



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 225**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)

C07K 16/26 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02795556 .6**

96 Fecha de presentación : **25.10.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1506285**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2005**

54 Título: **Combinaciones de anticuerpos anti-DR5 y anticuerpos anti-DR4 y otros agentes terapéuticos.**

30 Prioridad: **01.11.2001 US 346402 P**
24.06.2002 US 391478 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.04.2011

73 Titular/es: **UAB RESEARCH FOUNDATION**
1120-G Administration Building
701 20th Street South
Birmingham, Alabama 35294, US

72 Inventor/es: **Zhou, Tong;**
Ichikawa, Kimihisa;
Kimberly, Robert, P.;
Koopman, William, J.;
Oshumi, Jun;
Lobuglio, Albert, F. y
Buchsbaum, Donald, J.

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 357 225 T3

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

DESCRIPCIÓN

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo capaz
5 de unirse específicamente a un único tipo de receptor de
ligando inductor de apoptosis (a partir de ahora mencionado
como "TRAIL") relacionado con el factor de necrosis tumoral
(a partir de ahora mencionado como "TNF"), más
particularmente, a un anticuerpo monoclonal que induce la
10 apoptosis en células *in vivo* e *in vitro* que expresan el tipo
único de receptor y terapias basadas en el mismo.

Antecedentes de la invención

TRAIL es un miembro de la familia de proteínas TNF, que
15 también incluye TNF- α y el ligando Fas (1). Estas proteínas
son potentes inductores de la apoptosis. Hasta la fecha, se
han identificado cinco receptores para TRAIL, dos de los
cuales, DR4 (TRAIL-R1) y DR5 (TRAIL-R2) (2-7), son capaces de
transducir la señal de apoptosis mientras que los otros tres
20 DcR1 (TRAIL-R3), DcR2 (TRAIL-R4), y la osteoprotegerina (OPG)
no transducen la señal de apoptosis (8-12). Los cinco
receptores para TRAIL comparten homología significativa en
sus dominios de unión a ligando extracelulares. Similares a
Fas y el receptor I de TNF (a partir de ahora mencionado como
25 "TNFRI"), los segmentos intracelulares tanto de DR4 como de
DR5 contienen un dominio de muerte, y transducen una señal de
apoptosis a través de una vía que implica la proteína del
dominio de muerte asociado a Fas (a partir de ahora
mencionado como "FADD") y la caspasa 8 (6,7). Además de
30 transducir la señal de apoptosis, los receptores DR4 y DR5
también pueden activar una vía que implica NF κ b (6,7).

Las funciones biológicas de TRAIL que se han demostrado

incluyen la capacidad de TRAIL de inducir de forma selectiva la apoptosis de células tumorales transformadas, siendo las células normales relativamente resistentes a la apoptosis mediada por TRAIL (13-15). Esta selectividad sugiere que, en
5 contraste con el ligando Fas, la administración de TRAIL está asociada con niveles muy bajos de toxicidad como se demuestra por la administración sistémica de TRAIL en un modelo animal sin inducir toxicidad significativa (13). Por tanto, se ha propuesto TRAIL como un potente agente inductor de la
10 apoptosis que sería un agente terapéutico adecuado para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades asociadas con la proliferación celular anormal. También se ha propuesto que TRAIL es un potente agente inductor de la apoptosis que sería adecuado para el tratamiento de enfermedades autoinmunes e
15 inflamatorias. Se ha demostrado que la apoptosis mediada por TRAIL está implicada en la muerte celular inducida por activación de células T, sirviendo de este modo como un mecanismo alternativo para el ligando Fas (16,17). La apoptosis mediada por TRAIL también funciona en la inducción
20 de la apoptosis de células T y otras células inflamatorias (18), y desempeña una tarea en la actividad de eliminación de células NK (19-21), y en la función inmunomoduladora de las células dendríticas (22,23). Por tanto, la apoptosis mediada por TRAIL también puede funcionar en el inmunoprivilegio y la
25 inmunovigilancia.

El sistema receptor de TRAIL es complejo, e incluye al menos dos receptores de muerte, DR4 y DR5, y al menos dos receptores no apoptóticos, DcR1 y DcR2. Todos estos receptores no solamente comparten una elevada homología de
30 secuencia de aminoácidos, sino que también muestran una afinidad de unión similar a TRAIL (2-12). La capacidad de los receptores DcR1 y DcR2 de competir por la unión de TRAIL sin inducir la apoptosis sugiere que pueden actuar como

receptores señuelo que bloquean o modulan la actividad del ligando TRAIL. Además, se ha informado de que las células no transformadas expresan niveles mayores de receptores señuelo que las células transformadas. Por tanto, se ha propuesto que

5 la modulación diferencial de la expresión de los receptores de muerte y señuelo puede representar un mecanismo regulador clave que determina la susceptibilidad de las células a la apoptosis mediada por TRAIL, pero debido a la ausencia de anticuerpos específicos de receptor (2). Aunque la expresión

10 y función de DR4 y DR5 se han estudiado extensivamente, su progreso se ha visto impedido por la ausencia de anticuerpos monoclonales específicos de receptor. No se ha documentado la expresión en superficie celular de DR5. Se ha informado de que se ha generado un panel de anticuerpos anti-receptor de

15 TRAIL que son capaces de inducir la apoptosis de células de melanoma *in vitro* pero solamente después de la inmovilización de los anticuerpos, para promover el entrecruzamiento y, en algunos casos, las células requieren cultivo con actinomicina D (24). Se han generado varios anticuerpos anti-DR5 (24). Sin

20 embargo, estos anticuerpos monoclonales anti-DR5 previamente generados tienen baja actividad inductora de la apoptosis *in vitro*, incluso en condiciones de entrecruzamiento. No se ha informado de actividad *in vivo*. Estos anticuerpos no se han usado para examinar la expresión en superficie celular de

25 receptores de TRAIL (24). Por tanto, existe la necesidad de un anticuerpo monoclonal selectivo para cada receptor de TRAIL específico que no solamente sea capaz de unirse al receptor de superficie celular sino que también induzca fuertemente la apoptosis de diversos tipos de células

30 anormales, incluyendo células tumorales, tanto *in vivo* como *in vitro* sin la necesidad de entrecruzamiento o inmovilización. Dicho anticuerpo no solamente proporcionaría un agente terapéutico potencial sino también una herramienta

de diagnóstico para el análisis funcional del receptor de TRAIL. Existe la necesidad particular de un anticuerpo específico contra cada uno de los receptores DR4 y DR5 inductores de muerte.

5 En el desarrollo o progreso de muchas enfermedades, a menudo se da el caso de que las células no se eliminan. En muchas enfermedades autoinmunes y afecciones inflamatorias, las células activadas supervivientes atacan a los tejidos o células normales. Además, el progreso de la tumorigénesis y
10 la formación del pannus proliferativo de artritis reumatoide se caracterizan por la proliferación no revisada de las células. Por tanto, una insuficiente apoptosis conduce al desarrollo de enfermedad, y los usos del ligando inductor de apoptosis o el anticuerpo monoclonal agonista para potenciar
15 la apoptosis se consideran una estrategia terapéutica potencial para eliminar esas células no deseadas.

 Por ejemplo, la artritis reumatoide (a partir de ahora mencionada como "RA") es una enfermedad autoinmune humana común. La comprensión actual sobre la patofisiología de la RA
20 es que las células T y células B autoinmunes inician una respuesta inflamatoria en las articulaciones, que dirige la hiperproliferación de los sinoviocitos. Como consecuencia de la hiperproliferación de las células sinoviales, se sobreproducen metaloproteinasas (a partir de ahora mencionadas
25 como "MMP"), lo que conduce adicionalmente a la destrucción erosiva del cartílago y el hueso que es característica de la RA (25). Por tanto, el control de la hiperproliferación de las células sinoviales inflamatorias es una etapa clave en el tratamiento de la RA. Los mecanismos moleculares que conducen
30 a la hiperproliferación de las células sinoviales aún son desconocidos. Aunque las células sinoviales hiperproliferativas no son malignas y no están transformadas, muchos estudios han sugerido que comparten algunas

características comunes con las células transformadas (46). Estas células, los llamados "sinoviocitos de apariencia transformada", se caracterizan por un retículo endoplasmático grueso y denso, numerosos núcleos irregulares, y cambios en el esqueleto celular normalmente ahusado. Se ha propuesto que la incorporación de los oncogenes y los genes derivados de virus pueden ser los desencadenantes principales del aspecto transformado de las células sinoviales RA (46).

Al menos dos aspectos de la RA sugieren que la apoptosis mal regulada puede contribuir a la patología y que la provocación terapéutica de la apoptosis puede ser un tratamiento eficaz: el fallo en la eliminación de las células T activadas T sugiere que existe una muerte celular inducida por la activación defectuosa de estas células T, que es un proceso que implica la apoptosis mediada por Fas y la apoptosis mediada por TRAIL, y la naturaleza hiperproliferativa de las células sinoviales RA es un factor contribuyente en las fase tardías de la patofisiología de la RA. De hecho, se ha demostrado que la administración de anticuerpos anti-Fas en la articulación inflamatoria inhibe el desarrollo de artritis crónica en ratones transgénicos *tax*, que son un modelo animal de RA humana (26). Además, la transducción localizada con el gen *ligando fas* por un vector adenoviral es eficaz en la prevención de la artritis inducida por colágeno (27). Se observa inhibición de la proliferación de las células sinoviales inflamatorias por la potenciación de la apoptosis mediada por Fas en ambos casos. Aunque el ligando Fas es un fuerte inductor de la apoptosis en células sinoviales RA, la aplicación de apoptosis mediada por ligando Fas como terapia para seres humanos se ha limitado por la toxicidad hepática letal. Por tanto, la apoptosis inducida por el receptor de TRAIL representa una terapia más segura y más eficaz para el tratamiento de la RA que la apoptosis

inducida por el ligando Fas.

La apoptosis inducida por el receptor de TRAIL también representa una terapia más segura y más eficaz para el tratamiento del cáncer que la apoptosis inducida por el
5 ligando Fas. Se sabe que la apoptosis mediada por TRAIL induce específicamente la apoptosis de células tumorales transformadas sin afectar a las células normales. Se ha demostrado que la administración sistémica del TRAIL soluble trimerizado no causaba toxicidad en animales experimentales
10 pero era capaz de inducir la regresión de los tumores implantados (13,28). Su potencial como terapia coadyuvante para tratamientos adicionales se acentuó por el reciente hallazgo de que la expresión de DR5 y la susceptibilidad a la apoptosis inducida por TRAIL de células de cáncer de mama
15 está potenciada por la radiación, lo que sugiere que combinado con radiación, la eficacia de TRAIL aumentaría en la terapia contra el cáncer (29).

Además, el gen que codifica el receptor DR5 de TRAIL se ha mapeado en el cromosoma 8p21-22, loci con un alta
20 frecuencia de mutación en algunas células cancerosas (30). Se ha informado de que al menos dos tipos de células tumorales, el cáncer pulmonar microcítico (31) y el cáncer de cabeza y cuello (32) muestran mutaciones en el dominio de muerte del gen de DR5. Por tanto, existe la necesidad de un anticuerpo
25 anti-DR5 en las investigaciones sobre el cáncer para determinar el efecto de la variación del epítipo del receptor sobre el desarrollo y progreso de los cánceres. Además, la funcionalidad de las mutaciones en el receptor de TRAIL resultaría ser una herramienta de diagnóstico clínico útil
30 cuando se usa junto con otros biomarcadores en la detección temprana de cánceres y como indicador de la agresividad del tumor.

Los documentos WO-0075191, WO 0119861 y WO 0177342

muestran anticuerpos monoclonales anti-DR5 agonistas usados en terapia de combinación junto con un agente quimioterapéutico. Como puede observarse en el documento WO 0119861, los anticuerpos descritos tienen reactividad cruzada
5 con otros receptores de TRAIL o necesitan entrecruzamiento, o ambas cosas.

K. Ichikawa et al. en el artículo titulado "Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity" en Nature Medicine, Vol. 7,
10 N° 8, páginas 954-960 (2001) describen un nuevo anticuerpo, pero no combinaciones.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un método definido en
15 la reivindicación 1 y a una composición definida en la reivindicación 2.

La invención se refiere a un anticuerpo que reconoce un receptor DR5 de TRAIL y que induce la apoptosis en una célula que expresa DR5 *in vivo* o *in vitro* que se define en las
20 reivindicaciones 1 y 2 y a un anticuerpo que reconoce el receptor DR4 de TRAIL y que induce la apoptosis en una célula que expresa DR4 *in vivo* o *in vitro* que se define en las reivindicaciones 1 y 2.

Un método proporcionado es la inducción de la apoptosis
25 en células diana o la inhibición de la proliferación de las células diana poniendo en contacto una célula con una cantidad terapéutica de un anticuerpo capaz de unirse a DR5 o DR4. En diversas realizaciones del método, la apoptosis puede inducirse o la proliferación celular puede inhibirse poniendo
30 en contacto las células diana con anticuerpos contra otros receptores de muerte.

También se describe una composición farmacológica que incluye una cantidad terapéutica de anticuerpo monoclonal

activo contra DR5, un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, un recipiente que incluye el anticuerpo y el vehículo. La invención proporciona adicionalmente el uso de un anticuerpo que reconoce DR5 o un anticuerpo que reconoce
5 DR4 para preparar una terapia para la apoptosis selectiva de células anormales o mal reguladas.

Un anticuerpo de la presente descripción interacciona con un receptor de ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral tal como DR4, DR5, DrR1,
10 DrR2 y OPG, que induce la apoptosis en una célula que expresa dicho receptor. Se describe un anticuerpo capaz de unirse de forma selectiva a un epítipo del receptor del ligando de factor de necrosis tumoral agonista o antagonista.

Los anticuerpos pueden usarse para el tratamiento de una
15 enfermedad relacionada con la apoptosis, el cáncer, una enfermedad inflamatoria, o una enfermedad autoinmune por un método que incluye poner en contacto el tejido diana que tiene la enfermedad con una cantidad terapéutica de un anticuerpo de la invención, individualmente o en combinación
20 con otros anticuerpos inductores de la apoptosis, y/u otros agentes terapéuticos o tratamientos.

Se describe adicionalmente una proteína de fusión que incluye una secuencia de aminoácidos del receptor de TRAIL antigénica que tiene al menos diez bases, acoplada con una
25 proteína inmunoglobulina o fragmento de la misma capaz de provocar una respuesta inmune en un sujeto.

Se describe un método de terapia génica en el que se transfecta una célula diana con una secuencia de ácido nucleico del receptor de TRAIL en un vector de expresión, de
30 modo que el receptor de TRAIL se expresa en la célula diana. La célula diana después se expone a un anticuerpo que se une de forma selectiva al receptor de TRAIL.

Se proporcionan secuencias de ácido nucleico y

secuencias de aminoácidos que codifican inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera de un anticuerpo selectivo para DR5. También se proporcionan secuencias para un anticuerpo que se une de forma selectiva a DR4. También se detallan vectores
5 que incluyen una secuencia de ácido nucleico de la invención y células hospedadoras transformadas con un vector de la invención.

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

Se describe un proceso para producir un anticuerpo
15 humanizado contra DR5 o contra DR4 en el que se transforma un hospedador con secuencias de ácido nucleico que codifican una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada y una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada después de lo cual el hospedador transformado se incuba durante un periodo
20 predeterminado de tiempo.

También se describe un proceso para inducir la apoptosis en células diana o para inhibir la proliferación celular, que incluye poner en contacto una célula diana con una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado contra
25 DR5, un anticuerpo humanizado contra DR4, o una combinación de un anticuerpo contra DR5 y un anticuerpo contra otro receptor de muerte (por ejemplo, un anticuerpo contra DR4), en presencia o ausencia de otros agentes terapéuticos y tratamientos.

30 Se proporciona un kit comercial para inducir la apoptosis que incluye un anticuerpo humanizado TRA-8 selectivo para DR5 y un anticuerpo humanizado contra DR4 (por ejemplo, 2E12 humanizado), envasados en un recipiente

adecuado, y opcionalmente con instrucciones para su uso.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Caracterización de TRA-8. (a.) Especificidad
 5 de unión de TRA-8: análisis de transferencia de Western
 (panel superior): Proteínas de fusión recombinantes de la
 familia TNFR sondeadas con TRA-8 o IgG anti-humano. Carril 1:
 proteína de fusión de DR5/hIgG1 (inmunógeno); Carril 2:
 DR4/hIgG1 (TRAIL-R1); Carril 3: DR5/hIgG1; Carril 4: TRAIL-R3
 10 (DcR-1)/hIgG1; Carril 5: TRAIL-R4 (DcR-2)/hIgG1; Carril 6:
 CD95/hIgG1; Carril 7: TNFRI soluble. Análisis ELISA (panel
 inferior): Los números de pocillo coinciden con los de la
 transferencia de Western excepto el pocillo 8 que es una
 proteína de fusión murina de DR5/IgG1. (b.) Actividad de
 15 unión de TRAIL y TRA-8 solubles a DR5 y DR4: Las placas ELISA
 se recubrieron con DR5/hIgG1 (panel izquierdo) o DR4/hIgG1
 (panel central) y después se incubaron con TRAIL o TRA-8.
 (c.) Análisis de citometría de flujo de la expresión
 superficial de DR5. Células Cos-7 transfectadas con el vector
 20 de expresión pcDNA3 que contiene el ADNc de DR5 de longitud
 completa (histograma compacto), ADNc de DR4 (histograma
 abierto, línea continua) o vector vacía (histograma abierto,
 línea discontinua). Cuarenta y ocho horas después de la
 transfección, las células se tiñeron con TRA-8 seguido de
 25 IgG1 anti-ratón conjugado con PE. (d.) Reactividad
 inmunohistoquímica in situ para DR5: Se tiñeron portaobjetos
 Cytospin de células Cos-7 transfectadas con el vector de
 expresión de DR5 o el vector de control con TRA-8 a las 48
 horas después de la transfección. (e.) Actividad de
 30 eliminación de TRA-8: Se incubaron células Jurkat con las
 concentraciones indicadas de TRA-8. La viabilidad celular se
 determinó por ensayos de exclusión de ATPLite, MTT, y PI
 después de cultivo durante una noche. Los resultados de los

ensayos de ATPLite y MTT se presentan como un porcentaje del control de medio, y los del ensayo de PI se presentan como un porcentaje de las células PI negativas. (f.) Análisis de transferencia de Western de la activación de caspasa: Se
5 incubaron células Jurkat con 500 ng/ml de TRA-8 durante el tiempo indicado. Los lisados celulares se separaron por SDS-PAGE al 15%, se transfirieron, y se sondearon con anticuerpos anti-caspasa. Las flechas indican las subunidades escindidas de cada caspasa. (g.) Ensayo de inhibición de caspasa: se
10 incubaron células Jurkat con 50 ng/ml de TRA-8 durante una noche en presencia de diversas concentraciones de inhibidores de caspasa indicados. La viabilidad celular se determinó por el ensayo de ATPLite.

Figura 2. Expresión de superficie celular de DR5 y
15 susceptibilidad a la apoptosis mediada por DR5. Se incubaron células T y B normales, recién aisladas de sangre periférica, líneas celulares de células T (a y a'), de glioma (b y b'), de cáncer de próstata (c) y de células B (d) con TRA-8 o anticuerpo de control de isotipo IgG1 murino seguido de IgG1
20 de cabra anti-ratón conjugado con PE. Los histogramas abiertos representan el control de isotipo de anticuerpo mientras que los histogramas compactos representan la tinción con TRA-8. La apoptosis se determinó por el ensayo de ATPLite después de incubación durante una noche con TRAIL soluble
25 (círculos abiertos) o TRA-8 (círculos cerrados) como se muestra en a, b' y d.

Figura 3a'. Se incubó la línea de células T U937 con TRA-8 o anticuerpo de control de isotipo IgG1 murino. La apoptosis se determinó por el ensayo de ATPLite después de
30 incubación durante una noche con TRAIL soluble (círculos abiertos) o TRA-8 (círculos cerrados).

Figura 3. Se incubaron líneas celulares de glioma (b) y cáncer de próstata (c) con TRA-8 o anticuerpo de control de

isotipo IgG1 murino. La apoptosis se determinó por el ensayo de ATPLite después de incubación durante una noche con TRAIL soluble (círculos abiertos) o TRA-8 (círculos cerrados).

Figura 4. Es una serie de gráficos que muestran la
5 viabilidad celular para células Jurkat humanas después de la exposición a concentraciones indicadas de (A) las cepas de anticuerpo TRA-1, -8 y -10 y (B) TRAIL en presencia de una concentración fija de cepas del anticuerpo de la invención representadas en la Figura 4A.

10 Figura 5. Expresión de DR5 en tejidos normales y cancerosos: Se sondearon homogeneizados de tejido normal y canceroso con TRA-8 y se revelaron por quimioluminiscencia. (a.) Análisis de transferencia de Western de la proteína DR5 en tejidos normales: carril 1: hígado, carril 2: cerebro,
15 carril 3: pulmón, carril 4: riñón, carril 5: bazo, carril 6: testículo, carril 7: ovario, carril 8: corazón, carril 9: páncreas. (b.) Análisis de transferencia de Western de la proteína DR5 en tejidos cancerosos. Se sondeó la transferencia de tejido canceroso que contenía cánceres de
20 ovario (carril 1), pulmón (carril 2), hígado (carril 3), recto (carril 4), cuello del útero (carril 5), piel (carril 6), testículo (carril 7), tiroides (carril 8), útero (carril 10), estómago (carril 11), laringofaringe (carril 12), y páncreas (carril 13). Inmunohistoquímica *in situ* de tejidos
25 humanos normales (c) y de tejidos cancerosos (d.). Las secciones congeladas se inmunotifñeron con TRA-8.

Figura 6. Actividad tumoricida de TRA-8. Se inocularon ratones SCID por vía subcutánea con células 1321N1. A los ratones se les inyectó por vía intravenosa una única dosis de
30 100 µg de TRA-8 en el segundo día después de la inoculación del tumor (a.), o con tres dosis de 100 µg de TRA-8 empezando 7 días después de la inoculación del tumor (b.) El

crecimiento del tumor se determinó por el peso y se examinó histológicamente con tinción H&E. Las fotografías muestran crecimiento viable del tumor en ratones de control pero no en ratones tratados con TRA-8 (c., panel superior), y tinción H&E del tumor (c., panel inferior). Se inyectó a los ratones SCID por vía intravenosa 10^6 células Jurkat y se trataron con una única dosis de TRA-8 en el segundo día después de la inyección. Siete días después, se recogieron las células esplénicas, se tiñeron con anticuerpo anti-CD3 humano y se analizaron por citometría de flujo (d.), o por inmunohistoquímica (e.).

Figura 7. Muestra la expresión de DR5 de superficie celular en células sinoviales RA (A) y OA (B). Se tiñeron 1×10^6 células sinoviales cultivadas primarias con TRA-8 purificado por afinidad y seguido de anticuerpo de cabra anti-IgG1 de ratón conjugado con PE. Se analizaron 10.000 células viables por FACSvantage.

Figura 8. Es una serie de gráficos que muestran la viabilidad celular como una función de la apoptosis inducida por la concentración de TRAIL y TRA-8 de las cepas representativas de células sinoviales RA (A) y OA (B) con diversas concentraciones de TRAIL soluble recombinante (círculos abiertos) o TRA-8 purificado por afinidad (círculos cerrados). La viabilidad celular es el porcentaje de las cpm de células tratadas frente a las cpm de células no tratadas.

Figura 9. Es una serie de gráficos que muestran la dependencia de caspasa de la apoptosis mediada por DR5 de células sinoviales RA. Se incubaron células sinoviales RA (RA512) con 50 ng/ml de ligando Fas soluble (cuadrados abiertos), anticuerpo anti-Fas (CH-11) (cuadrados cerrados), TRAIL soluble (círculos abiertos), o anticuerpo anti-DR5 (TRA-8) (círculos cerrados) en presencia de concentraciones variables de inhibidores de caspasas. Después de cultivo

durante una noche, la viabilidad celular se determina por ATPLite.

Figura 10A. Es un ensayo de desplazamiento en gel electroforético que indica la activación de NF κ B. Se incubaron células RA1016 con 20 ng/ml de TNF- α , 50 ng/ml de TRAIL soluble o 50 ng/ml de TRA-8 para los momentos puntuales indicados antes de someterse a electroforesis. Las Figuras 10B y C son gráficos que muestran la producción de MMP-1 y MMP-3. Se incuban 1×10^6 /ml de las células sinoviales RA indicadas con las concentraciones indicadas de TNF- α (círculos abiertos), TRAIL (triángulos abiertos) o TRA-8 (círculos cerrados). Después de cultivo durante una noche, se recogen los sobrenadantes de cultivo. Los niveles de MMP en los sobrenadantes de cultivo se determinan por ELISA.

Figura 11. TRA-8 no induce toxicidad hepatocelular. (a.) Los tejidos hepáticos normales no expresan DR5. Se prepararon secciones en parafina de dos tejidos hepáticos normales, un tejido de carcinoma hepatocelular, y la preparación cytospin de células FfepG2 para tinción H&E, y las secciones congeladas correspondientes se tiñeron con TRA-8. (b.) Análisis de citometría de flujo de la expresión de superficie celular de DR5. Se tiñeron hepatocitos, aislados de dos tejidos hepáticos normales y de un caso de tejido de carcinoma hepatocelular, y células HepG2 con TRA-8, anticuerpo anti-Fas (DX2) o un anticuerpo de control de isotipo. Los histogramas compactos indican la tinción con TRA-8 o DX2, y los histogramas abiertos son los controles de isotipo correspondientes.

Figura 12. TRAIL pero no TRA-8 induce toxicidad hepatocelular. Hepatocitos humanos normales frescos se mantuvieron en medio de cultivo de hepatocitos. (a.) La apoptosis de los hepatocitos se indujo con 1 μ g/ml de TRAIL

soluble más agente de entrecruzamiento o TRA-8 para los momentos puntuales indicados. La viabilidad celular se determinó por ATPLite. Los resultados se presentan como el porcentaje de células viables en comparación con el control de medio. Las barras sombreadas indican TRAIL y las barras negras indican TRA-8. (b.) Los núcleos condensados de los hepatocitos se tiñeron con Hoechst 33352 y se analizaron por citometría de flujo. (c.) Efecto de cicloheximida sobre la apoptosis de los hepatocitos. Los hepatocitos se cultivaron en medio de control o con 1 $\mu\text{g/ml}$ de TRAIL o TRA-8 en presencia (barras cerradas) o ausencia (barras abiertas) de 1 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida durante 8 horas. La viabilidad celular se determinó por ATPLite. Los resultados se presentan como la media $\pm$ SEM de cultivos triplicados de dos experimentos. (d.) Una comparación de la susceptibilidad de hepatocitos normales a DR5 y a la apoptosis mediada por Fas. Se incubaron hepatocitos recién aislados con concentraciones indicadas de TRAIL soluble, TRA-8, FasL soluble o el mAb anti-Fas CH11 durante 6 horas. La viabilidad celular se determinó por ensayo de ATPLite. Los resultados se presentan como el porcentaje de células viables en comparación con el control de medio. Para hepatocitos normales, se presenta la media $\pm$ SEM de cuatro individuos normales. Los resultados de las células de carcinoma hepatocelular de un paciente y las células HepG2 se presentan como el promedio de cultivos triplicados.

Figura 13. TRAIL induce hepatitis. Se inoculó por vía intravenosa a ratones B6 10^9 pfu de vector adenoviral que codificaba la longitud completa de TRAIL humano bajo el control del elemento de transcripción "Tet-on". La expresión de TRAIL se indujo por la dosis indicada de tetraciclina. (a.) Análisis de transferencia de Northern de la expresión de

- TRAIL humano en el hígado. A las 24 horas después de la inoculación del vector y de la inducción con tetraciclina, se aisló el ARN total de los hígados y se sondeó con el ADNc de TRAIL humano o β -actina. (b.) Niveles séricos de AST. A las 5 24 horas después de la transducción de TRAIL, se determinaron los niveles séricos de AST. (c.) Muerte celular mediada por TRAIL de hepatocitos infectados con vector adenoviral: se inoculó por vía intravenosa a ratones B6 vector adenoviral inducible por tetraciclina. A las 48 horas después de la 10 inoculación, se aislaron los hepatocitos de los ratones inoculados y los ratones de control no inoculados y se incubaron con concentraciones indicadas de TRAIL durante 8 horas (panel izquierdo). La viabilidad celular de los hepatocitos se determinó por el ensayo de ATPLite. A los 15 ratones, inoculados con vector adenoviral como anteriormente, se les inyectó por vía intravenosa 10 μ g de TRAIL humano soluble 48 horas después. Los niveles séricos de AST se midieron a las 24 horas después de la inyección de TRAIL (panel derecho). (d. y e.) Análisis histológico del daño 20 hepático inducido por TRAIL. Se recogieron los hígados a las 24 horas (d.) o a los 7 días (e.) después de la transducción con TRAIL. Las secciones en parafina se tiñeron con H&E, y se fotografiaron a 100X (panel superior) y 400X (panel inferior).
- 25 Figura 14. Es una serie de gráficos que muestran que las células T y células B activadas purificadas de PBMC humanas expresan niveles aumentados de DR5 determinados por citometría de flujo para células en reposo (en blanco) y activadas (sombreadas).
- 30 Figura 15. Gráficos de viabilidad como una función de la concentración de TRA-8 para las células T y células B purificadas representadas en la Figura 14 que se han

estimulado durante 48 horas con anticuerpo anti-CD3 o anti- μ , con células activadas y blastocitos recogidos por diferente densidad de Ficoll-Paque. La viabilidad se determina por ensayo de ATPLite.

5 Figura 16. Es un histograma y diagramas de citometría de flujo que muestran la expresión de CD3 en una población de linfocitos abierta para ratones NOD/SCID desprovistos de células NK inyectados con PBMC humanas y TRA-8 o IgG (control).

10 Figura 17. Muestra micrografías celulares teñidas con CD3 y TUNEL para tejido esplénico de ratón como se detalla en el Ejemplo 13.

 Figura 18. Muestra los diagramas de citotoxicidad para seres humanos con leucemia linfocítica crónica (CCL) y con
15 células B normales en presencia de TRA-8, BISVIII, y la combinación de los mismos.

 Figura 19(a). Unión específica de 2E12 a DR4. Se recubrieron placas ELISA con la forma soluble de las proteínas de fusión de receptor de TRAIL humano-Fc de IgG1
20 humana como se indica y se incubaron con la concentración indicada de mAb 2E12, seguido de IgG1 anti-ratón conjugado con HRP. La reacción se reveló con tampón de sustrato TMB y se midieron los valores de OD a 450/650 nm.

 Figura 19(b). 2E12 se une a DR4 de superficie celular.
25 Se transfectaron células Cos-7 con el vector que contenía el ADNc de longitud completa para DR4 (histograma compacto) o el vector de control (histograma abierto). Las células transfectadas se tiñeron con 10 μ g/ml de 2E12 e IgG1 anti-ratón conjugado con PE. Las células se analizaron por
30 citometría de flujo.

 Figura 19(c). Actividad inductora de apoptosis de 2E12. Se incubaron células de linfoma B Ramos humanas durante una

noche con las concentraciones indicadas de 2E12 en presencia de 2 µg/ml de IgG1 anti-ratón. La viabilidad celular se determinó por el ensayo de ATPLite. (d) Activación de caspasa inducida por 2E12. Las células Ramos se trataron con 2E12 y anticuerpo anti-IgG de ratón para los momentos puntuales indicados. La actividad caspasa y la escisión con PARP se determinaron por análisis de transferencia de Western usando anticuerpos específicos anti-caspasa o PARP.

Figura 20. El efecto de 2E12 y adriamicina en ratones desnudos atímicos que albergan xenoinjertos de cáncer de mama. Se inyectaron células 2LMP (3×10^7) por vía subcutánea en ratones desnudos atímicos en el día 0. Se inyectó a dos grupos de ratones por vía intraperitoneal 200 µg de 2E12 en los días 7, 10, 14, 17, 21, y 24. Dos grupos de ratones recibieron *i.v.* adriamicina (6 mg/kg) en los días 8, 12, y 16. Un grupo de ratones no recibió anticuerpo. Los datos se expresan como el cambio promedio en el tamaño del tumor con relación al tamaño en el día 7 (n=8 ratones/grupo).

Figura 21. El efecto de TRA-8, 2E12 y adriamicina en ratones desnudos atímicos que albergan xenoinjertos de cáncer de mama. Se inyectaron células 2LMP (3×10^7) *s.c.* en ratones desnudos atímicos en el día 0. A dos grupos de ratones se les inyectó *i.p.* 200 µg de TRA-8 y 2E12 en los días 7, 10, 14, 17, 21, y 24. Dos grupos de ratones recibieron *i.v.* adriamicina (6 mg/kg) en los días 8, 12, y 16. Un grupo de ratones no recibió anticuerpo. Los datos se expresan como el cambio promedio en el tamaño del tumor con relación al tamaño en el día 7 (n=8 ratones/grupo).

30 **Descripción detallada de la invención**

El fallo en eliminar células se debe a defectos en el sistema de inducción de la apoptosis que están asociados con

defectos que incluyen de forma ilustrativa la expresión o función del ligando, el receptor, o las moléculas reguladoras y efectoras intracelulares. La presente invención produce un método para corregir un sistema de inducción de la apoptosis
5 deficiente así como para dilucidar los defectos específicos inherentes en un sistema inductor de la apoptosis defectuoso dado.

La presente descripción se refiere a nuevas clases de anticuerpos monoclonales que tienen actividad inductora de la
10 apoptosis *in vivo* e *in vitro* selectiva contra receptores de TRAIL específicos, incluyendo DR5, DR4, DcR1 y DcR2. Por tanto, los anticuerpos de la presente descripción se unen específicamente a uno de los receptores de TRAIL. Por "unión selectiva" o "reconocimiento específico" se entiende que el
15 anticuerpo se une solamente a un receptor de TRAIL y muestra poca o ninguna unión a otros tipos de receptores de TRAIL usando análisis de transferencia de Western tradicional. Un anticuerpo contra DR5 de la presente invención se une a DR5 de forma selectiva y no muestra unión por encima de
20 aproximadamente 1,5 veces el fondo para DR4, DcR1 o DcR2. Asimismo, un anticuerpo contra DR4 de la presente invención se une a DR4 de forma selectiva y no muestra unión por encima de aproximadamente 1,5 veces el fondo para DR5, DcR1 o DcR2. Los anticuerpos de la presente invención tienen utilidad como
25 reactivo para la investigación de la señalización de la apoptosis, así como utilidad como terapia eficaz contra células que expresan receptores de TRAIL, incluyendo de forma ilustrativa amplias clases de células cancerosas, células que muestran mala regulación del sistema de apoptosis, linfocitos
30 activados u otras células inmunes activadas (por ejemplo, células linfoides y células mieloides), células infectadas con virus y células sinoviales de proliferación anormal (por ejemplo, células sinoviales de artritis reumatoide,

incluyendo células sinoviales inflamatorias, células linfoides y mieloides activadas en el sinovio, sinoviocitos tipo macrófago, y sinoviocitos tipo fibroblasto) de enfermedades autoinmunes. Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención son específicos en la unión a tipos particulares de receptores de TRAIL a pesar de la homología entre ellos. Los anticuerpos de la invención producen apoptosis dirigida de solamente aquellas células que expresan un receptor de TRAIL diana o, como alternativa, el bloqueo de la apoptosis por TRAIL de las células que expresan un receptor diana.

Un anticuerpo monoclonal contra DR5 y un anticuerpo monoclonal contra DR4 de la presente invención sirven como potente inductor de la apoptosis en células que expresan DR5 o DR4, respectivamente, *in vitro* y como potente inductor de la apoptosis *in vivo*. Las secuencias de CDR humanizadas fragmentarias injertadas en estructuras humanizadas de anticuerpos y proteínas de fusión de anticuerpos contra DR5 o DR4 de la presente invención muestran propiedades apoptóticas similares.

Hasta la fecha, no está disponible ningún anticuerpo monoclonal que se una a DR5 de superficie celular y que, incluso a bajas concentraciones, induzca la apoptosis de células que expresan DR5 tanto *in vitro* como *in vivo* en ausencia de un agente de entrecruzamiento. La presente invención incluye un anticuerpo contra DR5 funcional como agente terapéutico en el tratamiento de una diversidad de enfermedades. Aunque se ha demostrado que TRAIL soluble es eficaz en la inducción de la apoptosis de células tumorales *in vivo*, parece que la actividad de eliminación es muy baja con las dosis grandes y repetidas que a menudo se requieren (13). La presente invención proporciona un anticuerpo purificado que se une al receptor DR5 de TRAIL, donde dicho

anticuerpo, en su forma soluble a bajas concentraciones, tiene actividad inductora de la apoptosis in vivo e in vitro en células diana que expresan DR5. El anticuerpo purificado se une al receptor DR5 de TRAIL en ausencia de
5 entrecruzamiento del anticuerpo. Preferiblemente, el anticuerpo no induce apoptosis significativa de células fibroblásticas normales. Preferiblemente, la actividad inductora de la apoptosis se caracteriza por una viabilidad menor del 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, o cualquier
10 porcentaje intermedio, de las células diana a concentraciones de anticuerpo de menos de aproximadamente 0,1, 1, 5, 10 ó 20 µg/ml o cualquier concentración intermedia. El anticuerpo purificado se une específicamente al receptor DR5 de TRAIL y no se une a los receptores DR4, DcR1 o DcR2 de TRAIL sobre
15 análisis de transferencia de Western rutinario. El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que tiene la misma especificidad de epítipo que el hibridoma TRA-8 de ratón-ratón que tiene el número de acceso a la ATCC PTA-1428.

TRA-8, uno de una serie de anticuerpos contra DR5 de
20 acuerdo con la presente invención, es farmacéuticamente eficaz en animales que portan un transgén DR5 humano y también tiene utilidad para establecer un modelo para la investigación del papel de DR5 y TRAIL.

La invención proporciona anticuerpos que inducen la
25 apoptosis en ausencia de entrecruzamiento. Por ejemplo, el anticuerpo contra DR5 (por ejemplo, TRA-8) induce la apoptosis en ausencia de entrecruzamiento. "Entrecruzamiento" incluye, por ejemplo, el entrecruzamiento por un anticuerpo secundario. Otras realizaciones proporcionan anticuerpos que
30 inducen la apoptosis en presencia de agentes de entrecruzamiento incluyendo, por ejemplo, una realización preferida del anticuerpo contra DR4 (2E12).

Por tanto, la invención proporciona un anticuerpo purificado que se une específicamente a un receptor DR4 de TRAIL, donde dicho anticuerpo, en su forma soluble, tiene actividad inductora de la apoptosis *in vivo* e *in vitro* en
5 células diana que expresan DR4. El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que tiene la misma especificidad de epítipo que el hibridoma 2E12 que tiene el número de acceso a la ATCC PTA-3798, depositado el 24 de octubre de 2001, que se le ha designado el nombre "Clon de Hibridoma 2E12 contra DR4
10 Humano", en beneficio de la UAB Research Foundation. 2E12 uno de una serie de anticuerpos contra DR4 de la presente invención, es farmacéuticamente activo en la reducción del tamaño del tumor, en comparación con animales de control no tratados o en comparación con el tamaño del tumor antes del
15 tratamiento, en animales *in vivo* con cánceres que expresan DR4.

Los anticuerpos contra DR5 son eficaces en forma soluble a dosis bajas, entendiendo por dosis bajas a dosis o concentraciones de menos de aproximadamente 0,01 a
20 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 inducen la apoptosis de forma selectiva en células que expresan receptores DR5, sin inducir la apoptosis en hepatocitos,
25 fibrocitos, sinoviocitos, etc. no transformados, no activados, normales. Un anticuerpo de acuerdo con la presente invención creado contra un receptor de TRAIL se recoge de acuerdo con la presente invención de un animal experimental pero puede fabricarse por cualquier método de producción de
30 anticuerpos o síntesis conocido en la técnica. Humanizando el anticuerpo de acuerdo con la presente invención para mantener la actividad de unión al receptor provocando al mismo tiempo

una respuesta inmune disminuida y terapéuticamente tolerable en un sujeto humano, se usa un anticuerpo humanizado anti-receptor de TRAIL de acuerdo con la presente invención como agonista o antagonista terapéutico para un receptor de TRAIL
5 dado. La presente invención es funcional como terapia *in vivo* ya que no se requiere, opcionalmente, entrecruzamiento secundario del anticuerpo anti-receptor de TRAIL.

La presente invención se extiende más allá de un anticuerpo anti-receptor de TRAIL único que tiene efectos
10 apoptóticos agonistas o antagonistas. En su lugar, se ponen en contacto dos o más anticuerpos anti-receptor de TRAIL con un cultivo celular *in vitro* o un tejido corporal del sujeto *in vivo* para crear un tratamiento potenciado. Por "tratamiento potenciado" se entiende cualquier efecto
15 aditivo, sinérgico, o potenciador. Por ejemplo, la línea celular de glioma U87 y las líneas celulares hematopoyéticas U937 y Molt-4 son sensibles a la exposición sinérgica a anticuerpos anti-DR4 y anticuerpos anti-DR5 agonistas mientras que la exposición al anticuerpo contra DR5 agonista
20 solo muestra solamente éxito limitado en la inducción de la apoptosis.

Además, los anticuerpos antagonistas anti-receptor de TRAIL tienen utilidad particular cuando un anticuerpo es específico en la unión a uno de los receptores señuelo DcR1,
25 DcR2 u OPG. El bloqueo selectivo de un receptor señuelo con anticuerpo de acuerdo con la presente invención tiene el efecto en tipos celulares que expresan receptores señuelo de desplazar el equilibrio de unión a TRAIL hacia aquellos receptores de TRAIL capaces de transducir la señal de
30 apoptosis. Por tanto, en otra terapia combinada, un anticuerpo de unión al receptor señuelo sensibiliza a una célula en expresión a la transducción de la señal de apoptosis agonista por la unión del receptor de TRAIL.

En otra realización, se proporciona un método para dilucidar los epítomos agonistas y antagonistas de un receptor de TRAIL dado. Además, se dilucidan los polimorfismos entre individuos asociados con un receptor de TRAIL dado a través del uso de un panel de anticuerpos monoclonales que tienen cada uno una región variable o CDR diferente. Un panel caracterizado de anticuerpos monoclonales proporciona la capacidad de definir epítomos agonistas y antagonistas y polimorfismos. Por tanto, un panel de anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención tiene utilidad en el descubrimiento de fármacos y/o la exploración de sujetos para la propensión a enfermedades.

Otra realización más implica proteínas de fusión que incluyen un fragmento antigénico de un receptor de TRAIL acoplado a una proteína, polipéptido de inmunoglobulina o fragmento de la misma. Un fragmento del receptor de TRAIL se define como uno que contiene una cantidad suficiente de bases para provocar una respuesta inmunogénica contra un receptor de TRAIL nativo expresado en la superficie celular de un sujeto. Un fragmento de fusión del receptor de TRAIL incluye al menos diez aminoácidos. Una proteína de fusión de inmunoglobulina o fragmento de la misma se define en este documento como una que incluye una proteína nativa o sintética o segmento polipeptídico que tiene una cantidad suficiente de bases aminoacídicas para activar una respuesta de cascada inmunogénica en un sujeto. Un inmunógeno que incluye una fusión de un fragmento del receptor de TRAIL acoplado con un fragmento de inmunoglobulina tiene utilidad como terapia *in vivo* para producir un anticuerpo anti-receptor de TRAIL *in situ* en un sujeto.

