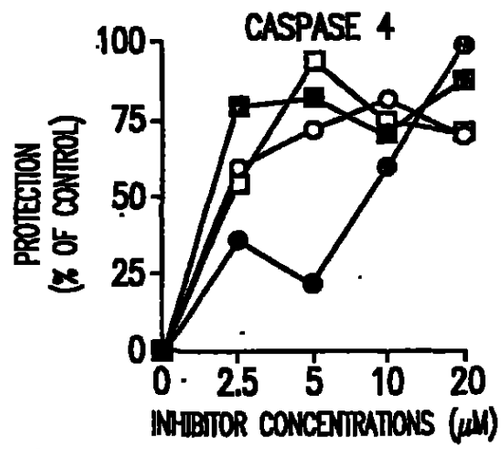


FIG. 9D

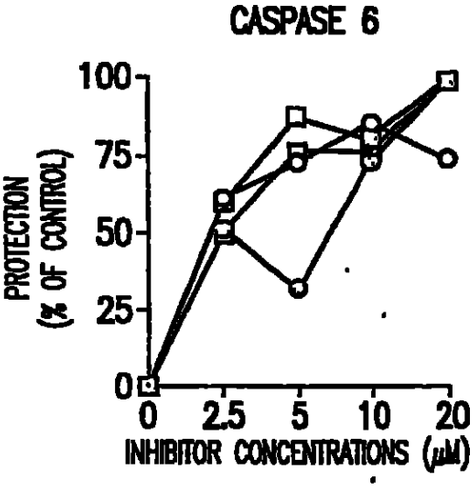


FIG. 9E

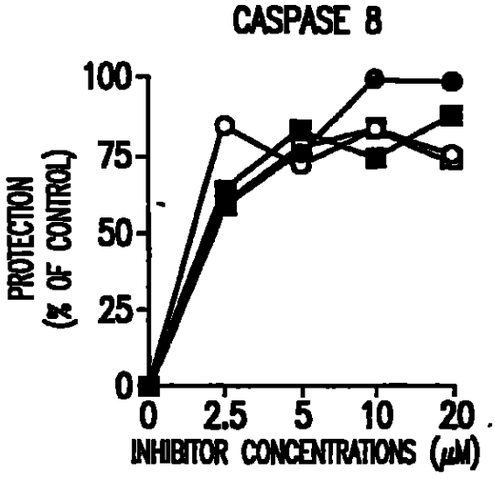


FIG. 9F

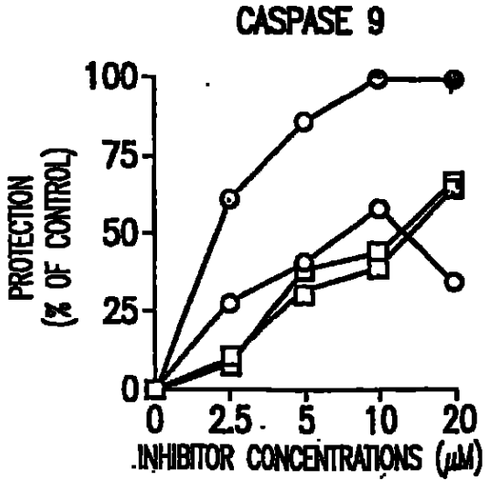


FIG. 9G

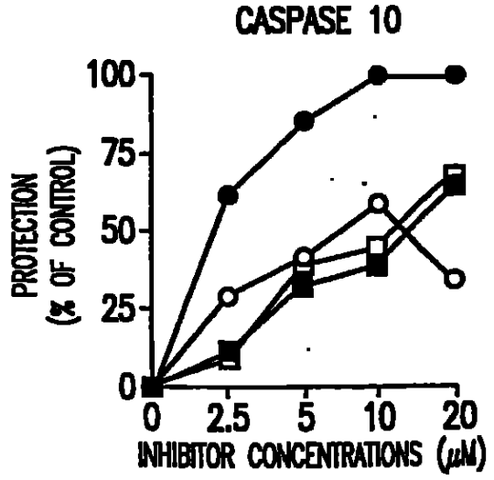


FIG. 9H

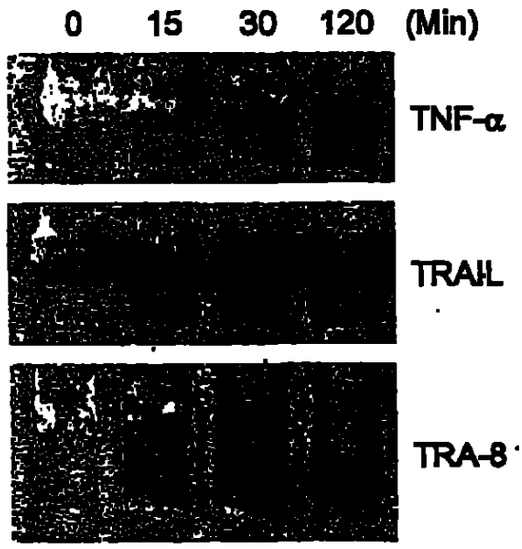


FIG.10A

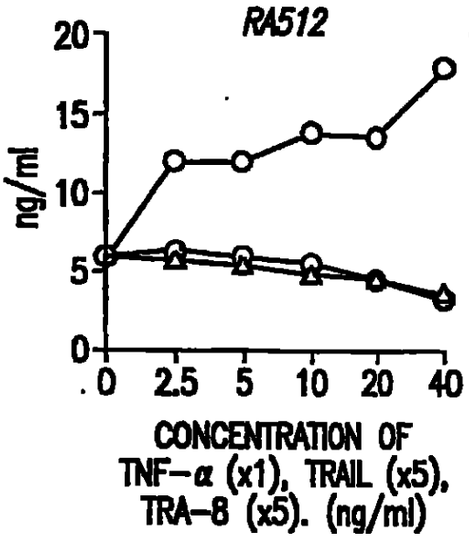


FIG. 10B1

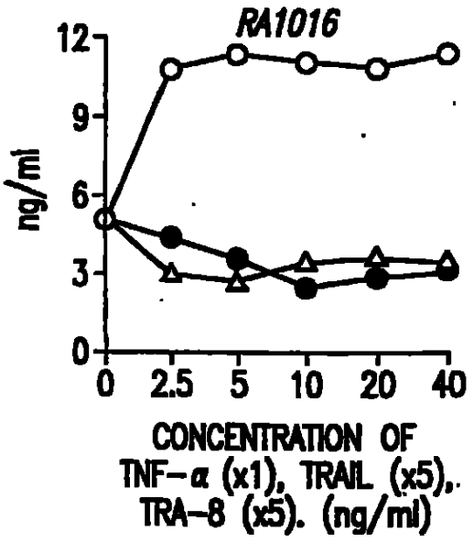


FIG. 10B2

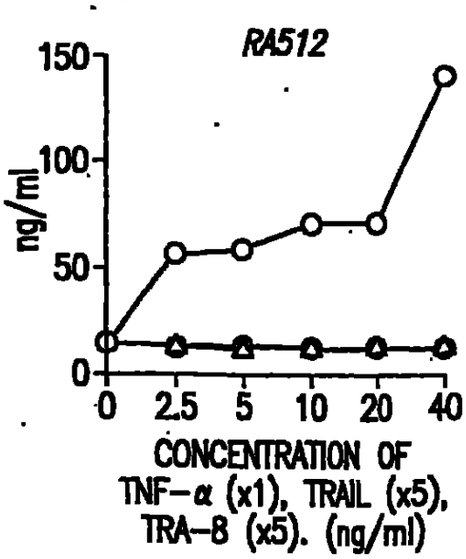


FIG. 10C1

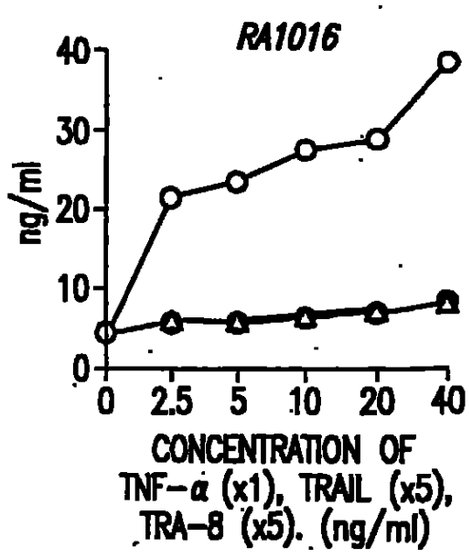


FIG. 10C2

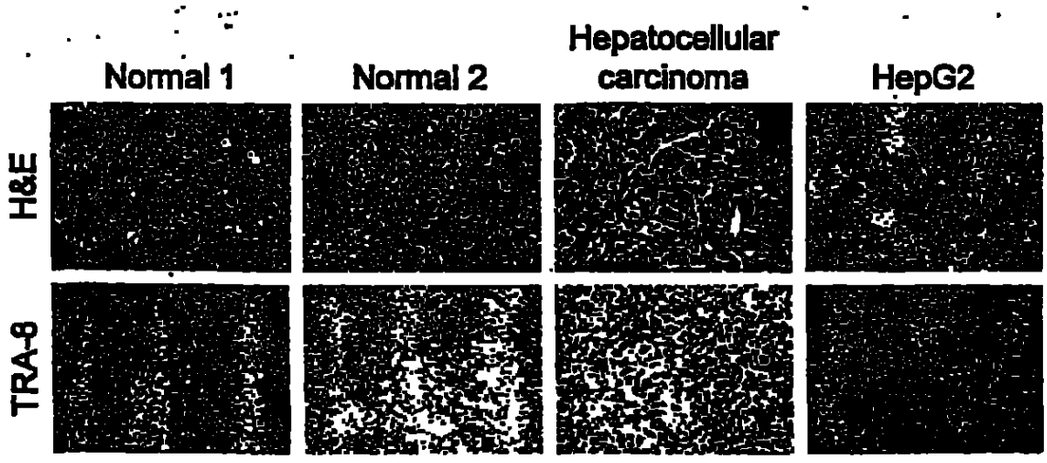


FIG.11A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

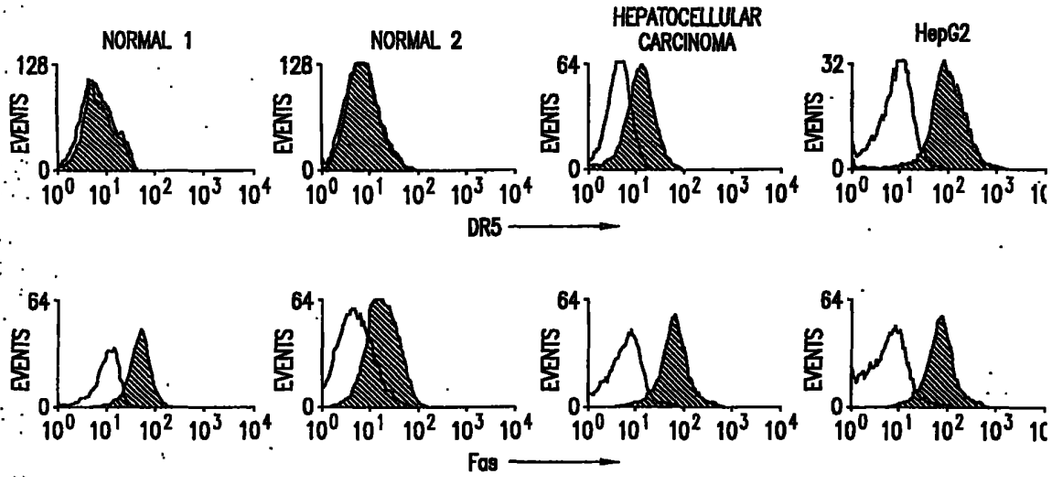


FIG. 11B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

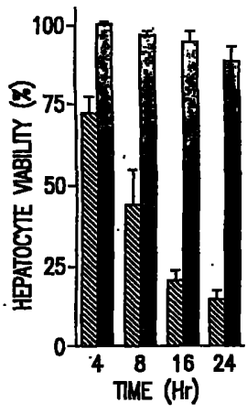


FIG. 12A

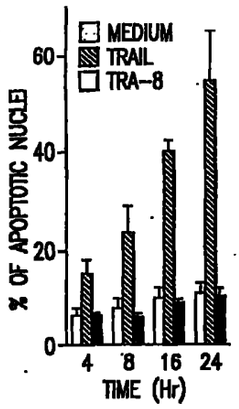


FIG. 12B

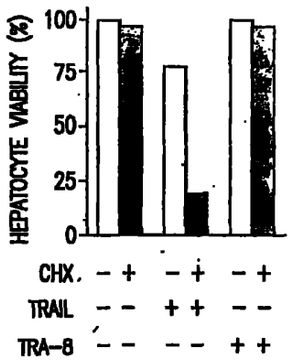


FIG. 12C

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