Se proporciona un método para inducir de forma selectiva la apoptosis en células diana que comprende las etapas de transfectar las células diana con un vector que comprende una

secuencia de ácido nucleico del receptor de TRAIL expresable; expresar en dichas células un receptor de TRAIL codificado por dicha secuencia de ácido nucleico del receptor de TRAIL; y poner en contacto dichas células con un anticuerpo inductor de la apoptosis selectivo para la unión con dicho receptor de TRAIL. En un aspecto de la terapia génica, las células diana se transfectan con un vector que porta una secuencia expresable correspondiente a un receptor de TRAIL, siendo el vector convencional y estando elegido en base a la susceptibilidad de la célula diana al vector. Los vectores de terapia génica incluyen de forma ilustrativa adenovirus, pAdCMV5. Después de que las células o el tejido diana hayan expresado el receptor de TRAIL transfectado, las células o el tejido se exponen a un anticuerpo de acuerdo con la presente invención específico para la unión al receptor de TRAIL transfectado. Se aprecia que el anticuerpo anti-receptor de TRAIL es agonista o antagonista al mismo coherente con el resultado terapéutico deseado.

Los anticuerpos de la presente invención también son funcionales junto con un sensibilizante. Como se usa en este documento, se define que un sensibilizante incluye cualquier estímulo que induzca la apoptosis, incluyendo luz ultravioleta, moléculas orgánicas que incluyen específicamente la clase de bisindolmaleimidas, metales pesados y especies de radicales libres.

En el contexto de la terapia contra el cáncer, TRA-8 es capaz de inducir la apoptosis de la mayoría de las células tumorales sensibles a TRAIL de un modo dependiente de caspasa en ausencia de entrecruzamiento secundario. TRA-8 o 2E12, solo o en combinación con otros anticuerpos, muestra una fuerte actividad tumoricida *in vivo*. La capacidad de TRA-8 o 2E12 de inducir la apoptosis de la mayoría de las células sensibles a TRAIL confirma que DR5 o DR4 solo es suficiente

para desencadenar la apoptosis. La mayoría de las células tumorales detalladas en este documento expresan DR5 en superficie celular y su susceptibilidad a la muerte celular inducida por TRA-8 iguala a su susceptibilidad a TRAIL, lo
5 que indica que DR5 es un receptor de muerte principal para la apoptosis mediada por TRAIL en la mayoría de las células tumorales. Se obtuvieron resultados similares con anticuerpos específicos para DR4 (por ejemplo, 2E12). Por tanto, la expresión diferencial de DR5 o DR4 por células normales y
10 cancerosas es funcional en la selectividad de la apoptosis mediada por TRAIL. TRA-8 evita los receptores señuelo para inducir la apoptosis mediada por TRAIL. Sin embargo, solamente una minoría de las células tumorales resistentes a TRAIL son sensibles a TRA-8, lo que indica que los receptores
15 señuelo no parecen desempeñar una tarea principal en la resistencia de las células tumorales a la apoptosis mediada por TRAIL.

Aunque estudios previos han indicado que la administración sistémica de la forma soluble de TRAIL en
20 animales no induce regresión tumoral sin causar toxicidad^{3,4,22}, la forma unida a membrana de TRAIL humano induce daño hepático en ratones, como se muestra en este documento. Sin embargo, la toxicidad hepática de TRAIL es mucho menos potente que la del ligando de Fas como se
25 demuestra por la menor susceptibilidad de los hepatocitos normales a lesiones inducidas por TRAIL en comparación con el ligando de Fas y por la ausencia de letalidad de TRAIL *in vivo*. Por tanto, la titulación de TRAIL tiene utilidad en terapia contra el cáncer.

30 Como se detalla en este documento, se muestra la ausencia de niveles significativos de expresión de la proteína DR5 por hepatocitos normales y está asociada con la resistencia de los hepatocitos a la apoptosis inducida por

TRA-8. El entrecruzamiento de DR5 con un anticuerpo monoclonal es insuficiente para organizar las formas homopoliméricas del receptor de muerte capaz de desencadenar la apoptosis. Experimentos en monos tití indican ausencia de evidencias de toxicidad hepáticas de la administración de TRA-8. Por tanto, un anticuerpo monoclonal agonista contra DR5 probablemente es más selectivo y más seguro que TRAIL soluble como agente terapéutico. De forma similar, DR4 se expresa por células transformadas o activadas y no se expresa en cantidades apreciables o solamente en cantidades muy inferiores por células normales, por ejemplo, fibroblastos. El DR4 de la presente invención induce la apoptosis de ciertas células diana sin muerte celular apreciable en células no diana, como fibroblastos, etc. Como se usa en este documento, la ausencia de un efecto o la ausencia de un efecto apreciable o significativo se refiere a e incluye la ausencia completa del efecto o un efecto que es menor o igual a los niveles de fondo o de control y no excede los niveles de fondo y de control en más de 1,5 veces el nivel de fondo o de control.

Como ensayo de exploración o herramienta de formación de imágenes, la presente invención es muy adecuada para detectar pequeños grupos de células DR4 o DR5 que aún pueden mostrar morfología celular normal. Por ejemplo, la tinción de secciones celulares *in situ* de células cancerosas humanas incluyendo cánceres de pulmón, próstata e hígado con anticuerpos marcados de acuerdo con la presente invención, identifica fácilmente las células cancerosas. Los anticuerpos de la presente invención también son útiles para explorar otras manifestaciones patológicas incluyendo, por ejemplo, diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes, como artritis reumatoide. Dicha exploración puede ser útil incluso antes de la aparición de otros síntomas clínicos y podría

usarse para explorar sujetos en riesgo de enfermedad, de modo que pueda iniciarse el tratamiento profiláctico antes de la manifestación de otros signos o síntomas. Específicamente, se observa que las células cancerosas expresan niveles muy altos
5 de DR5 en comparación con células normales del mismo tipo. Por tanto, la presente descripción tiene utilidad como método de exploración sensible para malignidades en fase temprana dentro de un tejido incluyendo, al menos, pulmón, próstata, colon, sangre, cuello del útero, mama e hígado. En este
10 documento se detalla un proceso terapéutico para la inhibición de la proliferación celular anormal asociada con enfermedades, de forma ilustrativa cánceres malignos y leucemias linfáticas entre otras.

La presente invención se detalla en este documento con
15 particularidad a un anticuerpo monoclonal anti-DR5 humano denominado TRA-8, que tiene el número de acceso a la ATCC PTA-1428. Por tanto, la presente invención se detalla en este documento con respecto a un anticuerpo inductor de la apoptosis específico para DR4 humano. El anticuerpo tiene la
20 misma especificidad de epítipo que el hibridoma 2E12, que se depositó el 24 de octubre de 2001, adquiriendo un número de acceso en beneficio de la UAB Research Foundation, en la American Type Culture Collection, Rockville, Md. La descripción del material depositado fue "Clon de Hibridoma
25 2E12 contra DR4 Humano", con la denominación de cepa 2E12 y el número de expediente de referencia PCT/US01/14151 (documento WO 031037913). Los niveles de expresión de un receptor de apoptosis, tal como Fas, no se correlacionan necesariamente con la susceptibilidad de las células a la
30 apoptosis. Para la apoptosis mediada por TRAIL, se ha sugerido que la expresión de los receptores señuelo para TRAIL influye en la susceptibilidad de las células. Además, se ha sugerido que DR5 debe asociarse con DR4 para la

transducción eficaz de la señal de apoptosis a través de FADD y la vía de la caspasa 8. La disponibilidad del anticuerpo monoclonal agonista anti-DR5 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 la apoptosis mediada por TRA-8 con su susceptibilidad a la apoptosis mediada por TRAIL ofrece una nueva percepción sobre el papel de DR5 en la apoptosis mediada por TRAIL y los mecanismos que pueden afectar a la susceptibilidad. El anticuerpo contra DR4 proporciona ventajas similares.

Esta ventaja generalmente se extiende a los anticuerpos humanizados contra DR5 y DR4 de la presente invención. Un clon molecular de un anticuerpo contra DR5, por ejemplo, se prepara por técnicas conocidas detalladas con respecto a los siguientes Ejemplos. La metodología de ADN recombinante (33) es funcional en este documento para construir secuencias de ácido nucleico que codifiquen una molécula de anticuerpo monoclonal o región de unión a antígeno del mismo.

La presente invención permite la construcción de anticuerpos humanizados contra el receptor de TRAIL que tienen poca probabilidad de inducir una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (a partir de ahora mencionada como "HAMA") (34), teniendo aún al mismo tiempo una función efectora de anticuerpo eficaz. También pueden crearse anticuerpos completamente humanos inmunizando ratones capaces de crear un anticuerpo completamente humano (por ejemplo, ratones modificado genéticamente para producir anticuerpos humanos), explorando clones que se unen a DR5 o DR4, que inducen la apoptosis y compiten por el epítipo TRA-8 o 2E12. Véase, por ejemplo, Lonberg y Huszar (1995) Human antibodies from transgenic mice, Int. Rev. Immunol. 13:65-93. Como se usan en este documento, los términos "humano" y "humanizado",

en relación a los anticuerpos, se refieren a cualquier anticuerpo que se espera que provoque una respuesta inmunogénica débil terapéuticamente tolerable en un sujeto humano.

5 La presente invención un anticuerpo contra DR5, un anticuerpo humanizado anti-DR5, inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera e inmunoglobulinas humanizadas de cadena pesada y ligera de TRA-8. La invención también proporciona un anticuerpo contra DR4, un anticuerpo humanizado contra DR4,
10 inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera del anticuerpo contra DR4 e inmunoglobulinas humanizadas de cadena pesada y ligera, ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos y cadenas pesadas y ligeras, vectores que comprenden esos ácidos nucleicos, y células que comprenden los vectores.
15 Ciertos truncamientos de estas proteínas o genes realizan las funciones reguladoras o enzimáticas de la proteína o gen de secuencia completa. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico codificantes pueden alterarse por sustituciones, adicciones, deleciones o expresión multimérica que
20 proporcionan proteínas o genes funcionalmente equivalentes. Debido a la degeneración de las secuencias codificantes de ácido nucleico, pueden usarse otras secuencias que codifican sustancialmente las mismas secuencias de aminoácidos que aquellas de las proteínas de origen natural en la práctica de
25 la presente invención. Éstas incluyen, aunque sin limitación, secuencias de ácido nucleico que incluyen secuencias de ácido nucleico completas o partes de la secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos anteriores, que están alteradas por la sustitución de diferentes codones que
30 codifican un resto aminoacídico funcionalmente equivalente dentro de la secuencia, produciendo de éste modo un cambio 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% calculadas por métodos convencionales ("Current Methods in Sequence Comparison and Analysis", Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pág. 127-149, 1998, Alan R. Liss, Inc.) siempre que dicha variante forme un anticuerpo funcional que reconozca un receptor DR5 de TRAIL. Por ejemplo, puede sustituirse uno o más restos aminoacídicos dentro de una secuencia polipeptídica por otro aminoácido de una polaridad similar que actúe como equivalente funcional, provocando una alteración silenciosa. Los sustitutos para un aminoácido dentro de la secuencia pueden seleccionarse entre otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido (es decir, una sustitución conservativa). Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. También se incluyen dentro del alcance de la presente descripción proteínas o fragmentos o derivados de las mismas que están modificados de forma diferente durante o después de la traducción, por ejemplo, por glucosilación, escisión proteolítica, unión a una molécula de anticuerpo u otros ligandos celulares, etc. Además, el vector recombinante que codifica las secuencias de ácido nucleico de los anticuerpos de la presente invención puede diseñarse para modificar el procesamiento o la expresión de un vector. Pueden hacerse otras modificaciones en la secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos sin reducir o sin reducir sustancialmente la actividad de apoptosis en el anticuerpo.

Dichas modificaciones pueden suceder en las regiones CDR o no CDR usando técnicas rutinarias en la técnica. Véase, por ejemplo, Yang et al. (1995), J. Mol. Biol. 254:392-403.

Adicionalmente, puede mutarse una secuencia de ácido
5 nucleico que codifica un inhibidor *in vitro* o *in vivo* para
crear y/o destruir secuencias de traducción, inicio, y/o
terminación o para crear variaciones en las regiones
codificantes y/o formar nuevos sitios para endonucleasas de
restricción o destruir los pre-existentes, para facilitar la
10 modificación *in vitro* adicional. Puede usarse cualquier
técnica para mutagénesis conocida en la técnica, incluyendo,
aunque sin limitación, mutagénesis dirigida al sitio *in*
vitro, J. Biol. Chem. 253:6551, uso de enlazadores Tab
(Pharmacia), y similares.

15 Los datos de cristalografía de rayos X indican que la
inmunoglobulina de anticuerpo plegada generalmente forma una
estructura cilíndrica larga que comprende dos capas de
láminas b antiparalelas, que constan cada una de tres o
cuatro cadenas b. En una región variable, tres bucles de cada
20 uno de los dominios V de cadenas H y L se agrupan juntos para
formar un sitio de unión a antígeno. Cada uno de estos bucles
se llama región determinante de complementariedad (CDR). Las
CDR tienen la mayor variabilidad en la secuencia de
aminoácidos del anticuerpo. Las partes de la región variable
25 que no son parte de una CDR se llaman "regiones flanqueantes"
(regiones "FR") y generalmente desempeñan una tarea en el
mantenimiento de la estructura de las CDR. Preferiblemente,
todas las CDR de un anticuerpo dado se injertan en un
anticuerpo aceptor, para conservar la región de unión para la
30 región del epítipo del receptor de TRAIL. Se aprecia que el
injerto de una parte de la cantidad total de CDR en un
donante es funcional en este documento. Se entiende que el
injerto generalmente implica el remplazo, resto por resto, de

un aminoácido o región, por otro. Sin embargo, de forma ocasional, especialmente con la transferencia de una región, pueden añadirse u omitirse o sustituirse uno o más restos, según se desee, y que dichas delecciones e inserciones, así como los remplazos e inversiones apropiadas, pertenecen a las habilidades de la técnica.

Un anticuerpo de la presente invención se obtiene, por ejemplo, injertando cada CDR de subunidad de cadena L y cadena H de un anticuerpo monoclonal anti-receptor de TRAIL en una región CDR correspondiente de un anticuerpo humano, humanizando de éste modo un anticuerpo monoclonal de ratón eficaz contra un receptor de TRAIL.

También pueden generarse fragmentos de anticuerpo que contienen el idiotipo de la molécula y en este documento hacerse funcionales usando técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen de forma ilustrativa el fragmento (AB')₂ anti-receptor de TRAIL que puede producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, los fragmentos AB' del anticuerpo contra el receptor de TRAIL generados a través de reducción de los puentes disulfuro del fragmento (AB')₂ contra el receptor de TRAIL, y el fragmento de anticuerpo que se genera tratando la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor.

Los anticuerpos de la presente invención pueden crearse usando numerosas técnicas conocidas en la técnica. A modo de ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-DR5 TRA-8 puede obtenerse cultivando un hibridoma que, a su vez, puede obtenerse inmunizando un ratón con DR5 humano y posteriormente fusionando las células esplénicas o las células del ganglio linfático del ratón con células de mieloma de ratón.

La preparación de un anticuerpo monoclonal implica de forma ilustrativa las siguientes etapas:

- a) purificación de una biomacromolécula para su uso como antígeno;
- b) preparación de células productoras de anticuerpos, después de inmunizar primero a un animal usando inyecciones
5 del antígeno, extrayendo sangre del animal y ensayando el título de anticuerpo, para determinar cuándo retirar el bazo;
- c) preparación de células de mieloma;
- d) fusión de las células productoras de anticuerpo y las células de mieloma;
- 10 e) selección de un hibridoma productor de un anticuerpo deseado;
- f) preparación de un clon celular único (clonación);
- g) opcionalmente, cultivo de las células de hibridoma, o cría de animales en los que se han transplantado las
15 células de hibridoma, para una preparación a gran escala del anticuerpo monoclonal; y
- h) ensayo de las actividades biológicas y la especificidad, o ensayo de las propiedades del agente marcador, del anticuerpo monoclonal preparado de éste modo.
- 20 El procedimiento para la preparación de un anticuerpo monoclonal se detalla a continuación con referencia a las etapas descritas anteriormente. Este método para preparar un anticuerpo de la presente invención pretende ser solamente ilustrativo de los métodos de preparación y no se limitan al
25 mismo. Pueden seguirse otros procedimientos conocidos, o el siguiente método modificado, por ejemplo usando células productoras de anticuerpo diferentes a las células esplénicas y el mieloma.
- (a) Preparación de antígeno.
- 30 Una proteína recombinante (a partir de ahora mencionada como "DR5 humano recombinante" o "DR4 humano recombinante"), eficaz como antígeno, se obtiene transfectando células QBI-293A con el vector de expresión pAdDR5-IgG para una proteína

de fusión que comprende el dominio extracelular de DR5 o DR4 y la región Fc del anticuerpo IgG1 humano (a partir de ahora mencionado como "IgG"), (cf. PTA-1428) para expresarla usando el kit ADENO-Quest (Quantum Biotechnologies Inc., Canadá), y
5 recogiendo y purificando parcialmente el producto de expresión. El plásmido pAdDR5-IgG se construye insertando ADN que codifica una proteína de fusión de DR5 o DR4 humano e IgG humana en pAdCMV5, que es un vector de expresión para células animales. Otros materiales, tales como el ADN que codifica
10 DR5 o DR4, el vector, y el hospedador, son funcionales en este documento.

La proteína de fusión de DR5 o DR4 humano e IgG producida en el sobrenadante de cultivo de las células QBI-293A transfectadas con el vector pAdDR5-IgG pueden
15 purificarse parcialmente por cromatografía de afinidad en proteína A-Sepharose o cromatografía de afinidad en proteína G-Sepharose, o cromatografía de intercambio iónico usando una columna Resource Q (nombre comercial; Pharmacia).

Como alternativa, el DR5 o DR4 purificado obtenido de
20 las membranas celulares de líneas celulares humanas se usa como antígeno. Además, como las estructuras primarias de DR4 y DR5 son conocidas (cf. PTA-1428), puede sintetizarse químicamente un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1, por un método conocido tal
25 como el método de Sanger, y usarse como antígeno.

(b) Preparación de células productoras de anticuerpo.

Se inmuniza un ratón con el inmunógeno producido en la etapa (a), se mezcla con un adyuvante, tal como adyuvante completo o incompleto de Freund o alumbre. Otros animales
30 experimentales adecuados incluyen de forma ilustrativa ratas, cobayas, conejos, perros, pollos, caballos, cerdos, vacas y ovejas.

Las vías de administración adecuadas para inmunizar a un

animal experimental incluyen las vías subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, e intramuscular, siendo preferidas las inyecciones subcutáneas e intraperitoneales.

5 Las inmunizaciones opcionalmente se realizan por una única dosis o por varias dosis repetidas a intervalos apropiados (preferiblemente de 1 a 5 semanas). Los animales inmunizados se controlan para el título de anticuerpos en su suero, y se selecciona un animal con un título de anticuerpo
10 suficientemente alto como fuente de células productoras de anticuerpo. La selección de un animal con un alto título hace que el posterior proceso sea más eficaz. Las células para la posterior fusión generalmente se recogen del animal de 3 a 5 días después de la inmunización final.

15 Los métodos para ensayar el título de anticuerpos incluyen diversas técnicas bien conocidas tales como radioinmunoensayo (a partir de ahora, mencionado como "RIA"), inmunoensayo enzimático en fase sólida (a partir de ahora, mencionado como "ELISA"), ensayo de anticuerpos fluorescentes
20 y ensayo de hemaglutinación pasiva, siendo preferidos RIA y ELISA por razones de sensibilidad de detección, rapidez, precisión y potencial de automatización.

La determinación del título de anticuerpos puede realizarse, por ejemplo, por ELISA, del siguiente modo.
25 Primero, se adsorbe DR5 o DR4 purificado o parcialmente purificado en la superficie de una fase sólida, tal como una placa ELISA de 96 pocillos, seguido del bloqueo de cualquier superficie restante, a la que no se ha unido DR5 o DR4, con una proteína no relacionada con el antígeno, tal como
30 albúmina sérica bovina (BSA). Después del lavado, las superficies de los pocillos se ponen en contacto con muestras diluidas en serie de sueros de ratón para posibilitar la unión del anticuerpo contra DR5 o DR4 en las muestras al

antígeno. Se añade un anticuerpo anti-ratón marcado como anticuerpo secundario, para que se una al anticuerpo de ratón. El marcador puede incluir un marcador enzimático, un marcador fluorescente u otros marcadores conocidos en la técnica. Después del lavado, se añade el sustrato enzimático, y se estima el título de anticuerpos determinando el cambio en la adsorbancia debido al desarrollo de color causado por la alteración del sustrato o similares.

(c) Preparación de células de mieloma.

Las células de líneas celulares de ratón establecidas sirven como fuente de células de mieloma, incluyendo, por ejemplo, las cepas de mieloma derivadas de ratones BALB/c resistentes a 8-azaguanina P3X63Ag8U.1 (P3-U1), 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 se transfiere en serie en un medio apropiado, tal como medio de 8-azaguanina. El medio de 8-azaguanina incluye medio de Dulbecco modificado por Iscove (a partir de ahora mencionado como "IMDM") o medio de Eagle modificado por Dulbecco (a partir de ahora mencionado como "DMEM"), medio RPMI-1640 suplementado con glutamina, 2-mercaptoetanol, gentamicina, suero de ternera fetal (a partir de ahora mencionado como "FCS"), y 8-azaguanina. Las células después se transfieren a un medio normal, tal como medio ASF104 (Ajinomoto, K. K.) que contiene FCS al 10%, de 3 a 4 días antes de la fusión, para asegurar que están disponibles al menos 2×10^7 células en el día de la fusión.

(d) Fusión celular.

Los linfocitos y las células plasmáticas obtenidas de cualquier parte adecuada del animal son células precursoras para producir el anticuerpo. Las fuentes de linfocitos o células plasmáticas incluyen de forma ilustrativa bazo, ganglios linfáticos, sangre periférica, o cualquier

combinación apropiada de los mismos, siendo las células esplénicas la fuente más común.

Después de la última inyección de refuerzo, el tejido en el que están presentes las células productoras de anticuerpos se retira de un ratón que tiene el título de anticuerpos predeterminado. La técnica actualmente favorecida para la fusión de células esplénicas con células de mieloma preparadas en la etapa c), emplea polietilenglicol.

La técnica de fusión incluye lavar el bazo y las células de mieloma con medio sin suero (tal como RPMI 1640) o solución salina tamponada con fosfato (a partir de ahora mencionada como "PBS") de modo que la proporción numérica de células esplénicas a células de mieloma sea de aproximadamente entre 5:1 y 10:1, y después se centrifugan. Después de haber desechado el sobrenadante y haber soltado suficientemente las células sedimentadas, se añade 1 ml de medio sin suero que contiene polietilenglicol al 50% (p/v) (p.m. 1.000 a 4.000) gota a gota con mezcla. Posteriormente, se añaden lentamente 10 ml de medio sin suero y después se centrifugan. Se desecha de nuevo el sobrenadante, y las células sedimentadas se suspenden en una cantidad apropiada de medio HAT que contiene una solución de hipoxantina, aminopterina y timidina (a partir de ahora mencionado como "HAT") e interleuquina-2 de ratón (a partir de ahora mencionado como "IL-2"). Después la suspensión se distribuye en los pocillos de placas de cultivo (también mencionadas en este documento simplemente como "placas") y se incuba en presencia de CO₂ al 5% v/v a 37°C durante aproximadamente 2 semanas, con la adicción suplementaria de medio HAT según sea apropiado.

(e) Selección de hibridomas.

Cuando la cepa de mieloma usada es resistente a 8-azaguanina, es decir, es deficiente en la enzima hipoxantina

guanina fosforribosil transferasa (HGPRT), cualquier célula de mieloma no fusionada y cualquier fusión mieloma-mieloma es incapaz de sobrevivir en medio HAT. Por otro lado, las fusiones de células productoras de anticuerpos entre sí, así como hibridomas de células productoras de anticuerpos con células de mieloma pueden sobrevivir, teniendo solamente las primeras una vida limitada. Por consiguiente, la incubación continuada en medio HAT provoca la selección de solamente los hibridomas deseados.

Los hibridomas resultantes crecen en colonias que después se transfieren en medio HAT que carece de aminopterina (medio HT). Después de ello, se retiran alícuotas del sobrenadante de cultivo para determinar el título de anticuerpo anti-Fas por, por ejemplo, ELISA. Cuando se usa la proteína de fusión mencionada anteriormente como antígeno ELISA, también es necesario eliminar los clones productores de un anticuerpo que se una específicamente a la región Fc de IgG1 humana. La presencia o ausencia de dicho clon puede verificarse, por ejemplo, por ELISA usando Fas-IgG1 o IgG1, como antígeno.

(f) Clonación

Los hibridomas que han demostrado producir anticuerpos específicos, usando un método similar al descrito en la etapa b) para determinar el título de anticuerpos, después se transfieren a otra placa para la clonación. Los métodos de clonación adecuados incluyen: el método de dilución limitante, en el que los hibridomas se diluyen para que contengan una célula por pocillo de una placa y después se cultivan; el método de agar blando en el que se recuperan colonias después de cultivarlas en medio de agar blando; un método que usa un micromanipulador para separar una única célula para el cultivo; y "clasificación de un clon", en el que se separan células individuales por un clasificador

celular.

El procedimiento de clonación de acuerdo con, por ejemplo, el método de dilución limitante se repite de 2 a 4 veces para cada pocillo que muestre un título de anticuerpos, y los clones que tienen título de anticuerpos estable se seleccionan como hibridomas productores de anticuerpo monoclonal anti-DR5. Los hibridomas que producen un anticuerpo anti-DR5 de ratón se seleccionan por un método similar para obtener una línea celular productora de anticuerpo monoclonal anti-DR5.

El hibridoma TRA-8 de ratón-ratón que es una base para los anticuerpos de la presente invención se depositó en la American Type Culture Collection el 1 de marzo de 2000, y tiene el número de acceso PTA-1428. El hibridoma 2E12 se depositó en la American Type Culture Collection el 24 de octubre de 2001, como se ha descrito anteriormente y tiene el número de acceso a la ATCC PTA-3798. Por consiguiente, cuando se prepara un anticuerpo usando el hibridoma TRA-8 de ratón-ratón o cualquier otro hibridoma establecido, la preparación puede realizarse siguiendo un procedimiento empezando desde la siguiente etapa g), omitiendo las etapas a) a f).

(g) Cultivo de hibridoma para preparar un anticuerpo monoclonal.

El hibridoma obtenido por la clonación después se cultiva en medio normal, no en medio HT. Se realiza cultivo a gran escala por cultivo en frascos rotatorios, usando frascos de cultivo grandes o por cultivo rotativo. El sobrenadante del cultivo a gran escala después se recoge y purifica por un método adecuado, tal como filtración en gel, que es bien conocido para los especialistas en la técnica, para obtener un anticuerpo monoclonal contra DR5 o DR4 que es una base para los anticuerpos de la presente invención. El hibridoma también puede cultivarse de forma intraperitoneal en un ratón

singénico, tal como un ratón BALB/c o un ratón nu/nu, para obtener fluidos ascíticos que contengan un anticuerpo monoclonal contra DR5 o DR4 en grandes cantidades. Se usan convenientemente kits de purificación de anticuerpos monoclonales disponibles en el mercado (por ejemplo, kit MAbTrap GII; Pharmacia) para purificar los anticuerpos recogidos.

Los anticuerpos monoclonales preparados como anteriormente tienen una alta especificidad por DR5 o DR4 humano, respectivamente.

(h) Ensayo del anticuerpo monoclonal.

Los métodos de identificación adecuados del isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal incluyen el método de Ouchterlony, ELISA y RIA. Preferiblemente, se usa un kit comercial para la identificación, tal como un kit Mouse Typer (nombre comercial; BioRad).

La cuantificación de la proteína puede realizarse por el método de Folin-Lowry, o por cálculo basado en la absorbancia a 280 nm ($1,4 \text{ (OD280)} = 1 \text{ mg/ml}$ de inmunoglobulina).

La identificación del epítipo que el anticuerpo monoclonal reconoce se realiza del siguiente modo. Primero, se preparan diversas estructuras parciales de la molécula que el anticuerpo monoclonal reconoce. Las estructuras parciales se preparan por un método en el que se preparan sintéticamente diversos péptidos parciales de la molécula por la técnica de síntesis de oligopéptidos conocida, o un método en el que se incorpora ADN que codifica el polipéptido parcial deseado en un plásmido de expresión adecuado, y se expresa en un hospedador adecuado, tal como *E. coli*, para producir los péptidos. Generalmente, ambos métodos se usan frecuentemente en combinación para el objetivo anterior. Por ejemplo, puede prepararse una serie de polipéptidos que tienen longitudes apropiadamente reducidas, trabajando desde

el extremo C o N de la proteína antigénica, por técnicas de ingeniería genética establecidas. Estableciendo qué fragmentos reaccionan con el anticuerpo se obtiene una idea aproximada del epítipo.

5 El epítipo se identifica mejor sintetizando una diversidad de oligopéptidos más pequeños correspondientes el mismo o mutantes del péptido usando técnicas de síntesis de oligopéptidos establecidas para determinar una propiedad de unión de los péptidos al anticuerpo monoclonal anti-DR5, por
10 ejemplo, que es una base para la preparación del anticuerpo de la presente invención y una inhibición competitiva de la unión del péptido a un antígeno con el anticuerpo monoclonal. Pueden usarse convenientemente kits disponibles en el mercado, tales como el kit SPOTs (Genosys Biotechnologies, Inc.) y una serie de kits de síntesis de péptidos multipin
15 basados en el método de síntesis de multipin (Chiron Corp.) para obtener una gran diversidad de oligopéptidos.

Un anticuerpo de la presente invención tiene las diversas propiedades funcionales a) a f) descritas a
20 continuación, cada una de las cuales se verifica por, por ejemplo, un método descrito a continuación en este documento.

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

Una característica única de la presente invención es la
25 capacidad de unirse a DR5 de superficie celular. Esto se demuestra por análisis de citometría de flujo de células que expresan DR5. Primero, se confirma la unión de superficie celular específica de DR5 por las células COS-7 transfectadas con el ADNc de longitud completa que codifica DR5 humano. Específicamente, TRA-8 sólo reconoce células COS-7
30 transfectadas con DR5 pero no con vector de control vacío o vector que codifica DR4. Segundo, se ensayan tres orígenes diferentes: células hematopoyéticas, de glioma, y de cáncer

de próstata de tumor maligno humano. La mayoría de estas células tumorales transfectadas expresaban niveles significativos de DR5 de superficie celular, aunque los niveles de expresión variaban enormemente. Tercero, se examinan dos paneles de células fibroblásticas sinoviales primarias humanas de pacientes RA y OA. Todas las células sinoviales RA expresaban niveles significativamente más elevados de DR5 en comparación con células OA.

b) Inducción de la apoptosis de células tumorales malignas humanas *in vitro* en ausencia de entrecruzamiento.

La capacidad de un anticuerpo creado de acuerdo con la presente invención de reconocer el receptor de TRAIL y de inducir directamente la apoptosis de células tumorales humanas malignas se determina por ensayo de viabilidad celular (ATPLite) durante cultivo *in vitro* de células con diversas concentraciones de un anticuerpo, específicamente TRA-8. La mayoría de células tumorales son susceptibles a la apoptosis inducida por TRA-8. Para algunas células, TRA-8 mostraba una fuerte actividad inductora de la apoptosis, por ejemplo, TRA-8 es capaz de inducir la apoptosis de células Jurkat humanas en los niveles de pg/ml. De forma importante, la apoptosis inducida por TRA-8 no requería entrecruzamiento, y en la mayoría de las células, TRA-8 mostraba una actividad inductora de la apoptosis más fuerte que TRAIL soluble recombinante en presencia del potenciador.

c) Actividad tumoricida de TRA-8 *in vivo*.

La actividad tumoricida de TRA-8 se evalúa en dos modelos SCID/células tumorales humanas. Primero, se inoculan por vía intravenosa ratones SCID con células Jurkat de leucemia humana, y se tratan con una única dosis (100 µg) de TRA-8. Los resultados muestran que la mayoría de las células Jurkat implantadas se eliminan de la sangre periférica y del bazo por el tratamiento con TRA-8, como se determina por

análisis de citometría de flujo y tinción inmunohistoquímica in situ de células Jurkat. Segundo, se inoculan por vía subcutánea células de astrocitoma humano, 1321N1, en ratones SCID, y los ratones que albergan el tumor se tratan con una
5 única dosis de TRA-8. El crecimiento de las células 1321N1 implantadas se inhibe significativamente en ratones tratados con TRA-8 como se determina por los tamaños del tumor y análisis histológico.

d) Identificación de células sinoviales RA por TRA-8.

10 Las células sinoviales primarias aisladas de 8 pacientes RA y 4 pacientes OA se ensayan para la expresión de superficie celular de DR5. TRA-8 es capaz de teñir positivamente todas las células RA pero de teñir negativamente todas las células OA. Por tanto, RA se
15 diferencia de OA por la expresión superficial de DR5 detectado por TRA-8.

e) Inducción de la apoptosis en células fibroblásticas sinoviales RA por TRA-8.

La capacidad de TRA-8 de inducir la apoptosis de células
20 sinoviales RA se determina por ensayo de viabilidad celular durante cultivo *in vitro* en presencia de diversas concentraciones de TRA-8. Todas las células RA mostraron niveles de altos a intermedios de susceptibilidad a 100 ng/ml de TRA-8. En contraste, todas las células OA son
25 esencialmente resistentes a la apoptosis inducida por TRA-8. De forma importante, TRA-8 mostró una mejor actividad inductora de la apoptosis en células sinoviales RA que TRAIL soluble con el potenciador. Además, en comparación con el anticuerpo anti-Fas (CH-11), TRA-8 mostró una mejor
30 selectividad por células sinoviales RA.

f) TRA-8 no induce la producción de MMP en células sinoviales RA.

Como TRA-8 es capaz de inducir la actividad de NF-kb en

células sinoviales RA como TNF- α , se determina el efecto de TRA-8 sobre la producción de MMP-1 y MMP-3 de células sinoviales. Aunque TNF- α inducía un aumento dependiente de la dosis de MMP, TRA-8 es incapaz de inducir ninguna producción
5 de MMP, y en algunas concentraciones, TRA-8 disminuía ligeramente la producción de MMP en células sinoviales RA.

g) TRA-8 induce múltiple activación de caspasas.

Como las caspasas desempeñan una tarea crucial en la inducción de la apoptosis, se determina la capacidad de TRA-8
10 de inducir la activación de caspasas en células Jurkat humanas. Cuando se incuban células Jurkat con una baja dosis (50 ng/ml) de TRA-8, se observa la activación de caspasa 8, caspasa 9, y caspasa 3 tan pronto como a los 15 minutos después de la incubación como se demuestra por análisis de
15 transferencia de Western y análisis de escisión de caspasas. En términos de tiempo, cantidad y fuerza de activación de las caspasas, los anticuerpos de la presente invención, incluyendo el anticuerpo demostrativo TRA-8, mostraron una actividad mucho mejor que cualquier otro anticuerpo inductor
20 de la apoptosis conocido, tal como el anticuerpo anti-Fas humano (CH-11).

El anticuerpo 2E12 se une específicamente a DR4 en su forma soluble, tiene actividad inductora de la apoptosis *in vivo* e *in vitro* en células diana que expresan DR4
25 (incluyendo, por ejemplo, células cancerosas, células sinoviales de artritis reumatoide, células inmunes activadas como linfocitos activados, y células infectadas por virus), tiene actividad tumoricida *in vivo* (preferiblemente, en ausencia de toxicidad a células no tumorales).
30 Preferiblemente, el anticuerpo contra DR4 de la presente invención tiene actividad inductora de la apoptosis caracterizada por menos de aproximadamente el 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, o 10% de viabilidad de las células diana a

concentraciones de anticuerpo de menos de 30 µg/ml, 3 µg/ml, 0,3 µg/ml, o 0,03 µg/ml y actividad tumoricida caracterizada por una reducción del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% en el tamaño del tumor. Por tanto, un anticuerpo
5 de la presente invención es una sustancia que tiene la propiedad de inducir selectivamente la apoptosis en células patogénicas como se muestra en el efecto (a) y (g). Por consiguiente, es útil como agente profiláctico y terapéutico para enfermedades asociadas con una supervivencia inapropiada
10 de las células o una proliferación inapropiada de las células, tales como las que se pueden atribuir a la mala regulación de los sistemas de apoptosis incluyendo el sistema Fas/ligando Fas.

La capacidad de un anticuerpo de la presente invención
15 de inducir la apoptosis se confirma cultivando células tales como la línea celular de leucemia humana Jurkat (American Type Culture N° TIB-152) y la línea celular de astrocitoma 1321N1 en medio en el que se ha añadido la muestra de ensayo, y determinando el índice de supervivencia por, por ejemplo,
20 un ensayo de ATPLite.

El anticuerpo de la presente invención, es decir, los anticuerpos contra DR5 y DR4 que tienen casi la misma inmunogenicidad para seres humanos que la de los anticuerpos humanos, se usa como agente para la profilaxis o tratamiento
25 de enfermedades asociadas con supervivencia o proliferación inapropiada de las células, incluyendo aquellas que se pueden atribuir a la mala regulación de los sistemas de apoptosis en enfermedades inflamatorias y autoinmunes que incluyen ilustrativamente lupus sistémico eritematoso, enfermedad de
30 Hashimoto, artritis reumatoide, enfermedad de injerto contra hospedador, síndrome de Sjögren, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, esclerodermia, síndrome de

Goodpasture, enfermedad de Crohn, anemia hemolítica autoinmune, esterilidad, miastenia grave, esclerosis múltiple, enfermedad de Basedow, trombopenia púrpura, diabetes mellitus insulín dependiente, alergia; asma, 5 enfermedad atópica, arteriosclerosis; miocarditis; cardiomiopatía; nefritis glomerular; anemia hipoplásica; rechazo después de un transplante de órganos y numerosas malignidades de tejidos de pulmón, próstata, hígado, colon, cuello del útero, linfáticos y de mama. Los anticuerpos de la 10 presente invención pueden usarse para dirigir e inducir selectivamente la apoptosis en células inmunes activadas incluyendo linfocitos activados, células linfoides, células mieloides, y células sinoviales reumatoides (incluyendo sinoviocitos inflamatorios, sinoviocitos tipo macrófago, 15 sinoviocitos tipo fibroblasto) y en células infectadas por virus (incluyendo aquellas infectadas con VIH, por ejemplo) siempre que aquellas células marcadas como diana expresen o pueda hacerse que expresen los receptores de TRAIL específicos (es decir, DR4 o DR5).

20 Dicho agente profiláctico o terapéutico puede administrarse en diversas formas. Los modos adecuados de administración incluyen administración oral, tal como por comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos y jarabes, o administración parenteral, tal como por inyección o 25 supositorios.

El anticuerpo o agente terapéutico puede administrarse por vía oral, rectal, intracisternal, intraventricular, intracraneal, intratecal, intra-articular, intravaginal, parenteral (intravenosa, intramuscular o subcutánea), de 30 forma local (polvos, pomadas, u gotas), por vía intraperitoneal, transdérmica, por inhalación o como un pulverizador bucal o nasal. La cantidad exacta del anticuerpo o agente terapéutico necesaria variará de un sujeto a otro,

dependiendo de la edad, del peso y del estado general del sujeto, la gravedad de la enfermedad que se está tratando, la localización y tamaño del tumor, los compuestos particulares usados, el modo de administración, y similares. Una cantidad
5 apropiada puede determinarla un especialista en la técnica usando solamente experimentación rutinaria dados los contenidos de este documento. Las dosificaciones sencillas típicas de anticuerpo varían de 0,1-10.000 microgramos, preferiblemente entre 1 y 100 microgramos. Las
10 concentraciones típicas de anticuerpo en un vehículo varían de 0,2 a 2000 nanogramos por mililitro suministrado. Para inyección en una articulación, los volúmenes de anticuerpo y vehículo variarán dependiendo de la articulación, pero se inyectan aproximadamente 0,5-10 ml, y preferiblemente 1-5 ml,
15 en una rodilla humana y aproximadamente 0,1-5 ml, y preferiblemente 1-2 ml en el tobillo humano.

Dependiendo del modo pretendido de administración, el anticuerpo o agente terapéutico puede estar en composiciones farmacéuticas en formas de dosificación sólidas, semisólidas
20 o líquidas, tales como, por ejemplo, comprimidos, supositorios, píldoras, cápsulas, polvos, líquidos, o suspensiones, preferiblemente en forma de dosificación unitaria adecuada para una única administración de una dosificación precisa. Las composiciones incluirán una
25 cantidad eficaz del sustrato seleccionado en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable y, además, pueden incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, vehículos, o diluyentes. Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente indeseable o
30 indeseable de otro modo, que puede administrarse a un individuo junto con el sustrato seleccionado sin causar efectos biológicos indeseables significativos o sin interaccionar de un modo perjudicial con cualquiera de los

otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

Las composiciones adecuadas para inyección parenteral pueden comprender soluciones, dispersiones, suspensiones o
5 emulsiones acuosas o no acuosas fisiológicamente aceptables y estériles, y polvos estériles para su reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. Los ejemplos de medios, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles
10 (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tal como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina,
15 por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y por el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes, y dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos
20 puede asegurarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico y similares. La absorción prolongada de la forma
25 farmacéutica inyectable puede conseguirse por el uso de agentes retardadores de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, y
30 gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente (o vehículo) habitual inerte tal como citrato sódico o fosfato dicálcico o (a) cargas o diluyentes, como por ejemplo,

almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico, (b) aglutinantes, como por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa, y goma arábica, (c) 5 humectantes, como por ejemplo, glicerol, (d) agentes disgregantes, como por ejemplo, agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos complejos, y carbonato sódico, (e) retardantes de la solución, como por ejemplo, parafina, (f) acelerantes de 10 la absorción, como por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes, como por ejemplo, alcohol cetílico, y monoestearato de glicerol, (h) adsorbentes, como por ejemplo, caolín y bentonita, y (i) lubricantes, como por ejemplo, talco, estearato cálcico, 15 estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato sódico, o mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos, y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tamponantes.

Las composiciones sólidas de un tipo similar también 20 pueden emplearse como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular, y similares.

Las formas de dosificación sólidas tales como 25 comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras, y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y vainas, tales como recubrimientos entéricos y otros bien conocidos en la técnica. Pueden contener agentes opacificantes, y también pueden ser de un tipo de composición que libera el compuesto 30 o compuestos activos en una cierta parte del tracto intestinal de un modo retardado. Los ejemplos de composiciones impregnantes que pueden usarse son sustancias poliméricas y ceras. Los compuestos activos también pueden

estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes mencionados anteriormente.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y
5 elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes habitualmente usados en la técnica, tales como agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, como por ejemplo, alcohol
10 etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites, en particular, aceite de algodón, aceite de cacahuete, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino y aceite de
15 sésamo, glicerol, tetrahidrofurfuril alcohol, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de estas sustancias, y similares.

Más allá de dichos diluyentes inertes, la composición también puede incluir adyuvantes, tales como agentes
20 humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes.

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

Las composiciones para administraciones rectales son preferiblemente supositorios que pueden prepararse mezclando
30 los compuestos de la presente invención con excipientes o vehículos no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio, que son sólidas a temperaturas habituales pero líquidas a temperatura

corporal y, por lo tanto, se funden en el recto o la cavidad vaginal y liberan el componente activo.

Las formas de dosificación para administración tópica de un compuesto de esta invención incluyen pomadas, polvos, 5 pulverizaciones, e inhalantes. El componente activo se mezcla en condiciones estériles con un vehículo fisiológicamente aceptable y cualquier conservante, tampón, o propulsor que pueda ser necesario. Las formulaciones oftálmicas, pomadas, polvos, y soluciones también se contemplan como dentro del 10 alcance de esta invención.

La expresión "sales, ésteres, amidas y profármacos farmacéuticamente aceptables" como se usa en este documento se refiere a aquellas sales de carboxilato, sales de adición de aminoácidos, ésteres, amidas, y profármacos de los 15 compuestos de la presente invención que son, dentro del alcance del justo criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de los pacientes sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica indebidas, y similares, en proporción con una relación beneficio/riesgo razonable, y 20 eficaz para su uso pretendido, así como las formas zwitteriónicas, cuando sea posible, de los compuestos de la invención. El término "sales" se refiere a las sales de adicción de ácidos inorgánicos y orgánicos, relativamente no tóxicas de compuestos de la presente invención. Estas sales 25 pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislando la sal formada de este modo. Las sales representativas 30 incluyen las sales bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, nitrato, acetato, oxalato, valerato, aleato, palmitato, estearato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato,

tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato, matanosulfonato, y laurilsulfonato, y similares. Éstas pueden incluir cationes basados en metales alcalinos y alcalino-térreos, tales como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y similares, así como cationes amonio no tóxicos, amonio cuaternario y amina incluyendo, aunque sin limitación, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, tetrilamina, etilamina y similares (véase, por ejemplo, S. M. Barge et al., "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66:1-19).

El término "profármaco" se refiere a compuestos que se transforman rápidamente *in vivo* para producir los compuestos precursores de la fórmula anterior, por ejemplo, por hidrólisis en la sangre. Se proporciona un análisis minucioso en T. Higuchi y V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14 de la A.C.S. Symposium Series, y en *Bioreversible Carriers in Drug Design*, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

Una célula diana es una célula de un animal incluyendo de forma ilustrativa seres humanos, primates no humanos, gatos, perros, ratas, ratones, cobayas, conejos, cabras, ovejas, vacas, caballos, pollos, cerdos, monos tití y hurones.

Además, el anticuerpo o agente terapéutico puede existir en formas no solvatadas así como solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables, tales como agua, etanol, y similares. En general, las formas solvatadas se consideran equivalentes a las formas no solvatadas para los propósitos de la siguiente invención.

Las moléculas de anticuerpo se purifican por técnicas conocidas que incluyen de forma ilustrativa cromatografía de absorción de amino o por afinidad por amino, técnicas cromatográficas tales como cromatografía líquida a alta

presión, o una combinación de las mismas.

Otro aspecto incluye un producto farmacéutico para su uso en el suministro de anticuerpo anti-receptor de TRAIL biológicamente activo o anticuerpo humanizado anti-receptor de TRAIL a un vertebrado. El producto farmacéutico incluye una cantidad farmacéuticamente eficaz de anticuerpo anti-receptor de TRAIL o fragmento del mismo, un vehículo farmacéuticamente aceptable, y un recipiente que encierra el vehículo y el anticuerpo de un modo estéril.

Una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención inhibe la proliferación celular o induce la apoptosis por contacto con una célula diana o con células diana. Una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo que reconoce DR5 o DR4 o un anticuerpo humanizado que reconoce DR5 o DR4 es una cantidad administrada a un individuo suficiente para causar un efecto deseado. Como se usa en este documento, las expresiones "cantidad farmacéuticamente eficaz" y "cantidad terapéutica" son sinónimas. Los efectos deseados de la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de anticuerpos que reconocen DR5 o DR4 incluyen la muerte de una o más células diana, la inhibición del crecimiento de una o más células diana, la estimulación de DR5 o DR4, respectivamente, la unión a DR5 o DR4, respectivamente, y niveles o actividad aumentada de NFkB en una célula diana. Una célula diana es una célula que expresa DR5 o DR4 e incluye de forma ilustrativa células que crecen de forma anormal y células tumorales tales como papilomas y verrugas; cáncer de mama, cáncer de colon, hepatomas, leucemias, cáncer pulmonar, melanomas, mielomas, osteosarcomas, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de la cabeza y el cuello, cáncer de la tiroides, cáncer uterino, tumores del cerebro tales como astrocitomas, células inmunes activadas

(por ejemplo, linfocitos activados, células linfoides y mieloides), células inflamatorias, células sinoviales de artritis reumatoide, y células infectadas por virus. In vivo, la célula diana es una célula de un individuo con una
5 afección patológica, incluyendo aquellas en las que la proliferación celular es anormal o está mal regulada tal como cáncer maligno o benigno o artritis reumatoide.

En otra realización preferida, la célula diana también se pone en contacto con un agente terapéutico. Por tanto, los
10 anticuerpos y composiciones de la presente invención pueden administrarse solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos incluyen, aunque sin limitación, otros miembros de la familia de TNF, agentes quimioterapéuticos, anticuerpos, antivirales, anti-
15 inflamatorios esteroideos y no esteroideos, agentes inmunoterapéuticos convencionales, citoquinas, quimioquinas, y/o factores de crecimiento. Las composiciones pueden administrarse de forma concomitante (por ejemplo, como una mezcla), por separado pero simultáneamente (por ejemplo,
20 mediante líneas intravenosas diferentes en el mismo sujeto), o secuencialmente (por ejemplo, uno de los compuestos o agentes se da primero seguido por el segundo). Por tanto, el término "composición" se usa para hacer referencia a administración concomitante, simultánea, o secuencial de dos
25 o más agentes.

En una realización, la composición es adecuada para la administración de miembros de la familia de TNF. El TNF, moléculas relacionadas con TNF o tipo TNF que pueden administrarse con el anticuerpo de la invención incluyen,
30 aunque sin limitación, formas solubles de TNF- α , linfoxina- α (LT- α , también conocido como TNF- β), LT- β (encontrado en el heterotrímero complejo LT- α 2- β), OPGL, FasL, CD27L, CD30L,

CD40L, 4-1BBL, DcR3, OX40L, TNF- γ (documento WO 96/14328), TRAIL, AIM-II (documento WO 97/34911), APRIL (J. Exp. Med. 188:1185-90), endoquina- α (documento WO 98/07880), TR6 (documento WO 98/30694), OPG y factor de crecimiento de nervios (NGF), y formas solubles de Fas, CD30, CD27, CD40 y 4-1BB, TR2 (documento WO 96/34095), DR3 (documento WO 97/33904), DR4 (documento WO 98/32856), TR5 (documento WO 98/30693), TRANK, TR9 (documento WO 98/56892), TRIO (documento WO 98/54202), 312C2 (documento WO 98/06842), y TR12, y formas solubles de CD154, CD70 y CD153.

En otra realización, los anticuerpos de la invención son adecuados para administrarse en combinación con ligandos CD40 (CD40L) de origen natural, sintéticos o diseñados, incluyendo, por ejemplo, una forma soluble de CD40L (por ejemplo, AVREND), fragmentos, variantes o derivados biológicamente activos de CD40L, anticuerpos contra CD40L (por ejemplo, anticuerpos agonistas o antagonistas), y/o anticuerpos contra CD40 (por ejemplo, agonistas o antagonistas).

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

De acuerdo con la invención, los anticuerpos de la

invención son adecuados para administrarse con ligando Fas (Fas-L) o un anticuerpo contra Fas que se une a Fas y transduce la señal biológica que provoca la apoptosis. Preferiblemente, los anticuerpos contra Fas empleados de acuerdo con éste método son anticuerpos monoclonales.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con agentes anti-retrovirales, inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa, inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa, y/o inhibidores de proteasa. Los inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa que pueden administrarse en combinación con los anticuerpos de la invención incluyen, aunque sin limitación, RETROVIR® (zidovudina/AZT) (Gaxo-Wellcome, Research Triangle Park, NC), VIDEX® (didanosina/ddI) (Bristol-Myers Squibb, Nueva York), HIVID® (zalcitabina/ddC) (Roche, Nutley, Nueva Jersey), ZERIT® (estavudina) (Bristol-Myers Squibb). Los inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa que pueden administrarse en combinación con el anticuerpo de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, VIRAMUNE® (nevirapina) (Boehringer Ingelheim/Roxanne, Columbus, Ohio), RESCRIPTOR® (delavirdina) (Pharmacia & Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan), y SUSTIVA® (efavirenz) (Bristol-Myers Squibb).

Los inhibidores de proteasa que pueden administrarse en combinación con los anticuerpos de la invención incluyen, aunque sin limitación, CRIXIVAN® (sulfato de indinavir) (Merck & Company, Whitehouse Station, NJ), NORVIR® (ritonavir) (Abbott Laboratories, Chicago, IL), INVIRASE® (saquinavir) (Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ), y VIRACEPT® (nelfinavir) (Agouron Pharmaceuticals, San Diego, CA). En una realización específica, los agentes anti-retrovirales, los inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa, los

inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa y/o los inhibidores de proteasa, pueden usarse en cualquier combinación con composiciones de la invención para tratar el SIDA y/o prevenir o tratar la infección por VIH.

5 En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención son adecuados para administrarse en combinación con agentes anti-infecciones oportunistas. Los agentes anti-infecciones oportunistas que pueden administrarse en combinación con las composiciones de la invención incluyen, aunque sin
10 limitación, trimetoprim-pentaminida, sulfametoxazol, DAPSONE® (Jacobus Pharmaceuticals, Princeton, NJ), ATOVAQUONE® (GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC), ISONIAZID® (CIBA Pharmaceuticals, Summit, NJ), RYFADIN® (rifampina) (Hoechst-Marrion-Roussel, Kansas City, MO), PYRAZINAMIDE®
15 (Lederle, Pearl River, NY), BIAXIN® (claritromicina) (Abbott Laboratories, Chicago, IL), ETHAMBUTOL® (Lederle, Pearl River, NY), RIFABUTIN® (Pharmacia & Upjohn Company, Kalamazoo, MI), AZITHROMYCIN® (Pfizer Inc., Nueva York, NY), GANCICLOVIR (Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ), FOSCARNET®
20 (Astra, Westborough, MA), CIDOFOVIR® (Gilead Sciences, Foster City, CA), KETOCONAZOLE® (Janssen, Titusville, NJ), FLUCONAZOLE® (Pfizer Inc., Nueva York, NY), ITRACONAZOLE® (Janssen, Titusville, NJ), ACYCLOVIR® (Glaxo-Wellcome, Research Triangle Park, NC), FAMCICOLCIR® (SmithKline Beecham
25 Pharmaceuticals, Pittsburgh, PA), pirimetamina, leucovorina, NEUPOGEN® (filgrastim/GM-GSF) (Amgen, Thousand Oaks, CA), y LEUKINE® (sargramostim/GM-CSF) (Immunex, Seattle, WA).

En una realización específica, los anticuerpos de la invención se usan en cualquier combinación con trimetoprim-sulfametoxazol y/o Atovaquona, Dapsona, Pentamidina, para
30 tratar y/o prevenir profilácticamente una infección oportunista de neumonía por *Pneumocystis carinii*.

En otra realización específica, los anticuerpos de la

invención se usan en cualquier combinación con Isoniazid, RIFADIN® (Merrell Dow Pharmaceuticals, Cincinnati, Ohio), Pirazinamida, y/o Etambutol para tratar y/o prevenir profilácticamente una infección compleja oportunista por

5 *Mycobacterium avium*. En otra realización específica, los anticuerpos de la invención se usan en cualquier combinación con Rifabutina, Claritromicina, y/o Azitromicina para tratar y/o prevenir profilácticamente una infección compleja oportunista por *Mycobacterium tuberculosis*. En otra

10 realización específica, los anticuerpos de la invención se usan en cualquier combinación con Ganciclovir, Foscarnet, y/o Cidofovir, para tratar y/o prevenir profilácticamente una infección compleja oportunista por citomegalovirus. En otra realización específica, los anticuerpos de la invención se

15 usan en cualquier combinación con Fluconazol, Traconazol, y/o cetoconazol para tratar y/o prevenir profilácticamente una infección fúngica oportunista. En otra realización específica, los anticuerpos de la invención se usan en cualquier combinación con Aciclovir y/o Famciclovir para

20 tratar y/o prevenir profilácticamente una infección oportunista con el virus del herpes simple tipo I y/o tipo II. En otra realización específica, los anticuerpos de la invención se usan en cualquier combinación con pirimetamina y/o leucovorina para tratar y/o prevenir profilácticamente

25 una infección oportunista por *Toxoplasma gondii*. En otra realización específica, los anticuerpos de la invención se usan en cualquier combinación con leucovorina y/o NEUPOGEN® (Amgen, Thousand Oaks, CA) para tratar y/o prevenir profilácticamente una infección bacteriana oportunista.

30 En una realización adicional, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con un agente antiviral. Los agentes antivirales que pueden administrarse incluyen, aunque sin limitación, aciclovir, ribavirina,

amantadina, y remantidina.

En una realización adicional, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con un agente antibacteriano. Los agentes antibacterianos que pueden administrarse con las composiciones de la invención incluyen, aunque sin limitación, amoxicilina, aminoglucósidos, beta-lactama (glucopéptido), betalactamasas, clindamicina, cloranfenicol, cefalosporinas, ciprofloxacina, eritromicina, fluoroquinolonas, macrolidas, metronidazol, penicilinas, quinolonas, ritampina, estreptomina, sulfonamida, tetraciclinas, trimetoprim, trimetoprim-sulfamtoazol, y vancomicina.

Los agentes inmunosupresores no específicos convencionales, que pueden administrarse en combinación con los anticuerpos de la invención incluyen, aunque sin limitación, esteroides, ciclosporina, análogos de ciclosporina, ciclofosfamida, metilprednisona, prednisona, azatioprina, FK-506 (Fujisawa Pharmaceuticals, Deerfield, IL), 15 desoxiespergualina, y otros agentes inmunosupresores que actúan suprimiendo la función de las células inmunes respondedores (incluyendo, por ejemplo, células T), directa (por ejemplo, actuando sobre la célula inmune) o indirectamente (actuando sobre otras células mediadoras).

En realizaciones específicas, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con inmunosupresores. Las preparaciones de inmunosupresores que pueden administrarse con el anticuerpo de la invención incluyen, aunque sin limitación, ORTHOCLONE® (OKT3) (Ortho Biotech, Raritan, NJ), SANDIMMUNE® ORAL (ciclosporina) (Sandoz Pharmaceuticals, Hanover, NJ), PROGRAF® (tacrolimus) (Fujisawa Pharmaceuticals, Deerfield, IL), CELLCEPT® (micofenolato) (Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ), azatioprina, glucocorticosteroides, y RAPAMUNE® (sirolimus)

(Wyeth, Collegeville, PA). En una realización específica, pueden usarse inmunosupresores en combinación con los anticuerpos para prevenir el rechazo de un órgano o médula ósea transplantada.

5 En una realización adicional, los anticuerpos de la invención se administran solos o en combinación con una o más preparaciones intravenosas de inmunoglobulina. Las preparaciones intravenosas de inmunoglobulina que pueden administrarse con el anticuerpo de la invención, aunque sin
10 limitación, GAMMARE® (Centeon, Kankakee, IL), IVEEGAM® (Immuno-US Inc., Rochester, MI), SANDOGLOBULFN® (Sandoz Pharmaceuticals, Hanover, NJ), GAMMAGARD® (Baxter Healthcare, Glendale, CA), y GAMIMUNE® (Bayer Biological, West Haven, CT). En una realización específica, los anticuerpos de la
15 invención se administran en combinación con preparaciones intravenosas de inmunoglobulina en terapia de trasplante (por ejemplo, trasplante de médula ósea).

En una realización adicional, los anticuerpos de la invención se administran solos o en combinación con un agente
20 anti-inflamatorio. Los agentes anti-inflamatorios que pueden administrarse con las composiciones de la invención incluyen, aunque sin limitación, glucocorticoides y anti-inflamatorios no esteroideos, derivados de ácido aminoarilcarboxílico, derivados de ácido arilacético, derivados de ácido
25 arilbutírico, ácidos arilcarboxílicos, derivados de ácido arilpropiónico, pirazoles, pirazolonas, derivados de ácido salicílico, tiazinacarboxamidas, ácido e-acetamidocaproico, S-adenosilmetionina, ácido 3-amino-4-hidroxi-butírico, amixetrina, bendazac, benzydamina, bucoloma, difenpiramida,
30 ditazol, emorfazona, guaiazuleno, nabumetona, ninesulida, orgoteína, oxaceprol, paranilina, perisoxal, pifoxima, proquazona, proxazol, y tenidap.

En una realización, los anticuerpos de la invención se

administran en combinación con terapia de esteroides. Los esteroides que pueden administrarse en combinación incluyen metilprednisolona (por ejemplo, metilprednisolona IV). En una realización específica, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con prednisona. En una realización específica adicional, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con prednisona y un agente inmunosupresor. Los agentes inmunosupresores que pueden administrarse con prednisona son aquellos descritos en este documento e incluyen, aunque sin limitación, azatioprina, ciclofosfamida, y ciclofosfamida IV. En una realización específica, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con metilprednisolona. En una realización específica adicional, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con metilprednisolona y un agente inmunosupresor. Los agentes inmunosupresores que pueden administrarse con prednisolona son aquellos descritos en este documento e incluyen, aunque sin limitación, azatioprina, ciclofosfamida, y ciclofosfamida IV.

En otra realización, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con un antimalarial. Los antimalariales que pueden administrarse con las composiciones de la invención incluyen, aunque sin limitación, hidroxicloroquina, cloroquina, y/o quinacrina.

En otra realización más, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con un NSAID. Opcionalmente, el anticuerpo de la invención se administra en combinación con uno, dos, tres, cuatro, cinco, diez, o más de los siguientes fármacos: NRD-101 (Hoechst Marion Roussel, Kansas City, MO), diclofenaco (Dimethaid, Ontario, CN), oxaprozina potasio (Monsanto), mecasemina (Chiron, Emeryville, CA), T-614 (Toyama), pemetrexed disódico (Eli Lilly, Indianápolis, 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,
 5 Surrey, UK), terapia génica de IL-Ira (Valentis, Burlingame,
 CA), JTE-522 (Japan Tobacco, Tokyo, Japón), paclitaxel
 (Angiotech, Vancouver, BC), DW-166HC (Dong Wha, Seúl, Corea),
 mesilato de darbufelona (Pfizer Inc., Nueva York, NY),
 receptor 1 de TNF soluble (synergen; Amgen, Thousand Oaks,
 10 CA), IPR 6001 (Institute for Pharmaceutical Research),
 trocade (Hoffman-La Roche, Nutley, CT), EF5 (Scotia
 Pharmaceuticals), BIIL-284 (Boehringer Ingelheim,
 Ridgefield, CT), BIIF-1149 (Boehringer Ingelheim, Ridgefield,
 CT), LEUKOVAX® (Inflammatics, Malvern, PA), MK-663 (Merck,
 15 Whitehouse Station, NJ), ST-1482 (Sigma-Tau, Gaithersburg,
 MD), y propionato de butixocort (Pfizer Inc., Nueva York,
 NY).

En otra realización más, los anticuerpos de la invención
 se administran en combinación con uno o más de DMARD. Por
 20 tanto, puede usarse uno, dos, tres, cuatro, cinco o más de
 los siguientes fármacos: metotrexato, leflunomida,
 edatrexato, epiroprim, iometrexol, piritrexim, trimetrexato,
 brodimoprim, MX-68, ácido N-[4-[3-(2,4-diamino-6,7-dihidro-
 5H-ciclopenta[d]-pirimidin-5-il)propil]benzoil]-L-glutámico,
 25 ácido N-[[5-[2-(2-amino-1,4,5,6,7,8-hexahidro-4-
 oxipirirido[2.3-d]pirimidin-6-il)etil]-2-tienil]carbonil]-L-
 glutámico, ácido (R)N-[[5-[2-(2-amino-1,4,5,6,7,8-hexahidro-
 4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-6-il)etil]-2-tienil]-carbonil]L-
 glutámico, ácido N-((2,4-diamino-3,4,5,6,7,8-
 30 hexahidropirido[2,3-d]pirimidin-6-il)etil)-2-tienilcarbonil-
 L-glutámico, ácido (S)-2-[[[4-carboxi-4-[[4-[[2,4-diamino-6-
 pteridinil)metil]amino]benzoil]amino]butil]amino]carbonil]-
 benzoico, ácido N-[4-[3-(2,4-diamino-1-H-pirrolo[2,3-

d]pirimidin-5-il)propil]benzoil]-L-glutámico, 2,4-diamino-6-(N-(4-(fenilsulfonil)bencil)metilamino)quinazolina, 2,4-diamino-5-[4-[3-(4-aminofenil-4-sulfonilfenilamino)propoxi]-3,5-dimetoxibencil]pirimidina, ácido N-[4-4-(2,4-diamino-5-pirimidinil)butil]benzoil]-L-glutámico, ácido N-[4[3-(2,4-diamino-6-pteridinil)etil]-benzoil]-L-glutámico, ácido N-[4-[2-(2,4-diamino-6-pteridinil)etil]-benzoil-4-metilen-DL-glutámico y diamida clorhidrato del ácido N-(1-metiletil)-N'[3-(2,4,5-triclorofenoxi)propoxi]imidodicarbonimídico

10 (PS15), sulfasalazina, aurotiomalato sódico, auranofina, ciclosporina, penicilamina, azatioprina, un fármaco antimalarial (por ejemplo, como se describe en este documento), ciclofosfamida, clorambucilo, oro, Enbrel (etanercept) (Wyeth-Ayerst Laboratories, Filadelfia, PA),

15 anticuerpo anti-TNF, y prednisolona. En una realización preferida, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con un antimalarial, metotrexato, anti-TNF, Enbrel y/o sulfasalazina.

En una realización, los anticuerpos de la invención se

20 administran en combinación con metotrexato. En otra realización, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con anticuerpo anti-TNF. En otra realización, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con metotrexato y anticuerpo anti-TNF o anticuerpo anti-Fas.

25 En otra realización, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con sulfasalazina.

En otra realización específica, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con metotrexato, anticuerpo anti-TNF, anticuerpo anti-Fas y sulfasalazina. En

30 otra realización, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con Enbrel. En otra realización, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con Enbrel y metotrexato. En otra realización, los

anticuerpos de la invención se administran en combinación con Enbrel, metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, etroricoxib, misoprostol/diclofenaco sódico, valdecoxib, tiracoxib, rofecoxib, celecoxib, galantamina, mesilato de darbufelona, 5 aceclofenaco, ML-3000, anakinra, hialuronato sódico, nimesulida, micofenolato mofetil, diacereina, sivelest sódico, deflazacort, clorhidrato de nalmefeno, samarium-153 lexidronam pentasódico, pentostatina, T-614, clorhidrato de amiprilosa, rocepagant, ampiroxicam, famesilato de 10 prednisolona, meloxicam, diclofenaco sódico, lomoxicam, salazosulfapiridina, etodolac, maleato de flupirtina, ebselen, tacrolimus hidrato, nabumetona, cloprednol, cinamato de piroxicam, proquazona, rimexolona, fenretinida, hidroxibenzoato de imidazol, droxicam, fentiazac, 15 alfacalcidol, diacetato de halopredona, clorhidrato de gusperimus, inosina pranobex, actarit, indometacina farnesilo, mizoribina, ácido tolfenámico, diflunisal, piroxicam, oxaprocina, hialuronato sódico, bucilamina, ciclosporina, floctafenina, tenoxicam, palmitato de 20 dexametasona, amfenaco sódico, acemetacina, auranofina, lobenzarit disódico, o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con Enbrel, metotrexato y sulfasalazina. En otra realización, se combinan uno o más 25 antimalariales con una de las combinaciones citadas anteriormente. En una realización específica, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con un antimalarial (por ejemplo, hidroxicloroquina), Enbrel, metotrexato y sulfasalazina. En otra realización específica, 30 los anticuerpos de la invención se administran en combinación con un antimalarial (por ejemplo, hidroxicloroquina), sulfasalazina, anticuerpo anti-TNF, y metotrexato.

En otra realización, los anticuerpos de la invención se

administran en combinación con un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos que pueden administrarse con las composiciones de la invención incluyen, aunque sin limitación, derivados antibióticos (por ejemplo, doxorubicina, bleomicina, daunorrubicina, y dactinomicina); antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno); antimetabolitos (por ejemplo, fluorouracilo, 5-FU, metotrexato, fluxoridina, interferón alfa-2B, ácido glutámico, plicamicina, mercaptopurina, y 6-tioguanina); agentes citotóxicos (por ejemplo, carmustina, BCNU, lomustina, CCNU, arabinósido de citosina, ciclofosfamida, estramustina, hidroxiaurea, procarbazona, mitomicina, busulfán, cisplatino, y sulfato de vincristina); hormonas (por ejemplo, medroxiprogesterona, fosfato sódico de estramustina, etinil estradiol, estradiol, acetato de megestrol, metiltestosterona, difosfato de dietilestilbestrol, clorotrianiseno, y testolactona); derivados de mostaza de nitrógeno (por ejemplo, melfalán, clorambucilo, mecloretamina (mostaza de nitrógeno) y tiotepa); esteroides y combinaciones (por ejemplo, fosfato sódico de betametasona); y otros (por ejemplo, dicarbazina, asparaginasa, mitotant, sulfato de vincristina, sulfato de vinblastina, y etopósido). Otros quimioterapéuticos incluyen, por ejemplo, CPT-11, deflunomida, cicloheximida, y mitomicina.

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

En una realización adicional, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con citoquinas. Las citoquinas que pueden administrarse con las composiciones de la invención incluyen, aunque sin limitación, GM-CSF, G-CSF, 5 IL-1alfa, IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, anti-CD40, CD40L, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, TNF-alfa, y TNF-beta.

En una realización adicional, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con factores de crecimiento hematopoyéticos. Los factores de crecimiento hematopoyéticos que pueden administrarse con las composiciones de la invención incluyen, aunque sin limitación, LEUKINE® (sargramostim) y NEUPOGEN® (filgrast). 10

En realizaciones adicionales, los anticuerpos de la invención se administran en combinación con uno o más regímenes terapéuticos o profilácticos diferentes tales como, por ejemplo, radioterapia. 15

Como se usa en todo este documento, un "agente terapéutico" es un compuesto o composición eficaz para mejorar una afección patológica. Los ejemplos ilustrativos de un agente terapéutico incluyen un compuesto anti-cáncer, miembros de la familia de TNF, agentes anti-inflamatorios, agentes antivirales, agentes anti-retrovirales, agentes anti- 25 oportunistas, antibióticos, agentes inmunosupresores, inmunoglobulinas, agentes antimalariales, fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD), citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, y anticuerpos secundarios que promueven la apoptosis de las 30 células diana.

Un compuesto anti-cáncer o agente quimioterapéutico es un compuesto o composición eficaz para inhibir o detener el crecimiento de una célula que crece de forma anormal. Por

tanto, dicho agente puede usarse terapéuticamente para tratar el cáncer así como otras enfermedades marcadas por un crecimiento celular anormal. Una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto anti-cáncer es una cantidad administrada a un individuo suficiente para causar la inhibición o detención del crecimiento de una célula que está creciendo de forma anormal. Los ejemplos ilustrativos de compuestos anti-cáncer incluyen: bleomicina, carboplatino, clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, daunorrubicina, dactinomicina, dietilestilbestrol doxorrubicina, etopósido, 5-fluorouracilo, floxuridina, melfalán, metotrexato, mitomicina, 6-mercaptopurina, tenipósido, 6-tioguanina, vincristina y vinblastina. Se encuentran ejemplos adicionales de compuestos anti-cáncer y agentes terapéuticos en The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15^a Ed., Berkow et al., eds., 1987, Rahway, N.J. y Sladek et al. Metabolism and Action of Anti-Cancer Drugs, 1987, Powis et al. Eds., Taylor and Francis, Nueva York, N.Y.

Los anticuerpos de la presente invención pueden combinarse adicionalmente con otras terapias, tales como quimioterapia y/o radioterapia en el tratamiento de una malignidad, y la eficacia terapéutica puede potenciarse por compuestos inductores de la apoptosis, tales como bisindolilmaleimida VIII (BisVIII) u otros agentes sensibilizantes como SN-50 o LY294002. Por tanto, en una realización, los anticuerpos de la presente invención pueden combinarse con BisVIII u otro agente sensibilizante y un agente quimioterapéutico (por ejemplo, adriamicina, etopósido, topotecán, taxotere, o paclitaxel). En otra realización, los anticuerpos de la presente invención pueden combinarse con un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (por ejemplo, sulfuro de sulindac u otros inhibidores de COX-1 o COX-2), un agente quimioterapéutico (por ejemplo,

adriamicina, etopósido, topotecán, taxotere, o paclitaxel). En el tratamiento de otras enfermedades, por ejemplo, enfermedades autoinmunes e inflamatorias, también pueden usarse combinaciones de tratamiento. Por ejemplo, puede
5 administrarse un anticuerpo junto con otros agentes terapéuticos como agentes anti-inflamatorios, DMARD, agentes quimioterapéuticos, metotrexato, bisindolilmaleimida VIII u otros agentes sensibilizantes, y similares. La radioterapia también puede combinarse con otros agentes terapéuticos en el
10 tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Un especialista en la técnica adaptaría la forma de radioterapia a la enfermedad inflamatoria o autoinmune específica (por ejemplo, sinovectomía por radiación en el tratamiento de la artritis).

15 La terapia usando anticuerpos de la presente invención también puede combinarse con terapia usando otro anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo contra DR5 y un anticuerpo contra DR4 pueden administrarse a un sujeto que lo necesite junto con, antes de, o después de la administración de un
20 anticuerpo contra TNF, B7, ligando CD40, CD40, CD20 (por ejemplo, rituximab), Fas, o una combinación de los mismos. Dicha terapia de anticuerpos combinada pueda combinarse adicionalmente con la administración de uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos,
25 doxorubicina, y/o metotrexato), radioterapia, o ambos.

Por tanto, la invención proporciona un método *in vitro* para inducir selectivamente la apoptosis o para inhibir la proliferación en células diana que expresan DR5 como se define en la reivindicación 1. Las células diana pueden
30 seleccionarse entre células que muestran mala regulación del sistema de apoptosis, neutrófilos, linfocitos activados u otras células inmunes activadas (por ejemplo, células linfoides y células mieloides), células infectadas por virus,

y células sinoviales de proliferación anormal (por ejemplo, células sinoviales de artritis reumatoide, incluyendo células sinoviales inflamatorias, células linfoides y mieloides activadas en el sinovio, sinoviocitos tipo macrófago, y
5 sinoviocitos tipo fibroblasto) de enfermedades autoinmunes. En comparación con el anticuerpo anti-DR5 publicado previamente (24), la actividad inductora de la apoptosis del anticuerpo TRA-8 demostrativo de la presente invención es muy fuerte, y es capaz de inducir la apoptosis de células Jurkat
10 con niveles *in vitro* de pg/ml y demuestra actividad tumoricida *in vivo* superior en comparación con TRAIL soluble presentado previamente. La administración intravenosa de una única dosis de TRA-8 es suficiente para inhibir el crecimiento tanto de tumores sólidos como de células
15 tumorales hematopoyéticas, mientras que la inducción de la regresión tumoral *in vivo* con el TRAIL soluble requiere una dosis muy elevada (500 µg cada día durante 10 días). Los anticuerpos anti-receptor de TRAIL de la presente invención parecen ser tan seguros como TRAIL soluble ya que el
20 anticuerpo TRA-8 ejemplar no induce la apoptosis de células fibroblásticas no transformadas. Se han observado resultados similares con anticuerpos contra DR4.

Los vectores incluyen una secuencia de ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina de cadena pesada o ligera de
25 un anticuerpo contra DR5 o DR4 unida de forma funcional a un elemento regulador tal como un promotor o potenciador. "Unido de forma funcional" se refiere a una disposición de secuencias nucleotídicas configuradas para realizar su función habitual. Por tanto, un elemento regulador unido de
30 forma funcional a una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido es capaz de dirigir la transcripción, la replicación y/o la traducción del polipéptido. Los

especialistas en la técnica reconocerán que un único vector incluye opcionalmente secuencias codificantes para la inmunoglobulina tanto de cadena pesada como de cadena ligera de un anticuerpo contra DR5 o DR4. Los vectores pueden
5 codificar inmunoglobulinas de cadena ligera o pesada humanizadas.

Los siguientes ejemplos se exponen a continuación para ilustrar los métodos y los resultados de acuerdo con la presente invención. No se pretende que estos ejemplos
10 incluyan todos los aspectos de la presente invención, sino que ilustren los métodos y resultados representativos.

Ejemplo 1. Preparación de antígeno DR5

1.1 Clonación del ADNc de DR5

15 El ADN que codifica la proteína DR5 humana se clona por el siguiente método de RT-PCR usando:

a) Molde

Se extrae el ARN total de células HeLa usando reactivo TRIzol (GIBCO BRL). El molde para la reacción de PCR usado es
20 ADNc que se obtiene usando el kit de síntesis de ADNc First-Strand (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con el manual de instrucciones proporcionado con el kit.

b) Cebadores de PCR

Se sintetizan los siguientes cebadores
25 oligonucleotídicos para la PCR:

5'-gacgatgcccgatctactttaagg-3' (DR5p1: SEC ID N° 1);

5'-ccactgggtgatgttgatggg-3' (DR5p2: SEC ID N° 2);

Salvo que se especifique lo contrario, todos los oligonucleótidos en estos Ejemplos se sintetizan por
30 Lifetechnologies. Todos oligonucleótidos se almacenan a -20°C después de disolverse en agua destilada.

c) Reacción de PCR

Composición de la solución de reacción de PCR:

ADNc molde, 5 μ l de la reacción total de 33 μ l
cebador DR5p1, 10 pmol;
cebador DR5p2, 10 pmol;
5 tampón de PCR concentrado 10 x (proporcionado con
el kit), 10 μ l;
dNTP (2,5 mM cada uno), 4 μ l; y
Taq polimerasa (Promega), 5 unidades.

Se añade agua destilada estéril a la solución para un
volumen total de 100 μ l. Salvo que se especifique lo
10 contrario, los dNTP son una mezcla equimolar de dATP, dCTP,
dGTP y dTTP (2,5 mM cada uno).

La reacción de PCR se realiza del siguiente modo. La
solución primero se calienta a 94°C durante 2 minutos,
después de lo cual se repite 40 veces un ciclo de
15 calentamiento a 94°C durante 30 segundos, 52°C durante 1
minuto y 72°C durante 3 minutos. Después de completarse este
procedimiento, la solución de reacción se calienta a 72°C
durante 10 minutos.

Los fragmentos de ADN amplificados, obtenidos de este
20 modo, se separan en un gel de agarosa al 1% que contiene 0,25
 μ g/ml de bromuro de etidio. Las bandas que se determina que
contienen los fragmentos de ADN deseados se cortan usando una
hoja de afeitar y se recupera el ADN de las mismas usando el
kit Gene Clean (BIO101). El fragmento de ADN se clona usando
25 el kit TA Cloning (Invitrogen, CA). Esto se realiza del
siguiente modo.

El fragmento de ADN recuperado de la solución de
reacción de PCR, junto con 50 μ g del vector pCR2.1 que se
proporciona con el kit TA Cloning, se mezcla con 1 μ l de
30 tampón de reacción de ligasa 10 X (Tris-HCl 6 mM (pH 7,5),
cloruro de magnesio 6 mM, cloruro sódico 5 mM, β -
mercaptoetanol 7 mM, ATP 0,1 mM, DTT 2 mM, espermidina 1 mM,

y 0,1 mg/ml de albúmina sérica bovina), al que se han añadido 4 unidades de ADN ligasa T4 (1 µl). El volumen total de la mezcla se ajusta a 10 µl con agua desionizada estéril, y la solución de ligasa resultante se incuba a 14°C durante 15
5 horas. Después de este tiempo, se añaden 2 µl de la solución de reacción de ligasa a 50 µl de la cepa TOP10F' de *E. coli* competente, que se proporciona con el kit TA Cloning y se lleva a competencia de acuerdo con el manual de instrucciones, a la que se han añadido 2 µl de β-
10 mercaptoetanol 0,5 M, y la mezcla resultante se mantiene en hielo durante 30 minutos, después a 42°C durante 30 segundos, y de nuevo en hielo durante 5 minutos. A continuación, se añaden 500 µl de medio que contiene tristona al 2% v/v, extracto de levadura al 0,5% p/v, cloruro sódico al 0,05%
15 p/v, cloruro potásico 2,5 mM, cloruro de magnesio 1 mM, y glucosa 20 mM (a partir de ahora mencionado como medio "SOC") al cultivo, y la mezcla se incuba durante 1 hora a 37°C con agitación. Después de este tiempo, el cultivo se extiende en una placa de agar de caldo L (tristona al 1% v/v, extracto de
20 levadura al 0,5% p/v, cloruro sódico al 0,5% p/v, glucosa al 0,1% p/v, y bacto-agar al 0,6% p/v (Difco)), que contiene 100 µg/ml. Las colonias resistentes a ampicilina que aparecen en la placa se seleccionan y se retiran por raspado con un bucle de transferencia de platino, y se cultivan en medio de caldo
25 L que contiene 100 µg/ml de ampicilina a 37°C, durante una noche, con agitación a 200 r.p.m. Después de la incubación, las células se recogen por centrifugación, a partir de lo cual se prepara el ADN plasmídico por el método alcalino. El fragmento de ADNc EcoRI-EcoRI de DR5 del plásmido obtenido de
30 este modo se subclona en el plásmido pcDNA3 (Invitrogen, CA). Se secuencia la longitud completa del gen de DR5 en pcDNA3 y se aparea con la secuencia publicada. El plásmido obtenido de

este modo se denomina plásmido pcDNA3-DR5.

1.2 Construcción del vector de expresión de DR5-IgG

Para obtener una forma soluble de DR5 humano que carezca
 5 del dominio transmembrana, se construye un vector plasmídico
 de expresión. Este vector se diseña para que codifique una
 proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de
 DR5 humano fusionado al ADN del Fc de IgG1 humana (41). El
 ADN que codifica el DR5 humano que carece del dominio
 10 transmembrana se obtiene por la siguiente reacción de PCR.

a) Molde

El molde para la reacción de PCR usado es pcDNA3-DR5.

b) Cebadores de PCR

Se sintetizan los siguientes cebadores
 15 oligonucleotídicos para la PCR:

5'-gacgatgcccgatctactttaagg-3' (DR5p1: SEC ID N° 1);

5'-ggatccgtggacacattcgatgtc-3' (DR5p3: SEC ID N° 3);

Salvo que se especifique lo contrario, todos los
 oligonucleótidos en estos Ejemplos se sintetizan por
 20 Lifetechnologies. Todos los oligonucleótidos se almacenan a -
 20°C después de disolverse en agua destilada.

c) Reacción de PCR

Se realiza la reacción de PCR y se aísla el ADN
 amplificado según el Ejemplo 1.1(c).

25 El plásmido obtenido de este modo se denomina plásmido
 pCR- Δ DR5. El fragmento BamHI-EcoRI que codifica el fragmento
 Fc humano que se recupera de pmFas-hIgG1Fc se subclona en los
 sitios de clonación múltiple BamHI y EcoRI de pcDNA3. El
 plásmido obtenido de este modo se denomina pcDNAFc. Además,
 30 el fragmento BamHI-BamHI que codifica la región DR5 soluble
 humana que se recupera de pCR- Δ DR5 se subclona en el sitio
 BamHI del plásmido pcDNAFc. El plásmido obtenido de este modo

se denomina plásmido pcDNA Δ DR5-Fc. El fragmento EcoRI que codifica DR5 humano soluble-región Fc del IgG humano que se recupera del plásmido pcDNA Δ DR5-Fc se hace romo en los extremos usando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa (GIBCO BRL) y después se subclona en el vector lanzadera pAdCMV5 (Quantum Biotechnologies Inc., Canadá) que se hace romo en los extremos cortando con BamHI. El plásmido obtenido de este modo se denomina pAd Δ DR5-Fc.

10 **1.3 Expresión y purificación de la proteína de fusión de DR5 humano-IgG1**

Se co-transfectan células QBI-293A (proporcionadas con el kit ADENO-Quest) con pAd Δ DR5-Fc y ADN QBI-viral (proporcionado con el kit ADENO-Quest) usando el kit ADENO-Quest (Quantum Biotechnologies Inc., Canadá) de acuerdo con el manual de instrucciones. Las placas de virus recombinante se cultivan y se exploran para la expresión de la proteína de fusión de DR5-IgG por análisis ELISA del sobrenadante. Las placas positivas se amplifican en células QBI-293A y se almacenan a -80°C como reserva de virus. Se transfecta cincuenta placas (150 mm) de células QBI-293A con virus recombinante pAd Δ DR5-Fc a 10 m.o.i. (multiplicidad de infección). Los medios de cultivo se recogen después de transfección durante 48 horas.

Las células transfectadas que tienen el gen de DR5-IgG se cultivan hasta una densidad celular de 1×10^6 células/ml por incubación en 500 ml de medio DMEM (GIBCO), que contiene FCS al 10% v/v, a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% v/v durante 2 días. El cultivo después se centrifuga (1.000 r.p.m., 5 minutos) y se recoge el sobrenadante. La purificación de DR5-IgG del sobrenadante se consigue usando cromatografía de afinidad por Proteína A-Sepharose CL-4B

(Pharmacia) en las siguientes condiciones:

columna: columna de Proteína A-Sepharose CL-4B
(tamaño de columna de 2 ml; Pharmacia);

5 tampón de elución: glicina 0,1 M (pH 2,4), NaCl
0,15 M;

tampón de neutralización: Tris-HCl 1 M (pH 8,5).

Después de aplicar todo el sobrenadante a la columna, se lava tres veces con 20 ml de PBS y después se añade 1 ml de tampón de elución 10 veces. Se mide la densidad óptica de
10 cada fracción eluida (1 ml). Se recogen de la segunda fracción a la quinta fracción (con $OD_{280} \geq 0,1$) y después de la adición de 100 μ l de tampón de neutralización, los eluatos se colocan por separado en tubos de diálisis, y se dializan los eluatos frente a 1 litro de PBS (pH 7,5) a 4°C. El tampón
15 de diálisis se cambia dos veces.