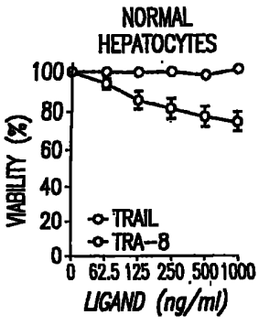


FIG. 12D1

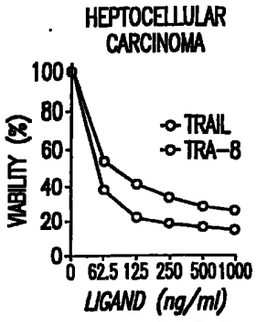


FIG. 12D2

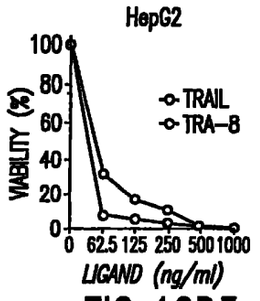


FIG. 12D3

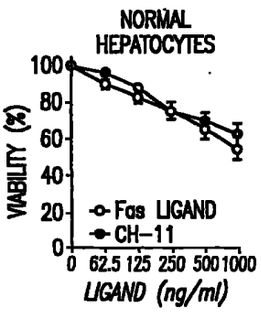


FIG. 12D4

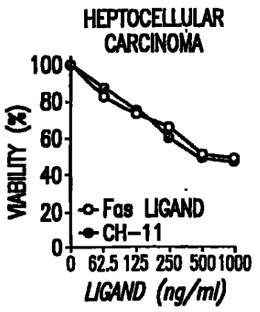


FIG. 12D5

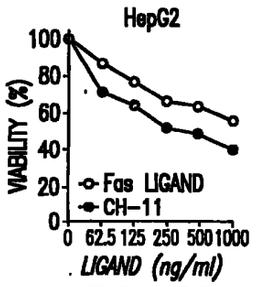


FIG. 12D6

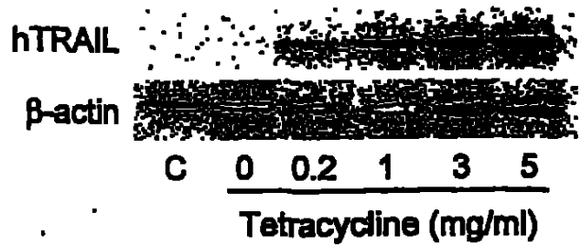


FIG.13A

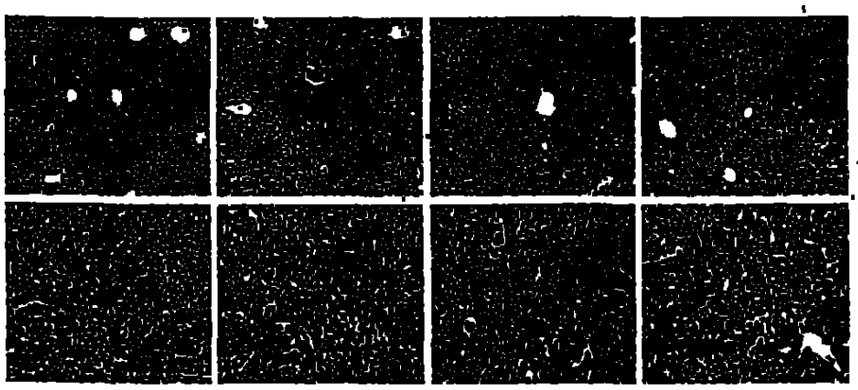


FIG.13D

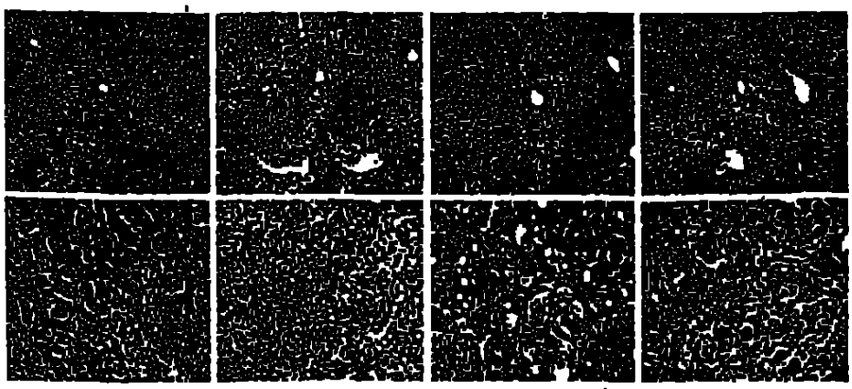


FIG.13E

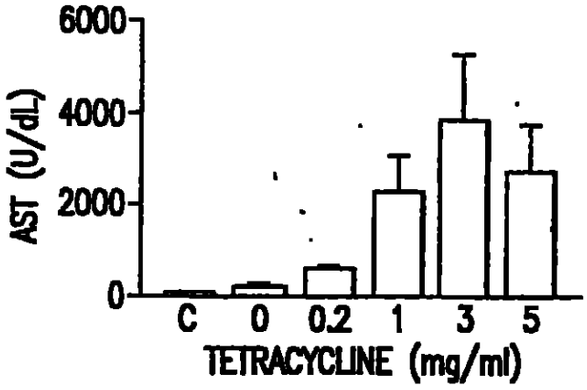


FIG. 13B

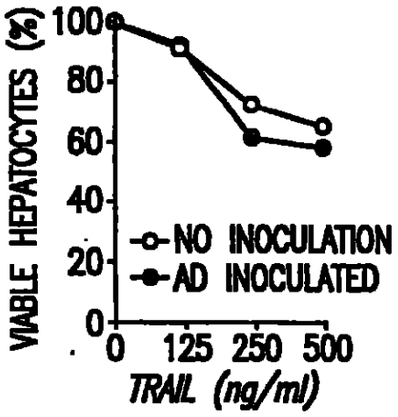


FIG. 13C1

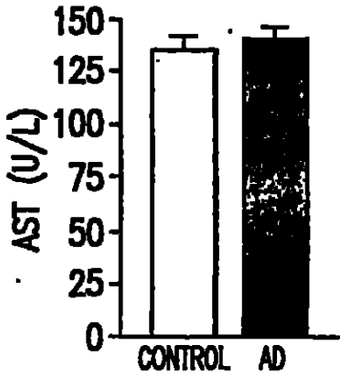


FIG. 13C2

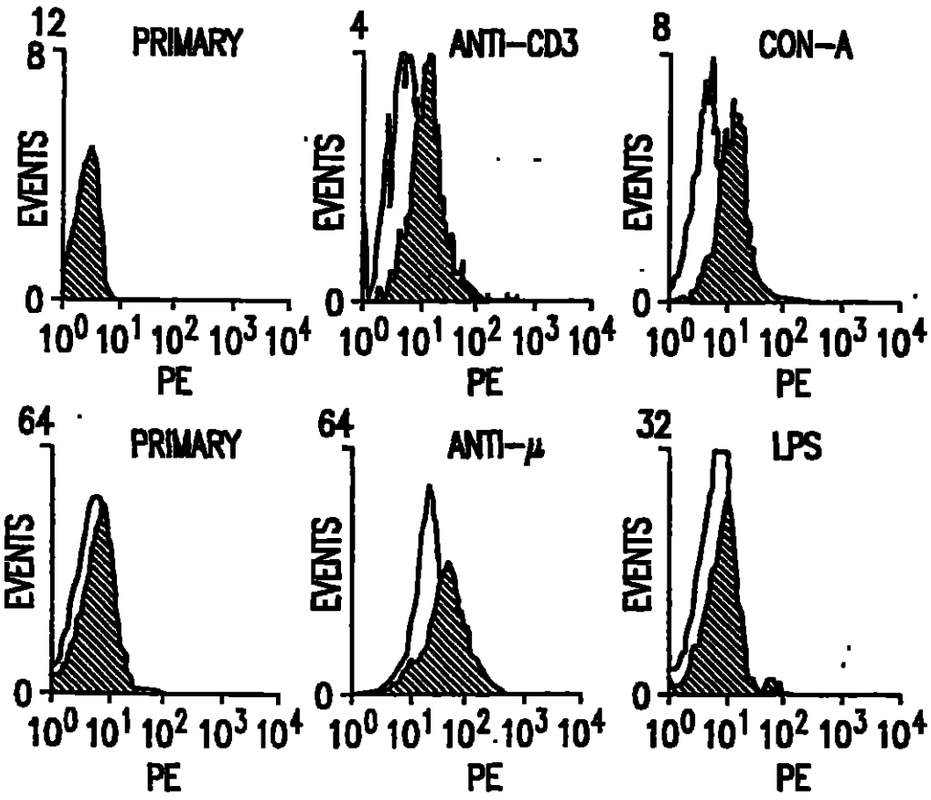

PRIMARY
ANTI-CD3
CON-A
PRIMARY
ANTI-μ
LPS
EVENTS
PE
12
8
4
64
32
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4

FIG. 14

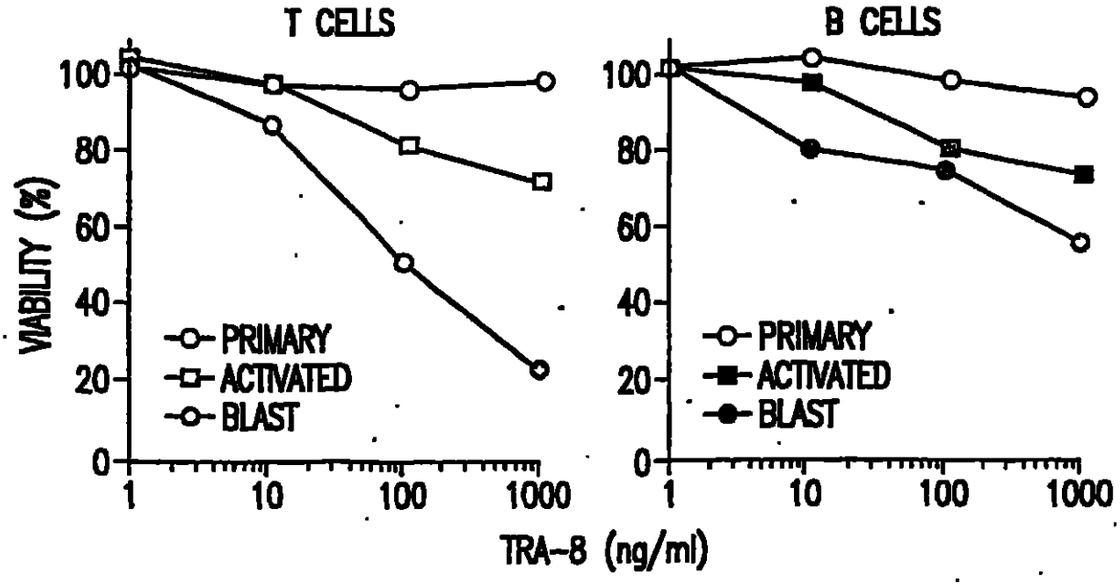

T CELLS
B CELLS
VIABILITY (%)
100
80
60
40
20
0
PRIMARY
ACTIVATED
BLAST
1
10
100
1000
TRA-8 (ng/ml)

FIG. 15

FIG. 16

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

138

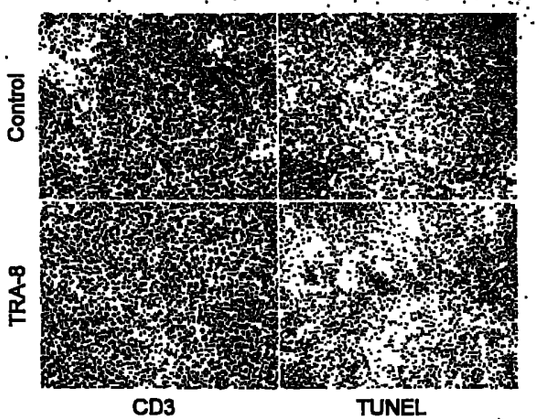


FIG.17

FIG. 18

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

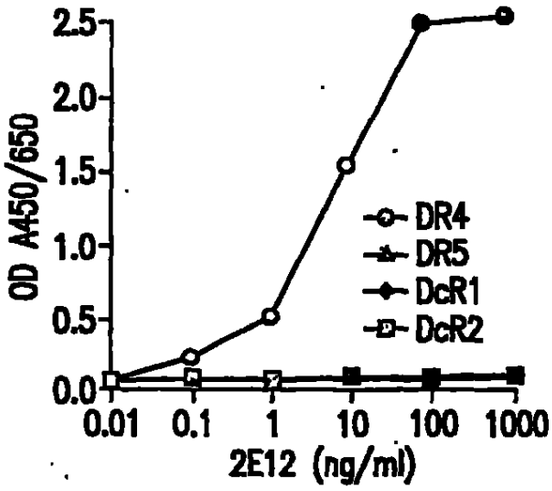


FIG. 19A

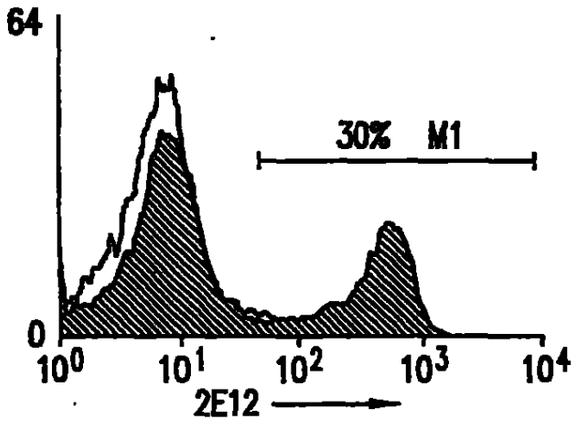


FIG. 19B

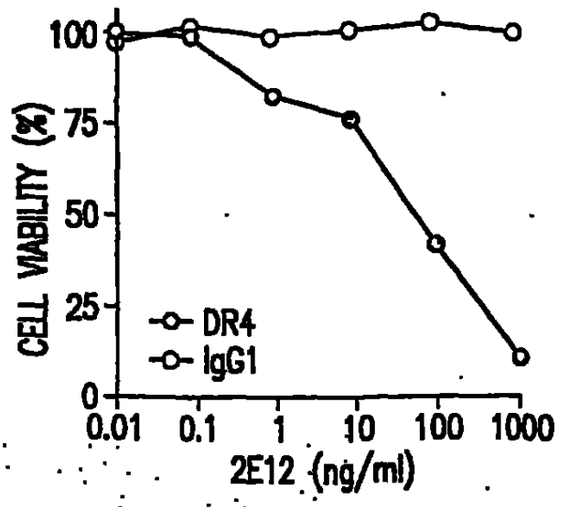


FIG. 19C

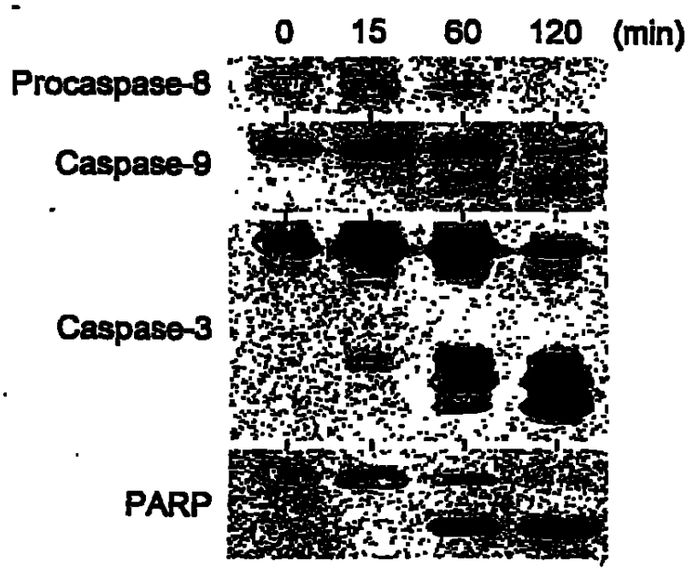


FIG.19D

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

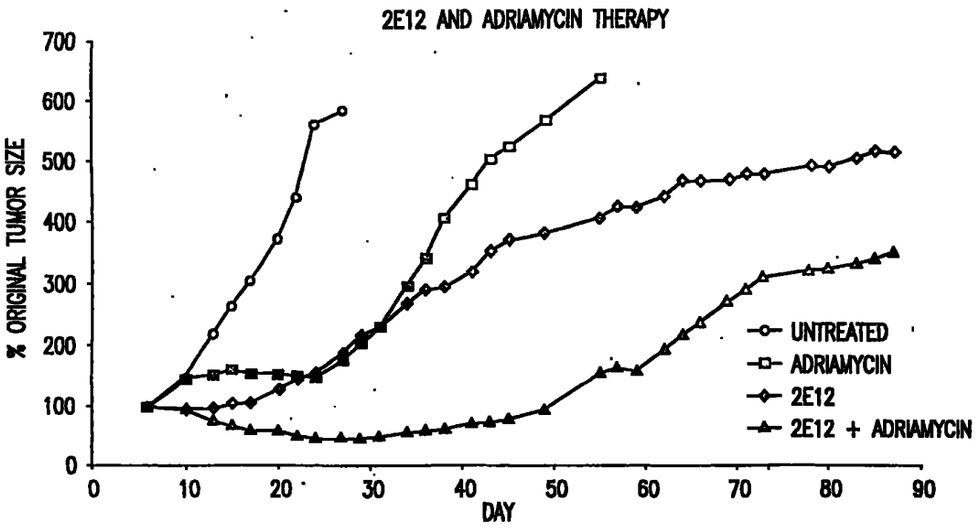


FIG. 20

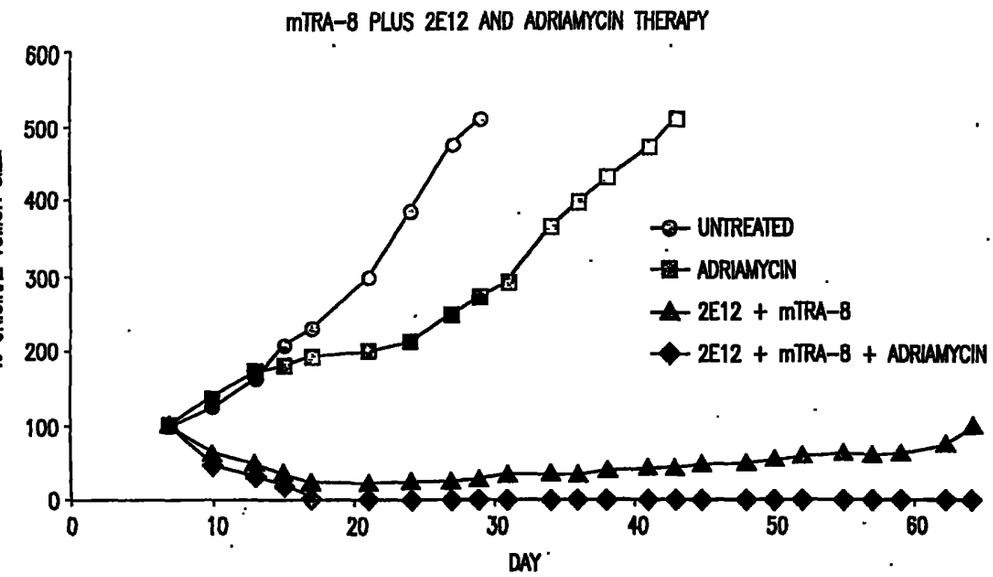


FIG. 21

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

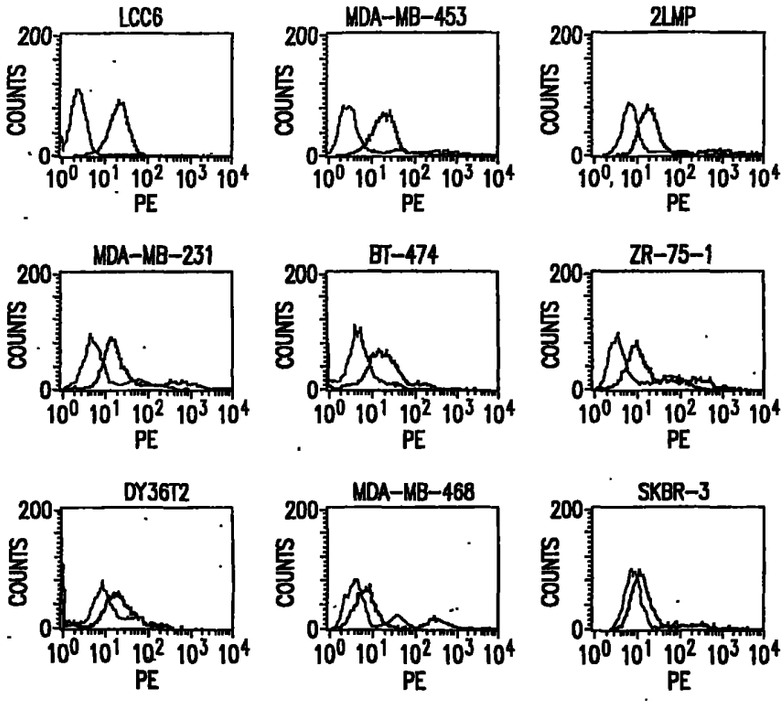


FIG. 22A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

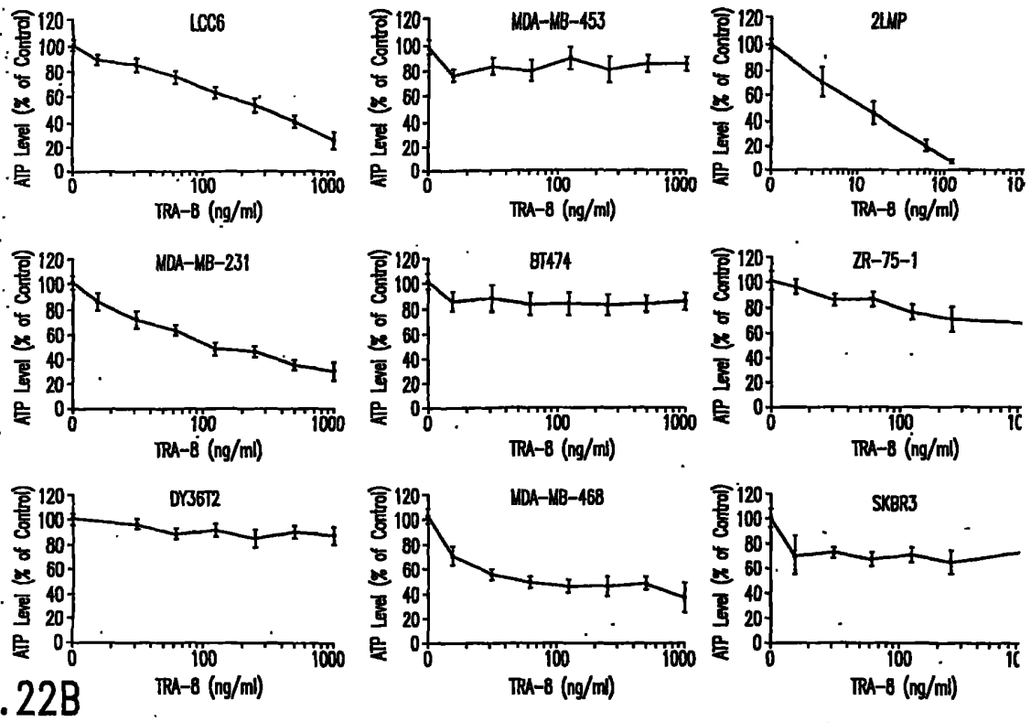


FIG. 22B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

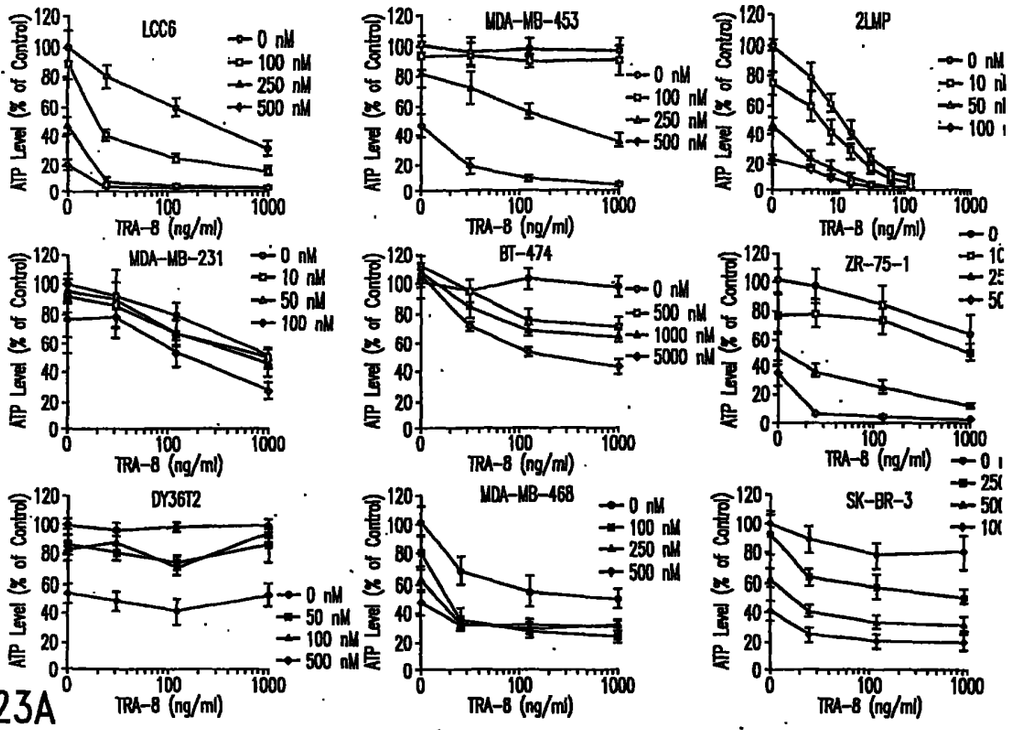