Después se ensayan los eluatos para la expresión del producto génico DR5-IgG por ELISA. Primero, se colocan por separado 100 μ l de cada fracción en pocillos de una microplaca de 96 pocillos (Costar) y se incuban a 37°C
20 durante 1 hora. Después de este tiempo, se retira la solución de los pocillos, y la placa se lava 3 veces con 100 μ l/pocillo de PBS que contiene Tween 20 al 0,1% v/v (a partir de ahora mencionado como "PBS-Tween"). Después del lavado, se añade PBS que contiene albúmina sérica bovina al 2% p/v (a
25 partir de ahora mencionado como "BSA") en cantidad de 100 μ l/pocillo, y después se incuba la placa a 37°C durante 1 hora. Después de este tiempo, se lavan los pocillos 3 veces más con 100 μ l/pocillo de PBS-Tween, después de lo cual se añaden 100 μ l/pocillo de una solución de anticuerpo
30 monoclonal anti-IgG1 humana diluido 1000 veces con PBS-Tween a cada pocillo, y la placa se incuba otra vez a 37°C durante 1 hora. Después se lavan los pocillos 3 veces con 100

μl/pocillo de PBS-Tween. Después se añade sistema de sustrato líquido (Sigma) 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (a partir de ahora mencionado como "TMB") en una cantidad de 100 μl/pocillo y se deja reposar la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos y después se detiene la reacción añadiendo 100 μl/pocillo de H₂SO₄ 0,2 N. Se lee la absorbancia de cada pocillo a 450 nm para estimar la concentración del anticuerpo unido, usando la absorbancia a 650 nm como lectura de control. La absorbancia se mide usando un lector de microplaca (Molecular Devices). La producción de DR5-IgG1 se confirma usando este método ELISA. El peso molecular de la proteína de fusión DR5-IgG1 expresada se determina usando análisis de transferencia de Western en el que se usa mAb anti-IgG1 humana (Sigma) para detectar el anticuerpo en el gel. El peso molecular de la proteína de fusión DR5-IgG1 expresada tiene un peso molecular aproximado de 50 kDa. La pureza conseguida es mayor del 90% evaluada por análisis en SDS-PAGE y detección de la proteína por tinción con azul de Coomassie.

20

Ejemplo 2. Generación de anticuerpos monoclonales contra DR5 humano

2.1 Inmunización

Se inmunizan ratones Balb/c hembra (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) de 6-8 semanas de edad, con la proteína de fusión DR5 humano/hIgG1 purificada por afinidad. Para la inmunización inicial de la almohadilla plantar, se emulsiona la proteína de fusión (50 μg) en adyuvante completo de Freund (Difco, Detroit, MI). Los ratones después se refuerzan con cuatro inyecciones de 50 μg de proteína de fusión administrados sin adyuvante en días alternos. Tres días después de la última inyección, los linfocitos de los

ganglios linfáticos locales se fusionan con células de mieloma NS-1, y los hibridomas se cultivan en medio F104 suplementado con suero de ternera fetal al 10%. Se seleccionan los hibridomas positivos por ELISA en el que las
5 placas se recubren con 1 µg/ml de DR5/hIgG1 o la misma cantidad de Fas/hIgG1 como control. El isotipo de los hibridomas se determina por ELISA usando un panel de anticuerpos de cabra específicos de isotipo de Ig de ratón (Southern Biotechnology, Binningham, AL). Los anticuerpos
10 monoclonales se purifican por cromatografía de afinidad usando IgG1 anti-ratón inmovilizada o proteína G (Sigma).

2.2 Fusión celular

En el tercer día después de la inyección de refuerzo, se retiran los ganglios linfáticos locales del ratón y se ponen
15 en 10 ml de medio RPMI1640 libre de suero (GIBCO BRL) que contiene 50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin, y 300 µg/ml de ácido L-glutámico, y se descomponen pasando el órgano a través de una malla (colador celular; Falcon) usando una paleta. La suspensión celular
20 resultante se centrifuga para sedimentar las células de los ganglios linfáticos locales que después se lavan dos veces con medio RPMI libre de suero. Las células lavadas después se resuspenden en medio RPMI libre de suero y se cuentan.

Entre tanto, las células de mieloma NS1 (American Type
25 Culture Collection TUB-18) se han cultivado hasta una densidad celular que no excede de 1×10^8 células/ml en medio ASF104 (Ajinomoto, K. K.) que contiene FCS al 10% v/v (Gibco BRL) ("medio ASF con suero") a 37°C en CO₂ al 5% v/v, y éstas se descomponen, se lavan, se resuspenden y se cuentan de
30 forma similar.

Se mezcla una cantidad de la suspensión celular NS1 que se ha calculado que contiene 3×10^7 células con una cantidad

de la suspensión celular esplénica que se ha calculado que contiene 3×10^8 células. La mezcla resultante se centrifuga y se desecha el sobrenadante. Las siguientes etapas de la fusión celular se realizan manteniendo en todo momento el tubo de plástico que contiene el sedimento a 37°C en un vaso de precipitados de agua caliente.

Después se añade lentamente un ml de polietilenglicol 1500 al 50% (p/v) (Boehringer Mannheim) al tubo, todo el tiempo agitando el sedimento usando la punta de una pipeta. Posteriormente, se añade lentamente 1 ml de medio RPMI libre de suero, precalentado a 37°C, en 2 partes, seguido de la adición de 7 ml adicionales de medio RPMI libre de suero. La mezcla resultante después se centrifuga, se desecha el sobrenadante y se añaden 10 ml de medio HAT que contiene FCS al 10% v/v agitando al mismo tiempo suavemente con la punta de una pipeta. Se añaden 20 ml adicionales de medio HAT que contiene FCS al 10% v/v, y la suspensión se suministra en microplacas de cultivo celular de 96 pocillos a 100 µl/pocillo y se incuban a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% v/v. Después de 7 u 8 días, se usan 100 µl/pocillo de medio HAT fresco para remplazar el medio en cualquier pocillo que muestra un tono amarillento. Las células de fusión de estos pocillos se clonan por dilución limitante como se describe a continuación.

2.3 Clonación por dilución limitante

Se retiran los timos de ratones BALB/c hembra de 4 a 10 semanas de edad (de Japan SLC, Inc.), se descomponen en una malla (colador celular; Falcon) como se ha descrito anteriormente, y las células descompuestas se lavan dos veces con medio HT que contiene FCS al 10% v/v. Se suspende una cantidad de células tímicas correspondiente a las de un ratón en 30 ml de medio HT que contiene FCS al 10% v/v para

producir una suspensión celular de suministro. La preparación de células de fusión obtenida anteriormente en el Ejemplo 2.2 se diluye con esta suspensión celular de suministro de 10 a 100, y se diluye adicionalmente en serie con la suspensión celular de suministro para crear suspensiones que tienen densidades de células de fusión de 5,1 y 0,5 células/ml. Las muestras preparadas de este modo se suministran en pocillos de microplacas de cultivo celular de 96 pocillos a 100 µl/pocillo y se incuban durante 5 días a 37°C en CO₂ al 5% v/v.

2.4 Exploración

Los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas en cultivo se exploran por ELISA usando placas recubiertas con 1 µg/ml de DR5/hIgG1 o la misma cantidad de Fas/hIgG1 (41) como control. Los anticuerpos unidos se detectan usando inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) (Southern Biotechnology. Birmingham, AL) con TMB (Sigma, St Louis, MI) como sustrato. Se introduce DR5-IgG1 purificada a una concentración de 1 µg/ml o la misma cantidad de Fas-hIgG1 en un pocillo de una placa de separación ELISA/RIA de 96 pocillos (Costar, NY). La placa se mantiene reposando a 4°C durante una noche para permitir la adsorción de la proteína sobre la superficie del pocillo. Después de este tiempo, se desecha la solución de los pocillos y cada pocillo se lava 3 veces con PBS-Tween. Después, se añaden 100 µl de PBS que contiene albúmina sérica bovina al 1% (p/v) (A3803; Sigma Chemicals Co.) a cada pocillo y la placa se incuba a 37°C durante 1 hora. Después se lavan los pocillos 3 veces más con PBS-Tween, y después se añaden 50 µl de cada sobrenadante de cultivo de los hibridomas en cultivo a cada pocillo. Después se incuba la placa a 37°C durante 1 hora, y se lavan de nuevo los pocillos

4 veces con PBS-Tween. Después del lavado, se añaden 50 µl de anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina de ratón marcado con peroxidasa de rábano rusticano (Southern Biotechnology. Birmingham, AL), diluido 1000 veces con PBS, por pocillo, y la placa se incuba de nuevo a 37°C durante 1 hora, después de lo cual los pocillos se lavan 4 veces con PBS-Tween. Después se añade sistema de sustrato líquido (Sigma) 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB) en una cantidad de 100 µl/pocillo y la placa se deja reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos y después la reacción se detiene por la adición de 100 µl/pocillo de H₂SO₄ 0,2 N. La absorbancia de cada pocillo a 450 nm (control 650 nm) se mide usando un lector de microplaca (Molecular Devices) y se seleccionan las células de fusión de la muestra que tenía la absorbancia (450 nm-650 nm, valores de OD; > 0,5) claramente más alta que la de aquellas a las que no se había añadido sobrenadante de células de fusión (valores de OD; ≈ 0,03). Además, los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas en cultivo también se exploran funcionalmente midiendo la actividad inductora de la apoptosis usando células Jurkat. Se añaden cincuenta µl de medio RPMI que contiene células Jurkat (1000 células por pocillo) y bisindolilmaleimida VIII 5 µM (BisVIU, Alexis, San Diego, CA) en placas de 96 pocillos en presencia de 50 µl de los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas en cultivo. Las células se cultivan en un incubador humidificado a 37°C durante una noche. La apoptosis se determina por la viabilidad celular usando el kit ATPLite como se indica por el fabricante (Packard Instruments), y las muestras se cuentan usando el TopCounter (Packard Instruments).

30 **2.5 Unión en ELISA de TRAIL y TRA-8 a los receptores**

Se recubren placas ELISA con 2 µg/ml de proteína de fusión DR4-Ig o DR5-Ig durante una noche. Después de

bloquearlas con BSA al 3%, se añade TRAIL-FLAG soluble o TRA-8 a las concentraciones indicadas y se incuban a 37°C durante una hora. La unión de TRAIL o TRA-8 se detecta por anticuerpo anti-Flag conjugado con HRP (Alexis) o anticuerpo anti-IgG1 murino conjugado con HRP (Southern Biotechnology), respectivamente. Las reacciones se desarrollan por tampón de sustrato TMB y se miden por el lector de microplaca Benchmark (BioRad). Los valores de Kd se estiman por el modelo de unión a un sitio de regresión no lineal usando el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Para el ELISA competitivo, se añaden 100 ng/ml de TRAIL-FLAG y se incuban en presencia de diversas concentraciones de TRA-8. La unión de TRAIL se determina como anteriormente.

2.6 Clonación

Se repiten 5 veces las etapas descritas en los Ejemplos 2.3 y 2.4 anteriores para las células seleccionadas en 2.4, posibilitando de este modo la selección de varios clones de hibridoma cada uno de los cuales producía un único anticuerpo que se unía a DR5-IgG pero no se unía a Fas-IgG. Como resultado de este procedimiento de selección, se obtiene un hibridoma de ratón-ratón, denominado TRA-8 y que produce un anticuerpo que se une a DR5-IgG, pero no a Fas-IgG. Este hibridoma, TRA-8, se depositó en la American Type Culture Collection el 1 de marzo de 2000, y se le ha asignado el N° de acceso PTA-1428.

Las subclases del anticuerpo producido por el hibridoma de ratón-ratón TRA-8 (a partir de ahora mencionado simplemente como "TRA-8") está demostrado que son IgG1, κ , después de un ensayo con un kit de isotipado de anticuerpos monoclonales (Pierce).

Usando esta proteína de fusión de DR5 humano-IgG1 como inmunógeno, se obtienen siete clones de hibridoma por

exploración ELISA inicial, todos los cuales son fuertemente positivos para DR5-IgG pero no para la proteína de fusión Fas-IgG, lo que indica que los hibridomas obtenidos producen anticuerpos que reconocen la parte extracelular de DR5 pero no la parte Fc de IgG1 (datos no mostrados).

2.7 Análisis de transferencia de Western

Los filtros para el análisis de transferencia de Western de homogeneizados de tejido humano normal y canceroso se adquieren de Geno Technology (St Louis, MO). Cada carril se carga con una cantidad igual de proteína determinada por un anticuerpo anti- β -actina. Las transferencias se sondean con 1 μ g/ml de TRA-8 durante una noche, y seguido de anticuerpo de cabra anti-IgG1 de ratón conjugado con HRP (Southern Biotechnology) a temperatura ambiente durante una hora, y se revela por quimioluminiscencia.

2.8 Inmunohistoquímica *in situ*

Los tejidos humanos se obtienen del Tissue Procurement Center of UAB. Las secciones congeladas se fijan en etanol al 70%, se bloquean con suero de caballo al 10% en PBS, y después se incuban con 10 μ g/ml de TRA-8 purificado por afinidad a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se usa el kit ABC anti-IgG de ratón con diaminobenzidina (Vector, Burlingame, CA) como sustrato colorimétrico para visualizar la reactividad.

2.9 Análisis de la activación de caspasas

Se incuban células Jurkat (1×10^6 /ml) con 500 ng/ml de TRA-8. Se separan alícuotas (30 μ g de proteína) del lisado celular en SDS-PAGE al 15%, se transfieren a una membrana de nylon, y las transferencias se sondean con anticuerpos anti-caspasa 8, 9, y 3 (BD Pharmingen, San Diego, CA) seguido de anticuerpo secundario conjugado con HRP y visualización por quimioluminiscencia de los productos escindidos. La serie de

inhibidores de caspasa se adquiere de R&D Systems (Minneapolis, MN). Cada inhibidor de caspasa se añade en cultivo a las concentraciones indicadas.

5 **Ejemplo 3. Purificación del anticuerpo monoclonal TRA-8**

El hibridoma de ratón-ratón, TRA-8, se cultiva hasta una densidad celular de 1×10^6 células/ml por incubación en 500 ml de medio ASF, que contiene FCS al 10% v/v, a 37°C en CO₂ al 5% v/v durante 5 días. El cultivo después se centrifuga
10 (1.000 r.p.m., 5 minutos) y se recoge el sobrenadante. La purificación de TRA-8 a partir del sobrenadante se consigue usando cromatografía de afinidad por Proteína G-Sepharose CL-4B (Pharmacia) en las siguientes condiciones:

15 columna: columna de Proteína G-Sepharose CL-4B
 (tamaño de columna 2 ml; Pharmacia);

 tampón de elución: glicina 0,1 M (pH 2,4), NaCl 0,15 M;

 tampón de neutralización: Tris-HCl 1 M (pH 8,5).

20 Después de aplicar todo el sobrenadante a la columna, se lava tres veces con 20 ml de PBS y después se añade tampón de elución en volúmenes de 1 ml durante 10 times. Se mide la densidad óptica de cada fracción eluida (1 ml). Se recogen por separado las fracciones N° 2 a N° 5 ($OD_{280} = 0,1$).

25 Después de añadir 100 µl de tampón de neutralización, los eluatos se colocan en tubos de diálisis por separado, y los eluatos se dializan frente a 1 litro de PBS (pH 7,5) a 4°C. El tampón de diálisis se cambia dos veces. Esta muestra se ensaya para la actividad del anticuerpo anti-DR5 por ELISA usando la proteína de fusión de DR5 humano-IgG preparada
30 anteriormente usando la técnica descrita anteriormente.

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

Se repiten los procedimientos de los Ejemplos 1-3 con ADNc molde y cebadores de DR4 en lugar de los detallados en el Ejemplo 1 para obtener un antígeno DR4 que se utiliza según los Ejemplos 1.2-3 para obtener un anticuerpo monoclonal específico contra DR4.

Ejemplo 5. Anticuerpos monoclonales contra DcR1 y DcR2

Se crean anticuerpos monoclonales contra los receptores señuelo DcR1 y DcR2 sustituyendo el ADNc y los cebadores correspondientes para crear los antígenos respectivos según el Ejemplo 1. Se crean vectores de expresión para las fusiones DcR1 o DcR2 con inmunoglobulina G y los anticuerpos monoclonales purificados resultantes según los Ejemplos 2 y 3.

Ejemplo 6. La especificidad de un anticuerpo monoclonal

Como todos los receptores de TRAIL y otras proteínas de la familia de TNFR comparte homología significativa, la especificidad del anticuerpo ejemplar TRA-8 para DR5 se determinar por análisis de transferencia de Western usando dos proteínas de fusión diferentes de DR5 humano-IgG y formas recombinantes solubles de otras proteínas relacionadas. Se construye una primera proteína de fusión DR5-Ig fusionado el ADNc de los restos 1-180 de la parte extracelular de DR5 y el ADNc que codifica la región constante de IgG1 humana. El ADNc fusionado se clona en un vector adenoviral recombinante (Quantum Biotechnologies, Inc., Montreal, Canadá). La proteína de fusión DR5/hIgG1 expresada, que tenía un peso molecular relativo de 50 kDa, se purifica usando una columna de afinidad anti-IgG humana (Sigma, St Louis, MO). Para el análisis de transferencia de Western de la especificidad, se

adquiere una segunda proteína de fusión recombinante de DR5 humano/IgG1 (aa. 52-212), así como las proteínas de fusión TRAIL-R1, R3 y R4, de Alexis. Las formas solubles de Fas y TNFR1 humanos las proporcionó amablemente el Dr. Carl Edwards de Amgen, Inc., Thousands Oaks, CA, EEUU. Las moléculas humanas recombinantes solubles DR4, DcR1, DcR2, TNFR1, R4, y Fas usadas son proteínas de fusión de IgG1 humana. Se separan 0,5 µg de cada proteína por SDS-PAGE al 10% y se transfieren sobre una membrana de nitrocelulosa. Las transferencias se bloquean con leche en polvo al 5% en PBS a temperatura ambiente durante una hora, y se sondean con 1 µg/ml de anticuerpos monoclonal anti-DR5 purificado (clon: TRA-8) o 0,1 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con HRP a 4°C durante una noche. Se usa anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) como anticuerpo secundario para detectar TRA-8 unido. Las transferencias se revelan por quimioluminiscencia.

Se usan células Cos-7 transfectadas con el vector pcDNA3 (Clontech, Palo Alto, CA) que contiene DR5 o DR4 de longitud completa o vector vacío para el análisis por citometría de flujo. Se clona el ADNc de longitud completa que codifica TRAIL humano o ligando de Fas murino en el vector pTRE cadena abajo del promotor controlable por tetraciclina (Clontech). Se clonan además los fragmentos XhoI-HindIII de pTRE-hTRAIL o pTRE-mFasL en el vector lanzadera adenoviral pAdBN (Quantum Biotechnologies, Inc.). Se co-transfectan células hospedadoras 293 con el pAd-TRE-hTRAIL o pAd-TRE-mFasL linealizado y el ADN de fragmento grande de adenovirus. La expresión de TRAIL humano o ligando de Fas murino funcional a partir de las placas de virus recombinante se explora usando un ensayo de liberación de ⁵¹Cr con Jurkat como dianas.

TRA-8 reaccionaba fuertemente con la proteína de fusión DR5-IgG (~50 kDa), que se usa para la inmunización como se muestra en la Figura 1a, DR5, n° 1, y débilmente con la segunda proteína de fusión DR5-IgG (~60 kD) como se muestra en la Figura 1a, DR5, n° 2. No hay unión significativa de TRA-8 a DR4, DcR1, DcR2, Fas (CD95) o TNFR1. Estos resultados indican que TRA-8 reconoce los epítomos que son específicos para DR5 pero no están compartidos por los otros miembros de la familia.

TRA-8 no reacciona con otros miembros de la superfamilia del receptor de TNF, tales como Fas (CD95) y receptor 1 de TNF, y TRA-8 tampoco reacciona de forma cruzada con el homólogo murino de DR5 como se muestra por las proporciones de absorbancia óptica para 450 nm y 650 nm, en los números 1-7 del panel inferior (Fig. 1a, la columna 8 del panel inferior). TRAIL soluble y TRA-8 se unían de forma comparable a DR5 inmovilizado (Fig. 1b, panel de la izquierda). En contraste, TRAIL se unía a DR4, pero TRA-8 no mostraba ninguna actividad de unión a DR4 (Fig. 1b, panel central). Los valores de Kd para la unión de TRAIL y TRA-8 a DR5 se estiman a 59 nM y 3 nM, respectivamente. De forma importante, TRA-8 compite de forma eficaz con TRAIL por la unión a DR5 pero no por la unión a DR4, como se muestra en el ELISA competitivo (Fig. 1b, panel de la derecha). Estos resultados establecen la especificidad de TRA-8 por DR5 humano.

TRA-8 es capaz de detectar la expresión en superficie celular de DR5, indicando el análisis citométrico de flujo unión específica a la superficie celular de células Cos-7 transfectadas con DR5 humano de longitud completa, pero no de células Cos-7 transfectadas con DR4 o vector vacío (Fig. 1c). Asimismo, la inmunohistoquímica *in situ* con TRA-8 mostró reactividad con células Cos-7 transfectadas con ADN de DR5 de longitud completa pero no con las transfectadas con vector de

control (Fig. 1d). TRA-8 no induce la apoptosis de células Cos-7 no transfectadas, y la RT-PCR del ARN de células Cos-7 usando cebadores apareados que codifican DR5 humano mostró
 5 eso productos de PCR no específicos. El análisis funcional adicional usando células Jurkat humanas como dianas mostró que, en ausencia de entrecruzamiento, TRA-8 induce fuertemente muerte celular, demostrada por tres ensayos diferentes para la viabilidad celular incluyendo ATPLite, MTT
 10 y exclusión de PI (Fig. 1e). Más del 50% de las células Jurkat se eliminan por niveles de nanogramos de TRA-8 como se muestra por el ensayo de ATPLite. La actividad de eliminación de TRA-8 es específica para DR5 ya que podía bloquearse por DR5-Ig pero no por la proteína de fusión DR4-Ig (datos no mostrados). La escisión de las caspasas 8, 9, y 3 podía
 15 detectarse por análisis de transferencia de Western tan pronto como a los 30 minutos después del tratamiento con TRA-8 de las células Jurkat (Fig. 1f), y la muerte celular de las células Jurkat se inhibe completamente por el inhibidor de caspasa general (Z-VAD) (Fig. 1g). Los inhibidores de caspasa
 20 individuales para la caspasa 8, 3, 9, y 10 inhibían parcialmente la muerte celular, lo que indica adicionalmente que la muerte celular mediada por TRA-8 es principalmente a través de un mecanismo apoptótico dependiente de caspasa.

25 **Ejemplo 7. Análisis citométrico de flujo de la expresión de DR5 de superficie celular: Un receptor de muerte principal en muchas células tumorales pero no en células normales**

La capacidad de TRA-8 de unirse a DR5 expresado en la superficie celular y la especificidad de esta reacción
 30 entonces se evalúa usando células COS-7 (American Type Culture Collection N° CRL-1651) transfectadas con el vector de expresión que contiene el ADNc de DR5 o DR4 humano de longitud completa o vector vacío como control. Se usa

anticuerpo anti-IgG1 de ratón conjugado con ficoeritrina (PE) (Pharmingen) como anticuerpo secundario para detectar el TRA-8 unido. Se mide la fluorescencia de 1×10^4 células, usando un citómetro de flujo (FACSVantage) en las siguientes
5 condiciones:

Longitud de onda de excitación: 488 nm;

Longitud de onda de detección; 600 nm.

El análisis de citometría de flujo mostró que TRA-8 teñía aproximadamente el 30% de las células COS-7
10 transfectadas con el vector de DR5 como se muestra en el histograma compacto de la Figura 1c. Este porcentaje es igual a la eficacia de transfección determinada por análisis de transfección usando proteína fluorescente verde (GFP) (datos no mostrados). TRA-8 no teñía significativamente células
15 transfectadas con DR4 (el histograma abierto) o vector de control (el histograma punteado), lo que indica que TRA-8 es específico por DR5 de superficie celular.

Aunque se ha estudiado extensivamente la expresión de DR5 en células tumorales a nivel de ARNm, no se ha
20 documentado la expresión de DR5. Por tanto, la disponibilidad de anticuerpo monoclonal anti-DR5 permite examinar los niveles superficiales de DR5, y correlacionar la expresión con la susceptibilidad de las células a la apoptosis mediada por TRAIL. Se incubó el siguiente panel de células (1×10^6)
25 con 10 µg/ml de TRA-8 purificado por afinidad a temperatura ambiente durante 30 min., y después se tiñe con anticuerpo anti-IgG1 de ratón conjugado con PE (Pharmingen) durante otros 30 min. Se analizan 10.000 células viables usando el citómetro de flujo FACS vantage en las siguientes
30 condiciones:

Longitud de onda de excitación: 488 nm;

Longitud de onda de detección: 600 nm.

Las cinco líneas celulares hematopoyéticas ensayadas son células Jurkat, CEM-6, Molt-4, H-9 y U937. La expresión de DR5 es detectable en la superficie de células Jurkat, CEM-6, H-9, y U937 pero es casi indetectable en células Molt-4 como se muestra en la Figura 2a y 2a'. Aunque se han descrito previamente elevados niveles de expresión de ARN de DR5 (43), el análisis FACS indicó que estas células no expresan altos niveles de DR5 superficial. Estos resultados indican que la expresión de superficie celular de DR5 no se correlaciona con la expresión transcripcional de DR5, lo que no es inesperado para dicho receptor. El nivel de expresión en la superficie celular de DR5 puede ser específico del linaje celular ya que la mayoría de las células de origen hematopoyético expresaban bajos niveles mientras que la mayoría de las células de glioma y próstata expresaban altos niveles de DR5.

El anticuerpo monoclonal TRA-8 se usa para determinar el papel de DR5 en la inducción de la apoptosis mediada por TRAIL examinando su expresión en superficie celular entre un panel de diferentes tipos de células tumorales humanas así como la susceptibilidad de estas células a la apoptosis mediada tanto por TRAIL como por TRA-8. Las células T de sangre periférica primarias no expresaban niveles significativos de DR5 en superficie celular y son resistentes a la apoptosis mediada tanto por TRAIL como por TRA-8 (Fig. 2a, 2a' y 3a'). Aunque las cinco líneas celulares de leucemia T humanas ensayadas expresaban niveles detectables aunque relativamente bajos de DR5 en superficie celular, dos de las cuales (Jurkat y CEM-6) son muy susceptibles tanto a la apoptosis mediada por TRAIL como a la mediada por TRA-8, lo que indica que DR5 solo es suficiente para inducir la 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, lo que sugiere que pueden estar implicados otros receptores de TRAIL en la transducción de una señal de apoptosis. Las células H-9 son resistentes a la apoptosis tanto mediada por TRAIL como por TRA-8, lo que implica un
5 bloqueo mediado por una vía anti-apoptosis intracelular.

El panel de células incluía las líneas celulares de glioma maligno humano, Hs683, U251MG, D37MG, D54MG, U373MG, CH235MG, U87 y astrositos humanos normales, que los proporcionó el Dr. Yancey Gillespie del departamento de
10 neurocirugía de la universidad de Alabama en Birmingham. Las líneas celulares de cáncer de próstata humano, Du154, PC3 y LnCap, las proporcionó el Dr. William Grizzle del departamento de patología de la universidad de Alabama en Birmingham que había obtenido las líneas celulares de la
15 American Type Culture Collection. Las líneas de células T de leucemia humana, de linfoma de células B, HepG2 Jurkat (American Type Culture Collection TUB-152) y CCRF-CEM CEM-6 (American Type Culture Collection CCL-119); las líneas celulares de monocitos, U937 (American Type Culture
20 Collection CRL-2367); se adquirieron de la American Type Culture Collection. Todas las líneas celulares anteriores se cultivan en RPMI1640 suplementado con FCS al 10%. La línea celular de astrocitoma humano, 1321N1, la proporcionó amablemente el Dr. Richard Joep del departamento de
25 psiquiatría de la universidad de Alabama en Birmingham, y se cultiva en DMEM suplementado con FCS al 5%.

TRAIL humano recombinante soluble, adquirido de Alexis Corporation (San Diego, CA), es una proteína de fusión compuesta por el dominio extracelular de TRAIL humano (restos
30 aa 95 a 281) fusionado en el extremo N a una marca FLAF y un péptido enlazador de 8 aminoácidos. A diferencia del TRAIL marcado con His presentado previamente, esta preparación de TRAIL solo no induce una fuerte respuesta apoptótica en

células Jurkat y requiere un anticuerpo anti-FLAG como agente de entrecruzamiento para potenciar la apoptosis. El anticuerpo anti-FLAG también se adquirió de Alexis.

Las 10 células de glioma maligno humano ensayadas expresaban niveles detectables de DR5 en la superficie celular. La mayoría expresaban niveles de intermedios a altos de DR5 como se muestra en la Figura 2b. Tres líneas, D-54MG, U373MG y CH-235MG expresaban altos niveles de DR5 mientras que seis líneas, Hs-683, U251-MG, D37-MG, U87, SMK1 y 1321N1, expresaban niveles intermedios de DR5. Solamente una línea celular, H-465, expresaba niveles bajos de DR5. Las tres líneas celulares de cáncer de próstata expresaban niveles altos de DR5 como se muestra en la Figura 2c.

Como las células T primarias normales, las células B primarias no expresaban niveles significativos de DR5 y no experimentaban apoptosis después del tratamiento con TRAIL o TRA-8 (Fig. 2d). Tres (SKW6.4, EB-3, y Raji) de las cuatro líneas celulares de linfoma B ensayadas expresaban niveles relativamente altos de DR5 y son muy susceptibles a la apoptosis mediada tanto por TRAIL como por TRA-8. La cuarta línea celular, Daudi, expresaban niveles muy bajos de DR5 y es mucho menos susceptible a la apoptosis mediada por TRAIL o TRA-8. Aunque los astrositos primarios no expresaban niveles detectables de DR5 en superficie celular (Fig. 2b'), las cuatro líneas celulares de glioma ensayadas expresaban altos niveles de DR5. El nivel más elevado de expresión de DR5 en células de glioma que en células T y B no está acompañado por una susceptibilidad significativamente mayor a la apoptosis mediada por TRAIL y DR5, lo que sugiere que el nivel de expresión en superficie celular de DR5 no está necesariamente correlacionada con el nivel de apoptosis de las células tumorales. La RT-PCR, realizada para determinar los niveles de mensajero de DR4, DR5 y DCR2, detectó mensajero en todas

las células ensayadas (Tabla 1). Sin embargo, en general, las células normales primarias expresaban niveles relativamente bajos de DR5 en comparación con las células tumorales.

Tabla 1: Análisis de RT-PCR de la expresión del receptor de 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
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

* Se aisló el ARN total de las células y se realizó la RT-PCR como se describe en los métodos. Los productos de PCR se separaron en gel de agarosa al 3% y se analizaron por el sistema Fluor-S MAX Multilmager (BioRad). Los valores se presentan como una proporción relativa a β -actina.

Ejemplo 8. Inducción de la apoptosis *in vitro* en células malignas

Para determinar si TRA-8 induce la apoptosis en células transformadas *in vitro*, todas las células tumorales DR5-positivas se examinan para su susceptibilidad a la apoptosis inducida por TRA-8 o TRAIL.

Las células diana (1×10^3 por pocillo) se cultivan en placas de 96 pocillos en presencia de las concentraciones indicadas de TRAIL soluble más agente de entrecruzamiento (Alexis) o TRA-8 a 37°C durante una noche. La viabilidad celular se determina usando (1) el kit ATPLite de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Packard Instruments, Meriden, CT); (2) el kit de proliferación celular/viabilidad en MTT (Sigma); o (3) tinción con PI de células muertas y se analiza por citometría de flujo. Al final del cultivo, las células se tiñen con 10 µg/ml de PI y las células PI-negativas se seleccionan como células viables. Para el análisis de los núcleos condensados de hepatocitos, las células se tiñen con 10 ng/ml de Hoechst 33352 (Molecular Probes) y se analizan por citometría de flujo.

El anticuerpo TRA-8 es capaz de inducir la apoptosis en la mayoría de las células 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 hematopoyéticas DR5-positivas. No inducía apoptosis en la línea celular Molt-4, que expresaba niveles casi indetectables en la superficie celular de DR5. Sin embargo, los niveles de susceptibilidad de las células a la apoptosis mediada por TRA-8 variaban considerablemente entre las líneas celulares.

La variabilidad de la susceptibilidad de las células a la apoptosis inducida por el anticuerpo TRA-8 sugiere que aunque se requiere un nivel mínimo de expresión en la

superficie celular de DR5, el nivel de expresión en la superficie celular de DR5 no es necesariamente el determinante principal de la susceptibilidad y otros factores influyen en este proceso. Aunque todas las células de glioma
5 generalmente expresaban niveles significativamente mayores del DR5 superficial que las células hempatopoyéticas, la susceptibilidad de las células de glioma a la apoptosis inducida por TRA-8 no está aumentada proporcionalmente en comparación con la de las células hematopoyéticas. La
10 susceptibilidad de cinco de las líneas celulares de glioma, D-37MG, D54-MG, U373-MG, CH235-MG y 1321N1 a la apoptosis inducida por TRA-8 es alta y es equivalente a su susceptibilidad a la apoptosis mediada por TRAIL como se muestra en la Figura 3b. Dos de las líneas celulares de
15 glioma, H-456 y SMK1, son mucho menos susceptible a la apoptosis inducida por TRA-8. En el caso de las células H-456, la expresión superficial de DR5 es baja; sin embargo, la expresión superficial de DR5 en SMK1 es similar a las líneas celulares más susceptibles, lo que sugiere que otros
20 mecanismos pueden desempeñar un papel en la determinación de la susceptibilidad a la apoptosis mediada por TRAIL. Aunque las tres líneas celulares de cáncer de próstata expresaban niveles altos de DR5, las células Du145 son las más sensibles a la apoptosis inducida por TRA-8, las células PC3 son
25 parcialmente sensibles mientras que las células LnCAP son completamente resistentes como se muestra en la Figura 3c. Entre las células hematopoyéticas, se encuentra que las células Jurkat y CEM-6 son muy susceptibles a la apoptosis inducida por TRA-8 como se muestra en la Figura 2a, aunque se
30 ha descubierto que estas dos líneas celulares expresan niveles bajos de DR5. Aunque DR5 es detectable en células U937, estas células son resistentes a la apoptosis inducida por TRA-8. Asimismo, aunque las células H-9 expresaban

niveles detectables de DR5, las células H-9 son resistentes a la apoptosis inducida por TRA-8. Estos resultados implicaban la existencia de mecanismos reguladores que influyen en la apoptosis mediada por DR5.

5 Se produce una unión superficial adicional de anticuerpos anti-DR5 según los procedimientos de los Ejemplos 1-3. Se estudian dos anticuerpos anti-DR5 adicionales denominados TRA-1 y TRA-10 junto con TRA-8 para determinar la capacidad comparativa de inducir la apoptosis y actuar de
10 este modo como agonista o por lo contrario de bloquear la apoptosis mediada por TRAIL, actuando de este modo como antagonista. Se usan células Jurkat humanas como diana para determinar la actividad agonista y/o antagonista de los tres anticuerpos anti-DR5 indicados TRA-1, TRA-8 y TRA-10. Como se
15 muestra en la Figura 4, la viabilidad celular es de aproximadamente el 90%, el 70% y el 20% para TRA-10, TRA-1 y TRA-8, respectivamente después de incubación durante una noche con 2,5 µg por ml. TRA-8 inducía una fuerte respuesta apoptótica de un modo dependiente de la dosis mientras que
20 TRA-1 inducía solamente una respuesta apoptótica moderada y TRA-10 solamente inducía una respuesta débil. TRA-8, por lo tanto, se clasifica como un anticuerpo anti-DR5 agonista. En la Figura 4, se muestra la viabilidad de las células Jurkat humanas como una función dependiente de la dosis de la
25 apoptosis inducida por TRAIL. TRA-10 bloqueaba la apoptosis de las células Jurkat humanas a un grado significativo en un estudio de apoptosis inducida por TRAIL a baja dosis. Por tanto, TRA-10 se clasifica como un anticuerpo anti-DR5 antagonista.

30 La susceptibilidad de las cinco líneas celulares de glioma, D-37MG, D54-MG, U373-MG, CH235-MG y 1321N1 a la apoptosis inducida por TRA-8 es equivalente a sus

susceptibilidad a la apoptosis mediada por TRAIL como se muestra en la Figura 3b, lo que indica que la apoptosis inducida por TRAIL en estas células está mediada principalmente a través de DR5. Además, dos de las líneas celulares de glioma, Hs683 y U251-MG, son resistentes a la apoptosis inducida por TRAIL pero parcialmente sensibles a la apoptosis inducida por TRA-8, lo que indica que los receptores señuelo funcionan en estas células y que el uso del anticuerpo TRA-8 esquivaba este mecanismo regulador. En las líneas celulares de cáncer de próstata, a pesar de la sensibilidad variable a la apoptosis inducida por TRA-8, ésta igualaba a la sensibilidad de las células a la apoptosis inducida por TRAIL, lo que sugiere de nuevo que DR5 desempeña un papel principal en la apoptosis mediada por TRAIL en las células cancerosas de próstata. Entre las células hematopoyéticas, se encuentra que las células Jurkat y CEM-6 son muy susceptibles a la apoptosis mediada tanto por TRA-8 como por TRAIL. El nivel de apoptosis inducida por TRA-8 es comparable al inducido por TRAIL como se muestra en las Figuras 2a y 3a'. Solamente una de las líneas celulares de glioma, U87, y dos líneas celulares hematopoyéticas, U937 y Molt-4, mostraban sensibilidad a la apoptosis inducida por TRAIL pero son menos sensibles o resistentes a la apoptosis inducida por TRA-8. Una línea celular, la línea celular H-9, expresaban niveles detectables de DR5 pero es resistente a la apoptosis inducida por TRA-8 o TRAIL. Aunque se requieren niveles mínimos de expresión de DR5 para la apoptosis inducida por TRA-8, el nivel de expresión de DR5 no predice necesariamente la susceptibilidad de las células a la apoptosis mediada por TRA-8; los receptores señuelo desempeñan un papel en la modulación de la apoptosis mediada por TRAIL en algunas células, pero parece que no desempeñan un papel principal en la mayoría de las células ensayadas

hasta la fecha; como se ha anticipado, el anticuerpo TRA-8 esquivaba los efectos de los receptores señuelo; pueden suceder mutaciones funcionales del receptor DR5 en células transformadas; y, finalmente, los mecanismos reguladores intracelulares pueden ser tan importantes como, o más importantes que los receptores señuelo para definir la susceptibilidad de las células a la apoptosis mediada por TRAIL y DR5.

Estudios previos han demostrado que el ARNm para DR5 está distribuido ampliamente en tejidos normales⁷. Para evaluar la expresión de DR5 a nivel de proteínas, se sondea un panel de homogeneizados tisulares humanos normales (Geno Technology, St. Louis, MO) con el anticuerpo TRA-8 en análisis de transferencia de Western. Entre nueve tejidos humanos normales, el tejido cerebral es débilmente positivo (Fig. 5a, carril 2). La proteína DR5 no es detectable por reactividad TRA-8 en el hígado (carril 1), el pulmón (carril 3), el riñón (carril 4), el bazo (carril 5), los testículos (carril 6), el ovario (carril 7), el corazón (carril 8), o el páncreas (carril 9). En contraste, los trece tejidos cancerosos humanos se tiñeron positivamente con TRA-8 (Fig. 5b), incluyendo cánceres de ovario (carril 1), pulmón (carril 2), hígado (carril 3), recto (carril 4), cuello del útero (carril 5), piel (carril 6), testículos (carril 7), tiroides (carril 8), útero (carril 10), estómago (carril 11), laringofaringe (carril 12), y páncreas (carril 13). Además, la inmunohistoquímica *in situ* de tejidos normales y cancerosos con TRA-8 confirmó que a parte de unas pocas células positivas dispersas en el bazo, la expresión de DR5 en tejidos normales de mama, pulmón y bazo no es detectable (Fig. 5c). Los tejidos cancerosos correspondientes, incluyendo carcinoma ductal infiltrante de mama, cáncer pulmonar microcítico, y linfoma reaccionaban positivamente

con TRA-8 (Fig. 5d). Entre un total de 22 tejidos cancerosos examinados, 5 de 6 cánceres de mama, 2 de 2 cánceres de cuello del útero, 4 de 5 cánceres de hígado, 5 de 8 linfomas, 2 de 2 cánceres pulmonares, y 2 de 2 cánceres de próstata reaccionaban positivamente con TRA-8. Estos resultados son coherentes con los del análisis de citometría de flujo e indican que los tejidos cancerosos expresan niveles mayores de proteína DR5 que los tejidos normales.

10 **Ejemplo 9. Actividad tumoricida de TRA-8 *in vivo***

Por diversas razones, muchos agentes que se muestran prometedores en estudios *in vitro* no muestran eficacia *in vivo*. Por lo tanto, es importante ensayar la eficacia de TRA-8 en un modelo animal *in vivo*. Para conseguir esto, se administra el anticuerpo TRA-8 anti-DR5 humano a ratones que albergan xenoinjertos humanos que expresan la molécula DR5 humana. Los ratones usados son ratones NOD/SCID (Jackson Laboratory) de 6 a 8 semanas de edad, que se inoculan por vía subcutánea con células 1321N1 de astrocitoma humano (1×10^7), o se inoculan por vía intravenosa con células Jurkat de leucemia humana (1×10^6). En el día 2 después de la inoculación del tumor, los ratones se inoculan por vía intravenosa con TRA-8 (100 μ g). Cinco días después del tratamiento con TRA-8, se determina el crecimiento del tumor 1321N1 por el tamaño y el peso de la masa tumoral. El crecimiento de las células Jurkat se determina por el peso del bazo y el porcentaje de células Jurkat CD3 humano-positivas en el bazo de los animales inoculados. Se toman biopsias de los tejidos tumorales y se examinan histológicamente.

El tratamiento temprano con una única dosis intravenosa de 100 μ g de TRA-8 un día después de la inoculación del tumor

inhibía completamente que las células 1321N1 formaran un tumor sólido (Fig. 6a). El tratamiento tardío con tres dosis de 100 µg de TRA-8 una semana después de la inoculación del tumor reducía el peso del tumor 4 veces o más (Fig. 6b). La
5 formación de tumor no es visible en animales tratados con TRA-8 en un momento puntual temprano (Fig. 6c, panel superior). El análisis histológico puso de manifiesto un tejido tumoral drásticamente degenerado en animales tratados con TRA-8 (Fig. 6c, panel inferior). Asimismo, el tratamiento
10 con TRA-8 inhibía la población del bazo por células Jurkat como se demuestra por la escasez de células Jurkat CD3-positivas en el bazo (Fig. 6d, 6e). El análisis histológico del tumor implantado mostró unas pocas células tumorales dispersadas en el tejido blando en animales tratados con TRA-
15 8 mientras que los controles mostraron la formación de un tumor sólido como se muestra en la Figura 6c. En el modelo celular Jurkat, la cantidad de células Jurkat en los bazos de animales tratados con TRA-8 es menor del 2% en comparación con casi el 10% en el bazo de animales de control como se
20 demuestra por análisis de citometría de flujo que se muestra en la Figura 6a y por la tinción CD3 *in situ* de la Figura 6c.

Estos resultados confirman la reciente demostración de que la administración sistémica de TRAIL recombinante entrecruzado inhibe el crecimiento de tumores *in vivo* (13).
25 Estos resultados indican que una única dosis de TRA-8 es muy eficaz en la eliminación de células tumorales *in vivo*.

Como se usa un anticuerpo anti-humano en un modelo murino, no se pudo evaluar la toxicidad del tratamiento con TRA-8. Sin embargo, el estudio de administración de TRAIL *in vivo* indicó que no había toxicidad significativa asociada con
30 este tratamiento (13).

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

La mayoría de los estudios de la técnica previa de apoptosis mediada por TRAIL se han centrado en células malignas. La apoptosis mediada por TRAIL de acuerdo con la presente invención también es terapéutica en afecciones autoinmunes e inflamatorias, tales como RA.