FIG. 23A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

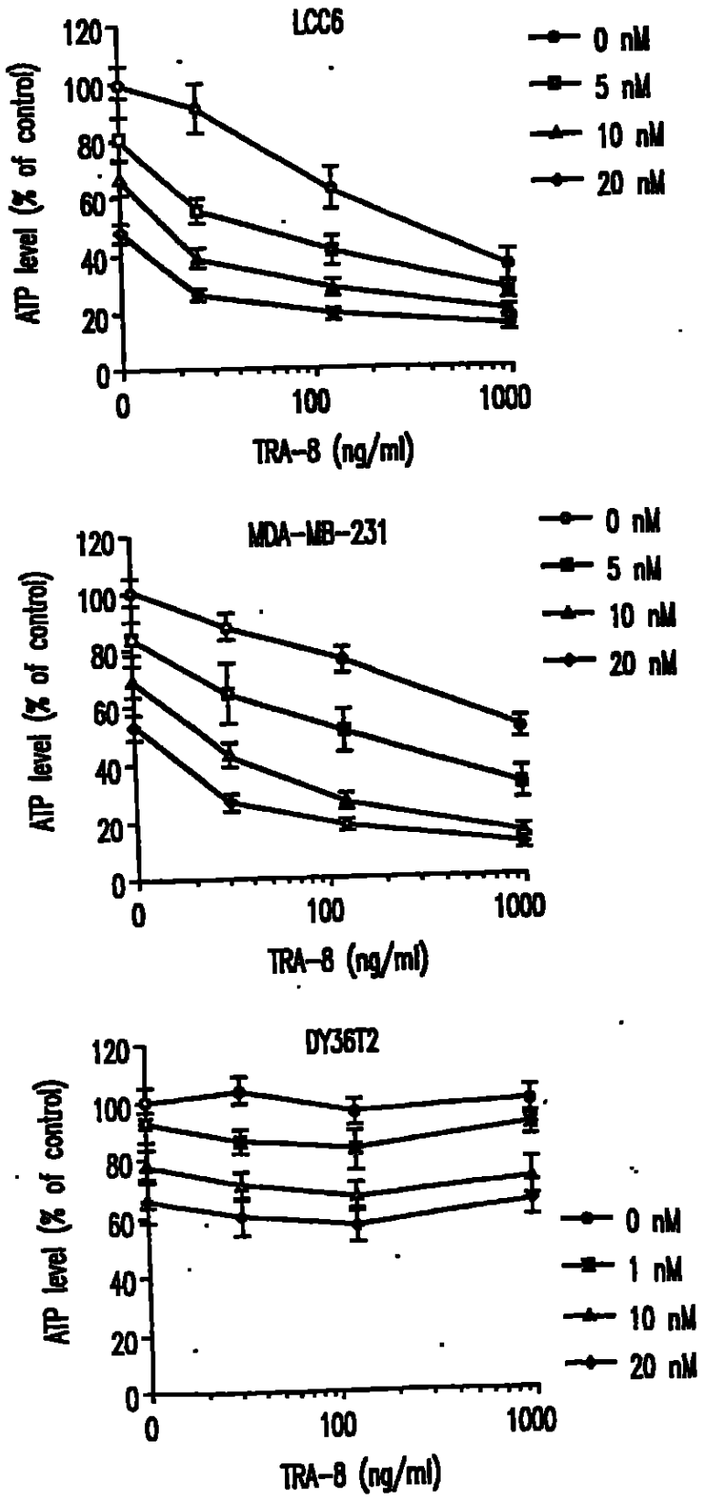

LCC6
ATP level (% of control)
TRA-8 (ng/ml)
0 nM
5 nM
10 nM
20 nM
MDA-MB-231
ATP level (% of control)
TRA-8 (ng/ml)
0 nM
5 nM
10 nM
20 nM
DY36T2
ATP level (% of control)
TRA-8 (ng/ml)
0 nM
1 nM
10 nM
20 nM

FIG. 23B1

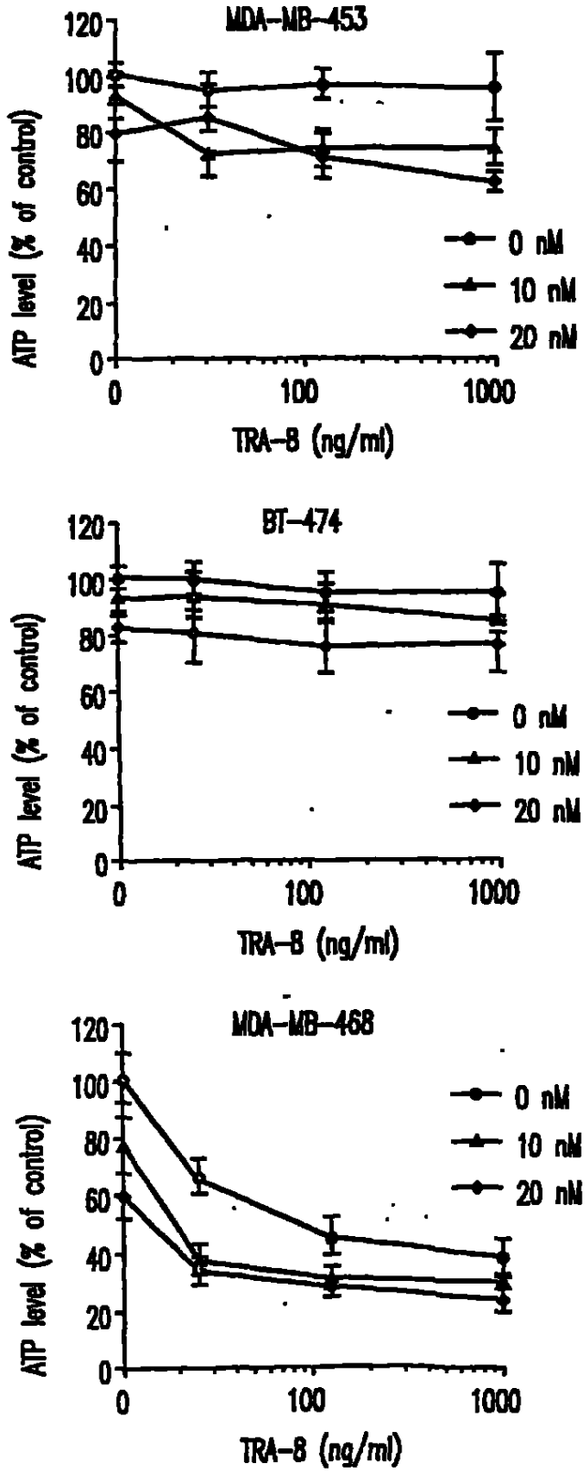

MDA-MB-453
ATP level (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
0
100
1000
TRA-8 (ng/ml)
0 nM
10 nM
20 nM
BT-474
ATP level (% of control)
TRA-8 (ng/ml)
0 nM
10 nM
20 nM
MDA-MB-468
ATP level (% of control)
TRA-8 (ng/ml)
0 nM
10 nM
20 nM

FIG. 23B2

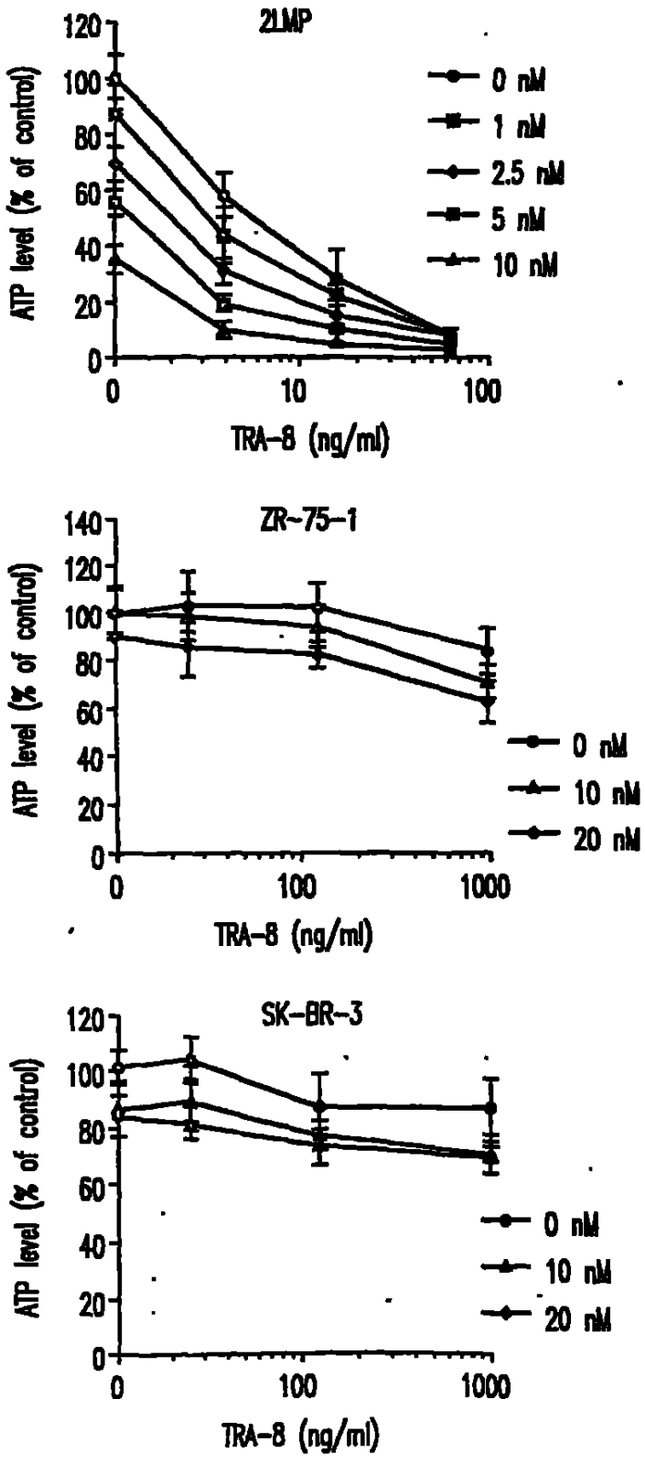

21MP
ATP level (% of control)
TRA-8 (ng/ml)
0 nM
1 nM
2.5 nM
5 nM
10 nM
ZR-75-1
ATP level (% of control)
TRA-8 (ng/ml)
0 nM
10 nM
20 nM
SK-BR-3
ATP level (% of control)
TRA-8 (ng/ml)
0 nM
10 nM
20 nM

FIG. 23B3

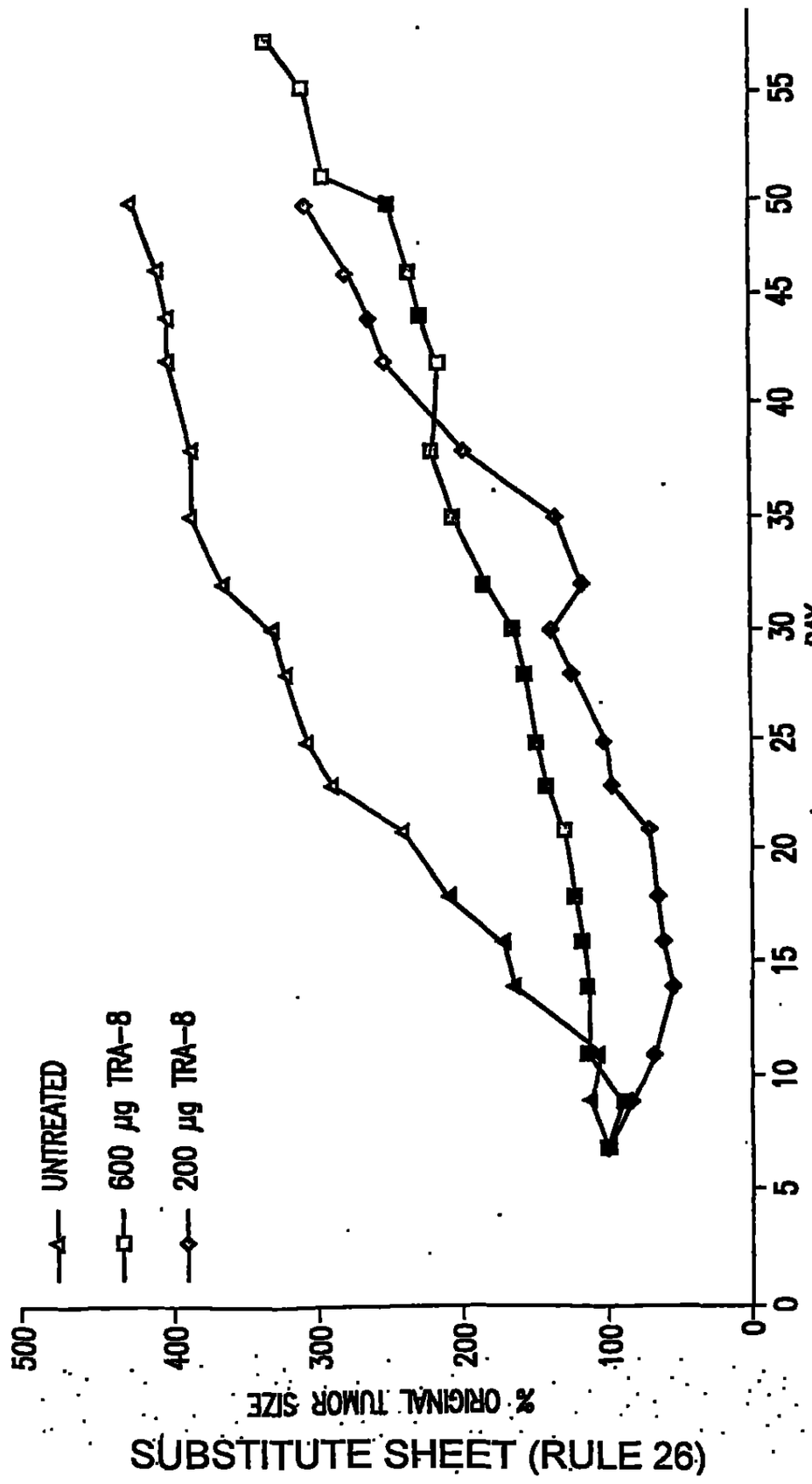

UNTREATED
600 µg TRA-8
200 µg TRA-8
% ORIGINAL TUMOR SIZE
DAY
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
100
200
300
400
500

FIG. 24

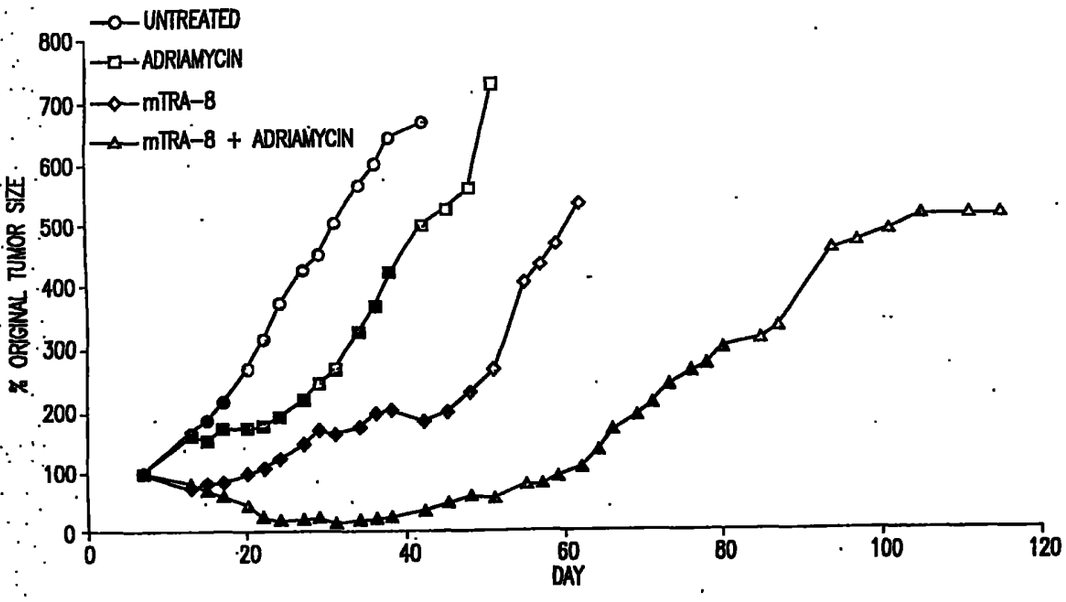


FIG. 25

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

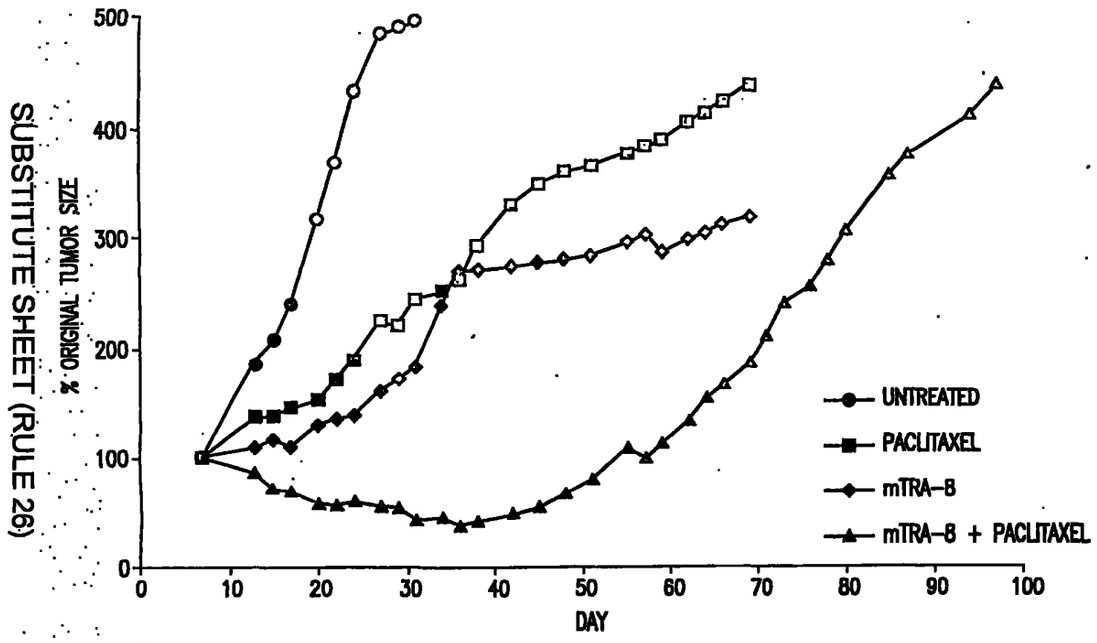


FIG. 26

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

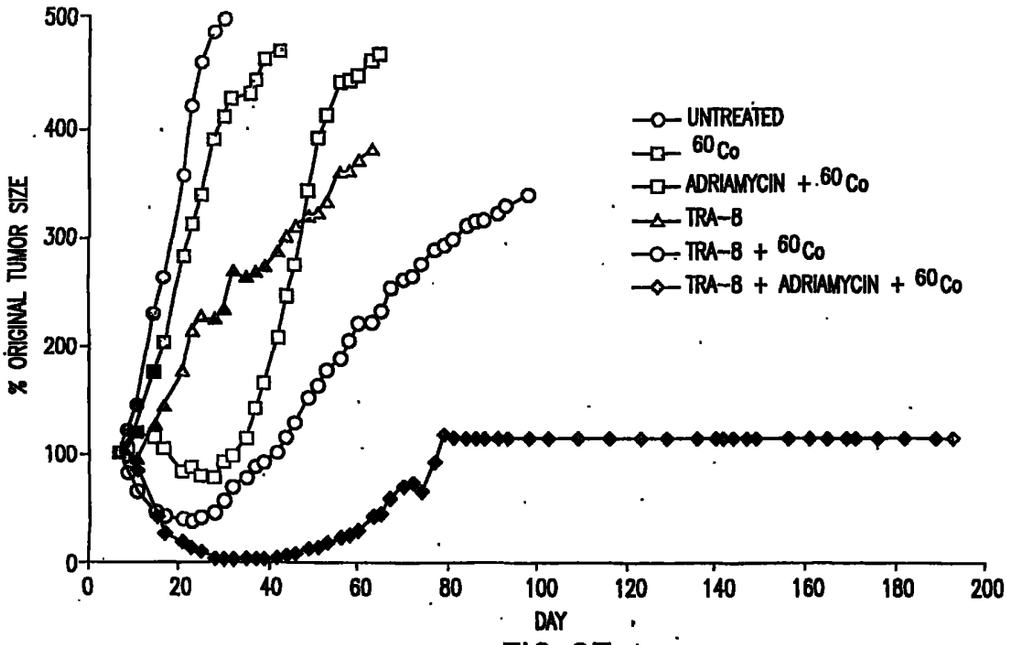


FIG. 27

SEQUENCE LISTING

<110> The UAB Research Foundation
Zhou, Tong
Ichikawa, Kimihisa
Kimberly, Robert P.
Koopman, William J.
Oshumi, Jun
LoBuglio, Albert S.
Buchsbaum, Donald J.

<120> COMBINATIONS OF ANTIBODIES SELECTIVE FOR A TUMOR NECROSIS FACTOR-RELATED APOPTOSIS-INDUCING LIGAND RECEPTOR AND OTHER THERAPEUTIC AGENTS

<130> 21085.0029P3

<150> 60/391,478

<151> 2002-06-24

<150> 60/346,402

<151> 2001-11-01

<150> PCT/US01/14151

<151> 2001-05

<150> 60/201,344

<151> 2000-05-02

<160> 102

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 1
gacgatgccc gatctacttt aaggg 25

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 2
ccactgggtg atgttggatg gg 22

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 3
ggatccgtgg acacattcga tgtc 24

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 4

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu
20

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 5

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser
20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 6
cagcactgaa cacggacccc 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 7
aaaggtaatt tattgagaag 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 8
cctcaccatg aacttcgggc 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 9
ctgttgtatg cacatgagac 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 10
gaagtgatgc tggtggagtc 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 11
agtgtgaagt gatgctggtg 20

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 12
tttaccagga gagtgggaga g 21

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 13
tgcagagaca gtgaccagag 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 14
tgttcaggac cagcatgggc 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 15
aagacatttt ggattctaac 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 16
tatcatgaag tctttgtatg 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 17
gatggagaca cattctcagg 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 18
gacattgtga tgacccagtc 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 19
ttaacactca ttcctgttga 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 20
gactgggtca tcacaatgtc 20

<210> 21

<211> 1386

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 21
atgaacttcg ggctcagctt gattttcctt gtccttgttt taaaaggtgt ccagtgtgaa 60

gtgatgctgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gagggtccct gaaactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatgtaatgt cttgggttcg ccagactccg 180

gagaagaggc tggagtgggt cgcaaccatt agtagtggtg gtagttacac ctactatcca 240

gacagtgtga aggggcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300

caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcaag acggggggac 360

tctatgatta cgacggacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctcagccaaa 420

acgacacccc catctgtcta tccactggcc cctggatctg ctgcccaaac taactccatg 480

gtgaccctgg gatgcctggt caagggctat ttccctgagc cagtgacagt gacctggaac 540

tctggatccc tgtccagcgg tgtgcacacc ttcccagctg tcctgcagtc tgacctctac 600

actctgagca gctcagtgac tgtccctcc agcacctggc ccagcgagac cgtcacctgc 660

aacgttgccc acccggccag cagcaccaag gtggacaaga aaattgtgcc cagggattgt 720

ggttgtaagc cttgcatatg tacagtccca gaagtatcat ctgtcttcat cttcccccca 780

aagcccaagg atgtgctcac cattactctg actcctaagg tcacgtgtgt tgtggtagac 840

atcagcaagg atgatcccga ggtccagttc agctggtttg tagatgatgt ggaggtgcac 900

acagctcaga cgcaaccccg ggaggagcag ttcaacagca ctttccgctc agtcagtgaa 960

cttcccatca tgcaccagga ctggctcaat ggcaaggagt tcaaatgcag ggtcaacagt 1020

gcagctttcc ctgccccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaaggcag accgaaggct 1080

ccacaggtgt acaccattcc acctcccaag gagcagatgg ccaaggataa agtcagtctg 1140

acctgcatga taacagactt cttccctgaa gacattactg tggagtggca gtggaatggg 1200

cagccagcgg agaactacaa gaacactcag cccatcatgg acacagatgg ctcttacttc 1260

gtctacagca agctcaatgt gcagaagagc aactgggagg caggaaatac tttcacctgc 1320

tctgtgttac atgagggcct gcacaaccac catactgaga agagcctctc ccactctcct 1380

ggtaaa 1386

<210> 22

<211> 705

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 22

atgaagtctt tgtatgtgtt agtgtataca cattatctgt ttctgtttgc aggtgttgaa 60

ggagacattg tgatgaccca gtctcacaaa ttcatgtcca catcagtagg agacagggtc 120

agcatcacct gcaaggccag tcaggatgtg ggtactgctg tagcctggta tcaacagaaa 180

ccagggcaat ctcctaaact actgatttac tgggcatcca cccggcacac tggagtccct 240

gatcgcttca caggcagtgg atctgggaca gatttcactc tcaccattag caatgtgcag 300

tctgaagact tggcagatta tttctgtcag caatatagca gctatcggac gttcggtgga 360

ggcaccaagc tggaaatcaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 420

tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac 480

cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 540

aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg 600

ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca 660

tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttaa 705

<210> 23

<211> 462

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 23

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Val Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Asp Ser Met Ile Thr Thr Asp Tyr Trp
115 120 125