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

Se compara la expresión de DR5 en un panel de ocho células sinoviales cultivadas primarias de pacientes con RA con la de ocho células sinoviales cultivadas primarias de pacientes con osteoartritis (a partir de ahora mencionado como "OA"). Los ocho cultivos celulares sinoviales RA primarios humanos RA-1014, RA-1016, RA-1021, RA-512, RA-707, RA-811, RA-716, y RA-929 los proporcionó amablemente el Dr. M. Ohtsuki (Sankyo Co. Ltd., Tokyo, Japón) y se cultivaron en DMEM suplementado con FCS al 10%, penicilina, estreptomycin, y glutamina. Los siete cultivos celulares primarios de células sinoviales OA se aíslan de los tejidos sinoviales de pacientes con OA por un método de colagenasa convencional y se cultivan en las mismas condiciones. El número de pases de todas las células primarias está por debajo de 10. La expresión de DR5 se determina por análisis FACS como se describe en el Ejemplo 5.

Todos los cultivos primarios de células RA expresaban altos niveles de DR5 superficial, y hay 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 de DR5 superficial en la superficie de células sinoviales aisladas de pacientes OA es muy baja o indetectable según la Figura 7b. Se halla que células sinoviales transformadas con SV40 expresan altos niveles de

DR5 comparables con los mostrados por las células RA. En contraste, células fibroblásticas no transformadas expresaban bajos niveles de DR5 comparables con los mostrados por las células OA en la Figura 7b.

5 **10.2 Susceptibilidad de las células sinoviales RA a la apoptosis mediada por TRA-8 o TRAIL**

En general, todas las células sinoviales aisladas de los pacientes RA son susceptibles a la apoptosis inducida tanto por TRAIL como por anticuerpo anti-DR5, y todas las células
10 OA son resistentes a la apoptosis inducida por TRAIL y por anticuerpo anti-DR5 según la Figura 8a, b. Estos estudios indican que el anticuerpo TRA-8 se dirige a células alteradas en preferencia a las células normales. Además, el patrón de la susceptibilidad o resistencia a la apoptosis inducida por
15 TRAIL está correlacionado con la inducida por anticuerpo anti-DR5, lo que indica que las células sinoviales utilizan principalmente DR5 para desencadenar la apoptosis por TRAIL.

Como se describe para las células malignas, la susceptibilidad a la apoptosis inducida por TRAIL o
20 anticuerpo anti-DR5 variaba entre las células sinoviales RA aunque expresando niveles similares de DR5. RA-512 y RA-707 son las más susceptible ya que más del 80% de las células se eliminan por concentraciones de TRAIL o TRA-8 por debajo de 20 ng/ml. RA-1014, RA-811, RA-716, y RA929 están entre
25 aquellas con susceptibilidad intermedia a TRAIL o TRA-8, sufriendo casi el 100% de muerte celular en presencia de altas concentraciones (>50 ng/ml) de TRAIL o TRA-8. En células RA-1016 y RA1021, aunque la mayoría (más del 60%) de las células se eliminan por una baja dosis de TRAIL o TRA-8,
30 una parte de las células sobrevivía en presencia de altas concentraciones de TRAIL o TRA-8, lo que indica que una subpoblación de células es resistente a la apoptosis mediada por TRAIL. En contraste, todas las células OA son mucho menos

susceptibles a la apoptosis inducida por TRAIL y TRA-8. No más del 60% de las células se eliminan en OA52F y OA69F incluso en presencia de una alta concentración de TRAIL o TRA-8. Las células OA72M son completamente resistentes a la apoptosis inducida por TRAIL o TRA-8. Las células sinoviales transformadas con SV40 también son susceptibles a la Apoptosis inducida por TRAIL y TRA-8 (datos no mostrados). En contraste, parecía que las células fibroblásticas no transformadas eran resistentes a TRAIL y TRA-8.

Se ha demostrado previamente que DR5 utiliza una vía dependiente de FADD/caspasa 8 para desencadenar la apoptosis (44). Para determinar la dependencia de caspasa de la apoptosis mediada por DR5 de células sinoviales RA, las células RA se cultivan con TRAIL o anticuerpo anti-DR5 en presencia de inhibidores de caspasa específicos. Entre los ocho inhibidores de caspasa ensayados, los inhibidores de caspasa 6, 8 y 10 son capaces de inhibir la apoptosis de células sinoviales RA inducida tanto por TRAIL como por DR5 como se muestra en la Figura 9, lo que indica que estas tres caspasas están implicadas en la apoptosis mediada por DR5.

10.3 TRA-8 o TRAIL inducen la activación de NF- κ b en células sinoviales RA sin liberación aumentada de MMP

Hay evidencias considerables que apoyan el concepto de que hay conexiones estrechas entre la señalización de apoptosis y la señalización de proliferación (45). Se ha establecido que DR5 es capaz de activar una vía de NF- κ b además de la transducción de señales de apoptosis, y que la activación de NF- κ b puede ser capaz de transducir una señal anti-apoptosis. Por lo tanto, se realiza un ensayo de desplazamiento en gel. Las células se estimulan con 50 ng/ml del TRAIL soluble recombinante, el ligando de Fas en presencia de 1 mg/ml de potenciador, o 50 ng/ml de TRA-8

durante el tiempo indicado. Los extractos nucleares se preparan e incuban con la sonda de oligo-ADN marcada con [³²P] de doble tinción. Los resultados se analizan usando la cámara para imágenes con fósforo cyclone (TopCount NXT, Packard Instrument Company, CT). Después de incubar las células sinoviales RA con TNF- α o TRAIL, se activa NF- κ b de un modo dependiente del tiempo. El anticuerpo TRA-8 es capaz de activar fuertemente NF- κ b. En contraste, el ligando de Fas es incapaz de inducir la activación de NF- κ b según la Figura 10a.

Por tanto, aunque TRAIL y el anticuerpo TRA-8 inducen una fuerte respuesta de apoptosis en células sinoviales RA, también activan NF- κ b, y se ha creído que la activación de NF- κ b contribuye al papel proinflamatorio de TNF- α en RA. Por tanto, es posible que TRAIL, como TNF- α , puedan servir como citoquina pro-inflamatoria. Para determinar si hay una consecuencia biológica similar de la activación de NF- κ b inducida por TRAIL y TNF- α , se determina la producción de MMP por ELISA. Se cultivan células sinoviales en medio solo o con 50 ng/ml interleuquina 1b, 10 ng/ml de TNF- α , 50 ng/ml de TRAIL, o 50 ng/ml de TRA-8 durante una noche. Los niveles de MMP-1 y MMP-3 en los sobrenadantes de cultivo se determinan por los kits ELISA.

Cuando se incuban células sinoviales RA con una citoquina pro-inflamatoria, TNF- α o IL-1b, la producción de MMP-1, 3, y 13 está aumentada en comparación con el control de medio como se muestra en la Figura 10 b,c. En contraste, el tratamiento con TRAIL o anticuerpo anti-DR5 no está asociado con una liberación aumentada de estas MMP.

30

Ejemplo 11A. Fallo en la inducción de toxicidad hepatocelular

Para los ensayos de viabilidad celular de 24 horas, se

adquirieron hepatocitos humanos normales frescos en placas de 96 pocillos de In Vitro Technology (Baltimore, MD). Los hepatocitos se cultivan en el medio de cultivo de hepatocitos que contiene 1 µg/ml de TRAIL soluble o TRA-8. Para los
5 ensayos de viabilidad de 6 horas, se aíslan hepatocitos normales o células cancerosas hepatocelulares de muestras quirúrgicas recientes recogidas del UAB Tissue Procurement Center. Todos los reactivos para el aislamiento de hepatocitos humanos incluyendo el tampón de perfusión, el
10 medio de digestión, el medio de lavado, y el medio de unión de hepatocitos se adquirieron de Gibco. Los portaobjetos tisulares se digieren en el medio de digestión de hepatocitos a 37°C con agitación (50 rpm) durante una hora. Los hepatocitos aislados se recogen por centrifugación a baja
15 velocidad (50 g, 3 min.), y se lavan con el medio de lavado de hepatocitos seis veces. Se cultiva una única suspensión celular de hepatocitos en el medio de unión que contiene FCS al 10% en placas Matrigel de 96 pocillos (BD) durante seis horas. Los hepatocitos no unidos se retiran lavando dos veces
20 con medio de unión pre-calentado. Los hepatocitos unidos se incuban adicionalmente con diversas concentraciones de TRAIL soluble o FasL en presencia de agente de entrecruzamiento, o TRA-8 o CH11 durante 6 horas.

TRAIL tiene al menos dos receptores (DR4 y DR5) que son
25 capaces de inducir la apoptosis. TRA-8 se usa para determinar si el entrecruzamiento de DR5 solo es suficiente para inducir la apoptosis de hepatocitos normales. La expresión de DR5 a nivel de proteínas se examina inicialmente en cinco tejidos hepáticos humanos normales y cinco tejidos de cáncer de
30 hígado por inmunohistoquímica *in situ* usando TRA-8. Las secciones de los tejidos hepáticos normales mostraron arquitectura y morfología celular normales en tinción H&E

(Fig. 11a, paneles superiores de la izquierda) en ausencia de reactividad positiva con TRA-8 para DR5 (Fig. 11a, paneles inferiores de la izquierda). En contraste, el tejido de carcinoma hepatocelular humano reaccionó positivamente con TRA-8 en un patrón coherente con la presencia tanto de membrana celular como citoplasmática de DR5 en las células cancerosas. La línea celular de carcinoma hepatocelular humano HepG2 también es positiva para DR5. Estos resultados son constantes entre los cinco tejidos hepáticos normales, y solamente uno (adenoma hepático) de los cinco tejidos de cáncer de hígado es DR5-negativo. Estos resultados son coherentes con los datos de transferencia de Western, mostrados en la Figura 5a, ya que, como con otros tejidos normales, el tejido hepático humano normal no expresa niveles significativos de proteína DR5. Además, el análisis de transferencia de Western de hepatocitos humanos normales aislados sondeada con TRA-8 no revela niveles detectables de DR5.

La expresión en superficie celular de DR5 en hepatocitos humanos por análisis de citometría de flujo demostró que hepatocitos normales recién preparados no expresaban niveles detectables de DR5 de superficie celular (Fig. 11b, paneles superiores de la izquierda). Tampoco se detecta en hepatocitos humanos normales que se habían criopreservado o puesto en cultivo a corto plazo. En contraste, las células de carcinoma hepatocelular recién aisladas así como las células HepG2 expresan DR5 de superficie celular. Usando Fas como comparación, los hepatocitos normales, las células de carcinoma hepatocelular, y las células HepG2 expresaban todas niveles equivalentes de Fas (Fig. 11b, paneles inferiores). Estos resultados son coherentes con los obtenidos usando inmunohistoquímica *in situ* y transferencia de Western e indican que DR5 de superficie celular se expresa enormemente

en células hepáticas cancerosas pero no en hepatocitos normal. La presencia de niveles de ARNm para DR4, DR5, DcR1 y DcR2 en hepatocitos humanos, demostrada por RT-PCR²³, sugiere que puede que los hepatocitos humanos expresen niveles muy
5 bajos de proteína DR5 que están por debajo del umbral para la detección por TRA-8.

Para determinar si TRA-8 induce toxicidad hepatocelular, se examina la susceptibilidad de hepatocitos humanos normales para la apoptosis inducida por TRA-8 y por TRAIL soluble más
10 agente de entrecruzamiento. Cuando se cultivan hepatocitos normal en presencia de una alta concentración de TRAIL, se observa una disminución dependiente del tiempo en la viabilidad celular por ATPLite (Fig. 12a) y ensayos MTT. La muerte celular mediada por TRAIL de hepatocitos normales
15 podía observarse tan pronto como a las cuatro horas después de la adición de TRAIL. Al final de un cultivo de 24 horas, más del 80% de los hepatocitos están eliminados por TRAIL. En contraste, durante el mismo periodo de cultivo, TRA-8 no inducía muerte celular significativa en hepatocitos normales.
20 Los núcleos condensados teñidos con Hoechst, una característica de la apoptosis, están aumentados en hepatocitos tratados con TRAIL pero no en los tratados con TRA-8 (Fig. 12b). La cantidad de hepatocitos apoptóticos está muy correlacionada con la viabilidad celular disminuida
25 determinada por ensayo de ATPLite, lo que sugiere que la muerte celular inducida por TRAIL de los hepatocitos está mediada por la apoptosis. Esto se confirma por la capacidad de Z-VAD de inhibir la toxicidad mediada por TRAIL de los hepatocitos. Como la cicloheximida es un potente potenciador
30 de la apoptosis, se investiga el efecto de este compuesto sobre los hepatocitos tratados con TRAIL y TRA-8. Durante un cultivo de cuatro horas, la cicloheximida potenciaba significativamente la muerte celular de los hepatocitos

inducida por TRAIL, eliminándose más del 70% de los hepatocitos por TRAIL en presencia de cicloheximida (Fig. 12c). Sin embargo, el tratamiento con cicloheximida es incapaz de potenciar la muerte celular mediada por TRA-8 en los hepatocitos. Para comparar las características de la apoptosis inducida por TRA-8 con la inducida por TRAIL en hepatocitos, se incuban hepatocitos normales así como células cancerosas con concentraciones variables de TRAIL soluble con agente de entrecruzamiento o TRA-8. Durante un periodo de cultivo de 6 horas, TRAIL inducía una respuesta apoptótica moderada en hepatocitos normales. Más del 20% de los hepatocitos se eliminan en presencia de 500 ng/ml de TRAIL (Fig. 12d, izquierda superior). El tratamiento con TRA-8 de hepatocitos normales no provocaba ninguna muerte celular significativa durante el mismo periodo de tiempo. En contraste con los hepatocitos normales, las células de carcinoma hepatocelular primarias (Fig. 12d, centro superior) y las células HepG2 (Fig. 12d, derecha superior) son muy susceptibles a la apoptosis mediada por TRAIL o TRA-8. Más del 80% de las células de carcinoma hepatocelular y casi el 100% de las células HepG2 se eliminan 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 las células de cáncer de hígado. Usando el ligando de Fas y anticuerpo anti-Fas (CH-11), no hay diferencia significativa en la susceptibilidad a la apoptosis mediada por Fas entre los hepatocitos normales, las células de carcinoma hepatocelular, y las células HepG2 (Fig. 12d, paneles inferiores).

Ejemplo Comparativo 11B. Inducción de hepatitis *in vivo* por TRAIL humano unido a membrana

A ratones B6 hembra de 8-10 semanas de edad se les inyecta por vía intravenosa 10^9 pfu de Ad/hTRAIL con la misma
5 cantidad de Ad/Tet-on. Se alimenta a los ratones diferentes con concentraciones de tetraciclina en su agua para beber inmediatamente después de la inoculación de los vectores adenovirales. La lesión hepática se determina por los niveles séricos de AST usando un kit de diagnóstico de AST (Sigma).
10 La expresión de TRAIL se determina por análisis de transferencia de Northern.

Para determinar si la forma unida a membrana de TRAIL induce el daño hepático *in vivo*, se construye un vector adenoviral recombinante que codifica el TRAIL humano de
15 longitud completa (Ad/hTRAIL), cuya expresión está bajo el control del promotor inducible por tetraciclina. Veinticuatro horas después de la inoculación intravenosa de los ratones B6 con Ad/hTRAIL, se observa expresión inducida por tetraciclina de TRAIL humano en el hígado de un modo dependiente de la
20 dosis como se demuestra por el análisis de transferencia de Northern (Fig. 13a). Los niveles de expresión de TRAIL se correlacionaban bien con el daño hepático como se demuestra por un aumento dependiente de tetraciclina en los niveles séricos de transaminasas, de nuevo de un modo dependiente de
25 la dosis (Fig. 13b). Como la inoculación con vector adenoviral *per se* puede aumentar la susceptibilidad de los hepatocitos a la apoptosis mediada por TRAIL, se aíslan los hepatocitos de ratones inoculados con Ad/TRAIL y se ensayan para la muerte celular mediada por TRAIL. No hay muerte
30 celular significativamente aumentada de los hepatocitos infectados con Ad/TRAIL en comparación con los de ratones de control (Fig. 13c, panel de la izquierda). Además, los ratones inoculados con Ad/TRAIL no mostraron lesión hepática

aumentada después de la inyección intravenosa de TRAIL humano soluble. Por tanto, se entiende que la hepatitis inducida por Ad/TRAIL está mediada por altos niveles de expresión de TRAIL en su forma de membrana. Análisis histológicos de secciones

5 hepáticas revelaron que el daño a los hepatocitos es evidente tan pronto como a las 24 horas después de la inoculación del vector (Fig. 13d), y persiste durante al menos 7 días (Fig. 13e). Estas alteraciones patológicas en el hígado también son dependientes de tetraciclina y sucedían de un modo

10 dependiente de la dosis. La fase temprana, en las 24 horas de tratamiento, del daño hepático inducido por TRAIL está caracterizado por focos de necrosis. No se observa infiltración de células inflamatorias en esta fase, pero ha existido hemorragia. En el día 7 después de la inoculación,

15 es evidente un daño hepático difuso con un marcado desarreglo lobular, degeneración severa de los hepatocitos con citoplasma aglomerado de forma irregular y grandes espacios claros, y apoptosis y necrosis prominentes. Un infiltrado extensivo de células mononucleares es un rasgo característico

20 en esta fase. Estos resultados indican que TRAIL humano en su forma unida a membrana es capaz de inducir daño hepático *in vivo*. A pesar de la propensión de TRAIL humano a causar hepatitis severa en ratones, no inducía una respuesta letal. En contraste, ratones inoculados con vectores controlados con

25 tetraciclina similares que codifican el ligando de Fas desarrollaron hepatitis fulminante con apoptosis y necrosis masivas de los hepatocitos acompañada por hemorragia severa y por una mortalidad que sucede de un modo dependiente de la dosis de tetraciclina en las 72 horas desde la inoculación.

30 La tasa de mortalidad alcanzó el 100% en las 48 horas en aquellos subgrupos que recibieron 3 mg/ml o más de tetraciclina. En contraste, todos los ratones que recibieron Ad/hTRAIL, independientemente de la dosis de tetraciclina,

aún están vivos cuatro semanas después de la inoculación. Por tanto, se entiende que, *in vivo*, la forma unida a membrana de TRAIL es un inductor menos potente de daño hepatocelular que el ligando de Fas. Se sugiere adicionalmente que TRAIL puede
5 inducir daño hepático a través de un mecanismo que difiere del mecanismo subyacente a la toxicidad del ligando de Fas.

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

10 Para determinar si DR5 desempeña un papel en la apoptosis mediada por TRAIL de células T y B activadas, se examina la expresión superficial de DR5 en células T y B en reposo y activadas usando TRA-8. Las células T humanas no estimuladas en PBMC no expresaban niveles significativos de
15 DR5 (Fig. 14). A las 48 horas después de la estimulación anti-CD3 o Con-A, la expresión de superficie celular de DR5 está significativamente aumentada. Asimismo, las células B no estimuladas expresaban niveles muy bajos de DR5. La estimulación con anti- μ , pero sin LPS provocó una expresión
20 en superficie celular aumentada de DR5. Estos resultados indican que tanto las células T como las células B activadas expresan niveles mayores de DR5 de superficie celular. Las células se tiñen con 20 μ g/ml de TRA-8 y anticuerpo PE-anti-IgG1 de ratón.

25

Ejemplo 13. Las células T y B activadas llegan a ser susceptible 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, se estimulan
30 las células T y B de PBMC humanas con anti-CD3 o anti- μ *in vitro* durante 48 horas, respectivamente. Las células viables y los blastocitos en proliferación se recogen por

centrifugación en gradiente, y se incuban con diversas concentraciones de TRA-8. Las células T y B no estimuladas no son susceptibles a la apoptosis mediada por TRA-8 (Fig. 15). Todas las células T y B estimuladas mostraron una
5 susceptibilidad moderadamente aumentada a la apoptosis mediada por TRA-8, eliminándose un 20% de las células por TRA-8 después de cultivo durante una noche. Los blastocitos T de alta proliferación son incluso más susceptibles a la apoptosis mediada por TRA-8. Más del 70% de los blastocitos T
10 pudieron eliminarse por TRA-8. Los blastocitos B son también más susceptibles a la apoptosis mediada por TRA-8 en comparación con otros. Estos resultados indican que las células T y B activadas son susceptibles a la apoptosis mediada por DR5.

15

Ejemplo 14. TRA-8 reduce las células T activadas en seres humanos/ratones SCID

Para determinar la eficacia *in vivo* anti-células T de TRA-8, se inyecta a ratones NOD/SCID por vía intravenosa 1×10^8 PBMC humanas. Normalmente, las células T humanas en
20 ratones SCID se activan rápidamente en respuesta a estimulación xenogénica. A los ratones SCID con PBMC humanas se les inyecta por vía intraperitoneal 100 μg de TRA-8 o IgG1 de control desde el día de la transferencia, lo que se repite
25 diariamente durante tres días. Cinco días después de la transferencia, se aíslan las células mononucleares del bazo y se tiñen con anticuerpo anti-CD3 humano, y se selecciona la población linfocítica por análisis de citometría de flujo, y se analizan las células T humanas CD3 positivas.
30 Aproximadamente el 30% de los linfocitos esplénicos son células T humanas, como se determina por la tinción anti-CD3 humano en ratones tratados de control. Sin embargo, se

observan solamente unas pocas células T humanas (menos del 3%) entre los linfocitos esplénicos en ratones tratados con TRA-8 (Fig. 16). El estudio histológico *in situ* reveló que en el bazo de ratones de control, las células T humanas son
 5 repobladas en el bazo con solamente unas pocas células apoptóticas observadas, como se demuestra por la tinción con TUNEL. En contraste, la repoblación con células T humanas viables no se observa en el bazo de ratones tratados con TRA-8, sino que se observan muchas células apoptóticas (Fig. 17).
 10 Estos resultados demuestran que TRA-8 tiene actividad anti-células T *in vivo*, e indican la utilidad de los anticuerpos de la invención para el tratamiento de la enfermedad GVH.

Ejemplo 15. Actividad terapéutica anti-cáncer de TRA-8

15.1 Expresión y función de DR5 en líneas tisulares y celulares cancerosas humanas

i) Expresión de DR5 en tejidos cancerosos humanos por tinción in situ con TRA-8. Para determinar su las células y tejidos cancerosos expresan de forma diferencial niveles
 20 mayores de DR5, se tiñe un panel de tejidos cancerosos humanos incluyendo unos 20 cánceres de mama, 6 cánceres de ovario, 5 cánceres de colon y 5 cánceres de próstata con TRA-8 para inmunohistoquímica. La mayoría de estos tejidos cancerosos expresaban DR5 detectable. Los niveles de
 25 expresión de DR5 en estos tejidos cancerosos variaban. En general, los tejidos cancerosos expresaban niveles mayores de DR5 que los tejidos no implicados. Además, la expresión de DR5 está aparentemente no correlacionada con la mutación de p53.

ii) Expresión y función de DR5 en líneas celulares de cáncer humano (Tabla 2). Se examinan nueve líneas celulares de cáncer de mama humano, tres líneas de cáncer de ovario, tres líneas de cáncer de colon y tres líneas de cáncer de

próstata para la expresión en superficie celular de DR5 y la susceptibilidad a la apoptosis inducida por TRA-8 *in vitro*. Unas 7 de las 9 líneas de cáncer de mama, 3 de las 3 líneas de cáncer de ovario, 3 de las 3 líneas de cáncer de colon y 3 de las 3 líneas de cáncer de próstata expresaban niveles variables de DR5 de superficie celular. De las 9 líneas de cáncer de mama, tres son muy susceptibles, tres son intermedias y tres son resistentes a la apoptosis mediada por TRA-8. Las tres líneas de cáncer de ovario son muy susceptibles. Una de las tres líneas de cáncer de colon es muy susceptible, mientras que dos tienen sensibilidad intermedia. Dos de las tres líneas de cáncer de próstata tienen sensibilidad intermedia y una es resistente.

Tabla 2. Expresión y función de DR5 en células cancerosas humanas.

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	-	-
Caov-3	ovario	+	++++
OVCAR-3	ovario	++	++++

5

Skov-3	ovario	+	+++
Wide	colon	+++	++++
HST29	colon	++	+++
T84	colon	+	++
PC3	próstata	+++	++
LnCap	próstata	+++	+
Du-145	próstata	+++	+

10 Nota: ¹determinada por citometría de flujo, las células se
 tiñen con 20 µg/ml de TRA-8 y se compara con anticuerpo de
 control. ²determinada por ensayo de ATPLite. ++++:
 eliminación de más del 80%, +++: eliminación entre el 60-80%,
 ++: eliminación entre el 40-60%, +: eliminación entre el 20-
 15 40%, - sin eliminación.

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
 elevadas de adriamicina mostraron un efecto aditivo. Sin
 20 embargo, en algunas líneas resistentes a TRA-8, bajas dosis
 de adriamicina potencian de forma sinérgica la apoptosis
 inducida por TRA-8.

**iv) Actividad de unión in vitro e in vivo de TRA-8 a
 células cancerosas humanas.** Usando TRA-8 marcado con
 25 radioisótopo, se examina la actividad de unión de TRA-8 a una
 línea de cáncer de mama *in vitro* e *in vivo* en ratones SCID
 con tumor implantado. La actividad de unión *in vitro* a las
 células cancerosas se estima como un valor de Kd de 3 nM, que
 es constante con la estimación previa usando ELISA, y al
 30 menos 50 veces mayor que TRAIL soluble. *In vivo*, TRA-8 se
 localizaba en los tejidos tumorales implantados.

15.2. Terapia de leucemia linfoblástica crónica en

ratones NOD/SCID con TRA-8

La leucemia linfocítica crónica (CLL) es una forma común de malignidad de células B. La mayoría de las células B malignas en CLL son de fenotipo maduro y son resistentes a muchos estímulos de apoptosis. Se examina la expresión y función de DR5 en las células B de cinco pacientes con CLL. Todos los pacientes tenían recuentos elevados de células B periféricas demostrados por más del 95% de células B CD19+ en PBMC. En comparación con células B primarias normales, las células B de CLL de todos los pacientes tenían niveles mayores de DR5 de superficie celular y son más susceptibles a la apoptosis inducida por TRA-8 *in vitro*. De forma interesante, las células B de CLL son también sensibles a citotoxicidad inducida por bisindolmaleimida VIII (BisVIII). Después del tratamiento combinado con TRA-8 y BisVIII, casi el 50% de las células B de CLL estaban eliminadas mientras que las células B normales permanecían insensibles (Fig. 18). La transferencia de células B de CLL en ratones NOD/SCID provocó una repoblación de aproximadamente el 25%-30% de células B CD19+ en el bazo de los ratones receptores a los cinco días después de la transferencia. Sin embargo, tres dosis de 100 µg de tratamiento con TRA-8 eliminaban completamente las células B de CLL de cuatro de los cinco pacientes en el bazo de los ratones SCID receptores. Por tanto, TRA-8 solo o en concierto con otras sustancias es activo como agente terapéutico para la leucemia linfocítica crónica.

Ejemplo 16. Clonación de ADNc**(1) Determinación de las secuencias de aminoácidos N-terminales de las cadenas pesada y ligera de TRA-8**

Para obtener ADNc de las cadenas pesada y ligera de TRA-8, se determinan las secuencias de aminoácidos N-terminales

de las cadenas pesada y ligera de TRA-8 y los genes de TRA-8 clonado por técnicas conocidas.

Diez μg de la solución que contiene el anticuerpo anti-DR5 humano TRA-8 se someten a electroforesis en gel de SDS-
5 poliacrilamida ("SDS-PAGE"), usando una concentración de gel del 12% p/v, voltaje constante a 100 V, durante 120 minutos. Después de la electroforesis, el gel se sumerge en tampón de transferencia Tris-HCl 25 mM (pH 9,5), metanol al 20%, SDS al 0,02% v/v durante 5 minutos. Después de este tiempo, se
10 transfiere el contenido de proteínas del gel a una membrana de difluoruro de polivinilideno ("membrana de PVDF"; tamaño de poro de 0,45 μm ; Millipore, Japón), preimpregnada en tampón de transferencia, usando una aparato de transferencia (KS-8451; Marysol) en condiciones de 10 V de voltaje
15 constante, 4°C, durante 14 horas.

Después de este tiempo, la membrana de PVDF se lava con tampón de lavado NaCl 25 mM, tampón borato sódico 10 mM (pH 8,0), después se tiñe en una solución de tinción (metanol al 50% v/v, ácido acético al 20% v/v y azul brillante de
20 Coomassie al 0,05% p/v) durante 5 minutos para localizar las bandas de proteína. La membrana de PVDF después se destiñe con metanol acuoso al 90% v/v, y se escinden las bandas correspondientes a la cadena pesada, la banda con la movilidad inferior y a la cadena ligera, la banda con la
25 movilidad mayor previamente localizadas en la membrana de PDVF y se lavan con agua desionizada.

La secuencia de aminoácidos N-terminal de las cadenas pesada y ligera se determina por el método automatizado de Edman (Edman, P., et al., (1967), Eur. J. Biochem., 1, 80)
30 usando un secuenciador de proteínas en fase gaseosa (PPSQ-10; Shimadzu Seisakusyo, K. K.).

Se determina que la secuencia de aminoácidos N-terminal

de la banda correspondiente a la cadena pesada es:

Glu-Val-Met-Leu-Val-Glu-Ser-Gly-Gly-Gly-Leu-Val-Lys-Pro-Gly-Gly-Ser-Leu-Lys-Leu (SEC ID N° 4 de la lista de secuencias); y que la de la banda correspondiente a la cadena ligera es:

5 Asp-Ile-Val-Met-Thr-Gln-Ser-His-Lys-Phe-Met-Ser-Thr-Ser-Val-Gly-Asp-Arg-Val-Ser (SEC ID N° 5 de la lista de secuencias).

La comparación de estas secuencias de aminoácidos con la base de datos de la secuencia de aminoácidos de anticuerpos producidos por Kabat et al. (Kabat E.A., et al., (1991), en
10 "Sequences of Proteins of Immunological Interest Vol. II," U.S. Department of Health and Human Services) reveló que la cadena pesada (cadena γ 1) y la cadena ligera (cadena κ) de TRA-8 pertenecían a los subtipos 3d y 1, respectivamente.

(2) Clonación de ADNc

15 En base a los hallazgos anteriores, se sintetizan cebadores oligonucleotídicos que se esperaba que hibridaran con partes de las regiones 5' no traducidas y los propios extremos de las regiones 3' traducidas de los genes que pertenecen a estos subtipos de ratón. Después, los ADNc que
20 codifican las cadenas pesada y ligera de TRA-8 se clonan por la siguiente combinación de transcripción inversa y PCR (RT-PCR):

a) Molde

Se extrae el ARN total del hibridoma TRA-8 (ATCC N° PTA-
25 1428) usando reactivo TRIzol (GIBCO BRL). El molde para la reacción de PCR usó el ADNc que se obtiene usando el kit de síntesis de ADNc First-Strand (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con el manual de instrucciones proporcionado con el kit.

30 b) Cebadores de PCR

Se sintetizan los siguientes cebadores oligonucleotídicos para la PCR:

- 5'-cagcactgaa cacggacccc-3' (H5NCS1: SEC ID N° 6 de la lista de secuencias);
- 5'-aaaggtaatt tattgagaag-3' (H5NCS2: SEC ID N° 7 de la lista de secuencias);
- 5 5'-cctcaccatg aacttcgggc-3' (H5SS1: SEC ID N° 8 de la lista de secuencias);
- 5'-ctgttgatg cacatgagac-3' (H5SS2: SEC ID N° 9 de la lista de secuencias);
- 5'-gaagtgatgc tggaggagtc-3' (H5CS1: SEC ID N° 10 de la lista de secuencias);
- 10 5'-agtgtgaagt gatgctggtg-3' (H5CS2: SEC ID N° 11 de la lista de secuencias);
- 5'-tttaccagga gagtgggaga g-3' (H3CR: SEC ID N° 12 de la lista de secuencias);
- 15 5'-tgcagagaca gtgaccagag-3' (H3VR: SEC ID N° 13 de la lista de secuencias);
- 5'-tgttcaggac cagcatgggc-3' (L5NCS1: SEC ID N° 14 de la lista de secuencias);
- 5'-aagacatttt ggattctaac-3' (L5NCS2: SEC ID N° 15 de la lista de secuencias);
- 20 5'-tatcatgaag tctttgtatg-3' (L5SS1: SEC ID N° 16 de la lista de secuencias);
- 5'-gatggagaca cattctcagg-3' (L5SS2: SEC ID N° 17 de la lista de secuencias);
- 25 5'-gacattgtga tgaccagtc-3' (L5CS: SEC ID N° 18 de la lista de secuencias);
- 5'-ttaacactca ttctgttg-3' (L3CR: SEC ID N° 19 de la lista de secuencias); y
- 5'-gactgggtca tcacaatgtc-3' (LCSR: SEC ID N° 20 de la lista de secuencias).
- 30

Salvo que se especifique otra cosa, todos los oligonucleótidos en estos Ejemplos se sintetizan por Pharmacia Biotech. Todos los oligonucleótidos se almacenan a

-20°C después de disolverse en agua destilada,

c) Reacción de PCR

Composición de la solución de reacción de PCR:

- ADNc molde, 5 µl de una reacción total de 33 µl
5 cebador DR5p1, 10 µmol;
cebador DR5p2, 10 µmol;
tampón de PCR concentrado 10x (proporcionado con el
kit), 10 µl;
dNTP (2,5 mM cada uno), 4 µl; y
10 Taq polimerasa (Promega), 5 unidades.

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

- 15 La reacción de PCR se realiza del siguiente modo. La solución se calienta primero a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 40 veces un ciclo de calentamiento a 94°C durante 30 segundos, 52°C durante 1 minuto y 72°C durante 3 minutos. Después de completarse este
20 procedimiento, la solución de reacción se calienta a 72°C durante 10 minutos.

- Los fragmentos de ADN amplificado, obtenidos de este modo, se separan en un gel de agarosa al 1% que contiene 0,25 µg/ml de bromuro de etidio. Las bandas que se ha determinado
25 que contienen los fragmentos de ADN deseados se cortan usando una hoja de afeitar y se recupera el ADN de las mismas usando el kit Gene Clean (BIO101). El fragmento de ADN se clona usando el vector pGEM-T Easy (Promega). Esto se realiza del siguiente modo.

- 30 El fragmento de ADN recuperado de la solución de reacción de PCR, junto con 50 ng del vector pGEM-T Easy (proporcionado con el kit), se mezcla con 1 µl de tampón de

reacción de ligasa 10 X (Tris-HCl 6 mM (pH 7,5), cloruro de magnesio 6 mM, cloruro sódico 5 mM, β -mercaptoetanol 7 mM, ATP 0,1 mM, DTT 2 mM, espermidina 1 mM, y 0,1 mg/ml de albúmina sérica bovina), al que se han añadido 4 unidades de
5 ADN ligasa T4 (1 μ l). El volumen total de la mezcla se ajusta a 10 μ l con agua desionizada estéril, y la solución de ligasa resultante se incuba a 14°C durante 15 horas. Después de este tiempo, se añaden 2 μ l de la solución de reacción de ligasa a 50 μ l de la cepa JM109 de *E. coli* competente (proporcionada
10 con el kit y llevada a competencia de acuerdo con el manual de instrucciones) a la que se han añadido 2 μ l de β -mercaptoetanol 0,5 M, y la mezcla resultante se mantiene en hielo durante 30 minutos, después a 42°C durante 30 segundos, y de nuevo en hielo durante 5 minutos. A continuación, se
15 añaden 500 μ l de medio que contiene tristona al 2% v/v, extracto de levadura al 0,5% p/v, cloruro sódico al 0,05% p/v, cloruro potásico 2,5 mM, cloruro de magnesio 1 mM, y glucosa 20 mM (a partir de ahora mencionado como medio "SOC") al cultivo, y la mezcla se incuba durante 1 hora a 37°C con
20 agitación. Después de este tiempo, el cultivo se extiende en una placa de agar de caldo L (tristona al 1% v/v, extracto de levadura al 0,5% p/v, cloruro sódico al 0,5% p/v, glucosa al 0,1% p/v, y bacto-agar al 0,6% p/v (Difco)), que contiene 100 μ g/ml. Las colonias resistentes a ampicilina que aparecen en
25 la placa se seleccionan y se retiran por raspado con un bucle de transferencia de platino, y se cultivan en medio de caldo L que contiene 100 μ g/ml de ampicilina a 37°C, durante una noche, con agitación a 200 r.p.m. Después de la incubación, las células se recogen por centrifugación, a partir de las
30 cuales se prepara el ADN plasmídico por el método alcalino. El plásmido obtenido se denomina plásmido pH62 para la cadena pesada de TRA-8 o pL28 para la cadena ligera de TRA-8. Las

cepas transformantes de *E. coli* que albergan este plásmido, denominadas *E. coli* JM109/pH62 y *E. coli* JM109/pL28 se depositaron en el International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 5 305-5466, Japón el 20 de abril de 2001, de acuerdo con el Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos, y se correspondieron con los números de acceso FERM BP-7560 y FERM BP-7561, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de 10 estos ADN que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de TRA-8 se confirman 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).

15 Las secuencias de nucleótidos de las cadenas pesada y ligera de TRA-8 se dan como las SEC ID N° 21 y N° 22 de la lista de secuencias, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de TRA-8 se dan como las SEC ID N° 23 y N° 24 de la lista de secuencias, 20 respectivamente. Las secuencias de aminoácidos N-terminales de las cadenas pesada y ligera de TRA-8 establecidas anteriormente coincidían perfectamente. Además, cuando se comparan las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera con la base de datos de secuencias de aminoácidos de 25 anticuerpos, se establece que, para la cadena pesada, los nucleótidos n° 58 a 414 en la SEC ID N° 21 constituían la región variable, mientras que los nucleótidos n° 415 a 1392 en la SEC ID N° 21 constituían la región constante. Para la cadena ligera, los nucleótidos n° 64 a 387 en la SEC ID N° 22 30 constituían la región variable, mientras que los nucleótidos n° 388 a 702 en la SEC ID N° 22 constituían la región constante. Las localizaciones y secuencias de las CDR también se dilucidaron comparando las homologías con la base de datos.

Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena pesada de TRA-8 se muestran en las SEC ID N° 25, N° 26, y N° 27, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena ligera de TRA-8 se muestran en las SEC ID N° 28, N° 29, y N° 30, respectivamente.

Ejemplo 17. Diseño de una versión humanizada del anticuerpo TRA-8

10 (1) Modelado molecular de una región variable de TRA-8

El modelado molecular de la región variable de TRA-8 se realiza por el método generalmente conocido como modelado de homología (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)). Se comparan las secuencias primarias de las regiones variables de inmunoglobulina humana registradas en el Protein Data Bank (Nuc. Acid Res. 28, 235-242 (2000)), para las que están disponibles las estructuras tridimensionales derivadas de cristalografía de ratos X, con las regiones flanqueantes de TRA-8 determinadas anteriormente. Como resultado, se seleccionan 1NCD y 1HIL como las que tienen las mayores homologías de secuencia con las regiones flanqueantes de las cadenas ligera y pesada de TRA-8, respectivamente. Las estructuras tridimensionales de las regiones flanqueantes se generan combinando las coordenadas de 1NCD y 1HIL que corresponden a las cadenas ligera y pesada de TRA-8, para obtener el "modelo flanqueante". Usando la clasificación definida por Chotia et al., las CDR de TRA-8 se clasifican del siguiente modo; CDRL₁, CDRL₂, CDRH₁ y CDRH₂ pertenecen a las clases canónicas 2, 1, 1, 3, respectivamente, mientras que CDRL₃ no pertenece a ninguna clase canónica específica. Los bucles CDR de CDRL₁, CDRL₂, CDRH₁, CDRH₂ se fijan a las conformaciones inherentes a sus clases canónicas respectivas, y se integran en el modelo flanqueante. A CDRL₃ se la asigna

la conformación del grupo 8A, de acuerdo con la clasificación de Thornton et al. (J. Mol. Biol., 263, 800-815, (1996)), y CDRH₃ se clasifica en k(8)C usando la norma H3 (FEBS letter 455,188-197(1999)). Después se integran las conformaciones
5 representativas para CDRL₃ y CDRH₃ en el modelo flanqueante.

Finalmente, se realizan cálculos de energía para eliminar los contactos inter-atómicos desfavorables, para obtener un modelo molecular probable de la región variable de TRA-8 en términos de energía. El procedimiento anterior se
10 realiza usando el sistema de modelado molécula común disponible en el mercado ABM (Oxford Molecular Limited, Inc.). Para el modelo molecular obtenido, se evalúa adicionalmente la exactitud de la estructura usando el software PROCHECK (J. Appl. Cryst. (1993), 26, 283-291).

15 **(2) Diseño de las secuencias de aminoácidos para TRA-8 humanizado.**

La construcción de anticuerpos TRA-8 humanizados se realiza por el método generalmente conocido como injerto de CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86,10029-10033 (1989)). El
20 anticuerpo aceptor se elige en base a la homología de aminoácidos en la región flanqueante. Las secuencias de la región flanqueante en TRA-8 se comparan con todas las secuencias flanqueantes humanas de la base de datos de Kabat de secuencias de aminoácidos de anticuerpos (Nuc. Acid Res.
25 29, 205-206 (2001)). Como resultado, se selecciona el anticuerpo mAB58'CL como aceptor debido a la homología de secuencia más alta del 80% para la región flanqueante. Los restos aminoacídicos de la región flanqueante para mAb58'CL se alinean con los de TRA-8 y se identifican las posiciones
30 donde se usan aminoácidos diferentes. Se analiza la localización de esos restos usando el modelo tridimensional de TRA-8 construido anteriormente y se eligen los restos donantes que deben injertarse en el aceptor por los criterios

dados por Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Se construyen las secuencias humanizadas de TRA-8 como se describe en el siguiente ejemplo transfiriendo varios restos donantes al anticuerpo aceptor, mAb58'CL.

5

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

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

10 Para determinar la actividad de TRA-8 humanizado, se construye el plásmido que lleva la cadena pesada de TRA-8 humanizado del siguiente modo. Sin embargo, se aprecia que la humanización de TRA-8 no está limitada a estos ejemplos.

15 Como se muestra en la SEC ID N° 31 de la lista de secuencias, la humanización de las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo de ratón anti-DR5 humano TRA-8 conllevó el remplazo del 13° aminoácido (lisina), el 19° aminoácido (lisina), el 40° aminoácido (treonina), el 42° aminoácido (ácido glutámico), el 44° aminoácido (arginina),
20 el 84° aminoácido (serina), el 88° aminoácido (serina), el 93° aminoácido (metionina), el 114° aminoácido (treonina), el 115° aminoácido (leucina) con glutamina, arginina, alanina, glicina, glicina, asparagina, alanina, valina, leucina, y valina, respectivamente.

25 El plásmido que lleva el ADN que codifica la región variable de la cadena pesada de TRA-8 humanizado (SEC ID N° 31 de la lista de secuencias) se construye del siguiente modo.

30 Se usa PCR para construir las siguientes secuencias de ADN, cada una de las cuales compuesta como se ha descrito anteriormente:

Se sintetizan los siguientes 12 oligonucleótidos:

5'- ttggataagc ttggcttgac ctcacatgg gatggagctg tatcatcctc

ttcttggttag caacagctac aggtgtccac -3' (A; SEC ID N° 32);
 5'- tctgaagtaa tgctggtgga gtctggggga ggcttagtac agcctggagg
 gtccctgaga ctctcctgtg cagcctctgg -3' (B; SEC ID N° 33);
 5'- attcactttc agtagttatg taatgtcttg ggttcggcag gcaccaggga
 5 agggctctgga gtgggttgca accattagta -3' (C; SEC ID N° 34);
 5'- gtggtggttag ttacacctac tatccagaca gtgtgaaggg ccgattcacc
 atctccagag acaatgccaa gaacaccctg -3' (D; SEC ID N° 35);
 5'- tatctgcaaa tgaacagtct gagagcagag gacacggctg tttattactg
 tgcaagaagg ggtgactcta tgattacgac -3' (E; SEC ID N° 36);
 10 5'- ggactactgg ggccaaggga ccctgggtcac agtctcctca gcctc cacc
 aagggcccat cggtc -3' (F; SEC ID N° 37);
 5'- ctaccaagaa gaggatgata cagctccatc ccatggtgag gtcaagccaa
 gcttatccaa -3' (G; SEC ID N° 38);
 5'- tctcagggac cctccagggt gtactaagcc tccccagac tccaccagca
 15 ttacttcaga gtggacacct gtagctgttg -3' (H; SEC ID N° 39);
 5'- tccagaccct tccttggtgc ctgccgaacc caagacatta cataactact
 gaaagtgaat ccagaggctg cacaggagag -3' (I; SEC ID N° 40);
 5'- ctctggagat ggtgaatcgg cccttcacac tgtctggata gtaggtgtaa
 ctaccaccac tactaatggt tgcaaccac -3' (J; SEC ID N° 41);
 20 5'- ccttcttgca cagtaataaa cagccgtgtc ctctgctctc agactgttca
 tttgcagata cagggtgttc ttggcattgt -3' (K; SEC ID N° 42); y
 5'- gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtgacc agggtcctt
 ggccccagta gtccgtcgta atcatagagt cacc -3' (L; SEC ID N° 43).

Se sintetizan los siguientes 2 cebadores de PCR como se
 25 ha descrito anteriormente:

5'- ttggataagc ttggcttgac -3' (P1; SEC ID N° 44); y
 5'- gaccgatggg cccttggtgg a -3' (P2; SEC ID N° 45).

La síntesis del ADN que codifica una cadena
 polipeptídica que comprende una secuencia señal de secreción,
 30 una región variable de la cadena pesada de TRA-8 humanizado y
 los 8 restos aminoacídicos en el extremo N-terminal de la
 región IgG-CH1 se realiza usando una combinación de PCR
 respectivamente.

El fragmento de ADN se prepara del siguiente modo.

Composición de la solución de reacción de PCR:

- oligonucleótido A, 10 pmol;
- oligonucleótido B, 10 pmol;
- 5 oligonucleótido C, 10 pmol;
- oligonucleótido D, 10 pmol;
- oligonucleótido E, 10 pmol;
- oligonucleótido F, 10 pmol;
- oligonucleótido G, 10 pmol;
- 10 oligonucleótido H, 10 pmol;
- oligonucleótido I, 10 pmol;
- oligonucleótido J, 10 pmol;
- oligonucleótido K, 10 pmol;
- oligonucleótido L, 10 pmol;
- 15 oligonucleótido cebador P1, 2 μ M;
- oligonucleótido cebador P2, 2 μ M;
- tampón II Pirobest 10 X, 10 μ l;
- mezcla de dNTP, 8 μ l;
- ADN polimerasa Pirobest, 0,5 μ l; y
- 20 agua redestilada hasta un volumen final de 50 μ l.

La reacción de PCR se realiza del siguiente modo. La solución primero se calienta a 94°C durante 5 minutos, después de lo cual se repite 7 veces un ciclo de calentamiento a 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 30
 25 segundos y 72°C durante 1 minuto. Después de completar este procedimiento, la solución de reacción se calienta a 72°C durante 15 minutos.

Se añade un volumen igual de fenol-cloroformo (fenol al 50% v/v saturado con agua, cloroformo al 48% v/v, alcohol
 30 isoamílico al 2% v/v) a 200 μ l de cada uno de los productos de PCR, y se mezclan vigorosamente durante 1 minuto. Después de este tiempo, la mezcla se centrifuga a 10.000 X g, y la

capa acuosa se recupera y mezcla con un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (cloroformo al 96% v/v y alcohol isoamílico al 4% v/v), que se mezcla de nuevo vigorosamente a 10.000 X g y se recupera la capa acuosa. La serie de etapas enumerada en este párrafo se menciona, a partir de ahora, como "extracción con fenol").

Después se realiza la precipitación con etanol sobre la capa acuosa recuperada. Como se usa y menciona en este documento "precipitación con etanol" consta de añadir, con mezcla, una décima parte del volumen a acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol al 100% a la solución a tratar, y congelar la mezcla usando hielo seco. La mezcla resultante después se centrifuga a 10.000 X g para recuperar el ADN en forma de precipitado.

Después de la extracción con fenol y la precipitación con etanol, el precipitado de ADN resultante se seca al vacío, se disuelve en un mínimo de agua redestilada, y se separa por electroforesis en gel de agarosa al 3%. Después de la electroforesis, el gel se tiñe con una solución acuosa a 1 µg/ml de bromuro de etidio para permitir la detección de ADN en luz UV. La banda de ADN correspondiente al ADN de TRA-8 humanizado se corta usando una hoja de afeitar y se eluye del gel usando el kit Geneclean Spin (BIO 101, CA, EEUU). Después de la extracción con fenol, el ADN eluido entonces se concentra por centrifugación a 7.500 X g, seguido de precipitación con etanol, y finalmente se disuelve en 5 µl de agua destilada.

Cada ADN extraído resultante se clona usando el vector pGEM-T Easy (Promega) del siguiente modo:

el fragmento de ADN recuperado de la reacción de PCR, 5 µl;

tampón de Taq polimerasa 10 X, 1 µl;

mezcla de dNTP, 1 μ l;

Taq polimerasa (5 unidades/ml), 1 μ l; y

agua redestilada hasta un volumen final de 10 μ l.

Después de que la solución anterior haya reaccionado a
5 70°C durante 30 minutos, se liga cada solución de ADN y el
vector pGEM-T Easy usando un kit de ligamiento de ADN Versión
2.0 (Takara Shuzo Co., Ltd.) usando el protocolo del
fabricante.

Después de 4 horas de incubación a 15°C, se mezclan 2 μ l
10 de la solución de reacción incubada con 100 μ l de la cepa
JM109 de *E. coli* competente a una densidad celular de $1-2 \times 10^9$
células/ml (Takara Shuzo Co., Ltd.), y la mezcla se
mantiene en hielo durante 30 minutos, después a 42°C durante
30 segundos, y de nuevo en hielo durante 1 minuto. Después,
15 se añaden 500 μ l de medio SOC (tristona al 2% v/v, extracto
de levadura al 0,5% p/v, cloruro sódico al 0,05% p/v, cloruro
potásico 2,5 mM p/v, cloruro de magnesio 1 mM, y glucosa 20
mM) a la mezcla, que se incuba durante una hora adicional,
con agitación. Después se aíslan las cepas transformantes, y
20 se prepara el ADN plasmídico a partir de estas cepas como se
describe en "Molecular Cloning A Laboratory Manual". Las
secuencias de nucleótidos de estos ADN que codifican la
cadena pesada de TRA-8 humanizado se confirman por el método
didesoxi (Sanger, F. S., et al., (1977), Proc. Natl. Acad.
25 Sci. USA, 74:5463-5467) usando el analizador de ADN 3700 (AM
PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems, Japón).

Los plásmidos resultantes se denominan pHB14 (el
plásmido que lleva el ADNc que codifica la cadena pesada de
TRA-8 humanizado). La cepa transformante de *E. coli* que
30 alberga este plásmido, denominada *E. coli* JM109/pHB14 se
depositó en 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 el 20 de abril de 2001, de acuerdo con el Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos, y se correspondió con el número de acceso FERM BP-7556.

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

Los vectores de expresión recombinantes para células animales se construyen insertando el ADN que codifica la
10 cadena pesada de TRA-8 humanizado (clonado como anteriormente) del siguiente modo.

Se digiere un μg de plásmido pSRHHH3 (solicitud de patente europea EP 0-909-816-A1) que lleva la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humanizado anti-
15 Fas HFE7A y el ADN genómico de la región constante de IgG1 humana, un vector de expresión para células de mamífero, con las enzimas de restricción HindIII y ApaI, y se separa por electroforesis en gel de agarosa al 3%. Después de la electroforesis, el gel se tiñe con una solución acuosa a 1
20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio para permitir la detección de ADN en luz UV. Las bandas de ADN del vector que contienen el ADN genómico de la región constante de IgG1 humana sin la región variable de cadena pesada de HFE7A humanizado se cortan usando una hoja de afeitar y se eluyen del gel usando el kit
25 Geneclean Spin (BIO 101, CA, EEUU). Después de extracción con fenol, el ADN eluido entonces se concentra por centrifugación a 7.500 X g, seguido de precipitación con etanol, y finalmente se disuelve en 5 μl de agua destilada y después se desfosforila usando CIP. El plásmido digerido y
30 desfosforilado resultante (100 ng) se liga con 1 μg del fragmento de ADN de pHb14 que contiene el ADN que codifica la región variable de cadena pesada de TRA-8 humanizado, que

también se había digerido con HindIII y ApaI, usando un kit de ligamiento de ADN Versión 2.0 (Takara Shuzo Co., Ltd.). La mezcla de ligamiento después se usa para transformar E. coli JM109, que después se siembra en placas de agar LB que
5 contienen 50 µg/ml de ampicilina.

Los transformantes obtenidos por este método se cultivan en 2 ml de medio LB líquido que contiene 50 µg/ml de ampicilina a 37°C durante una noche, y posteriormente el ADN plasmídico se extrae del cultivo resultante por el método
10 alcalino-SDS.

El ADN plasmídico extraído se digiere con HindIII y ApaI, y se somete a electroforesis en gel de agarosa al 3% p/v para confirmar la presencia o ausencia del inserto de ADN que codifica la región variable de cadena pesada de TRA-8
15 humanizado. La inserción y orientación del fragmento de ADN deseado en el vector se confirma por secuenciación de ADN usando un analizador de secuencia génica (analizador de ADN ABI Prism 3700; Applied Biosystems). El plásmido de expresión resultante que lleva el ADNc que codifica la cadena pesada de
20 TRA-8 humanizado se denomina pHB14-1.

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

(1) Construcción de vectores para las cadenas ligeras de 25 versiones humanizadas del anticuerpo TRA-8

Como se muestra en la SEC ID N° 46 de la lista de secuencias, en la humanización de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo de ratón anti-DR5 humano TRA-8, se remplace el 8° aminoácido (histidina), el 9°
30 aminoácido (lisina), el 10° aminoácido (fenilalanina), el 11° aminoácido (metionina), el 13° aminoácido (treonina), el 20° aminoácido (serina), el 42° aminoácido (glutamina), el 43°

(serina), el 60° aminoácido (ácido aspártico), el 63° aminoácido (treonina), el 77° aminoácido (asparagina), el 78° aminoácido (valina), el 80° aminoácido (serina), el 83° aminoácido (leucina), el 85° aminoácido (ácido aspártico), el
 5 87° aminoácido (fenilalanina) y el 99° aminoácido (glicina), el 103° aminoácido (leucina) y el 108° aminoácido (alanina) desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de TRA-8 con prolina, serina, serina, leucina, alanina, treonina, lisina, alanina, serina, serina,
 10 serina, leucina, prolina, fenilalanina, treonina, tirosina, glutamina, valina y treonina respectivamente. La secuencia resultante se denomina LM2.

Los plásmidos de expresión que llevan este tipo de secuencias de aminoácidos de cadena ligera humanizada del
 15 anticuerpo anti-DR5 humano TRA-8 se construyen del siguiente modo.

1) Síntesis de cebadores para preparar las regiones variable y constante de la cadena ligera de TRA-8 humanizado

Los ADN que codifican la cadena polipeptídica LM2 (SEC
 20 ID N° 46 de la lista de secuencias), cada uno de los cuales es una fusión de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-DR5 humanizado TRA-8 y la región constante de la cadena ligera (cadena κ) de Ig humana, se sintetizan respectivamente usando combinaciones de PCR.

25 Además de 7AL1P (SEC ID N° 47) y 7ALCN (SEC ID N° 48), se sintetizan los siguientes cebadores oligonucleotídicos para PCR:

5'- gtcccccaca gatgcagaca aagaacttgg agattggggtc atcacaatgt
 caccagtggg -3' (HKSPR11; SEC ID N° 49);
 30 5'- ccaagttctt tgtctgcatc agtaggagac agggtcacca tcacctgc -3'
 (HKCDF11; SEC ID N° 50);
 5'- agtgtgccgg gtggatgccc agtaaatacag tagtttagga gctttccctg

gtttctg -3' (HKCDR12; SEC ID N° 51);

5'- tgggcatcca cccggcacac tgggggtccca agcaggttta gtggcagt -3'
(HKCDF22; SEC ID N° 52);

5'- ataactacta tattgctgac agtaataggt tgcaaaatcc tccggctgca
5 gactagagat ggt -3' (HKCDR22; SEC ID N° 53); y

5'- cagcaatata gcagctatcg gacgttcggt caaggcacca aggtggaaat
caaacggact gtg -3' (HKCF12; SEC ID N° 54).

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

10 El fragmento de ADN LM2 definido en la SEC ID N° 55 de la lista de secuencias que codifica la secuencia de aminoácidos definida en la SEC ID N° 46 de la misma se prepara realizando PCR de dos etapas, se inserta en un vector plasmídico y se clona en *E. coli*.

15 a) PCR de primera etapa

El fragmento de ADN LM2-F1 que codifica una secuencia señal de secreción y una parte de la región FRL₁ con un sitio de escisión por la enzima de restricción HindIII añadida en el extremo 5' se prepara en las siguientes condiciones. Los
20 plásmidos molde, pHSGHM17 y pSRPDHH, se obtienen siguiendo la descripción de la solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1. Composición de la solución de reacción:

ADN del plásmido pHSGHM17 (solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1), 25 ng

25 oligonucleótido cebador 7AL1P, 50 pmol
oligonucleótido cebador HKSPR11, 50 pmol
solución de dNTP, 5 µl
tampón de PCR 10x, 5 µl

ADN polimerasa ampliTaQ (PerkinElmer), 2,5 unidades

30 La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl añadiendo agua redestilada y se usa en PCR.

Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

El fragmento de ADN LM2-F2 que codifica una parte de FRL₁, CDRL₁, FRL₂, y CDRL₂ se prepara en las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

- 10 ADN del plásmido pL28, 25 ng
- oligonucleótido cebador HKCDF11, 50 pmol
- oligonucleótido cebador HKCDR12, 50 pmol
- cóctel de dNTP, 5 µl
- tampón de PCR 10x, 5 µl

- 15 ADN polimerasa ampliTa^q, 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl añadiendo agua redestilada y se usa en PCR.

- 20 Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

- 25 El fragmento de ADN LM2-F3 que codifica CDRL₂, FRL₃, y una parte de CDRL₃ se prepara en las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

- ADN del plásmido pSRPDHH (solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1), 25 ng
- oligonucleótido cebador HKCDF22, 50 pmol
- 30 oligonucleótido cebador HKCDR22, 50 pmol
- cóctel de dNTP, 5 µl
- tampón de PCR 10x, 5 µl

ADN polimerasa ampliTa_q, 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl añadiendo agua redestilada y se usa en PCR.

5 Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

10 El fragmento de ADN LM2-F4 que codifica CDRL₃, FRL₄ y la región constante con un sitio de escisión de la enzima de restricción EcoRI añadido en el extremo 3' se prepara en las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

15 ADN del plásmido pSRPDHH, 25 ng
 oligonucleótido cebador HKCF12, 50 pmol
 oligonucleótido cebador 7ALCN, 50 pmol
 cóctel de dNTP, 5 µl
 tampón de PCR 10x, 5 µl

20 ADN polimerasa ampliTa_q, 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl añadiendo agua redestilada y se usa en PCR.

25 Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

30 Los fragmentos de ADN amplificados después de PCR se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%. El gel después de la electroforesis se tiñe con 1 µg/ml de bromuro de etidio para detectar el ADN producido en luz UV.

Las bandas respectivas de ADN detectadas de este modo se escinden con una hoja de afeitar.

b) PCR de segunda etapa

El ADN LM2 en el que están fusionados los fragmentos de
5 ADN LM2-F1, LM2-F2, LM2-F3 y LM2-F4 descritos anteriormente se prepara en las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

fragmento de gel del ADN LM2-F1 preparado en la PCR de primera etapa,
10 fragmento de gel del ADN LM2-F2 preparado en la PCR de primera etapa,
fragmento de gel del ADN LM2-F3 preparado en la PCR de primera etapa,
fragmento de gel del ADN LM2-F4 preparado en la PCR de
15 primera etapa
oligonucleótido cebador 7AL1P, 50 pmol
oligonucleótido cebador 7ALCN, 50 pmol
cóctel de dNTP, 5,0 µl
tampón de PCR 10x, 5,0 µl
20 ADN polimerasa ampliTa_q, 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl añadiendo agua redestilada y se usa en PCR.

Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C
25 durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

El fragmento de ADN LM2 preparado de este modo se
30 inserta en el plásmido pCR3.1DNA usando el kit de clonación Eukaryotic TA (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante y se introduce en *E. coli* TOP10F' competente

contenida en el kit. Las secuencias de nucleótidos de estos ADN que codifican la cadena ligera de TRA-8 humanizado se confirman por el método dideoxi (Sanger, F. S., et al., (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467) usando el
5 analizador de ADN 3700 (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems, Japón).

Los plásmidos resultantes se denominan pCR3.1/M2-1 (el plásmido que lleva el ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de TRA-8 humanizado y una región constante de
10 cadena ligera de Ig humana).

El plásmido obtenido pCR3.1/M2-1 que contienen el fragmento de ADN LM2 se digiere con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

Se digiere un μg del ADN del plásmido de clonación
15 pHSG399 con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y después se desfosforila con CIP. El ADN de pHSG399 desfosforilado resultante y el fragmento de ADN LM2, que se han digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, se ligan usando el kit de ligamiento de ADN Versión 2.0
20 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Después, *E. coli* DH5 α se transforma con el ADN ligado y se extiende en medio de agar LB que contiene IPTG 0,1 mM, X-Gal al 0,1% y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloranfenicol (concentraciones finales). Los transformantes blancos obtenidos se cultivan en medio LB líquido que
25 contiene 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloranfenicol, y se extrae el ADN plasmídico del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS. El ADN plasmídico extraído se digiere con Hind III y EcoR I, y después se selecciona un clon que lleva el fragmento de ADN LM2 por electroforesis en gel de agarosa al
30 1%.

Como resultado del procedimiento anterior, se obtiene el plásmido pHSG/M2-1-4 que lleva un fragmento de fusión de la

región variable de la cadena ligera de TRA-8 LM2 humanizado y la región constante de la cadena Igκ humana. La cepa de *E. coli* transformante que alberga este plásmido, denominada *E. coli* DH5α/pHSG7M2-1-4 se depositó en el International Patent
5 Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japón el 20 de abril de 2001, de acuerdo con el Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos, y se correspondió con el número de acceso
10 FERM BP-7563.

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

El plásmido pHSG/M2-1-4 obtenido que lleva un fragmento de fusión de la región variable de la cadena ligera de TRA-8
15 LM2 humanizado y la región constante de la cadena Igκ humana se digiere con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

Se digiere un µg del ADN del plásmido de clonación pSRPDHH (solicitud de patente europea EP 0-909-816-A1) con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y después se
20 desfosforila con CIP. El ADN de pSRPDHH desfosforilado resultante y el fragmento de ADN HindIII-EcoRI obtenido de pHSG/M2-1-4 se ligan usando el kit de ligamiento de ADN Versión 2.0 (Talcara Syuzo, Co. Ltd.). Después, se transforma
25 *E. coli* DH5α con el ADN ligado y se extiende en agar LB. Los transformantes obtenidos se cultivan en medio LB líquido que contiene 100 µg/ml de ampicilina, y se extrae el ADN plasmídico del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS. La inserción y orientación del fragmento de ADN deseado en el vector pSRPDHH se confirma por secuenciación de
30 ADN usando un analizador de secuencia génica (analizador de ADN ABI Prism 3700; Applied Biosystems).

El plásmido de expresión resultante que lleva el ADNc

que codifica la cadena ligera de TRA-8 humanizado se denomina pSR/M2-1.

Ejemplo 20. Producción de anticuerpo humanizado

5 La transfección de células COS-7, es decir, una línea celular derivada de riñón de mono, con los plásmidos de expresión para la cadena pesada de TRA-8 humanizado y la cadena ligera de TRA-8 humanizado obtenidos anteriormente se realiza por métodos con reactivo de transfección FUGENE6
10 (Boehringer Mannheim Biochemica) de acuerdo con el manual de instrucciones proporcionado con el kit.

 Se cultivan células COS-7 (American Type Culture Collection N° CRL-1651) hasta semi-confluentes (3×10^6 células/placa) en una placa de cultivo (área de cultivo: 57
15 cm²; Sumitomo Bakelite) que contiene medio de Eagle modificado por Dulbecco (a partir de ahora mencionado como "D-MED"; Gibco BRL) suplementado con suero de ternera fetal al (a partir de ahora abreviado como "FCS"; Moregate).

 Mientras tanto, se mezclan 10 µg/placa (5 placas en
20 total) del ADN del plásmido de expresión de la cadena pesada humanizada contra DR5 (pHA15-1) y 10 µg/placa del ADN del plásmido de expresión de la cadena ligera humanizada contra DR5 preparado por el método alcalino-SDS y centrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio, y después se
25 precipitan con etanol, seguido de suspensión en 5 µl/placa de dH₂O.

 Después de mezclar 15 µl/placa de reactivo de transfección FUGENE6 con 180 µl/placa de D-MEM sin FCS, esta solución de FUGENE (185 µl/placa) se mezcla con 5 µl/placa de
30 solución de ADN que contiene 10 µg/placa del ADN del plásmido de expresión de la cadena pesada humanizada contra DR5 y 10 µg/placa del ADN del plásmido de expresión de la cadena

ligera humanizada contra DR5. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, la suspensión plasmídica obtenida (200 µl) se añade a las placas COS-7 preparadas previamente. Después de incubar en CO₂ al 5% a 37°C durante 5 24 horas, se cambia el medio de cultivo con D-MEM sin FCS. Después de incubar en CO₂ al 5% a 37°C durante 72 horas, se recupera el sobrenadante de cultivo para purificar los productos de expresión en los fluidos sobrenadantes. Por el método que se ha descrito anteriormente, las células COS-7 se 10 transfectan con cada una de las siguientes combinaciones plasmídicas:

(A): sin ADN plasmídico

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

El cultivo después se centrifuga (1.000 r.p.m., 5 15 minutos) y se recoge el sobrenadante. El sobrenadante se centrifuga de nuevo (9.800 r.p.m., 15 minutos) y se filtra con un filtro de 0,45 µm (ADVANTEC TOYO DISMIC-25cs, n° cat. 25CS045 AS). La purificación de IgG a partir de los filtrados se consigue usando cromatografía de afinidad en Proteína G- 20 POROS (Applied Biosystems) en las siguientes condiciones:

HPLC: BioCAD 700E (Applied Biosystems)

columna: cartucho de Proteína G-ID sensor (tamaño de columna: 2,1 mm ID x 30 mm LD, volumen de lecho: 0,1 ml; n° cat. 2-1002-00, Applied Biosystems)

25 tampón de elución: Glicina-HCl 0,1 M (pH 2,5)

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

detección: 280 nm

caudal: 1 ml/min

tamaño de fracción: 0,5 ml/0,5 min

30 tubo de fracción: microtubo de polipropileno de 1,5 ml

temperatura: 4°C

Después de aplicar todos los filtrados a la columna, se

- usan 30 ml de PBS (Sigma, n° cat. 1000-3) para lavar la columna. Cuando se aplica el tampón de elución, comienza la recogida de fracciones. Cada microtubo de fracción contenía previamente 55 μ l de NaCl 1 M, 110 μ l de tampón de neutralización y 74 μ l de albúmina sérica bovina a 2 mg/ml (Sigma, n° cat. A-7030) en PBS. Las fracciones N° 8 a N° 10 se recogen y se dializan frente a 1 litro de PBS (pH 7,5) a 4°C durante 1 día usando el Slide-A lyzer (Pierce, n° cat. 66450). El tampón de diálisis se cambia dos veces.
- 10 La verificación de la expresión de los anticuerpos humanizados y el ensayo cuantitativo de los productos de expresión en los fluidos del sobrenadante de cultivo preparados se realiza por ELISA con un anticuerpo anti-IgG humana.
- 15 A cada pocillo de una placa de 96 pocillos (MaxiSorp, Nunc), se añaden 100 μ l de anticuerpo policlonal de cabra anti-Fc de IgG humana específico (Kappel) disuelto a la concentración final de 0,5 μ g/ml en tampón de adsorción (hidrogenocarbonato sódico 0,05 M, azida sódica al 0,02%, pH 9,6) y la placa se incuba a 37°C durante 2 horas para causar la adsorción del anticuerpo. Después, la placa se lava con 350 μ l de PBS(-) que contiene Tween-20 al 0,05% (BioRad) (a partir de ahora mencionado como "PBS-T") cinco veces. A los pocillos después del lavado, se añade sobrenadante de cultivo diluido con D-MEM que contiene FCS al 10% y se incuba a 37°C durante 2 horas. Después de lavar de nuevo con PBS-T, se añaden 100 μ l de anticuerpo policlonal de cabra anti-Fc de IgG humana específico marcado con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research Lab.) diluido 10.000 veces con PBS-T a cada pocillo y se incuba a 37°C durante 2 horas. Después de lavar de nuevo con PBS-T, se añade una solución de sustrato de fosfato de p-nitrofenilo obtenida del kit de sustrato de
- 20
- 25
- 30

fosfatasa alcalina (Bio Rad) de acuerdo con el manual de instrucciones proporcionado con el kit. Después de incubar a 37°C durante 0,5 a 1 hora, se mide la absorbancia a 405 nm. En los presentes experimentos, se usa inmunoglobulina G plasmática humana subclase 1 (IgG1) (Biopure AG) diluida con D-MEM que contiene FCS al 10% para ciertas concentraciones como muestras de referencia de concentración de los anticuerpos humanizados contra DR5 contenidos en los fluidos de sobrenadante de cultivo.

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

15 **Ejemplo 21. Actividad inductora de la apoptosis del anticuerpo humanizado**

Se usan células Jurkat (ATCC N° TIB-152) para examinar la actividad inductora de la apoptosis del anticuerpo TRA-8 humanizado purificado.

20 Se distribuyen células Jurkat cultivadas en medio RPMI1640 con FCS al 10% (Gibco BRL) a 37°C durante 3 días en presencia de CO₂ al 5% en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos (Sumitomo Bakelite) a 50 µl por pocillo. El TRA-8 humanizado preparado en el Ejemplo 20 se ajusta para que
25 tenga la concentración del producto final de interés de 100 ng/ml con medio RPMI1640 que contiene FCS al 10% estimando 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 ajustada de este modo a 100 ng/ml se
30 usa para producir diluciones en serie repitiendo la dilución seriada de factor 2 con RPMI 1640 que contiene FCS al 10%. Cada una de las soluciones de TRA-8 humanizado diluido se

añade a cada pocillo a 50 µl por pocillo. Después de reaccionar a 37°C durante 12 horas, se añaden 50 µl de PMS 25 µM (metosulfato de fenazina; Sigma Chemical Co.) que contiene 1 mg/ml de XTT (sal interna de 2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tefrazolio-5-carboxamida; Sigma Chemical Co.)
 5 (concentraciones finales de 250 µg/ml para XTT y 5 µM para PMS). Después de incubar durante 3 horas, se mide la absorbancia a 450 nm de cada pocillo para calcular la viabilidad celular usando la capacidad de reducción de las
 10 mitocondrias como índice.

La viabilidad de las células en cada pocillo se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

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

en la que "a" es la medición de un pocillo de ensayo, "b" es
 15 la medición de un pocillo sin células, y "c" es la medición de un pocillo sin anticuerpo añadido.

Como resultado, se demuestra que el producto de expresión preparado en el Ejemplo 20 (TRA-8 humanizado) induce la apoptosis en células de la línea celular de linfoma
 20 T que expresa el antígeno DR5 humano.

Ejemplo 22. Reactividad de TRA-8 con diversas moléculas DR5

Para determinar la reactividad de TRA-8 con diversas moléculas DR5, se examina la reactividad de TRA-8 usando
 25 linfocitos activados del siguiente modo.

Primero, se toman muestras de sangre periférica de un ser humano (30 ml), un mono tití (3 ml), y un mono cynomolgus (20 ml). Las muestras sanguíneas tenían 1 ml de heparina (Novoheparin; Novo) añadido a las mismas y las muestras
 30 después se estratifican lentamente sobre un volumen igual de solución Ficoll-Paque PLUS ((Amersham Pharmacia Biotech.) gravedad específica: 1,077 para todos excepto mono

cynomolgus, que tenía una gravedad específica de 1,072) y se centrifugan a 1.700 r.p.m. durante 30 minutos para obtener una fracción de células mononucleares de sangre periférica. Esta fracción celular mononuclear se lava dos veces con
5 solución salina equilibrada de Hank y después se suspende en medio RPMI 1640 con FCS al 10% v/v a una densidad celular de 1×10^6 células/ml. Se añade fitohemaglutinina-P (PHA-P, Sigma Chemicals, Co.) a la suspensión resultante a una concentración final de 5 $\mu\text{g/ml}$ y la muestra se incuba a 37°C
10 en CO₂ al 5% v/v durante 24 horas. Después de este tiempo, se recuperan las células por centrifugación, se lavan y se resuspenden en medio RPMI 1640 que contiene FCS al 10% v/v. Después, para activar las células recuperadas, se añade interleuquina-2 (Amersham Pharmacia Biotech.) a la suspensión
15 a una concentración final de 10 unidades/ml, y ésta se incuba a 37°C en CO₂ al 5% v/v durante 72 horas.

Una cantidad de la preparación activada que se ha calculado que contiene 1×10^6 células linfocíticas activadas se coloca en un tubo de ensayo y se suspende en 50 μl de TRA-
20 8 a 0,5, 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ en PBS o 50 μl de PBS solo. La suspensión resultante se deja reposar en hielo durante 1 hora, después de lo cual las células se lavan 3 veces con alícuotas de 500 μl de PBS y después se suspenden en 50 μl de anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con FITC a 20 $\mu\text{g/ml}$
25 (Bioresource) en PBS. Usando las células suspendidas en 500 μl de PBS como controles, se miden las intensidades de fluorescencia, usando un citómetro de flujo (FACSCalibur; Becton Dickinson).

Se obtienen las distribuciones de las cantidades de
30 células por intensidad de fluorescencia y se calculan las proporciones de las cantidades de células teñidas a aquellas de células totales. Además, cada valor de Kd se calcula

usando la concentración de TRA-8 y las proporciones de las cantidades de células teñidas a aquellas de células totales. Cada frecuencia de reactividad con los linfocitos activados de ser humano, mono tití, y mono cynomolgus se casi igual.
5 Por consiguiente, TRA-8 es capaz de unirse a un amplio intervalo de DR5 de primates incluyendo ser humano contra el que se preparó originalmente TRA-8.

Ejemplo 23. Estudio de aumento de dosis de TRA-8 en monos tití
10

Se realiza un estudio de toxicidad preliminar de aumento de dosis de TRA-8 usando 1 mono tití macho y 1 mono tití hembra. Se realizan tres series de dosificaciones intravenosas únicas, que se separan por un periodo de retirada de 7 días. La dosis de TRA-8 se establece a 50, 250 y 1250 µg/cuerpo. Cuarenta y ocho horas después de cada tratamiento, se recoge sangre de la vena femoral y se prepara el plasma. Se miden las actividades plasmáticas aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa usando un
15 analizador (FUJI DRI-CHEM: Fuji Film Medical Co., Ltd.). Toda la sangre se toma sin anestesia. Como resultado, no se observan evidencias que indiquen lesión hepática en el examen bioquímico en plasma después de cada tratamiento.

Ejemplo 24. Estudios farmacológicos *in vitro* e *in vivo* de TRA-8 contra células cancerosas
25

Para determinar si TRA-8 tiene eficacia terapéutica en terapia anti-cáncer, se examina la actividad de eliminación *in vitro* de TRA-8 usando diversas líneas celulares cancerosas del siguiente modo.
30

Se distribuyen diversas células cancerosas ($2-8 \times 10^3$ células/50 µl) cultivadas en medio RPMI1640 (para Jurkat),

medio DMEM (para HCT-116), MEM-R (para WiDr), o DMEM-F12 (para COL2-Jck) obtenidas de Gibco BRL con FCS al 10% (Gibco BRL) a 37°C en presencia de CO₂ al 5% en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos (Sumitomo Bakelite). TRA-8 se
5 ajusta para que tenga la concentración del producto final de interés de 100 ng/ml con medio que contiene FCS al 10%. La solución de TRA-8 (100 ng/ml) se usa para producir diluciones en serie repitiendo la dilución seriada de factor 2 con medio que contiene FCS al 10%. Cada solución de TRA-8 diluida se
10 añade a cada pocillo a 50 µl por pocillo y se incuba a 37°C. Después de reaccionar a 37°C durante 72 horas, se añaden 50 µl de PMS 25 µM (metosulfato de fenazina; Sigma Chemical Co.) que contiene 1 mg/ml de XTT (concentraciones finales de 250 µg/ml para XTT y 5 µM para PMS). Después de incubar durante 3
15 horas, se mide la absorbancia a 450 nm de cada pocillo para calcular la viabilidad celular usando la capacidad de reducción de las mitocondrias como índice.

La viabilidad de las células en cada pocillo se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$20 \quad \text{Viabilidad (\%)} = 100 \times (a-b) / (c-b)$$

en la que "a" es la medición de un pocillo de ensayo, "b" es la medición de un pocillo sin células, y "c" es la medición de un pocillo sin anticuerpo añadido.

Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3

5

10

Células	ED50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Jurkat	0,001 - 0,01
HCT-116	0,004 - 0,02
WiDr	0,007 - 0,03
COL2-Jck	2,28

Diversas líneas celulares cancerosas tienen apoptosis
15 fuertemente inducida por TRA-8 en las condiciones *in vitro*.

Además, se determina el efecto anti-tumoral *in vivo* de
TRA-8 en ratones desnudos con células WiDr transplantadas,
porque TRA-8 no tiene reactividad cruzada con DR5 murino.

Se administra anticuerpo anti-DR5 humano TRA-8 a ratones
20 desnudos que albergan xenoinjertos humanos que expresan la
molécula DR5 humana. Los ratones usados eran ratones BALb/c
nude/nude de 6 semanas de edad (hembra, de Clea Japan Inc.),
a los que se les había transplantado líneas celulares de
cáncer de colon humano WiDr (5 mm^3). Un día después del
25 trasplante del tumor, estos ratones con trasplante se
tratan diariamente con la inyección intra-articular de TRA-8
($5\text{ }\mu\text{g}/\text{cuerpo}$) hasta 14 veces. Se determina diariamente el
crecimiento del tumor WiDr por el tamaño de la masa tumoral.
Los resultados se muestran en la siguiente

Tabla 4.

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

5 10 En este modelo, mientras que todos los animales no tratados mostraron crecimiento tumor visible, el crecimiento tumoral en los animales tratados con TRA-8 está inhibido como se demuestra por el tamaño del tumor. Este resultado indicó que TRA-8 es eficaz en la eliminación de células tumorales *in vivo*.
15

Ejemplo 25. Estudio de combinación de TRA-8

La línea celular de cáncer de próstata humano PC-3 se obtiene de la American Tissue Culture Collection (ATCC) y se
20 mantiene en mezcla nutriente F-12K (21127-022, Gibco BRL) que contiene suero bovino fetal al 10% (FBS, Hyclone), L-glutamina-200 mM al 1% (25030-149, Gibco BRL) y solución de penicilina y estreptomicina al 0,5% (P-7539, Sigma). Se usa medio RPMI1640 (MED-008, IWAKI) suplementado con FBS al 10% y
25 solución de penicilina y estreptomicina al 0,5% en el siguiente experimento. Se recogen células PC-3 en crecimiento exponencial por tratamiento con tripsina y se lavan dos veces con medio fresco. Las células después se cuentan, se resuspenden en medio fresco a una densidad de 5×10^4
30 células/ml y se distribuyen por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo plano (3598, Corning-Coster) en un volumen total de 100 μ l/pocillo un día antes del inicio del

experimento. Se diluye un fármaco anti-cáncer representativo, Paclitaxel (169-18611, Wako) disuelto en dimetilsulfóxido (10 mg/ml) en medio fresco y después se añade a las placas de 96 pocillos que contienen las células a 50 µl/pocillo. Las concentraciones finales de dimetilsulfóxido son menores del 0,1%. Después de incubación durante 24 h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, se añade TRA-8 diluido en medio fresco a los pocillos. Después de incubación durante 24 h adicionales, se añaden 50 µl de medio esencial mínimo (11095-098, Gibco BRL) que contiene 1 mg/ml de XTT y PMS 25 mM a los pocillos y se incuban las placas durante 6 h. Después se mide la OD450 por SPECTRA MAX 250 (Molecular Devices) y se calcula la viabilidad celular del siguiente modo.

Viabilidad celular (%) = $\frac{(\text{OD450 para el pocillo que contiene células tratadas con Taxol y/o TRA-8 (agente(s))} - \text{OD450 para el pocillo que no contiene ni células ni agente}) \times 100}{(\text{OD450 para el pocillo que contiene células sin agente} - \text{OD450 para el pocillo que no contiene ni células ni agente})}$

El resultado del ensayo anterior para TRA-8 combinado con un fármaco anti-cáncer representativo, Paclitaxel, es el siguiente. Paclitaxel reducía la viabilidad celular de células PC-3 pero aún permanecía más del 40% de las señales que indican células cancerosas viables a concentraciones de hasta 200 nM. Notablemente, la adición de 0,1 ng/ml de TRA-8 disminuía enormemente la viabilidad celular de las células cancerosas, hasta el 10%, aunque no se observa reducción en la viabilidad celular después de una aplicación única de TRA-8 a esta concentración. Este resultado indica claramente que TRA-8 mostraba actividad anti-cáncer de forma sinérgica cuando se combina con otros fármacos anti-cáncer.

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

(1) Diseño de anticuerpos humanizados

La construcción de una versión humanizada de de TRA-8 se realiza por el método generalmente conocido como injerto de CDR. Se usa el anticuerpo mAB58'CL como aceptor como se describe en el Ejemplo de Referencia 2 y se injertan las regiones CDR del anticuerpo TRA-8 en el aceptor. En la región flanqueante, se injertan algunos aminoácidos en el aceptor a partir de secuencias de TRA-8 o secuencias consenso humanas por los criterios dados por Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033, (1989)) y se construyen secuencias de TRA-8 humanizado como se describe a continuación en este documento.

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

Como se muestra en la SEC ID N° 56 de la lista de secuencias, la humanización tipo H1 de las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo de ratón anti-DR5 humano TRA-8 conllevaba remplazar el 3° aminoácido (metionina), el 13° aminoácido (lisina), el 19° aminoácido (lisina), el 40° aminoácido (treonina), el 42° aminoácido (ácido glutámico), el 44° aminoácido (arginina), el 84° aminoácido (serina), el 88° aminoácido (serina), el 93° aminoácido (metionina), el 114° aminoácido (treonina), el 115° aminoácido (leucina) con glutamina, glutamina, arginina, alanina, glicina, glicina, asparagina, alanina, valina, leucina, y valina, respectivamente.

Como se muestra en la SEC ID N° 59 de la lista de secuencias, la humanización de tipo H3 de las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo de ratón anti-DR5 humano TRA-8 conllevaba remplazar el 13° aminoácido

(lisina), el 19° aminoácido (lisina), el 40° aminoácido (treonina), el 42° aminoácido (ácido glutámico), el 44° aminoácido (arginina), el 88° aminoácido (serina), el 93° aminoácido (metionina), el 114° aminoácido (treonina), el
 5 115° aminoácido (leucina) con glutamina, arginina, alanina, glicina, glicina, alanina, valina, leucina, y valina, respectivamente.

Como se muestra en la SEC ID N° 60 de la lista de secuencias, la humanización de tipo H4 de las secuencias de
 10 aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo de ratón anti-DR5 humano TRA-8 conllevaba remplazar el 13° aminoácido (lisina), el 19° aminoácido (lisina), el 88° aminoácido (serina), el 93° aminoácido (metionina), el 114° aminoácido (treonina), el 115° aminoácido (leucina) con glutamina,
 15 arginina, alanina, valina, leucina, y valina, respectivamente.

Como se muestra en la SEC ID N° 61 de la lista de secuencias, el plásmido que lleva el ADN de la región variable de cadena pesada de TRA-8 quimérico se denomina
 20 "tipo M". Además, el TRA-8 humanizado descrito en el Ejemplo 17 y 18 se denomina "tipo H2".

Los plásmidos que llevan el ADN que codifica la región variable de cadena pesada de TRA-8 humanizado o quimérico se construyen del siguiente modo.

25 Se usa PCR para construir las siguientes secuencias de ADN, cada una de las cuales compuesta como se ha descrito anteriormente:

Se sintetizan los siguientes 24 oligonucleótidos:

5'- ttggataagc ttggcttgac ctcacatgg gatggagctg tatcatcctc
 30 ttcttggttag caacagctac aggtgtccac -3' (A; SEC ID N° 32);

5'- tctgaagtaa tgctggtgga gtctggggga ggcttagtac agcctggagg
 gtccctgaga ctctcctgtg cagcctctgg -3' (B; SEC ID N° 33);

5'- tctgaagtac agctggtgga gtctggggga ggcttagtac agcctggagg

gtccctgaga ctctcctgtg cagcctctgg -3' (B2; SEC ID N° 57);
 5'- tctgaagtaa tgctggtgga gtctggggga ggcttagtaa agcctggagg
 gtccctgaaa ctctcctgtg cagcctctgg -3' (B3; SEC ID N° 66);
 5'- attcactttc agtagttatg taatgtcttg ggttcggcag gcaccaggga
 5 agggctctgga gtgggttgca accattagta -3' (C; SEC ID N° 34);
 5'- attcactttc agtagttatg taatgtcttg ggttcggcag actccagaga
 agaggctgga gtgggttgca accattagta -3' (C2; SEC ID N° 64);
 5'- gtggtggtag ttacacctac tatccagaca gtgtgaaggg ccgattcacc
 atctccagag acaatgcaa gaacaccctg -3' (D; SEC ID N° 35);
 10 5'- tatctgcaaa tgaacagtct gagagcagag gacacggctg tttattactg
 tgcaagaagg ggtgactcta tgattacgac -3' (E; SEC ID N° 36);
 5'- tatctgcaaa tgagcagtct gagagcagag gacacggctg tttattactg
 tgcaagaagg ggtgactcta tgattacgac -3' (E2; SEC ID N° 62);
 5'- tatctgcaaa tgagcagtct gagatctgag gacacggcta tgtattactg
 15 tgcaagaagg ggtgactcta tgattacgac -3' (E3; SEC ID N° 67);
 5'- ggactactgg ggccaaggga ccctgggtcac agtctcctca gcctccacc
 aagggcccat cggtc -3' (F; SEC ID N° 37);
 5'- ggactactgg ggccaaggga ccactctcac agtctcctca gcctccacc
 aagggcccat cggtc -3' (F2; SEC ID N° 68);
 20 5'- ctaccaagaa gaggatgata cagctccatc ccatggtgag gtcaagccaa
 gcttatccaa -3' (G; SEC ID N° 38);
 5'- tctcaggga cctccaggct gtactaagcc tccccagac tccaccagca
 ttacttcaga gtggacacct gtagctggtg -3' (H; SEC ID N° 39);
 5'- tctcaggga cctccaggct gtactaagcc tccccagac tccaccagct
 25 gtacttcaga gtggacacct gtagctggtg -3' (H2; SEC ID N° 58);
 5'- tttcaggga cctccaggct ttactaagcc tccccagac tccaccagca
 ttacttcaga gtggacacct gtagctggtg -3' (H3; SEC ID N° 69);
 5'- tccagacct tccctggtgc ctgccgaacc caagacatta cataactact
 gaaagtgaat ccagaggctg cacaggagag -3' (I; SEC ID N° 40);
 30 5'- tccagcctct tctctggagt ctgccgaacc caagacatta cataactact
 gaaagtgaat ccagaggctg cacaggagag -3' (I2; SEC ID N° 65);
 5'- ctctggagat ggtgaatcgg cccttcacac tgtctggata gtaggtgtaa
 ctaccaccac tactaatggt tgcaaccac -3' (J; SEC ID N° 41);

5'- ccttcttgca cagtaataaa cagccgtgtc ctctgctctc agactgttca
tttgcagata caggggtgttc ttggcattgt -3' (K; SEC ID N° 42);

5'- ccttcttgca cagtaataaa cagccgtgtc ctctgctctc agactgttca
tttgcagata caggggtgttc ttggcattgt -3' (K2; SEC ID N° 63);

5 5'- ccttcttgca cagtaataca tagccgtgtc ctcagatctc agactgttca
tttgcagata caggggtgttc ttggcattgt -3' (K3; SEC ID N° 70);

5'- gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtgacc agggtcctt
ggccccagta gtccgtcgta atcatagagt cacc -3' (L; SEC ID N° 43) y

5'- gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtgaga gtggtcctt
10 ggccccagta gtccgtcgta atcatagagt cacc -3' (L2; SEC ID N° 71).