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

Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met
145 150 155 160

Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175

Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val
195 200 205

Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His
210 215 220

Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys
225 230 235 240

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
245 250 255

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
260 265 270

Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
275 280 285

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
290 295 300

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
305 310 315 320

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
325 330 335

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
340 345 350

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
355 360 365

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
370 375 380

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
385 390 395 400

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
405 410 415

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
420 425 430

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
435 440 445

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 24

<211> 234

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 24

Met Lys Ser Leu Tyr Val Leu Val Tyr Thr His Tyr Leu Phe Leu Phe
1 5 10 15

Ala Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met
20 25 30

Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln
35 40 45

Asp Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
50 55 60

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Ser Ser Tyr Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
130 135 140

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
165 170 175

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
195 200 205

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
210 215 220

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225 230

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 25

Ser Tyr Val Met Ser
1 5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 26

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 27

Arg Gly Asp Ser Met Ile Thr Thr Asp Tyr
1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 28

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 29

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 30

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Arg Thr
1 5

<210> 31

<211> 119

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 31

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Val Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Asp Ser Met Ile Thr Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 32

<211> 80

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 32
ttggataagc ttggcttgac ctcaccatgg gatggagctg tatcatcctc ttcttggtag 60

caacagctac aggtgtccac 80

<210> 33

<211> 80

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 33
tctgaagtaa tgctggtgga gtctgggggа ggcttagtac agcctggagg gtccctgaga 60

ctctcctgtg cagcctctgg 80

<210> 34

<211> 80

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 34
attcactttc agtagttatg taatgtcttg ggttcggcag gcaccaggga agggtctgga 60

gtgggttgca accattagta 80

<210> 35

<211> 80

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 35
gtggtggtag ttacacctac tatccagaca gtgtgaaggg ccgattcacc atctccagag 60

acaatgccaa gaacaccctg 80

<210> 36

<211> 80

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 36
tatctgcaaa tgaacagtct gagagcagag gacacggctg tttattactg tgcaagaagg 60

ggtgactcta tgattacgac 80

<210> 37

<211> 64

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 37
ggactactgg ggccaaggga ccctggtcac agtctcctca gcctccacca agggcccatc 60

ggtc 64

<210> 38

<211> 60

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 38
ctaccaagaa gaggatgata cagctccatc ccatggtgag gtcaagccaa gcttatccaa 60

<210> 39

<211> 80

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 39
tctcagggac cctccaggct gtactaagcc tccccccagac tccaccagca ttacttcaga 60

gtggacacct gtagctgttg 80

<210> 40

<211> 80

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 40
tccagaccct tccctggtgc ctgccgaacc caagacatta cataactact gaaagtgaat 60

ccagaggctg cacaggagag 80

<210> 41

<211> 80

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 41
ctctggagat ggtgaatcgg cccttcacac tgtctggata gtaggtgtaa ctaccaccac 60

tactaatggt tgcaacccac 80

<210> 42

<211> 80

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 42
ccttcttgca cagtaataaa cagccgtgtc ctctgctctc agactgttca tttgcagata 60

cagggtgttc ttggcattgt 80

<210> 43

<211> 84

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 43
gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtgacc agggtccctt ggccccagta 60

gtccgtcgta atcatagagt cacc 84

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 44
ttggataagc ttggcttgac 20

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 45
gaccgatggg cccttggtgg a 21

<210> 46

<211> 213

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 46

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Arg Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 47

<211> 34

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 47
cccaagctta agaagcatcc tctcatctag ttct 34

<210> 48

<211> 45

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 48
cccgaattct tactaacact ctcccctgtt gaagctcttt gtgac 45

<210> 49

<211> 60

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 49
gtccccccaca gatgcagaca aagaacttgg agattgggtc atcacaatgt caccagtgga 60

<210> 50

<211> 48

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 50
ccaagttctt tgtctgcatc agtaggagac agggtcacca tcacctgc 48

<210> 51

<211> 57

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 51
agtgtgccgg gtggatgccc agtaaatcag tagtttagga gctttccctg gtttctg 57

<210> 52

<211> 48

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 52
tgggcatcca cccggcacac tggggtccca agcaggttta gtggcagt 48

<210> 53

<211> 63

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 53
ataactacta tattgctgac agtaataggt tgcaaaatcc tccggctgca gactagagat 60

ggt 63

<210> 54

<211> 63

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 54
cagcaatata gcagctatcg gacgttcggt caaggcacca aggtggaaat caaacggact 60

gtg 63

<210> 55

<211> 711

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 55

atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt 60

gacattgtga tgacccaatc tccaagttct ttgtctgcat ctgtgggggа cagggtcacc 120

atcacctgca aggccagtca ggatgtgggt actgctgtag cctggtatca acagaaacca 180

gggaaagctc ctaaactact gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg ggtcccaagc 240

aggtttagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcaccctca ccatctctag tctgcagccg 300

gaggattttg caacctatta ctgtcagcaa tatagtagtt atcggacgtt cggtcaaggc 360

accaaggtgg aaatcaaacg gactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 420

gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480

agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540

agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600

agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 660

agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt agtaagaatt c 711

<210> 56

<211> 119

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 56

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Val Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Asp Ser Met Ile Thr Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 57

<211> 80

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 57
tctgaagtac agctggtgga gtctgggggа ggcttagtac agcctggagg gtccctgaga 60

ctctcctgtg cagcctctgg 80

<210> 58

<211> 80

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 58
tctcagggac cctccaggct gtactaagcc tcccccagac tccaccagct gtacttcaga 60

gtggacacct gtagctgttg 80

<210> 59

<211> 119

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 59

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Val Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Asp Ser Met Ile Thr Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 60

<211> 119

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 60

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Val Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Asp Ser Met Ile Thr Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 61

<211> 119

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 61

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Val Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Asp Ser Met Ile Thr Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 62

<211> 80

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 62
tatctgcaaa tgagcagtct gagagcagag gacacggctg tttattactg tgcaagaagg 60

ggtgactcta tgattacgac 80

<210> 63

<211> 80

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 63
ccttcttgca cagtaataaa cagccgtgtc ctctgctctc agactgttca tttgcagata 60

cagggtgttc ttggcattgt 80

<210> 64

<211> 80

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 64
attcactttc agtagttatg taatgtcttg ggttcggcag actccagaga agaggctgga 60

gtgggttgca accattagta 80

<210> 65

<211> 80

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 65
tccagcctct tctctggagt ctgccgaacc caagacatta cataactact gaaagtgaat 60

ccagaggctg cacaggagag 80

<210> 66

<211> 80

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 66
tctgaagtaa tgctggtgga gtctggggga ggcttagtaa agcctggagg gtccctgaaa 60

ctctcctgtg cagcctctgg 80

<210> 67

<211> 80

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 67
tatctgcaaa tgagcagtct gagatctgag gacacggcta tgtattactg tgcaagaagg 60

ggtgactcta tgattacgac 80

<210> 68

<211> 64

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 68
ggactactgg ggccaaggga ccactctcac agtctcctca gcctccacca agggcccatc 60

ggtc 64

<210> 69

<211> 80

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 69
tttcagggac cctccaggct ttactaagcc tcccccagac tccaccagca ttacttcaga 60

gtggacacct gtagctgttg 80

<210> 70

<211> 80

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 70
ccttcttgca cagtaataca tagccgtgtc ctcagatctc agactgctca tttgcagata 60

cagggtgttc ttggcattgt 80

<210> 71

<211> 70

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 71
gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtgaga gtggtccctt ggccccagta 60

gtccgtcgta 70

<210> 72

<211> 212

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 72

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Arg Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu
210

<210> 73

<211> 213

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 73

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Arg Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 74

<211> 213

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 74

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Arg Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 75

<211> 213

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 75

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Arg Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 76

<211> 213

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 76

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Gly Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 77

<211> 60

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 77
gtccccccaca gatgcagaca aagaacttgg agattgggtc atctgaatgt caccagtgga 60

<210> 78

<211> 65

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 78
atctagttct cagagatgga gacagacaca atcctgctat gggtgctgct gctctgggtt 60

ccagg 65

<210> 79

<211> 69

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 79
cagcacccat agcaggattg tgtctgtctc catctctgag aactagatga gaggatgctt 60

cttaagctt 69

<210> 80

<211> 67

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 80
ctccactggt gacattgtga tgacccaatc tccaagttct ttgtctgcat ctgtggggga 60

cagggtc 67

<210> 81

<211> 54

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 81
acttggagat tgggtcatca caatgtcacc agtggagcct ggaacccaga gcag 54

<210> 82

<211> 67

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 82
accatcacct gcaaggccag tcaggatgtg ggtactgctg tagcctggta ccaacagaaa 60

ccaggaa 67

<210> 83

<211> 72

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 83
tacagcagta cccacatcct gactggcctt gcaggtgatg gtgaccctgt cccccacaga 60

tgcagacaaa ga 72

<210> 84

<211> 71

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 84
aagcacccaa actcctcatc tattgggcat ccacccggca cactggggtc ccagataggt 60

ttacaggcag t 71

<210> 85

<211> 72

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 85
cccagtgtgc cgggtggatg cccaatagat gaggagtttg ggtgcttttc ctggtttctg 60

ttggtaccag gc 72

<210> 86

<211> 63

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 86
gggtctggga cagacttcac cctcaccatc tctagtctgc agccggagga ttttgcaacc 60

tat 63

<210> 87

<211> 60

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 87
actagagatg gtgagggtga agtctgtccc agacccactg cctgtaaacc tatctgggac 60

<210> 88

<211> 57

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 88
tactgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttcggtcaag gcaccaaggt ggaaatc 57

<210> 89

<211> 57

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 89
cgtccgatag ctgctatatt gctgacagta ataggttgca aaatcctccg gctgcac 57

<210> 90

<211> 51

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 90
aaacggactg tggctgcacc atctgtcttc atcttcccgc catctgatga g 51

<210> 91

<211> 63

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 91
gaagatgaag acagatggtg cagccacagt ccgtttgatt tccaccttgg tgccttgacc 60

gaa 63

<210> 92

<211> 57

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 92
ttctgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttcggtcaag gcaccaaggt ggaaatc 57

<210> 93

<211> 57

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 93
cgtccgatag ctgctatatt gctgacagaa ataggttgca aaatcctccg gctgcag 57

<210> 94

<211> 63

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 94
gggtctggga cagacttcac cctcaccatc tctagtctgc agccggagga ttttgcagat 60

tat 63

<210> 95

<211> 57

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 95
ttctgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttcggtggag gcaccaaggt ggaaatc 57

<210> 96

<211> 57

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 96
cgtccgatag ctgctatatt gctgacagaa ataatctgca aaatcctccg gctgcag 57

<210> 97

<211> 51

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 97
tgatgtggac atgaatttgt gagactgggt catcacaatg tcaccagtgg a 51

<210> 98

<211> 51

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 98
tgggttccag gctccactgg tgacattgtg atgacccagt ctcacaaatt c 51

<210> 99

<211> 49

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 99
aagacagatg gtgcagccac agcccgtttg atttccagct tggtgcctc 49

<210> 100

<211> 45

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 100
aagctggaaa tcaaacgggc tgtggctgca ccatctgtct tcatc 45

<210> 101

<211> 30

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 101
agatttcaac tgctcatcag atggcgggaa 30

<210> 102

<211> 63

<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 102
gaagatgaag acagatggtg cagccacagt ccgtttgatt tccaccttgg tgcctccacc 60

gaa 63

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No. 172

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference *(if desired) (12 characters maximum)* 21085.0029P3

Box No. I TITLE OF INVENTION

COMBINATIONS OF ANTIBODIES SELECTIVE FOR A TUMOR NECROSIS FACTOR-RELATED APOPTOSIS-INDUCING LIGAND RECEPTOR AND OTHER THERAPEUTIC AGENTS

Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

UAB RESEARCH FOUNDATION
701 South 20th Street, Suite 1120G
Birmingham, Alabama 35294
United States of America

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

ZHOU, Tong
332 West Stonebrook Place
Birmingham, Alabama 35226
United States of America

This person is:
☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: CH

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☒ agent ☐ common representative

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

McKeon, Tina Williams
NEEDLE & ROSENBERG, P.C.
The Candler Building
127 Peachtree Street, N.E.
Atlanta, Georgia 30303-1811
United States of America

Telephone No.
(404) 688-0770

Facsimile No.
(404) 688-9880

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office
43,791

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S) FF

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not to be included in the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*
ICHIKAWA, Kimihisa
1-3-42-205 Teraya, Tsurumi-ku, Yokohama-shi
Kanagawa-ken 230-0015
Japan

This person is:
☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: JP

State *(that is, country)* of residence: JP

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*
KIMBERLY, Robert P.
2045 Magnolia Ridge
Birmingham, Alabama 35243
United States of America

This person is:
☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*
KOOPMAN, William J.
187 Wildwood Avenue
Indian Springs, Alabama 35124
United States of America

This person is:
☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*
OSHUMI, Jun
21-38 Edahigashi-2-chome
Tsuduki-ku Yokohama-shi
Kanagawa-ken 224-0006
Japan

This person is:
☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: JP

State *(that is, country)* of residence: JP

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

174

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not to be included in the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

LOBUGLIO, Albert F.
2204 Tanglewood Road
Birmingham, Alabama 35216
United States of America

This person is:

- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

BUCHSBAUM, Donald J.
1013 32nd Street South
Birmingham, Alabama 35205
United States of America

This person is:

- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:

- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:

- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only. ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

125

Box No.V DESIGNATION OF STATES *Mark the applicable check-boxes below; at least one must be marked.*

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a):

Regional Patent

☒ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZM Zambia, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT *(if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)* .....

☒ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian

☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, BG Bulgaria, CH & LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, CZ Czech Republic, DE Germany, DK Denmark, EE Estonia, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, SK Slovakia, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

☒ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GQ Equatorial Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT *(if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)* .....

National Patent *(if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):*

☒	AE	United Arab Emirates	☒	GM	Gambia	☒	NZ New Zealand
☒	AG	Antigua and Barbuda	☒	HR	Croatia	☒	OM Oman
☒	AL	Albania	☒	HU	Hungary	☒	PH Philippines
☒	AM	Armenia	☒	ID	Indonesia	☒	PL Poland
☒	AT	Austria	☒	IL	Israel	☒	PT Portugal
☒	AU	Australia	☒	IN	India	☒	RO Romania
☒	AZ	Azerbaijan	☒	IS	Iceland	☒	RU Russian Federation
☒	BA	Bosnia and Herzegovina	☒	JP	Japan		
☒	BB	Barbados	☒	KE	Kenya	☒	SD Sudan
☒	BG	Bulgaria	☒	KG	Kyrgyzstan	☒	SE Sweden
☒	BR	Brazil	☒	KP	Democratic People's Republic	☒	SG Singapore
☒	BY	Belarus			of Korea	☒	SI Slovenia
☒	BZ	Belize	☒	KR	Republic of Korea	☒	SK Slovakia
☒	CA	Canada	☒	KZ	Kazakhstan	☒	SL Sierra Leone
☒	CH & LI	Switzerland and Liechtenstein	☒	LC	Saint Lucia	☒	TJ Tajikistan
☒	CN	China	☒	LK	Sri Lanka	☒	TM Turkmenistan
☒	CO	Colombia	☒	LR	Liberia	☒	TN Tunisia
☒	CR	Costa Rica	☒	LS	Lesotho	☒	TR Turkey
☒	CU	Cuba	☒	LT	Lithuania	☒	TT Trinidad and Tobago
☒	CZ	Czech Republic	☒	LU	Luxembourg		
☒	DE	Germany	☒	LV	Latvia	☒	TZ United Republic of Tanzania
☒	DK	Denmark	☒	MA	Morocco	☒	UA Ukraine
☒	DM	Dominica	☒	MD	Republic of Moldova	☒	UG Uganda
☒	DZ	Algeria				☒	US United States of America
☒	EC	Ecuador	☒	MG	Madagascar		
☒	EE	Estonia	☒	MK	The former Yugoslav Republic of	☒	UZ Uzbekistan
☒	ES	Spain			Macedonia	☒	VN Viet Nam
☒	FI	Finland	☒	MN	Mongolia	☒	YU Yugoslavia
☒	GB	United Kingdom	☒	MW	Malawi	☒	ZA South Africa
☒	GD	Grenada	☒	MX	Mexico	☒	ZM Zambia
☒	GE	Georgia	☒	MZ	Mozambique	☒	ZW Zimbabwe
☒	GH	Ghana	☒	NO	Norway		

Check-boxes below reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

☒	VC St. Vincent and the Grenadines	☐		☐	
☐		☐		☐	

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. *(Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)*

176

Supplemental Box *If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.*

1. *If, in any of the Boxes, except Boxes Nos VIII(i) to (v) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No...." (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:*

(i) *if more than two persons are to be indicated as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;*

(ii) *if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;*

(iii) *if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;*

(iv) *if, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;*

(v) *if, in Box No. V, the name of any State (or OAPI) is accompanied by the indication "patent of addition," or "certificate of addition," or if, in Box No. V, the name of the United States of America is accompanied by an indication "continuation" or "continuation-in-part": in such case, write "Continuation of Box No. V" and the name of each State involved (or OAPI), and after the name of each such State (or OAPI), the number of the parent title or parent application and the date of grant of the parent title or filing of the parent application;*

(vi) *if, in Box No. VI, there are more than five earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.*

2. *If, with regard to the precautionary designation statement contained in Box No. V, the applicant wishes to exclude any State(s) from the scope of that statement: in such case, write "Designation(s) excluded from precautionary designation statement" and indicate the name or two-letter code of each State so excluded.*

Continuation of Box No. IV:

NEEDLE, William H.; ROSENBERG, Sumner C.; PERRYMAN, David G.; KATZ, Mitchell A.; KIRSCH, Gregory J.; SPRATT, Gwendolyn D.; SETTY, Nagendra; JOHNSON, William R.; FAILS, Charles H.; ADES, Patricia L.; BECKER, Bruce L.; CORIN, Shari J.; DeCARLO, Kean J.; DERRICK, Wesley B.; FERNANDEZ, Lizette M.; HODGES, Robert A.; HUIZENGA, David E.; HUTTER, Jacqueline M.; MAXWELL, Lawrence D.; McKEON, Tina W.; MEADOWS, Brian C.; MEDLIN, Jennifer P.; MURPHY, Mark A.; VILLANUEVA, Lawrence A.; ZIDAR, Bernard L.

177

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application *(day/month/year)*	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 24 June 2002 (03/10/02)	60/391,478	US		
item (2) 01 November 2001 (01/11/01)	60/346,402	US		
item (3)				
item (4)				
item (5)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) *(only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office)* identified above as:

☐ all items ☒ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ item (4) ☐ item (5) ☐ other, see Supplemental Box

** Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)):* .....

.....

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) *(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):*

ISA/ US.....

Request to use results of earlier search; reference to that search *(if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):*

Date *(day/month/year)*	Number	Country *(or regional Office)*

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration)*:		Number of declarations
☐ Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor	:
☐ Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	:
☐ Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	:
☐ Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	:
☐ Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	:

178

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains:

(a) the following number of sheets in paper form:

request (including declaration sheets)	:	7
description (excluding sequence listing part)	:	176
claims	:	12
abstract	:	1
drawings	:	49
Sub-total number of sheets	:	245
sequence listing part of description *(actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (b) below)*	:	35
Total number of sheets	:	280

(b) sequence listing part of description filed in computer readable form

(i) ☐ only (under Section 801 (a)(i))

(ii) ☒ in addition to being filed in paper form (under Section 801 (a)(ii))

Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which the sequence listing part is contained *(additional copies to be indicated under item 9(ii), in right column)*:

1. diskette

This international application is accompanied by the following item(s) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item)*:

		Number of items
1. ☒ fee calculation sheet	:	1
2. ☐ original separate power of attorney	:	
3. ☐ original general power of attorney	:	
4. ☒ copy of general power of attorney; reference number, if any:	:	1
5. ☐ statement explaining lack of signature	:	
6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	:	
7. ☐ translation of international application into *(language)*:	:	
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:	
9. ☒ sequence listing in computer readable form (indicate also type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other))		
(i) ☒ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13*ter* only (and not as part of the international application)	:	1
(ii) ☐ *(only where check-box (b)(i) or (b)(ii) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13*ter*	:	
(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing part mentioned in left column	:	
10. ☒ other *(specify)*: postcard and transmittal letter	:	

Figure of the drawings which should accompany the abstract:

Language of filing of the international application: English

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Tina Williams McKeon, Agent

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:		2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA/	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application.

179

PCT

FEE CALCULATION SHEET

Annex to the Request

For receiving Office use only

International Application No.

Date stamp of the receiving Office

Applicant's or agent's file reference: 21085.0029P3

Applicant: UAB Research Foundation

CALCULATION OF PRESCRIBED FEES

1. TRANSMITTAL FEE ..... 240.00 T

2. SEARCH FEE ..... 700.00 S

International search to be carried out by ISA/US

(If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the name of the Authority which is chosen to carry out the international search.)

3. INTERNATIONAL FEE

Basic Fee

Where item (b) of Box No. IX applies, enter Sub-total number of sheets
Where item (b) of Box No. IX does not apply, enter Total number of sheets } 280

b1 first 30 sheets 382.00 b1

b2 .250 (number of sheets) x 9.00 (fee per sheet) = 2,250.00 b2

b3 additional component (only if sequence listing part of description is filed in computer readable form under Section 801(a)(i), or both in that form and on paper, under Section 801(a)(ii)):

400 x _____ (fee per sheet) = _____ b3

Add amounts entered at b1, b2 and b3 and enter total at B ... 2,832.00 B

Designation Fees

The international application contains 117 designations.

5 (number of designation fees payable *(maximum 5)*) x 88.00 (amount of designation fee) = 440.00 D

Add amounts entered at B and D and enter total at I ..... 3,072.00 I

(Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the international fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the

4. FEE FOR PRIORITY DOCUMENT *(if applicable)* ..... 30.00 P

5. TOTAL FEES PAYABLE ..... 4,042.00 TOTAL

Add amounts entered at T, S, I and P, and enter total in the TOTAL box

☐ The designation fees are not paid at this time.

MODE OF PAYMENT

☐ authorization to charge ☐ postal money order ☐ cash ☐ coupons

☐ cheque ☐ bank draft ☐ revenue stamps ☒ other *(specify)*: credit card form

AUTHORIZATION TO CHARGE (OR CREDIT) DEPOSIT ACCOUNT

(This mode of payment may not be available at all receiving Offices)

Receiving Office: RO/ US

☐ Authorization to charge the total fees indicated above.

Deposit Account No.: 14-0629

☒ *(This check-box may be marked only if the conditions for deposit accounts of the receiving Office so permit)* Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.

Date: 25 October 2002

Name: TingWilliams McKeon

☐ Authorization to charge the fee for priority document.

Signature: [signature]

Form PCT/RO/101 (Annex) (January 2002; reprint July 2002)
LegalStar 2002, Form PCTREQ

See Notes to the fee calculation sheet

DSP Tum 102 mm

By [illegible] 02/20/04

Received [illegible] PCT

PCT/US2002/034420

180

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MCKEON, Tina, Williams
Needle & Rosenberg, P.C.
The Candler Building
127 Peachtree Street, N.E.
Atlanta, GA 30303-1811
United States of America

RECEIVED
FEB 20 2004
NEEDLE & ROSENBERG

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 27 January 2004 (27.01.2004)	
Applicant's or agent's file reference 21085.0029P3	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2002/034420	International filing date (day/month/year) 25 October 2002 (25.10.2002)
International publication date (day/month/year) 08 May 2003 (08.05.2003)	Priority date (day/month/year) 01 November 2001 (01.11.2001)
Applicant UAB RESEARCH FOUNDATION et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. (If applicable) An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
01 Nove 2001 (01.11.2001)	60/346,402	US	31 Janu 2003 (31.01.2003)
24 June 2002 (24.06.2002)	60/391,478	US	31 Janu 2003 (31.01.2003)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Junko TAKEUCHI (Fax: 338 71 30)
Facsimile No. (41-22) 338.71.30	Telephone No. (41-22) 338 8448

Form PCT/IB/304 (January 2004)

008074257

DPP/Tw/JSL/mmo
DOCKETED
By: Date: 5/23/03
Filename/Date
PCT

WO 03/038043
PCT/US02/34420

ENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

181

To:

MCKEON, Tina, Williams
Needle & Rosenberg, P.C.
The Candler Building
127 Peachtree Street, N.E.
Atlanta, GA 30303-1811
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

RECEIVED
MAY 23 2003
NEEDLE & ROSENBERG

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

Date of mailing *(day/month/year)* 08 May 2003 (08.05.03)	
Applicant's or agent's file reference 21085.0029P3	IMPORTANT NOTICE

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US02/34420	25 October 2002 (25.10.02)	01 November 2001 (01.11.01)

Applicant
UAB RESEARCH FOUNDATION

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:

   KP, KR, US

   In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

   AE, AG, AL, AM, AP, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EA, EC, EE, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

   The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-*bis*)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 08 May 2003 (08.05.03) under No. 03/038043

4. TIME LIMITS for filing a demand for international preliminary examination and for entry into the national phase

   The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date, but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see *PCT Gazette* No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the *PCT Newsletter*, October and November 2001 and February 2002 issues.