Se sintetizan los siguientes 2 cebadores de PCR como se
ha descrito anteriormente:

5'- ttggataagc ttggcttgac -3' (P1; SEC ID N° 44); y

5'- gaccgatggg cccttggtgg a -3' (P2; SEC ID N° 45).

15 La síntesis del ADN tipo H1 que codifica una cadena
polipeptídica que comprende una secuencia señal de secreción,
una región variable de cadena pesada de TRA-8 humanizado y
los 8 restos aminoacídicos en el extremo N-terminal de la
región IgG-CH1 se realiza usando una combinación de PCR
20 respectivamente.

El fragmento de ADN tipo H1 se prepara del siguiente
modo.

Composición de la solución de reacción de PCR:

oligonucleótido A, 10 pmol;
25 oligonucleótido B2, 10 pmol;
oligonucleótido C, 10 pmol;
oligonucleótido D, 10 pmol;
oligonucleótido E, 10 pmol;
oligonucleótido F, 10 pmol;
30 oligonucleótido G, 10 pmol;
oligonucleótido H2, 10 pmol;
oligonucleótido I, 10 pmol;
oligonucleótido J, 10 pmol;

oligonucleótido K, 10 pmol;
oligonucleótido L, 10 pmol;
oligonucleótido cebador P1, 2 μ M;
oligonucleótido cebador P2, 2 μ M;
5 tampón II Pirobest 10 X, 10 μ l;
mezcla de dNTP, 8 μ l;
ADN polimerasa Pirobest, 0,5 μ l; y
agua redestilada hasta un volumen final de 50 μ l.

La reacción de PCR se realiza del siguiente modo. La
10 solución primero se calienta a 94°C durante 5 minutos,
después de lo cual se repite 7 veces un ciclo de
calentamiento a 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 30
segundos y 72°C durante 1 minuto. Después de completarse este
procedimiento, la solución de reacción se calienta a 72°C
15 durante 15 minutos.

Después de la extracción con fenol y la precipitación
con etanol, e precipitado de ADN resultante se seca al vacío,
se disuelve en un mínimo de agua redestilada, y se separa por
electroforesis en gel de agarosa al 3%. Después de la
20 electroforesis, el gel se tiñe con una solución acuosa a 1
 μ g/ml de bromuro de etidio para permitir la detección de ADN
en luz UV. Las bandas de ADN correspondientes al ADN tipo H1
se cortan usando una hoja de afeitar y se eluyen del gel
usando el kit Geneclean Spin (BIO 101, CA, EEUU). Después de
25 la extracción con fenol, el ADN eluido entonces se concentra
por centrifugación a 7.500 X g, seguido de precipitación con
etanol, y finalmente se disuelve en 5 μ l de agua destilada.

La síntesis del ADN tipo H3 que codifica una cadena
polipeptídica que comprende una secuencia señal de secreción,
30 una región variable de la cadena pesada de TRA-8 humanizado y
los 8 restos aminoacídicos en el extremo N-terminal de la
región IgG-CH1 se realiza usando una combinación de PCR

respectivamente.

El fragmento de ADN tipo H3 se prepara del siguiente modo.

Composición de la solución de reacción de PCR:

- 5 oligonucleótido A, 10 pmol;
- oligonucleótido B, 10 pmol;
- oligonucleótido C, 10 pmol;
- oligonucleótido D, 10 pmol;
- oligonucleótido E2, 10 pmol;
- 10 oligonucleótido F, 10 pmol;
- oligonucleótido G, 10 pmol;
- oligonucleótido H, 10 pmol;
- oligonucleótido I, 10 pmol;
- oligonucleótido J, 10 pmol;
- 15 oligonucleótido K2, 10 pmol;
- oligonucleótido L, 10 pmol;
- oligonucleótido cebador P1, 2 μ M;
- oligonucleótido cebador P2, 2 μ M;
- tampón II Pirobest 10 X, 10 μ l;
- 20 mezcla de dNTP, 8 μ l;
- ADN polimerasa Pirobest, 0,5 μ l; y
- agua redestilada hasta un volumen final de 50 μ l.

- La reacción de PCR se realiza del siguiente modo. La solución primero se calienta a 94°C durante 5 minutos,
- 25 después de lo cual se repite 7 veces un ciclo de calentamiento a 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. Después de completarse este procedimiento, la solución de reacción se calienta a 72°C durante 15 minutos.

- 30 Después de la extracción con fenol y la precipitación con etanol, el precipitado de ADN resultante se seca al vacío, se disuelve en un mínimo de agua redestilada, y se

separa por electroforesis en gel de agarosa al 3%. Después de la electroforesis, el gel se tiñe con una solución acuosa a 1 µg/ml de bromuro de etidio para permitir la detección de ADN en luz UV. Las bandas de ADN correspondientes al ADN tipo H3 se cortan usando una hoja de afeitar y se eluyen del gel usando el kit Geneclean Spin. Después de la extracción con fenol, el ADN eluido entonces se concentra por centrifugación a 7.500 X g, seguido de precipitación con etanol, y finalmente se disuelve en 5 µl de agua destilada.

10 La síntesis de ADN tipo H4 que codifica una cadena polipeptídica que comprende una secuencia señal de secreción, una región variable de la cadena pesada de TRA-8 humanizado y los 8 restos aminoacídicos en el extremo N-terminal de la región IgG-CH1 se realiza usando una combinación de PCR
15 respectivamente.

El fragmento de ADN tipo H4 se prepara del siguiente modo.

Composición de la solución de reacción de PCR:

oligonucleótido A, 10 pmol;
20 oligonucleótido B, 10 pmol;
oligonucleótido C2, 10 pmol;
oligonucleótido D, 10 pmol;
oligonucleótido E2, 10 pmol;
oligonucleótido F, 10 pmol;
25 oligonucleótido G, 10 pmol;
oligonucleótido H, 10 pmol;
oligonucleótido I2, 10 pmol;
oligonucleótido J, 10 pmol;
oligonucleótido K2, 10 pmol;
30 oligonucleótido L, 10 pmol;
oligonucleótido cebador P1, 2 µM;
oligonucleótido cebador P2, 2 µM;

tampón II Pirobest 10 X, 10 µl;
mezcla de dNTP, 8 µl;
ADN polimerasa Pirobest, 0,5 µl; y
agua redestilada hasta un volumen final de 50 µl.

5 La reacción de PCR se realiza del siguiente modo. La
solución primero se calienta a 94°C durante 5 minutos,
después de lo cual se repite 7 veces un ciclo de
calentamiento a 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 30
segundos y 72°C durante 1 minuto. Después de completarse este
10 procedimiento, la solución de reacción se calienta a 72°C
durante 15 minutos.

Después de la extracción con fenol y la precipitación
con etanol, el precipitado de ADN resultante se seca al
vacío, se disuelve en un mínimo de agua redestilada, y se
15 separa por electroforesis en gel de agarosa al 3%. Después de
la electroforesis, el gel se tiñe con una solución acuosa a 1
µg/ml de bromuro de etidio para permitir la detección de ADN
en luz UV. Las bandas de ADN correspondientes al ADN tipo H4
se cortan usando una hoja de afeitar y se eluyen del gel
20 usando el kit Geneclean Spin. Después de la extracción con
fenol, el ADN eluido entonces se concentra por centrifugación
a 7.500 X g, seguido de precipitación con etanol, y
finalmente se disuelve en 5 µl de agua destilada.

La síntesis del ADN tipo M que codifica una cadena
25 polipeptídica que comprende una secuencia señal de secreción,
una región variable de la cadena pesada de TRA-8 quimérico y
los 8 restos aminoacídicos en el extremo N-terminal de la
región IgG-CH1 se realiza usando una combinación de PCR
respectivamente.

30 El fragmento de ADN tipo M se prepara del siguiente
modo.

Composición de la solución de reacción de PCR:

oligonucleótido A, 10 pmol;
 oligonucleótido B3, 10 pmol;
 oligonucleótido C2, 10 pmol;
 oligonucleótido D, 10 pmol;
 5 oligonucleótido E3, 10 pmol;
 oligonucleótido F2, 10 pmol;
 oligonucleótido G, 10 pmol;
 oligonucleótido H3, 10 pmol;
 oligonucleótido I2, 10 pmol;
 10 oligonucleótido J, 10 pmol;
 oligonucleótido K3, 10 pmol;
 oligonucleótido L2, 10 pmol;
 oligonucleótido cebador P1, 2 μ M;
 oligonucleótido cebador P2, 2 μ M;
 15 tampón II Pirobest 10 X, 10 μ l;
 mezcla de dNTP, 8 μ l;
 ADN polimerasa Pirobest, 0,5 μ l; y
 agua redestilada hasta un volumen final de 50 μ l.

La reacción de PCR se realiza del siguiente modo. La
 20 solución primero se calienta a 94°C durante 5 minutos,
 después de lo cual se repite 7 veces un ciclo de
 calentamiento a 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 30
 segundos y 72°C durante 1 minuto. Después de completarse este
 procedimiento, la solución de reacción se calienta a 72°C
 25 durante 15 minutos.

Después de la extracción con fenol y la precipitación
 con etanol, el precipitado de ADN resultante se seca al
 vacío, se disuelve en un mínimo de agua redestilada, y se
 separa por electroforesis en gel de agarosa al 3%. Después de
 30 la electroforesis, el gel se tiñe con una solución acuosa a 1
 μ g/ml de bromuro de etidio para permitir la detección de ADN
 en luz UV. Las bandas de ADN correspondientes al ADN tipo M

se cortan usando una hoja de afeitar y se eluyen del gel usando el kit Geneclean Spin. Después de la extracción con fenol, el ADN eluido entonces se concentra por centrifugación a 7.500 X g, seguido de precipitación con etanol, y finalmente se disuelve en 5 µl de agua destilada.

Cada uno de los ADN extraídos resultantes (tipo H1, tipo H3, tipo H4, y tipo M) se clona usando el vector pGEM-T Easy (Promega) del siguiente modo:

El fragmento de ADN recuperado de la reacción de PCR (H1, H3, H4 o M), 5 µl;
Tampón de Taq polimerasa 10 X, 1 µl;
mezcla de dNTP, 1 µl;
Taq polimerasa (5 unidad/ml), 1 µl; y
agua redestilada hasta un volumen final de 10 µl.

Después de hacer reaccionar cada una de las soluciones anteriores a 70°C durante 30 minutos, cada solución de ADN y el vector pGEM-T Easy se ligan usando un kit de ligamiento de ADN Versión 2.0 (Takara Shuzo Co., Ltd.) usando el protocolo del fabricante.

Después de 4 horas de incubación a 15°C, se mezclan 2 µl de la solución de reacción incubada con 100 µl de la cepa JM109 de *E. coli* competente a una densidad celular de 1-2 x 10⁹ células/ml (Takara Shuzo Co., Ltd.), y la mezcla se mantiene en hielo durante 30 minutos, después a 42°C durante 30 segundos, y de nuevo en hielo durante 1 minuto. Después, se añaden 500 µl de medio SOC (tristona al 2% v/v, extracto de levadura al 0,5% p/v, cloruro sódico al 0,05% p/v, cloruro potásico 2,5 mM p/v, cloruro de magnesio 1 mM, y glucosa 20 mM) a la mezcla, que se incuba durante una hora adicional, con agitación. Después se aíslan las cepas transformantes, y se prepara el ADN plasmídico a partir de las cepas como se describe en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". La

secuencia de nucleótidos de este ADN que codifica la cadena pesada de TRA-8 humanizado o de ratón se confirma por el método dideoxi, respectivamente (Sanger, F. S., et al., (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467) usando el
5 analizador de ADN 3700 (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems, Japón).

El plásmido resultante se denomina pHA15 (el plásmido que lleva el ADNc que codifica la cadena pesada tipo H1 de TRA-8 humanizado), pHCl0 (el plásmido que lleva el ADNc que
10 codifica la cadena pesada tipo H3 de TRA-8 humanizado), pHD21 (el plásmido que lleva el ADNc que codifica la cadena pesada tipo H4 de TRA-8 humanizado), y pM11 (el plásmido que lleva el ADNc que codifica la cadena pesada de TRA-8 quimérico). Las cepas de *E. coli* transformantes que albergan estos
15 plásmidos, denominadas *E. coli* JM109/pHA15, *E. coli* JM109/pHCl0, *E. coli* JM109/pHD21, y *E. coli* JM109/pM11 se depositaron en el International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken,
20 305-5466, Japón el 20 de abril de 2001, de acuerdo con el Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos, y se correspondieron con los números de acceso FERM BP-7555, FERM BP-7557, FERM BP-7558, y FERM BP-7559, respectivamente.

**(3) Construcción de plásmidos de expresión que llevan el
25 ADN de la región variable de cadena pesada de TRA-8 humanizado de varios tipos o de ratón**

Se construyen vectores de expresión recombinantes para células animales insertando el ADN que codifica la cadena pesada de TRA-8 humanizado tipo H1, tipo H3, y tipo H4 o TRA-
30 8 quimérico tipo M (clonado anteriormente) del siguiente modo.

Se digiere un µg de plásmido pSRHHH3 (solicitud de

patente europea EP 0 909 816 A1) que lleva la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humanizado anti-Fas HFE7A y el ADN genómico de la región constante de IgG1 humana, un vector de expresión para células de mamífero, con
5 las enzimas de restricción HindIII y ApaI, y se separa por electroforesis en gel de agarosa al 3%. Después de la electroforesis, el gel se tiñe con una solución acuosa a 1 µg/ml de bromuro de etidio para permitir la detección de ADN en luz UV. Las bandas de ADN del vector que contienen el ADN
10 genómico de la región constante de IgG1 humana son la región variable de la cadena pesada de HFE7A humanizado se cortan usando una hoja de afeitar y se eluyen del gel usando el kit Geneclean Spin. Después de la extracción con fenol, el ADN eluido entonces se concentra por centrifugación a 7.500 X g,
15 seguido de precipitación con etanol, y finalmente se disuelve en 5 µl de agua destilada y después se desfosforila usando CIP. El plásmido digerido y desfosforilado resultante (100 ng) se liga con 1 µg del fragmento de ADN de pHA15, pHCl0, pHD21, o pM11 que contiene el ADN que codifica la región
20 variable de cadena pesada de TRA-8 humanizado o quimérico, que también se había digerido con Hind III y ApaI, usando un kit de ligamiento de ADN Versión 2.0 (Takara Shuzo Co., Ltd.). La mezcla de ligamiento después se usa para transformar *E. coli* JM109, que después se siembra en placas
25 de agar LB que contienen 50 µg/ml de ampicilina.

Los transformantes obtenidos por este método se cultivan en 2 ml de medio LB líquido que contiene 50 µg/ml de ampicilina a 37°C durante una noche, y posteriormente se extrae el ADN plasmídico del cultivo resultante por el método
30 alcalino-SDS.

El ADN plasmídico extraído se digiere con HindIII y ApaI, y se somete a electroforesis en gel de agarosa al 3%

p/v para confirmar la presencia o ausencia del inserto del ADN que codifica la región variable de cadena pesada de TRA-8 humanizado o quimérico. La inserción y orientación del fragmento de ADN deseado en el vector se confirma por
 5 secuenciación de ADN usando un analizador de secuencia génica (analizador de ADN ABI Prism 3700; Applied Biosystems). Los plásmidos de expresión resultantes que llevan el ADNc que codifica la cadena pesada de TRA-8 humanizado o quimérico se denominaron pHA15-1, pHC10-3, pHD21-1, y pM11-1,
 10 respectivamente.

(4) Construcción de vectores para las cadenas ligeras humanizadas

(4.1) Construcción de un vector de expresión para la cadena ligera del anticuerpo humanizado (tipo LM1)

15 Como se muestra en la SEC ID N° 72 de la lista de secuencias, otra humanización (tipo LM1) de las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo de ratón anti-DR5 humano TRA-8 conllevaba remplazar el 3° aminoácido (valina), el 8° aminoácido (histidina), el 9° aminoácido
 20 (lisina), el 10° aminoácido (fenilalanina), el 11° aminoácido (metionina), el 13° aminoácido (treonina), el 20° aminoácido (serina), el 42° aminoácido (glutamina), el 43° (serina), el 60° aminoácido (ácido aspártico), el 63° aminoácido (treonina), el 77° aminoácido (asparagina), el 78° aminoácido
 25 (valina), el 80° aminoácido (serina), el 83° aminoácido (leucina), el 85° aminoácido (ácido aspártico), el 87° aminoácido (fenilalanina), y el 99° aminoácido (glicina), el 103° aminoácido (leucina) y el 108° aminoácido (alanina) del extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la
 30 cadena ligera de TRA-8 con glutamina, prolina, serina, serina, leucina, alanina, treonina, lisina, alanina, serina, serina, serina, leucina, prolina, fenilalanina, treonina, tirosina, glutamina, valina y treonina respectivamente. La

secuencia resultante se denomina LM1.

Los plásmidos de expresión que llevan este tipo de secuencias de aminoácidos de cadena ligera humanizada del anticuerpo anti-DR5 humano TRA-8 (tipo LM1, SEC ID N° 72 de la lista de secuencias) se construyen del siguiente modo.

1) Síntesis de cebadores para preparar las regiones variable y constante de la cadena ligera de TRA-8 humanizado (tipo LM1)

Se sintetizan respectivamente el ADN que codifica la cadena polipeptídica LM1 (SEC ID N° 72 de la lista de secuencias), que es una fusión de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-DR5 TRA-8 humanizado (tipo LM1) y la región constante de la cadena ligera de Ig human (cadena κ), usando combinaciones de PCR.

Demás de 7AL1P (SEC ID N° 47), 7ALCN (SEC ID N° 48), HKCDF11 (SEC ID N° 50), HKCDR12 (SEC ID N° 51), HKCDF22 (SEC ID N° 52), HKCDR22 (SEC ID N° 53), y HKCF12 (SEC ID N° 54).

Se sintetizan los siguientes cebadores oligonucleotídicos para PCR:

5'-gtcccccaca gatgcagaca aagaacttgg agattggggtc atctgaatgt caccagtgga -3' (HKSPR12; SEC ID N° 77).

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

El fragmento de ADN LM1 que codifica la secuencia de aminoácidos definida en la SEC ID N° 72 de la misma se prepara realizando una PCR de dos etapas, se inserta en un vector plasmídico y se clona en *E. coli*.

a) PCR de primera etapa

Se prepara el fragmento de ADN LM1-F1 que codifica una secuencia señal de secreción y una parte de la región FRL₁ con un sitio de escisión para la enzima de restricción Hind III añadido al extremo 5' en las siguientes condiciones. Los

plásmidos molde, pHSGHM17 y pSRPDHH, se obtienen siguiendo la descripción de la solicitud de patente europea EP 0 909 816

A1. Composición de la solución de reacción:

- ADN del plásmido pHSGHM17, 25 ng
- 5 oligonucleótido cebador 7AL1P, 50 pmol
- oligonucleótido cebador HKSPR12, 50 pmol
- cóctel de dNTP, 5 μ l
- tampón de PCR 10x, 5 μ l
- ADN polimerasa ampliTa_q (PerkinElmer), 2,5 unidades

- 10 La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 μ l añadiendo agua redestilada y se usa en PCR.

- Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cuales se repite 30 veces un
- 15 ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

- El fragmento de ADN LM1-F2 que codifica una parte de FRL₁, CDRL₁, FRL₂, y CDRL₂ se prepara en las siguientes
- 20 condiciones.

Composición de la solución de reacción:

- ADN del plásmido pL28, 25 ng
- oligonucleótido cebador HKCDF11, 50 pmol
- oligonucleótido cebador HKCDR12, 50 pmol
- 25 cóctel de dNTP, 5 μ l
- tampón de PCR 10x, 5 μ l
- ADN polimerasa ampliTa_q, 2,5 unidades

- La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 μ l añadiendo agua
- 30 redestilada y se usa en PCR.

Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un

ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

El fragmento de ADN LM1-F3 que codifica CDRL₂, FRL₃, y una parte de CDRL₃ se prepara en las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

ADN del plásmido pSRPDHH, 25 ng
oligonucleótido cebador HKCDF22, 50 pmol
oligonucleótido cebador HKCDR22, 50 pmol
10 cóctel de dNTP, 5 µl
tampón de PCR 10x, 5 µl
ADN polimerasa ampliTaq, 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl añadiendo agua redestilada y se usa en PCR.

Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

El fragmento de ADN LM1-F4 que codifica CDRL₃, FRL4 y la región constante con un sitio de escisión para la enzima de restricción EcoR I añadido en el extremo 3' se prepara en las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

ADN del plásmido pSRPDHH, 25 ng
oligonucleótido cebador HKCF12, 50 pmol
oligonucleótido cebador 7ALCN, 50 pmol
cóctel de dNTP, 5 µl
30 tampón de PCR 10x, 5 µl
ADN polimerasa ampliTaq, 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición

anterior se ajusta a un volumen final de 50 μ l añadiendo agua redestilada y se usa en PCR.

Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un
5 ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

Los fragmentos de ADN amplificados después de PCR se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%. El
10 gel después de la electroforesis se tiñe con 1 μ g/ml de bromuro de etidio para detectar el ADN producido en luz UV. Las bandas de ADN respectivas detectadas de este modo se escinden con una hoja de afeitar.

b) PCR de segunda etapa

15 El ADN LM1 en el que están fusionados los fragmentos de ADN LM1-F1, LM1-F2, LM1-F3 y LM1-F4 se prepara en las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

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

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

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

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

oligonucleótido cebador 7AL1P, 50 pmol

oligonucleótido cebador 7ALCN, 50 pmol

cóctel de dNTP, 5,0 μ l

30 tampón de PCR 10x, 5,0 μ l

ADN polimerasa ampliTa_q, 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición

anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl añadiendo agua redestilada y se usa en PCR.

Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

El fragmento de ADN LM1 preparado de este modo se inserta en el plásmido pCR3.1DNA usando el kit de clonación Eukaryotic TA (InVitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante y se introduce en *E. coli* TOP10F' competente contenida en el kit. Las secuencias de nucleótidos de estos ADN que codifican la cadena ligera de TRA-8 humanizado (tipo LM1) se confirman 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 resultante se denominan pCR3.1/LM1-2 (el plásmido que lleva el ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de TRA-8 humanizado (tipo LM1) y una región constante de cadena ligera de Ig humana).

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

Se digiere un µg del ADN del plásmido de clonación pHSG399 con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y después se desfosforila con CIP. El ADN de pHSG399 desfosforilado resultante y el fragmento de ADN LM1, que se habían digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, se ligan usando el kit de ligamiento de ADN Versión 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Después, se transforma *E. coli* DH5α con el ADN ligado y se extiende en medio de agar LB que

contiene IPTG 0,1 mM, X-Gal al 0,1% y 50 µg/ml de cloranfenicol (concentraciones finales). Los transformantes blancos obtenidos se cultivan en medio LB líquido que contiene 50 µg/ml de cloranfenicol, y se extrae el ADN plasmídico del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS. El ADN plasmídico extraído se digiere con Hind III y EcoR I, y después se selecciona un clon que lleva el fragmento de ADN LM1 por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

10 Como resultado del procedimiento anterior, se obtiene el plásmido pHSG/M1-2-2 que lleva un fragmento de fusión de la región variable de la cadena ligera de TRA-8 LM1 humanizado y la región constante de la cadena Igκ humana. La cepa de *E. coli* transformante que alberga este plásmido, denominada *E. coli* DH5α/pHSG/M1-2-2 se depositó en 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 el 20 de abril de 2001, de acuerdo con el Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos, y se correlacionó con el número de acceso FERM BP-7562.

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

25 El plásmido pHSG/M1-2 obtenido que lleva un fragmento de fusión de la región variable de la cadena ligera de TRA-8 LM1 humanizado y la región constante de la cadena Igκ humana se digiere con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

30 Se digiere un µg del ADN del plásmido de clonación pSRPDHH (solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1) con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y después se desfosforila con CIP. El ADN de pSRPDHH desfosforilado resultante y el fragmento de ADN HindIII-EcoRI obtenido de

pHSG/M1-2-2 se ligan usando el kit de ligamiento de ADN Versión 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Después, *E. coli* DH5 α se transforma con el ADN ligado y se extiende en agar LB. Los transformantes obtenidos se cultivan en medio LB líquido que
 5 contiene 100 μ g/ml de ampicilina, y se extrae el ADN plasmídico del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS. La inserción y orientación del fragmento de ADN deseado en el vector pSRPDHH se confirma por secuenciación de ADN usando un analizador de secuencia génica.

10 El plásmido de expresión resultante que lleva el ADNc que codifica la cadena ligera de TRA-8 LM1 humanizado se denomina pSR/LM1-2.

(4.2) Construcción de un vector de expresión para la cadena ligera del anticuerpo humanizado (tipo LM3)

15 Como se muestra en la SEC ID N° 73 de la lista de secuencias, otra humanización (tipo LM3) de las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo de ratón anti-DR5 humano TRA-8 conllevaba remplazar el 8° aminoácido (histidina), el 9° aminoácido (lisina), el 10° aminoácido
 20 (fenilalanina), el 11° aminoácido (metionina), el 13° aminoácido (treonina), el 20° aminoácido (serina), el 42° aminoácido (glutamina), el 43° aminoácido (serina), el 77° aminoácido (asparagina), el 78° aminoácido (valina), el 80° aminoácido (serina), el 83° aminoácido (leucina), el 85°
 25 aminoácido (ácido aspártico), el 87° aminoácido (fenilalanina), el 99° aminoácido (glicina), el 103° aminoácido (leucina) y el 108° aminoácido (alanina) del extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de TRA-8 con prolina, serina, serina, leucina,
 30 alanina, treonina, lisina, alanina, serina, leucina, prolina, fenilalanina, treonina, tirosina, glutamina, valina y treonina, respectivamente. La secuencia resultante se

denomina LM3.

Los plásmidos de expresión que llevan este tipo de secuencias de aminoácidos de cadena ligera humanizada del anticuerpo anti-DR5 humano TRA-8 (tipo LM3, SEC ID N° 73 de la lista de secuencias) se construyen del siguiente modo.

1) Síntesis de cebadores para preparar las regiones variable y constante de la cadena ligera de TRA-8 LM3 humanizado

El ADN que codifica la cadena polipeptídica LM3 (SEC ID N° 73 de la lista de secuencias), que es una fusión de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-DR5 TRA-8 humanizado y la región constante de la cadena ligera de Ig humana (cadena κ), se sintetizan respectivamente usando combinaciones de PCR.

Además de 7AL1P (SEC ID N° 47) y 7ALCN (SEC ID N° 48), se sintetizan los siguientes cebadores oligonucleotídicos para PCR:

5'- atctagttct cagagatgga gacagacaca atcctgctat gggtgctgct gctctgggtt ccagg -3' (MOD1F1; SEC ID N° 78);

5'- cagcacccat agcaggattg tgtctgtctc catctctgag aactagatga gaggatgctt cttaagctt -3' (MOD1R1; SEC ID N° 79);

5'- ctccactggt gacattgtga tgacccaatc tccaagttct ttgtctgcat ctgtggggga cagggtc -3' (MOD1F22; SEC ID N° 80);

5'- acttggagat tgggtcatca caatgtcacc agtggagcct ggaaccaga gcag-3' (MOD1R22; SEC ID N° 81);

5'- accatcacct gcaaggccag tcaggatgtg ggtactgctg tagcctggta ccaacagaaa ccaggaa -3' (MOD1F3; SEC ID N° 82);

5'- tacagcagta cccacatcct gactggcctt gcaggtgatg gtgaccctgt ccccccacaga tgcagacaaa ga -3' (MOD1R3; SEC ID N° 83);

5'- aagcacccaa actcctcatc tattgggcat ccacccggca cactgggggtc ccagataggt ttacaggcag t -3' (MOD1F42; SEC ID N° 84);

5'- cccagtgtgc cgggtggatg cccaatagat gaggagtgtt ggtgcttttc ctggtttctg ttggtaccag gc -3' (MOD1R4; SEC ID N° 85);

5'- ggggtctggga cagacttcac cctcaccatc tctagtctgc agccggagga
ttttgcaacc tat -3' (MOD1F5; SEC ID N° 86);

5'- actagagatg gtgagggtga agtctgtccc agaccactg cctgtaaacc
tatctgggac -3' (MOD1R52; SEC ID N° 87);

5 5'- tactgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttcgggtcaag gcaccaaggt
ggaaatc -3' (MOD1F6; SEC ID N° 88);

5'- cgtccgatag ctgctatatatt gctgacagta atagggttgca aaatcctccg
gctgcac -3' (MOD1R6; SEC ID N° 89)

5'- aaacggactg tggctgcacc atctgtcttc atcttcccgc catctgatga g
10 -3' (MOD1F7; SEC ID N° 90);

5'- gaagatgaag acagatggtg cagccacagt ccgtttgatt tccaccttgg
tgccttgacc gaa -3' (MOD1R7; SEC ID N° 91); y

5'- agatttcaac tgctcatcag atggcgggaa (LR17; SEC ID N° 101).

15 **2) Construcción del plásmido pCR3.1/LM3-3-44 (clonación de la
cadena ligera tipo LM3 de TRA-8 humanizado)**

El fragmento de ADN LM3 que codifica la secuencia de aminoácidos definida en la SEC ID N° 73 de la misma se prepara realizando una PCR de 2 etapas, se inserta en un vector plasmídico y se clona en *E. coli*.

20 **a) PCR de primera etapa**

El fragmento de ADN LM3-F31B que codifica una región de secuencia señal de secreción con un sitio de escisión para la enzima de restricción Hind III añadido en el extremo 5', FRL₁, CDRL₁, FRL₂, y CDRL₂, FRL₃, CDRL₃, FRL₄ y una parte de la
25 región constante se prepara en las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

oligonucleótido cebador MOD1F1, 5 pmol
oligonucleótido cebador MOD1R1, 5 pmol
oligonucleótido cebador MOD1F22, 5 pmol
30 oligonucleótido cebador MOD1R22, 5 pmol
oligonucleótido cebador MOD1F3, 5 pmol
oligonucleótido cebador MOD1R3, 5 pmol
oligonucleótido cebador MOD1F42, 5 pmol

- oligonucleótido cebador MOD1R4, 5 pmol
 oligonucleótido cebador MOD1F5, 5 pmol
 oligonucleótido cebador MOD1R52, 5 pmol
 oligonucleótido cebador MOD1F6, 5 pmol
 5 oligonucleótido cebador MOD1R6, 5 pmol
 oligonucleótido cebador MOD1F7, 50 pmol
 oligonucleótido cebador MOD1R7, 5 pmol
 oligonucleótido cebador 7AL1P, 50 pmol
 oligonucleótido cebador LR17, 50 pmol
 10 cóctel de dNTP, 5 μ l
 tampón de PCR 10x, 5 μ l
 ADN polimerasa ampliTaq, 2,5 unidades
- La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 μ l añadiendo agua
 15 redestilada y se usa en PCR.
- Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C
 20 durante 10 minutos.
- El fragmento de ADN LM3-F31C que codifica una parte de la región constante con un sitio de escisión para la enzima de restricción EcoRI añadido al extremo 3' se prepara en las siguientes condiciones.
- 25 El plásmido molde, pSRPDHH, se obtiene siguiendo la descripción de la solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1.
- Composición de la solución de reacción:
- ADN del plásmido pSRPDHH, 25 ng
 30 oligonucleótido cebador MOD1F7, 50 pmol
 oligonucleótido cebador 7ALCN, 50 pmol
 cóctel de dNTP, 5 μ l

tampón de PCR 10x, 5 µl

ADN polimerasa ampliTa^q, 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl añadiendo agua
5 redestilada y se usa en PCR.

Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C
10 durante 10 minutos.

Los fragmentos de ADN amplificados después de la PCR se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%. El gel después de la electroforesis se tiñe con 1 µg/ml de bromuro de etidio para detectar el ADN producido en luz UV.
15 Las bandas de ADN respectivas detectadas de este modo se escinden con una hoja de afeitar.

b) PCR de segunda etapa

El ADN LM3 en el que están fusionados los fragmentos de ADN LM3-F31B, y LM3-F31C descritos anteriormente se prepara
20 en las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

fragmento de gel del ADN LM3-F31B preparado en la PCR de primera etapa,

fragmento de gel del ADN LM3-F31C preparado en la PCR de
25 primera etapa,

oligonucleótido cebador 7AL1P, 50 pmol

oligonucleótido cebador 7ALCN, 50 pmol

cóctel de dNTP, 5,0 µl

tampón de PCR 10x, 5,0 µl

30 ADN polimerasa ampliTa^q, 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl añadiendo agua

redestilada y se usa en PCR.

Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

El fragmento de ADN LM3 preparado de este modo se inserta en el plásmido pCR3.1DNA usando el kit de clonación Eukaryotic TA (InVitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante y se introduce en *E. coli* TOP10F' competente contenida en el kit. Las secuencias de nucleótidos de estos ADN que codifican la cadena ligera de TRA-8 LM3 humanizado se confirman por el método didesoxi (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 denominan pCR3.1/LM3-3-44 (el plásmido que lleva el ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de TRA-8 LM3 humanizado y una región constante de cadena ligera de Ig humana).

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

Se digiere un µg del ADN del plásmido de clonación pHSG399 con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y después se desfosforila con CIP. El ADN de pHSG399 desfosforilado resultante y el fragmento de ADN LM3, que se había digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, se ligan usando el kit de ligamiento de ADN Versión 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Después, se transforma *E. coli* DH5α con el ADN ligado y se extiende en medio de agar LB que contiene IPTG 0,1 mM, X-Gal al 0,1% y 50 µg/ml de

cloranfenicol (concentraciones finales). Los transformantes blancos obtenidos se cultivan en medio LB líquido que contiene 50 µg/ml de cloranfenicol, y se extrae el ADN plasmídico del cultivo resultante de acuerdo con el método
5 alcalino-SDS. El ADN plasmídico extraído se digiere con Hind III y EcoR I, y después se selecciona un clon que lleva el fragmento de ADN LM3 por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Como resultado del procedimiento anterior, se obtiene el
10 plásmido pHSG/M3-3-22 que lleva un fragmento de fusión de la región variable de la cadena ligera de TRA-8 LM3 humanizado y la región constante de la cadena Igκ humana. La cepa de *E. coli* transformante que alberga este plásmido, denominada *E. coli* DH5α/pHSG/M3-3-22 se depositó en el International Patent
15 Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japón el 20 de abril de 2001, de acuerdo con el Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos, y se correspondió con el número de acceso
20 FERM BP-7564.

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

El plásmido pHSG/M3-3-22 obtenido que lleva un fragmento de fusión de la región variable de la cadena ligera de TRA-8
25 LM3 humanizado y la región constante de la cadena Igκ humana se digiere con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

Se digiere un µg del ADN del plásmido de clonación pSRPDHH (solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1) con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y después se
30 desfosforila con CIP. El ADN de pSRPDHH desfosforilado resultante y el fragmento de ADN HindIII-EcoRI obtenido de pHSG7M3-3-22 se ligan usando el kit de ligamiento de ADN

Versión 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Después, se transforma *E. coli* DH5 α con el ADN ligado y se extiende en agar LB. Los transformantes obtenidos se cultivan en medio LB líquido que contiene 100 μ g/ml de ampicilina, y se extrae el ADN plasmídico del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS. La inserción y orientación del fragmento de ADN deseado en el vector pSRPDHH se confirma por secuenciación de ADN usando un analizador de secuencia génica (analizador de ADN ABI Prism 3700; Applied Biosystems).

El plásmido de expresión resultante que lleva el ADNc que codifica la cadena ligera de TRA-8 LM3 humanizado se denomina pSR/LM3-3-44-10.

(4.3) Construcción de un vector de expresión para la cadena ligera del anticuerpo humanizado (tipo LM4)

Como se muestra en la SEC ID N° 74 de la lista de secuencias, otra humanización (tipo LM4) de las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo de ratón anti-DR5 humano TRA-8 conllevaba remplazar el 8° aminoácido (histidina), el 9° aminoácido (lisina), el 10° aminoácido (fenilalanina), el 11° aminoácido (metionina), el 13° aminoácido (treonina), el 20° aminoácido (serina), el 42° aminoácido (glutamina), el 43° aminoácido (serina), el 77° aminoácido (asparagina), el 78° aminoácido (valina), el 80° aminoácido (serina), el 83° aminoácido (leucina), el 85° aminoácido (ácido aspártico), el 99° aminoácido (glicina), el 103° aminoácido (leucina) y el 108° aminoácido (alanina) del extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera TRA-8 con prolina, serina, serina, leucina, alanina, treonina, lisina, alanina, serina, leucina, prolina, fenilalanina, treonina, glutamina, valina y treonina respectivamente. La secuencia resultante se denomina LM4.

Los plásmidos de expresión que llevan este tipo de

secuencias de aminoácidos de cadena ligera humanizada del anticuerpo anti-DR5 humano TRA-8 (tipo LM4) (SEC ID N° 74 de la lista de secuencias) se construyen del siguiente modo.

1) Síntesis de cebadores para preparar las regiones variable y constante de la cadena ligera de TRA-8 LM4 humanizado

El ADN que codifica la cadena polipeptídica LM4 (SEC ID N° 74 de la lista de secuencias), que es una fusión de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-DR5 TRA-8 humanizado y la región constante de la cadena ligera de Ig humana (cadena κ), se sintetizan respectivamente usando combinaciones de PCR.

Además de 7AL1P (SEC ID N° 47), 7ALCN (SEC ID N° 48), MOD1F1 (SEC ID N° 78), MOD1R1 (SEC ID N° 79), MOD1F22 (SEC ID N° 80), MOD1R22 (SEC ID N° 81), MOD1F3 (SEC ID N° 82), MOD1R3 (SEC ID N° 83), MOD1F42 (SEC ID N° 84), MOD1R4 (SEC ID N° 85), MOD1F5 (SEC ID N° 86), MOD1R52 (SEC ID N° 87), MOD1F7 (SEC ID N° 90), y MOD1R7 (SEC ID N° 91), LR17 (SEC ID N° 101), se sintetizan los siguientes cebadores oligonucleotídicos para PCR:

5'- ttctgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttcggtcaag gcaccaaggt ggaaatc -3' (MOD1F62; SEC ID N° 92)

5'- cgtccgatag ctgctatatt gctgacagaa atagggttgca aaatcctccg gctgcag -3' (MOD1R62; SEC ID N° 93)

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

El fragmento de ADN LM4 que codifica la secuencia de aminoácidos definida en la SEC ID N° 74 de la misma se prepara realizando una PCR de 2 etapas, se inserta en un vector plasmídico y se clona en *E. coli*.

a) PCR de primera etapa

El fragmento de ADN LM4-F41B que codifica una región de secuencia señal de secreción con un sitio de escisión para la

enzima de restricción Hind III añadido al extremo 5', FRL₁, CDRL₁, FRL₂, y CDRL₂, FRL₃, CDRL₃, FRL₄ y una parte de la región constante se prepara en las siguientes condiciones. Composición de la solución de reacción:

- 5 oligonucleótido cebador MOD1F1, 5 pmol
- oligonucleótido cebador MOD1R1, 5 pmol,
- oligonucleótido cebador MOD1F22, 5 pmol
- oligonucleótido cebador MOD1R22, 5 pmol
- oligonucleótido cebador MOD1F3, 5 pmol
- 10 oligonucleótido cebador MOD1R3, 5 pmol
- oligonucleótido cebador MOD1F42, 5 pmol
- oligonucleótido cebador MOD1R4, 5 pmol
- oligonucleótido cebador MOD1F5, 5 pmol
- oligonucleótido cebador MOD1R52, 5 pmol
- 15 oligonucleótido cebador MOD1F62, 5 pmol
- oligonucleótido cebador MOD1R62, 5 pmol
- oligonucleótido cebador MOD1F7, 50 pmol
- oligonucleótido cebador MOD1R7, 5 pmol
- oligonucleótido cebador 7AL1P, 50 pmol
- 20 oligonucleótido cebador LR17, 50 pmol
- cóctel de dNTP, 5 µl
- tampón de PCR 10x, 5 µl
- ADN polimerasa ampliTaq, 2,5 unidades

25 La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl añadiendo agua redestilada y se usa en PCR.

30 Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

El fragmento de ADN LM4-F41C que codifica una parte de

la región constante con un sitio de escisión para la enzima de restricción Eco RI añadido al extremo 3' se prepara en las siguientes condiciones.

Los plásmidos molde, pSRPDHH, se obtienen siguiente la
5 descripción de la solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1.

Composición de la solución de reacción:

ADN del plásmido pSRPDHH, 25 ng
oligonucleótido cebador MOD1F7, 50 pmol
10 oligonucleótido cebador 7ALCN, 50 pmol
cóctel de dNTP, 5 µl
tampón de PCR 10x, 5 µl
ADN polimerasa ampliTaq, 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición
15 anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl añadiendo agua redestilada y se usa en PCR.

Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto
20 y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

Los fragmentos de ADN amplificados después de PCR se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%. El gel después de la electroforesis se tiñe con 1 µg/ml de
25 bromuro de etidio para detectar el ADN producido en luz UV. Las bandas de ADN respectivas detectadas de este modo se escinden con una hoja de afeitar.

b) PCR de segunda etapa

El ADN LM4 en el que están fusionados los fragmentos de
30 ADN LM4-F41B, y LM4-F41C descritos anteriormente se prepara en las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

fragmento de gel del ADN LM4-F41B preparado en la PCR de primera etapa,

fragmento de gel del ADN LM4-F41C preparado en la PCR de primera etapa,

- 5 oligonucleótido cebador 7AL1P, 50 pmol
 oligonucleótido cebador 7ALCN, 50 pmol
 cóctel de dNTP, 5,0 µl
 tampón de PCR 10x, 5,0 µl
 ADN polimerasa ampliTa_q, 2,5 unidades

- 10 La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl añadiendo agua redestilada y se usa en PCR.

- Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un
15 ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

- El fragmento de ADN LM4 preparado de este modo se inserta en el plásmido pCR3.1DNA usando el kit de clonación
20 Eukaryotic TA (InVitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante y se introduce en *E. coli* TOP10F' competente contenida en el kit. Las secuencias de nucleótidos de estos ADN que codifican la cadena ligera de TRA-8 LM4 humanizado se confirman por el método dideoxi (Sanger, F. S., et al.,
25 (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 denominan pCR3.1/LM4-5-3 (el plásmido que lleva el ADNc que codifica la región
30 variable de cadena ligera de TRA-8 LM4 humanizado y una región constante de cadena ligera de Ig humana).

El plásmido pCR3.1/LM4-5-3 obtenido que contiene el

fragmento de ADN LM4 se digiere con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

Se digiere un μg del ADN del plásmido de clonación pHSG399 con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y
5 después se desfosforila con CIP. El ADN de pHSG399 desfosforilado resultante y el fragmento de ADN LM4, que se habían digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, se ligan usando el kit de ligamiento de ADN Versión 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Después, se transforma *E. coli*
10 DH5 α con el ADN ligado y se extiende en medio de agar LB que contiene IPTG 0,1 mM, X-Gal al 0,1% y 50 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol (concentraciones finales). Los transformantes blancos obtenidos se cultivan en medio LB líquido que contiene 50 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol, y se extrae el ADN
15 plasmídico del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS. El ADN plasmídico extraído se digiere con Hind III y EcoR I, y después se selecciona un clon que lleva el fragmento de ADN LM4 por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

20 Como resultado del procedimiento anterior, se obtiene el plásmido pHSG/M4-5-3-1 que lleva un fragmento de fusión de la región variable de la cadena ligera de TRA-8 LM4 humanizado y la región constante de la cadena Ig κ humana. La cepa de *E. coli* transformante que alberga este plásmido, denominado *E. coli* DH5 α /pHSG/M4-5-3-1 se depositó en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced
25 Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japón el 20 de abril de 2001, de acuerdo con el Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos, y se correspondió con el número de acceso
30 FERM BP-7565.

3) Construcción del plásmido pSR/LM4-5-3-3 (plásmidos de

expresión para la cadena ligera de TRA-8 LM4 humanizado)

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

Se digiere un μg del ADN del plásmido de clonación pSRPDHH (solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1) con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y después se
10 desfosforila con CIP. El ADN de pSRPDHH desfosforilado resultante y el fragmento de ADN HindIII-EcoRI obtenido de pHSG/M4-5-3-1 se ligan usando el kit de ligamiento de ADN Versión 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Después, se transforma *E. coli* DH5 α con el ADN ligado y se extiende en agar LB. Los
15 transformantes obtenidos se cultivan en medio LB líquido que contiene 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina, y se extrae el ADN plasmídico del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS. La inserción y orientación del fragmento de ADN deseado en el vector pSRPDHH se confirma por secuenciación de
20 ADN usando un analizador de secuencia génica (analizador de ADN ABI Prism 3700; Applied Biosystems).

El plásmido de expresión resultante que lleva el ADNc que codifica la cadena ligera de TRA-8 LM4 humanizado se denomina pSR/LM4-5-3-3.

25 **(4.4) Construcción de un vector de expresión para la cadena ligera del anticuerpo humanizado (tipo LM5)**

Como se muestra en la SEC ID N° 75 de la lista de secuencias, otra humanización (tipo LM5) de las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo de ratón anti-
30 DR5 humano TRA-8 conllevaba remplazar el 8° aminoácido (histidina), el 9° aminoácido (lisina), el 10° aminoácido (fenilalanina), el 11° aminoácido (metionina), el 13°

aminoácido (treonina), el 20° aminoácido (serina), el 42° aminoácido (glutamina), el 43° aminoácido (serina), el 77° aminoácido (asparagina), el 78° aminoácido (valina), el 80° aminoácido (serina), el 83° aminoácido (leucina), el 103° aminoácido (leucina) y el 108° aminoácido (alanina) del extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de TRA-8 con prolina, serina, serina, leucina, alanina, treonina, lisina, alanina, serina, leucina, prolina, fenilalanina, valina y treonina respectivamente. La secuencia resultante se denomina LM5.

Los plásmidos de expresión que llevan este tipo de secuencias de aminoácidos de cadena ligera humanizada del anticuerpo anti-DR5 humano TRA-8 (tipo LM5) (SEC ID N° 75 de la lista de secuencias) se construyen del siguiente modo.

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

El ADN que codifica la cadena polipeptídica LM5 (SEC ID N° 75 de la lista de secuencias), que es una fusión de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-DR5 TRA-8 humanizado y la región constante de la cadena ligera de Ig human (cadena κ), se sintetizan respectivamente usando combinaciones de PCR.

Además de 7AL1P (SEC ID N° 47), 7ALCN (SEC ID N° 48), MOD1F1 (SEC ID N° 78), MOD1R1 (SEC ID N° 79), MOD1F22 (SEC ID N° 80), MOD1R22 (SEC ID N° 81), MOD1F3 (SEC ID N° 82), MOD1R3 (SEC ID N° 83), MOD1F42 (SEC ID N° 84), MOD1R4 (SEC ID N° 85), MOD1R52 (SEC ID N° 87), MOD1F7 (SEC ID N° 90), y LR17 (SEC ID N° 101), se sintetizan los siguientes cebadores oligonucleotídicos para PCR:

5'- ggggtctggga cagacttcac cctcaccatc tctagtctgc agccggagga ttttgcagat tat -3' (MOD1F52; SEC ID N° 94)
5'- ttctgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttcggtggag gcaccaaggt

ggaaatc -3' (MOD1F63; SEC ID N° 95)

5'- cgtccgatag ctgctatatt gctgacagaa ataatctgca aaatcctccg
gctgcag -3' (MOD1R63; SEC ID N° 96)

5'- gaagatgaag acagatggtg cagccacagt ccgtttgatt tccaccttgg
5 tgcctccacc gaa-3' (MOD1R72; SEC ID N° 102)

2) Construcción del plásmido pCR3.1/LM5-3-42 (clonación de la cadena ligera tipo LM5 de TRA-8 humanizado)

El fragmento de ADN LM5 que codifica la secuencia de aminoácidos definida en la SEC ID N° 75 de la misma se
10 prepara realizando una PCR de 2 etapas, se inserta en un vector plasmídico y se clona en *E. coli*.

a) PCR de primera etapa

El fragmento de ADN LM5-F51B que codifica una región de secuencia señal de secreción con un sitio de escisión para la
15 enzima de restricción Hind III añadido al extremo 5', FRL₁, CDRL₁, FRL₂, CDRL₂, FRL₃, CDRL₃, FRL₄ y una parte de la región constante se prepara en las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

	oligonucleótido cebador MOD1F1, 5 pmol
20	oligonucleótido cebador MOD1R1, 5 pmol
	oligonucleótido cebador MOD1F22, 5 pmol
	oligonucleótido cebador MOD1R22, 5 pmol
	oligonucleótido cebador MOD1F3, 5 pmol
	oligonucleótido cebador MOD1R3, 5 pmol
25	oligonucleótido cebador MOD1F42, 5 pmol
	oligonucleótido cebador MOD1R4, 5 pmol
	oligonucleótido cebador MOD1F52, 5 pmol
	oligonucleótido cebador MOD1R52, 5 pmol
	oligonucleótido cebador MOD1F63, 5 pmol
30	oligonucleótido cebador MOD1R63, 5 pmol
	oligonucleótido cebador MOD1F7, 50 pmol
	oligonucleótido cebador MOD1R72, 5 pmol
	oligonucleótido cebador 7AL1P, 50 pmol

oligonucleótido cebador LR17, 50 pmol

cóctel de dNTP, 5 µl

tampón de PCR 10x, 5 µl

ADN polimerasa ampliTa_q, 2,5 unidades

- 5 La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl añadiendo agua redestilada y se usa en PCR.

- Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

- El fragmento de ADN LM5-F51C que codifica una parte de la región constante con un sitio de escisión de la enzima de restricción Eco RI añadido en el extremo 3' se prepara en las siguientes condiciones. El plásmido molde, pSRPDHH, se obtiene siguiendo la descripción de la solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1.

Composición de la solución de reacción:

- 20 ADN del plásmido pSRPDHH, 25 ng
oligonucleótido cebador MOD1F7, 50 pmol
oligonucleótido cebador 7ALCN, 50 pmol
cóctel de dNTP, 5 µl
tampón de PCR 10x, 5 µl

- 25 ADN polimerasa ampliTa_q, 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl añadiendo agua redestilada y se usa en PCR.

- Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C

durante 10 minutos.

Los fragmentos de ADN amplificados después de PCR se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%. El gel después de la electroforesis se tiñe con 1 µg/ml de bromuro de etidio para detectar el ADN producido en luz UV. Las bandas de ADN respectivas detectadas de este modo se escinden con una hoja de afeitar.

b) PCR de segunda etapa

El ADN LM5 en el que están fusionados los fragmentos de ADN LM5-F51B, y LM5-F51C descritos anteriormente se prepara en las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

fragmento de gel del ADN LM5-F51B preparado en la PCR de primera etapa,
 15 fragmento de gel del ADN LM5-F51C preparado en la PCR de primera etapa,
 oligonucleótido cebador 7AL1P, 50 pmol
 oligonucleótido cebador 7ALCN, 50 pmol
 cóctel de dNTP, 5,0 µl
 20 tampón de PCR 10x, 5,0 µl
 ADN polimerasa ampliTaq, 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl añadiendo agua redestilada y se usa en PCR.

25 Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

30 El fragmento de ADN LM5 preparado de este modo se inserta en el plásmido pCR3.1DNA usando el kit de clonación Eukaryotic TA (InVitrogen) siguiendo el protocolo del

fabricante y se introduce en *E. coli* TOP10F' competente contenida en el kit. Las secuencias de nucleótidos de estos ADN que codifican la cadena ligera de TRA-8 LM5 humanizado se confirman por el método didesoxi (Sanger, F. S., et al.,
5 (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467) usando un analizador de ADN.

Los plásmidos resultantes se denominan pCR3.1/LM5-3-42 (el plásmido que lleva el ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de TRA-8 LM5 humanizado y una
10 región constante de cadena ligera de Ig humana).

El plásmido pCR3.1/LM5-3-42 obtenido que contiene el fragmento de ADN LM5 se digiere con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

Se digiere un μg del ADN del plásmido de clonación
15 pHSG399 con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y después se desfosforila con CIP. El ADN de pHSG399 desfosforilado resultante y el fragmento de ADN LM5, que se había digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, se ligan usando el kit de ligamiento de ADN Versión 2.0
20 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Después, se transforma *E. coli* DH5 α con el ADN ligado y se extiende en medio de agar LB que contiene IPTG 0,1 mM, X-Gal al 0,1% y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloranfenicol (concentraciones finales). Los transformantes blancos obtenidos se cultivan en medio LB líquido que
25 contiene 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloranfenicol, y se extrae el ADN plasmídico del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS. El ADN plasmídico extraído se digiere con Hind III y EcoR I, y después se selecciona un clon que lleva el fragmento de ADN LM5 por electroforesis en gel de agarosa al
30 1%.

Como resultado del procedimiento anterior, se obtiene el plásmido pHSG/M5-3-27 que lleva un fragmento de fusión de la

región variable de la cadena ligera de TRA-8 LM5 humanizado y la región constante de la cadena IgK humana.

3) Construcción del plásmido pSR/LM5-3-27-1 (plásmido de expresión para la cadena ligera de TRA-8 LM5 humanizado)

5 El plásmido pHSG/M5-3-27 obtenido que lleva un fragmento de fusión de la región variable de la cadena ligera de TRA-8 LM5 humanizado y la región constante de la cadena IgK humana se digiere con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

10 Se digiere un μg del ADN del plásmido de clonación pSRPDHH (solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1) con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y después se desfosforila con CIP. El ADN pSRPDHH desfosforilado resultante y el fragmento de ADN HindIII-EcoRI obtenido de pHSG/M5-3-27 se ligan usando el kit de ligamiento de ADN 15 Versión 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Después, se transforma *E. coli* DH5 α con el ADN ligado y se extiende en agar LB. Los transformantes obtenidos se cultivan en medio LB líquido que contiene 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina, y se extrae el ADN plasmídico del cultivo resultante de acuerdo con el método 20 alcalino-SDS. La inserción y orientación del fragmento de ADN deseado en el vector pSRPDHH se confirma por secuenciación de ADN usando un analizador de secuencia génica (analizador de ADN ABI Prism 3700; Applied Biosystems).

25 El plásmido de expresión resultante que lleva el ADNc que codifica la cadena ligera de TRA-8 LM5 humanizado se denomina pSR/LM5-3-27-1.

(4.5) Construcción de un vector de expresión para la cadena ligera del anticuerpo humanizado (tipo quimera)

30 La secuencia mostrada en la SEC ID N° 76 de la lista de secuencias, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de TRA-8 tipo quimera, se denomina LM6.

Los plásmidos de expresión que llevan este tipo de

secuencias de aminoácidos de cadena ligera humanizada del anticuerpo anti-DR5 humano TRA-8 (tipo LM6) (SEC ID N° 75 de la lista de secuencias) se construyen del siguiente modo.

1) Síntesis de cebadores para preparar las regiones variable y constante de la cadena ligera de TRA-8 LM6 humanizado

El ADN que codifica la cadena polipeptídica LM6 (SEC ID N° 75 de la lista de secuencias), que es una fusión de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo de ratón anti-DR5 TRA-8 (tipo LM6) y la región constante de la cadena ligera de Ig humana (cadena κ), se sintetiza respectivamente usando combinaciones de PCR.

Además de 7AL1P (SEC ID N° 47) y 7ALCN (SEC ID N° 48), se sintetizan los siguientes cebadores oligonucleotídicos para PCR:

5'- tgatgtggac atgaatttgt gagactgggt catcacaatg tcaccagtgg a -3' (HKSPR13; SEC ID N° 97);

5'- tgggttccag gctccactgg tgacattgtg atgacccagt ctcaaaatt c -3' (MVF11; SEC ID N° 98);

5'- aagacagatg gtgcagccac agcccgtttg atttccagct tgggtgcctc -3' (MVR11; SEC ID N° 99); y

5'- aagctggaaa tcaaacgggc tgtggctgca ccatctgtct tcatc -3' (MCF11; SEC ID N° 100).

2) Construcción del plásmido pCR3.1/LM6-1-16 (clonación de la cadena ligera tipo LM6 de TRA-8 humanizado)

El fragmento de ADN LM6 que codifica la secuencia de aminoácidos definida en la SEC ID N° 75 de la misma se prepara realizando una PCR de 2 etapas, se inserta en un vector plasmídico y se clona en *E. coli*.

a) PCR de primera etapa

El fragmento de ADN LM6-F1 que codifica una secuencia señal de secreción y una parte de la región FRL₁ con un sitio de escisión para la enzima de restricción Hind III añadido al

extremo 5' se prepara en las siguientes condiciones. Los plásmidos molde, pHSGHM17 y pSRPDHH, se obtienen siguiendo la descripción de la solicitud de patente europea EP 0 909 816 A1.

5 Composición de la solución de reacción:

ADN del plásmido pHSGHM17, 25 ng
oligonucleótido cebador 7AL1P, 50 pmol
oligonucleótido cebador HKSPR13, 50 pmol
cóctel de dNTP, 5 μ l

10 tampón de PCR 10x, 5 μ l

ADN polimerasa ampliTa_q (PerkinElmer), 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 μ l añadiendo agua redestilada y se usa en PCR.

15 Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

20 El fragmento de ADN LM6-F2 que codifica una parte de FRL₁, CDRL₁, FRL₂, CDRL₂, FRL₃, CDRL₃, FRL₄ y una parte de la región constante se prepara en las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

ADN del plásmido pL28, 25 ng
oligonucleótido cebador MVF11, 50 pmol
oligonucleótido cebador MVR12, 50 pmol
cóctel de dNTP, 5 μ l
tampón de PCR 10x, 5 μ l

ADN polimerasa ampliTa_q, 2,5 unidades

30 La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 μ l añadiendo agua redestilada y se usa en PCR.

Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

El fragmento de ADN LM6-F3 que codifica una parte de FRL₄ y la región constante con un sitio de escisión para la enzima de restricción EcoR I añadido en el extremo 3' se prepara en las siguientes condiciones.

10 Composición de la solución de reacción:

ADN del plásmido pSRPDHH, 25 ng
oligonucleótido cebador MCF11, 50 pmol
oligonucleótido cebador 7ALCN, 50 pmol
cóctel de dNTP, 5 µl

15 tampón de PCR 10x, 5 µl

ADN polimerasa ampliTaq, 2,5 unidades

La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 µl añadiendo agua redestilada y se usa en PCR.

20 Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

25 Los fragmentos de ADN amplificados después de PCR se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%. El gel después de la electroforesis se tiñe con 1 µg/ml de bromuro de etidio para detectar el ADN producido en luz UV. Las bandas de ADN respectivas detectadas de este modo se escinden con una hoja de afeitar.

30

b) PCR de segunda etapa

El ADN LM6 en el que están fusionados los fragmentos de

ADN LM6-F1, LM6-F2, y LM6-F3 descritos anteriormente se prepara en las siguientes condiciones.

Composición de la solución de reacción:

5 fragmento de gel del ADN LM6-F1 preparado en la PCR de primera etapa,

 fragmento de gel del ADN LM6-F2 preparado en la PCR de primera etapa,

 fragmento de gel del ADN LM6-F3 preparado en la PCR de primera etapa,

10 oligonucleótido cebador 7AL1P, 50 pmol

 oligonucleótido cebador 7ALCN, 50 pmol

 cóctel de dNTP, 5,0 μ l

 tampón de PCR 10x, 5,0 μ l

 ADN polimerasa ampliTa_q, 2,5 unidades

15 La solución de reacción que tiene la composición anterior se ajusta a un volumen final de 50 μ l añadiendo agua redestilada y se usa en PCR.

 Condiciones térmicas de PCR: Calentamiento a 94°C durante 2 minutos, después de lo cual se repite 30 veces un
20 ciclo térmico de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguido de calentamiento a 72°C durante 10 minutos.

 El fragmento de ADN LM6 preparado de este modo se inserta en el plásmido pCR3.1DNA usando el kit de clonación
25 Eukaryotic TA (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante y se introduce en *E. coli* TOP10F' competente contenida en el kit. Las secuencias de nucleótidos de estos ADN que codifican la cadena ligera de TRA-8 humanizado se confirman por el método dideoxi usando un analizador de ADN.

30 Los plásmidos resultantes se denominan pCR3.1/LM6-1-16 (el plásmido que lleva el ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de TRA-8 de ratón y una región

constante de cadena ligera de Ig humana).

El plásmido pCR3.1/LM6-1-16 obtenido que contiene el fragmento de ADN LM6 se digiere con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

5 Se digiere un μg del ADN del plásmido de clonación pHSG399 con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y después se desfosforila con CIP. El ADN de pHSG399 desfosforilado resultante y el fragmento de ADN LM6, que se
10 había digerido con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, se ligan usando el kit de ligamiento de ADN Versión 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Después, se transforma *E. coli* DH5 α con el ADN ligado y se extiende en medio de agar LB que contiene IPTG 0,1 mM, X-Gal al 0,1% y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloranfenicol (concentraciones finales). Los transformantes
15 blancos obtenidos se cultivan en medio LB líquido que contiene 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloranfenicol, y se extrae el ADN plasmídico del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS. El ADN plasmídico extraído se digiere con Hind III y EcoR I, y después se selecciona un clon que lleva el
20 fragmento de ADN LM6 por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Como resultado del procedimiento anterior, se obtiene el plásmido pHSG/M6-1-4-1 que lleva un fragmento de fusión de la
25 región variable de la cadena ligera de TRA-8 de ratón y la región constante de la cadena Ig κ humana. La cepa de *E. coli* transformante que alberga este plásmido, denominada *E. coli* DH5 α /pHSG/M6-1-4-1 se depositó en el International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced
30 Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japón el 20 de abril de 2001, de acuerdo con el Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos, y se correspondió con el número de acceso

FERM BP-7566.

3) Construcción del plásmido pSR/LM6-1-4-6 (plásmido de expresión para la cadena ligera de LM6 TRA-8 tipo quimera)

El plásmido pHSG/LM6-1-4-1 obtenido que lleva un
5 fragmento de fusión de la región variable de la cadena ligera de TRA-8 de ratón y la región constante de la cadena Igκ humana se digiere con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I.

Se digiere un µg del ADN del plásmido de clonación
10 pSRPDHH con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, y después se desfosforila con CIP. El ADN de pSRPDHH desfosforilado resultante y el fragmento de ADN HindIII-EcoRI obtenido de pHSG/LM6-1-4-1 se ligan usando el kit de ligamiento de ADN Versión 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.).
15 Después, se transforma *E. coli* DH5α con el ADN ligado y se extiende en agar LB. Los transformantes obtenidos se cultivan en medio LB líquido que contiene 100 µg/ml de ampicilina, y se extrae el ADN plasmídico del cultivo resultante de acuerdo con el método alcalino-SDS. La inserción y orientación del
20 fragmento de ADN deseado en el vector se confirma por secuenciación de ADN usando un analizador de secuencia génica.

El plásmido de expresión resultante que lleva el ADNc que codifica la cadena ligera de TRA-8 (tipo quimera) se
25 denomina pSR/LM6-1-4-6.

(5) Producción de anticuerpo TRA-8 humanizado de varios tipos o quimérico

La transfección de células COS-7 se realiza por métodos con reactivo de transfección FUGENE6 (Boehringer Mannheim
30 Biochemica) de acuerdo con el manual de instrucciones proporcionado con el kit.

Las células COS-7 (American Type Culture Collection N°

CRL-1651) se cultivan hasta semi-confluyentes (3×10^6 células/placa) en una placa de cultivo (área de cultivo: 57 cm^2 ; Sumitomo Bakelite) que contiene medio de Eagle modificado por Dulbecco (a partir de ahora mencionado como "D-MED"; Gibco BRL) suplementado con suero de ternera fetal al 10% (a partir de ahora abreviado como "FCS"; Moredgate).

Mientras tanto, se mezclan $10 \text{ }\mu\text{g/placa}$ (5 placas en total) del ADN del plásmido de expresión de la cadena pesada humanizada contra DR5 (pHA15-1) y $10 \text{ }\mu\text{g/placa}$ del ADN del plásmido de expresión de la cadena ligera humanizada contra DR5 preparado por el método alcalino-SDS y centrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio, y después se precipitan con etanol, seguido de suspensión en $5 \text{ }\mu\text{l/placa}$ de dH_2O .

Después de mezclar $15 \text{ }\mu\text{l/placa}$ de reactivo de transfección FUGENE6 con $180 \text{ }\mu\text{l/placa}$ de D-MEM sin FCS, esta solución de FUGENE ($185 \text{ }\mu\text{l/placa}$) se mezcla con $5 \text{ }\mu\text{l/placa}$ de solución de ADN que contiene $10 \text{ }\mu\text{g/placa}$ del ADN del plásmido de expresión de la cadena pesada humanizada contra DR5 y $10 \text{ }\mu\text{g/placa}$ del ADN del plásmido de expresión de la cadena ligera humanizada contra DR5. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, la suspensión plasmídica obtenida ($200 \text{ }\mu\text{l}$) se añade a las placas COS-7 preparadas previamente. Después de incubar en CO_2 al 5% a 37°C durante 24 horas, se cambia el medio de cultivo con D-MEM sin FCS. Después de incubar en CO_2 al 5% a 37°C durante 72 horas, se recupera el sobrenadante de cultivo para purificar los productos de expresión en los fluidos sobrenadantes. Por el método que se ha descrito anteriormente, las células COS-7 se transfectan con cada una de las siguientes combinaciones plasmídicas:

(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)
- 5 (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 pM11-1 y pSR/LM6-1-4-6 (quimera)

El cultivo después se centrifuga (3.500 r.p.m., 15 minutos) y se recoge el sobrenadante. El sobrenadante se filtra con un filtro de 0,45 µm (ADVANTEC TOYO DISMIC-25cs, nº cat. 25CS045 AS). La purificación de IgG a partir de los filtrados se consigue usando cromatografía de afinidad en Proteína G-POROS (Applied Biosystems) en las siguientes condiciones:

HPLC: BioCAD 700E (Applied Biosystems)
 columna: cartucho de Proteína G-ID sensor
 (tamaño de columna: 2,1 mm ID x 30 mm LD, volumen de lecho: 0,1 ml; nº cat. 2-1002-00, Applied Biosystems)
 20 tampón de elución: Glicina-HCl 0,1 M (pH 2,5)
 tampón de neutralización: Tris-HCl 1 M (pH 8,5)
 detección: 280 nm
 caudal: 1 ml/min
 tamaño de fracción: 0,5 ml/0,5 min
 25 tubo de fracción: microtubo de polipropileno de 1,5 ml
 temperatura: 4°C

Después de aplicar todos los filtrados a la columna, se usan 50 ml de PBS (Sigma, nº cat. 1000-3) para lavar la columna. Cuando se aplica el tampón de elución, comienza la recogida de fracciones. Cada microtubo de fracción contenía previamente 55 µl de NaCl 1 M, 110 µl de tampón de neutralización y 74 µl de albúmina sérica bovina a 2 mg/ml

(Sigma, n° cat. A-7030) en PBS. Se recogen las fracciones N° 7 a N° 8.

La verificación de la expresión de los anticuerpos humanizados y el ensayo cuantitativo de los productos de
5 expresión en los fluidos del sobrenadante de cultivo preparados se realiza por ELISA con un anticuerpo anti-IgG humana.

A cada pocillo de una placa de 96 pocillos (MaxiSorp, Nunc), se añaden 100 µl de anticuerpo policlonal de cabra
10 anti-Fc de IgG humana específico (Kappel) disuelto a la concentración final de 0,5 µg/ml en tampón de adsorción (hidrogenocarbonato sódico 0,05 M, azida sódica al 0,02%, pH 9,6) y la placa se incuba a 37°C durante 2 horas para causar la adsorción del anticuerpo. Después, la placa se lava con
15 350 µl de PBS-T cinco veces. A los pocillos después del lavado, se añade sobrenadante de cultivo diluido con D-MEM que contiene FCS al 10% y se incuba a 37°C durante 2 horas. Después de lavar de nuevo con PBS-T, se añaden 100 µl de anticuerpo policlonal de cabra anti-Fc de IgG humana
20 específico marcado con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research Lab.) diluido 10.000 veces con PBS-T a cada pocillo y se incuba a 37°C durante 2 horas. Después de lavar de nuevo con PBS-T, se añade una solución de sustrato de fosfato de p-nitrofenilo obtenida del kit de sustrato de fosfatasa
25 alcalina (Bio Rad) de acuerdo con el manual de instrucciones proporcionado con el kit. Después de incubar a 37°C durante 0,5 a 1 hora, se mide la absorbancia a 405 nm. En los presentes experimentos, se usa inmunoglobulina G plasmática humana subclase 1 (IgG1) (Biopure AG) diluida con D-MEM que
30 contiene FCS al 10% para ciertas concentraciones como muestras de referencia de concentración de los anticuerpos humanizados contra DR5 contenidos en los fluidos de

sobrenadante de cultivo.

Como resultado, se detecta la expresión y los productos purificados en el sobrenadante de cultivo específicamente con el anticuerpo anti-IgG humana. La concentración final de anticuerpo IgG humano es de 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 la apoptosis del anticuerpo humanizado de varios tipos o del anticuerpo quimérico

Se usan células Jurkat (ATCC N° TIB-152) para examinar la actividad inductora de la apoptosis del anticuerpo TRA-8 humanizado purificado.

Se distribuyen células Jurkat cultivadas en medio RPMI1640 con FCS al 10% (Gibco BRL) a 37°C durante 3 días en presencia de CO₂ al 5% en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos (Sumitomo Bakelite) a 50 µl por pocillo. El TRA-8 humanizado preparado en este Ejemplo 26 se ajusta para que tenga la concentración del producto final de interés de 100 ng/ml con medio RPMI1640 que contiene FCS al 10% estimando 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 ajustada de este modo a 100 ng/ml se usa para producir diluciones en serie repitiendo la dilución seriada de factor 2 con RPMI1640 que contiene FCS al 10%. Cada una de las soluciones de TRA-8 humanizado diluido (H1L1, H2L2, H2L3, H2L4, H3L3, H3L4 o H4L5) se añade a cada pocillo a 50 µl por pocillo. Después de reaccionar a 37°C durante 12 horas, se añaden 50 µl de PMS 25 µM que contiene 1 mg/ml de XTT (concentraciones finales de 250 µg/ml para XTT y 5 µM para PMS). Después de incubar durante 3 horas, se mide la absorbancia a 450 nm de cada pocillo para calcular la

viabilidad celular usando la capacidad de reducción de las mitocondrias como índice.

La viabilidad de las células en cada pocillo se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

5
$$\text{Viabilidad (\%)} = 100 \times (a-b) / (c-b)$$

en la que "a" es la medición de un pocillo de ensayo, "b" es la medición de un pocillo sin células, y "c" es la medición de un pocillo sin anticuerpo añadido.

10 Como resultado, se demuestra que los anticuerpos humanizados ensayados inducen la apoptosis en células de la línea celular de linfoma T que expresa el antígeno DR5 humano.

Además, se examina la actividad inductora de la apoptosis de TRA-8 humanizado para PC-3 añadiendo taxol de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 25.

15 La línea celular de cáncer de próstata humano PC-3 (ATCC N° CRL-1435) se obtiene de la American Tissue Culture Collection (ATCC) y se mantiene en mezcla nutriente F-12K (21127-022, Gibco BRL) que contiene suero bovino fetal al 10% (FBS, Hyclone), L-glutamina-200 mM al 1% (25030-149, Gibco BRL) y solución de penicilina y estreptomicina al 0,5% (P-7539, Sigma). Se usa medio RPMI1640 (MED-008, IWAKI) suplementado con FBS al 10% y solución de penicilina y estreptomicina al 0,5% en el siguiente experimento. Se
20 recogen células PC-3 en crecimiento exponencial por tratamiento con tripsina y se lavan dos veces con medio fresco. Las células después se cuentan, se resuspenden en medio fresco a una densidad de 5×10^4 células/ml y se distribuyen por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo plano (3598, Corning-Coster) en un volumen total de 100
30 μ l/pocillo un día antes del inicio del experimento. Se diluye un fármaco anti-cáncer representativo, Paclitaxel (169-18611,

Wako) disuelto en dimetilsulfóxido (10 mg/ml) en medio fresco y después se añade a las placas de 96 pocillos que contienen las células a 50 µl/pocillo. Las concentraciones finales de dimetilsulfóxido son menores del 0,1%. Después de incubación
 5 durante 24 h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, se añade anticuerpo TRA-8 humanizado (H1L1, H2L2, H2L3, H2L4, H3L2, H3L3, H3L4 o H4L5) diluido en medio fresco a los pocillos. Después de incubación durante 24 h adicionales, se añaden 50 µl de medio esencial mínimo (11095-098, Gibco BRL) que
 10 contiene 1 mg/ml de XTT y PMS 25 mM a los pocillos y se incuban las placas durante 6 h. Después se mide la OD450 por el contador ARVO HTS 1420 Multilabel (Wallac Berthold) y se calcula la viabilidad celular del siguiente modo.

Viabilidad celular (%) = (OD450 para el pocillo que
 15 contiene células tratadas con Taxol y/o TRA-8 humanizado (agente(s)) - OD450 para el pocillo que no contiene ni células ni agente) x 100 / (OD450 para el pocillo que contiene células sin agente - OD450 para el pocillo que no contiene ni células ni agente)

20 Como resultado, se demuestra que los anticuerpos humanizados ensayados inducen la apoptosis en células de cáncer de próstata humano que expresan el antígeno DR5 humano.

25 **Ejemplo 27. Producción de anticuerpo contra DR4**

Se expresó una proteína de fusión que contenía el dominio extracelular de DR4 humano (a.a. 1-236) y la parte Fc de IgG1 humana en células Cos-7 transfectadas con un vector adenoviral recombinante. La proteína de fusión se purificó
 30 por columna de afinidad por proteína A. Se inmunizaron ratones Balb/c con la proteína de fusión purificada como se ha descrito anteriormente. Se subclonó tres veces un clon de

hibridoma, 2E12 (IgG1, κ), con unión específica a DR4 y la capacidad de inducir la apoptosis de células de linfoma B humano Ramos. La especificidad de unión de 2E12 se determinó por ELISA y análisis de transferencia de Western usando DR5, DcR1 y DcR2 humanos y proteína de fusión de IgG1 como antígenos de control. La unión de 2E12 a DR4 de superficie celular se determinó por análisis de citometría de flujo de células Cos-7 transfectadas con el ADNc de longitud completa que codifica DR4 human. La actividad inductora de la apoptosis se determinó incubando células Ramos con 1 μ g/ml de 2E12 en presencia de anticuerpo de cabra anti-IgG1 de ratón. La viabilidad celular se determinó por el ensayo de ATPLite como se ha descrito anteriormente.

15 **Ejemplo 28. Caracterización del anticuerpo contra DR4**

El anticuerpo monoclonal contra DR4 (2E12) es específico para DR4 humano ya que no se unía a otros receptores de TRAIL tales como DR5, DcR1 y DcR2 en ELISA (Figura 19a). 2E12 reconocía DR4 de superficie celular como se demuestra por el análisis de citometría de flujo de células Cos-7 transfectadas con DR4 (Figura 19b). 2E12 era capaz de inducir la apoptosis de células de linfoma Ramos en presencia de entrecruzamiento con un segundo anticuerpo de una forma dependiente de la dosis (Figura 19c). El tratamiento in vitro de células Ramos con 2E12 provocó una activación dependiente del tiempo de la caspasa 8, 9 y 3, y la escisión de PARP (Figura 19d). Estos resultados indican que 2E12 es un anticuerpo anti-DR4 agonista, que induce la apoptosis de una forma dependiente de caspasa.

30 Usando anticuerpo anti-DR4 (2E12), seguido de anticuerpo de cabra anti-IgG1 de ratón conjugado con PE y citometría de flujo, se demostró que el anticuerpo contra DR4 se unía a una

línea celular de fibrosarcoma (Hs 913T) y varias líneas celulares de cáncer de mama (2LMP. MDA-MB231, y MDA-MB 453), pero mostraba de poca a ninguna unión a una línea celular de fibroblastos cutáneos humanos normales (Malme-3).

5

Ejemplo 29. Actividad tumoricida de anticuerpos contra DR4

La actividad tumoricida de 2E12 se ensayó usando modelos tumorales de cáncer de mama. Se inoculó s.c. a ratones desnudos la línea celular de cáncer de mama humano, 2LMP. El
10 tratamiento con dosis i.p. de 200 µg de 2E12 sucedió en los días 7, 10, 14, 17, 21, y 24 después de la inyección de la célula tumoral. Los animales recibieron i.v. adriamicina (doxorubicina) (6 mg/kg) en los días 8, 12, y 16. El
15 tratamiento con 2E12 y adriamicina (Figura 20) produjo mayor inhibición del crecimiento tumoral que 2E12 o adriamicina solos.

La actividad tumoricida de TRA-8 en combinación con 2E12 se ensayó usando los mismos modelos tumorales de cáncer de mama. El tratamiento con dosis i.p. de 200 µg de TRA-8 y 2E12
20 sucedió en los días 7, 10, 14, 17, 21, y 24 después de la inyección de la célula tumoral. Los animales recibieron i.v. adriamicina (6 mg/kg) en los días 8, 12, y 16. El tratamiento con TRA-8 más 2E12, o TRA-8 más 2E12 y adriamicina produjo una regresión tumoral completa del 88% y el 100%,
25 respectivamente. (Figura 21.)

Ejemplo 30. Actividad tumoricida de anticuerpos contra DR4/DR5 en combinación con otras terapias**(1) Líneas celulares y reactivos**

30 El subclón 2LMP de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231, el subclón LCC6 de MDA-MB-435, y el subclón DY36T2 de MDA-MB-361 se obtuvieron del Dr. Marc

Lipmann (Georgetown University, Washington, D.C.) y se mantuvieron en MEM mejorado suplementado con FBS al 10% (Hyclone, Logan, UT). Las líneas celulares de cáncer de mama humano MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-468, BT-474, SK-BR-3, y
5 ZR-75-1 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células MDA-MB-231, MDA-MB-453, y MDA-MB-468 se cultivaron en DMEM suplementado con vitaminas MEM, aminoácidos no esenciales MEM, piruvato sódico 1 mM y FBS al 10%. Las células BT-474 se cultivaron en RPMI 1640
10 suplementado con 10 µg/ml de insulina, 4,5 g/l de glucosa, HEPES 10 mM, piruvato sódico 1 mM y FBS al 10%. Las células SK-BR-3 se cultivaron en medio de McCoy con FBS al 15%. Las células ZR-75-1 se cultivaron en medio F12K de Ham con FBS al 20%. Todas las líneas celulares se mantuvieron en medio libre
15 de antibióticos a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y se exploraron de forma rutinaria para contaminación por micoplasma.

El mAb TRA-8 (IgG1) purificado se produjo en UAB y también lo proporcionó Sankyo Co., Ltd. (Tokyo, Japón). El
20 anticuerpo de cabra anti-IgG1 de ratón conjugado con ficoeritrina y el anticuerpo de control de IgG1 específico de isotipo se obtuvieron de Southern Biotechnology Associates (Birmingham, AL). La adriamicina y el paclitaxel se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) y se
25 prepararon en forma de soluciones de reserva 10 mM en H₂O destilada o DMSO, respectivamente. Para estudios en animales, la formulación clínica de paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Co., Princeton, NJ) se obtuvo de la University of Alabama at Birmingham Hospital Pharmacy (Birmingham, AL). Esta
30 preparación se diluyó 1:5 en PBS inmediatamente antes de su uso.

(2) Análisis de inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo de la expresión de DR5

Se lavaron células en fase de crecimiento exponencial una vez con PBS de Dulbecco (deficiente en Ca^{2+} y Mg^{2+}) y se
5 recogieron con EDTA 4 mM/KCl al 0,5% a 37°C. Las células se recogieron por centrifugación a 4°C durante 5 min. a 1.000 r.p.m., se lavaron una vez y se resuspendieron en PBS que contenía BSA al 1% y azida sódica al 0,01% (tampón FACS) a 4°C. Las células se incubaron con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de TRA-8
10 purificado o un anticuerpo de control de IgG1 específico de isotipo durante 60 min. a 4°C, se lavaron una vez con tampón, después se incubaron con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo de cabra anti-IgG1 de ratón conjugado con PE durante 20 min. a 4°C. Después de la tinción con anticuerpo, las células se lavaron
15 una vez con tampón FACS y se fijaron en paraformaldehído al 1% durante 15 min. en hielo. Las muestras se analizaron en un Becton Dickinson FACScan (San José, CA) y los datos se analizaron usando el software CellQuest.

(3) Ensayos de viabilidad celular usando ATPLite

20 Las células se trataron con tripsina y se resuspendieron en medio de cultivo completo. Se sembraron mil células por pocillo en placas negras de 96 pocillos ópticamente transparentes (Costar N° 3904, Corning, NY) y se incubaron durante una noche a 37°C antes de iniciar los tratamientos.
25 Los fármacos y el anticuerpo se diluyeron en medio de cultivo inmediatamente antes de su uso, y la concentración final de DMSO fue siempre $\leq 0,001\%$. La viabilidad celular se evaluó después de 24 horas de exposición a TRA-8 solo. Para tratamientos de combinación con fármacos citotóxicos, las
30 células se pre-trataron con el fármaco durante 24 horas antes de añadir el anticuerpo, y se incubaron durante 24 horas adicionales antes de evaluar la viabilidad celular por

medición de los niveles celulares de ATP usando el ensayo basado en luminiscencia ATPLite (Packard Instruments, Meriden, CT). Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante con la excepción de que se redujeron todos los volúmenes de reacción (medio de cultivo y reactivos) a la mitad. Todas las muestras se ensayaron por triplicado y se presentan como la media $\pm$ SE de un mínimo de 3 experimentos independientes.

(4) Estudios de terapia con TRA-8 solo o en combinación con quimioterapia o radiación en ratones desnudos atímicos que albergan xenoinjertos de cáncer de mama

A ratones desnudos atímicos se les inyectó s.c. 3×10^7 células 2LMP. A los 7 días después de la inyección de la célula tumoral, se administraron 200 ó 600 μg (10 ó 30 mg/kg) de TRA-8 e i.p. seguido de cinco inyecciones adicionales en los días 10, 14, 17, 21, y 24. Se controló el crecimiento de los tumores en el tiempo. En posteriores estudios, a los animales que albergaban tumores s.c. 2LMP se les inyectó i.p. 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., días 8, 12, y 16) o paclitaxel (20 mg/kg i.p., en los días 8, 12, 16, 20, y 24). Se determinó el tamaño del tumor y las tasas de regresión. Además, se realizó un estudio con TRA-8 y adriamicina usando el mismo régimen descrito anteriormente en combinación irradiación 3 Gy⁶⁰Co de xenoinjertos 2LMP en los días 9 y 17.

(5) Análisis de la apoptosis en xenoinjertos

A ratones desnudos atímicos a los que se les inyectó s.c. 3×10^7 células 2LMP en el día 0, recibieron 100 μg de TRA-8 i.p. en los días 7 y 10. Grupos de 2 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 programa. Un grupo de ratones no se trató. Los xenoinjertos se diseccionaron para el estudio de apoptosis en el día 14 después de la inyección de la célula tumoral. La razón para la reducción sustancial en la intensidad del tratamiento en comparación con el protocolo de tratamiento convencional fue permitir un tejido tumoral adecuado para el análisis en el día 14. El ensayo Tunel para la apoptosis en xenoinjertos tumorales se realizó del siguiente modo. Se montaron secciones de parafina de cinco micrómetros de tejido en portaobjetos Superfrost/Plus y se calentaron a 58°C durante 1 h. Las secciones tisulares se desparafinizaron en tres cambios de xileno y se rehidrataron con un cambio de etanol absoluto, etanol al 95%, y etanol al 70%, cada uno en incrementos de 5 minutos. Después, las secciones se sembraron en solución salina tamponada con Tris (base Tris 0,5 M, NaCl 0,15 M, Triton X-100 al 0,0002%, pH 7,6). Los núcleos apoptóticos se detectaron usando un kit Apop Tag Peroxidase (Intergen, Purchase, NY). Se añadió proteinasa K (20 µg/ml en H₂O desionizada destilada) a las muestras tisulares y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Las peroxidasas endógenas se inactivaron con una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 min. Las secciones se trataron con un tampón de equilibrio durante 30 min. y después se incubaron con TdT/enzima (diluido en mezcla de reacción de marcaje) durante 1 h a 37°C usando cubreobjetos de parafilm. Durante esta incubación, la enzima TdT se une a los extremos 3'-OH de los fragmentos de ADN y cataliza la adicción de desoxinucleótidos marcados digoxigenina y no marcados. Los controles negativos se incubaron con H₂O destilada (diluida en mezcla de reacción