   In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at http://www.wipo.int/pct/en/index.html.

   For filing a demand for international preliminary examination, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Chapter IX. Only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

   It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.(41-22) 740.14.35

Authorized officer
Judith Zahra

Telephone No.(41-22) 338.91.11

182

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more Authorities are competent, with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:

IPEA/ US

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:
The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty and hereby elects all eligible States (except where otherwise indicated).

For International Preliminary Examining Authority use only	
Identification of IPEA	Date of receipt of DEMAND

Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION		Applicant's or agent's file reference
		21085.0029P3
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority date *(day/month/year)*
PCT/US02/34420	25 October 2002	01 November 2001

Title of invention
Combinations of Antibodies Selective for a Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor and Other Therapeutic Agents

Box No. II APPLICANT(S)

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*	Telephone No.
UAB RESEARCH FOUNDATION 701 South 20th Street, Suite 1120G Birmingham, Alabama 35294 United States of America	Facsimile No.
	Teleprinter No.
	Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:
US	US

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*
ZHOU, Tong
332 West Stonebrook Place
Birmingham, Alabama 35226
United States of America

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:
CH	US

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*
ICHIKAWA, Kimihisa
1-3-42-205 Teraya, Tsurumi-ku, Yokohama-shi
Kanagawa-ken 230-0015
Japan

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:
JP	JP

[X] Further applicants are indicated on a continuation sheet.

Sheet No. 2.

International application No.
PCT/US02/34420

Continuation of Box No. II APPLICANT(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the demand.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

KIMBERLY, Robert P.
2045 Magnolia Ridge
Birmingham, Alabama 35243
United States of America

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:
US	US

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

KOOPMAN, William J.
187 Wildwood Avenue
Indian Springs, Alabama 35124
United States of America

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:
US	US

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

OSHUMI, Jun
21-38 Edahigashi-2-chome
Tuduki-ku Yokohama-shi
Kanagawa-ken 224-0006
Japan

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:
JP	JP

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

LOBUGLIO, Albert F.
2204 Tanglewood Road
Birmingham, Alabama 35216
United States of America

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:
US	US

☒ Further applicants are indicated on another continuation sheet.

Sheet No. 3.

International application No.
PCT/US02/34420

Continuation of Box No. II APPLICANT(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the demand.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

BUCHSBAUM, Donald J.
140 Windwood Circle
Montevallo, Alabama 35115
United States of America

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:
US	US

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:

☐ Further applicants are indicated on another continuation sheet.

International application No.
PCT/US02/34420

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The following person is ☒ agent ☐ common representative

and ☒ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination.

☐ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked.

☐ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

NEEDLE, William H. (35,304); ROSENBERG, Suzanne C. (39,783); PERRYMAN, David G. (35,456); KATZ, Mitchell A. (35,616); KRISCH, Gregory J. (36,570); SPRATT, Gwendolyn D. (36,618); JOHNSON, William R. (36,370); PAUL, Charles H. (37,616); LONG, William F. (31,697) MAXWELL, Lawrence D. (35,378); HUTTER, Jacqueline M. (44,769); MCKEON, Tina W. (43,701); ADEE, Patricia L. (44,488); BECKER, Bruce H. (48,894); DECARLO, Kiam J. (36,868); HODGES, Robert A. (41,074); HUZZENGA, David E. (49,089); KERVEN, David B. (45,712); MEADOWS, Brian C. (50,840); MEDLIN, Jennifer P. (41,358); MURPHY, Mark A. (49,619); ZIDAR, Bernard L. (48,820); COFIN, Sheri J. (48,940); DERRICK, Wesley B. (46,888); FERNANDEZ, Lissette M. (48,984); VILLAMIZAR, Lawrence A. (48,988); Christopher L. Carlson (32,757); and Christopher O. Green (52,904) all of NEEDLE & ROSENBERG, P.C., The Candler Building, 127 Peachtree Street, Atlanta, Georgia 30303-1811 United States of America

Telephone No.
(404) 688-0770

Facsimile No.
(404) 688-9880

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION

Statement concerning amendments:*

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

☒ the international application as originally filed

the description
☒ as originally filed
☐ as amended under Article 34

the claims
☒ as originally filed
☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)
☐ as amended under Article 34

the drawings
☒ as originally filed
☐ as amended under Article 34

2. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.

3. ☐ The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of 20 months from the priority date unless the International Preliminary Examining Authority receives a copy of any amendments made under Article 19 or a notice from the applicant that he does not wish to make such amendments (Rule 69.1(d)). *(This check-box may be marked only where the time limit under Article 19 has not yet expired.)*

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination: English

☒ which is the language in which the international application was filed.

☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.

☐ which is the language of publication of the international application.

☐ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.

Box No. V ELECTION OF STATES

The applicant hereby elects all eligible States *(that is, all States which have been designated and which are bound by Chapter II of the PCT)*

excluding the following States which the applicant wishes not to elect:

Sheet No. .5.

International application No.
PCT/US02/34420

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination:			For International Preliminary Examining Authority use only: received	not received
1. translation of international application	:	sheets	☐	☐
2. amendments under Article 34	:	sheets	☐	☐
3. copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19	:	sheets	☐	☐
4. copy (or, where required, translation) of statement under Article 19	:	sheets	☐	☐
5. letter	: 1	sheets	☐	☐
6. other *(specify)*	:	sheets	☐	☐

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

1. ☒ fee calculation sheet
2. ☐ original separate power of attorney
3. ☐ original general power of attorney
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:
5. ☐ statement explaining lack of signature
6. ☐ sequence listings in computer readable form
7. ☐ tables in computer readable form related to sequence listings
8. ☒ other *(specify)*: PTO2038- $862.00; Certificate of Express Mailing (Label No. EL924193132US)

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the demand).

Tina Williams McKeon, Agent
Reg. No. 43,791

For International Preliminary Examining Authority use only

1. Date of actual receipt of DEMAND:
2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b):
3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply. ☐ The applicant has been informed accordingly.
4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the period of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5.
5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on:

CHAPTER II

PCT

182

FEE CALCULATION SHEET

Annex to the Demand

International application No. PCT/US02/34420	For International Preliminary Examining Authority use only
Applicant's or agent's file reference 21085.0029P3	Date stamp of the IPEA

Applicant
UAB Research Foundation

CALCULATION OF PRESCRIBED FEES

1. Preliminary examination fee	$490.00	P	
2. Handling fee *(Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the handling fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the amount to be entered at H is 25% of the handling fee.)*	172.00	H	
3. Total of prescribed fees Add the amounts entered at P and H and enter total in the TOTAL box	662.00 TOTAL		

MODE OF PAYMENT

- ☐ authorization to charge deposit account with the IPEA (see below)
- ☐ cheque
- ☐ postal money order
- ☐ bank draft
- ☐ cash
- ☐ revenue stamps
- ☐ coupons
- ☒ other *(specify)*: Credit Card Payment Form PTO- 2038

AUTHORIZATION TO CHARGE (OR CREDIT) DEPOSIT ACCOUNT
(This mode of payment may not be available at all IPEAs)

IPEA/ US

- ☐ Authorization to charge the total fees indicated above.
- ☒ *(This check-box may be marked only if the conditions for deposit accounts of the IPEA so permit)* Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.

Deposit Account No.: 14-0629
Date: 25 April 2003
Name: Tina Williams McKeon
Signature:

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

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

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

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

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 L S DIBUJOS

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 uniór 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 inmunohistoquìmica 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.

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

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

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.

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

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.

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

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

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

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

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

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

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;

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

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.

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

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.

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.

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.

(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 (Chit¡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

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

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

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

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.

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,

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.

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,

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

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.

(*)

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.

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
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 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);

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 pr teína 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.

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 10^6 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) 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 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

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

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.

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.

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 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 ellàs (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 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 x 10^7), o inoculados intravenosamente con células Jurkat de leucemia humana (1 x 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-κb 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 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 cicloheximina 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 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 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.

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 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 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.

Línea 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	+	++++
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.

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.

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 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:

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

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:

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.

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 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

(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 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);

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
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 "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

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 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.

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

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.

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.

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).

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.

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 siguientes:

(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:

Viabilidad (%)=100x(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)	196	249	469	584	833	1193
SD	± 55	± 77	± 149	± 230	± 230	± 419
TRA-8	158	97	155	195	365	530
SD	± 78	±30	± 60	± 58	± 91	± 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

(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 tccccccagac tccaccagca ttacttcaga gtggacacct gtagctgttg-3' (H; ID de SEC No.39);

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

5'-tttcagggac cctccaggct ttactaagcc tccccccagac 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:

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);

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

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

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.

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.

(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 electrofóresis 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

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

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

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

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 23ª) 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

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

			Regresiones Completas		
Tratamiento	# de Animales	Tiempo de doblado de tumor (días) (medio/ mediano)	Total (%)	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.

REIVINDICACIONES

1. Una composicion que comprende (a) un anticuerpo que se enlaza especificamente a un receptor de DR5 de TRAIL, en donde dicho anticuerpo, en su forma soluble, tiene actividad de induccion de apoptosis in vivo e in vitro en celulas blanco que expresan DR5 y (b) uno o mas agentes terapeuticos.

2. La composicion de acuerdo co la reivindicacion 1, en donde el agente o agentes terapeutico(s) son seleccionados del grupo que consisite de agentes quemoterapeuticos, miembros de la familia de TNF, agentes anti-inflamatorios, agentes anti-virales, anti-retrovirales, anti-oportunistas, antibioticos, agentes immunosupresores immunoglobulinas, agentes antimalaria, medicamentos anti-reumaticos que modifica enfermedad, citoquininas, quemoquinas, factores de crecimiento, y segundos anticuerpos que promueve la apoptosis o bloquea la proliferacion de las celulas blanco.

3. La composicion de acuerdo con la revindicacion 1, que además comprende un portador farmaceuticamente aceptable.

4. La composicion de acuerdo con la reivindicacion 1, en donde el agente terapeutico es bisindolilmaleimida VIII (Bis VIII), SN-50 o LY294002.

5. La composicion de acuerdo con la reivindicacion 2, en dionde el agente o agentes terapeutico con seleccionados del grupo de quemioterapeuticos 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 composicion de acuerdo con la reivindicacion 2, en donde el agente o agentes terapueticos son seleccionados del grupo que

quemioterapeuticos que consiste de leflunomida, dactinomicina, tamoxifen, interferon α-2b, acido glutamico, 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.

533

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 04051012 00000000 Folios: 533
Fecha (AMD): 2004-06-01 17:36:20
Tramite : 411 PCT-PATENT 329 PAGO MACT 411 PRESENTE
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800174089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 39,306
FECHA : MAYO 17 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	20338569	17/05/2004	25,111,000.00

C O N C E P T O

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.
		TOTAL : $	422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Colo 13529-841-003-0

534

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DE TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCIÓN MODELO DE UTILIDAD	( )	( )
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	( )	( )
- Descripción de la invención.	( )	( )
- Dibujos de ser estos pertinentes.	( )	( )
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.		
COMPLETA ( ) INCOMPLETA	( )	( )
DISEÑO INDUSTRIAL ( )		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta	( )	( )
- la solicitud.		
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	( )	( )
Comprobante de pago de las tasas establecidas	( )	( )
COMPLETA ( ) INCOMPLETA	( )	( )
ESQUEMA DE TRAZADO ( )		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	( )	( )
- Datos de identificación del solcitante o de la persona que presenta		
La solicitud.	( )	( )
Representación gráfica del esquema de trazado	( )	( )
Comprobante de pago de las tasas establecidas.	( )	( )
COMPLETA ( ) INCOMPLETA	( )	( )

Firma Responsable:

Fecha:

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 04051012 00000000 Folios: 533
Fecha (AMD): 2004-06-01 17:36:20
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES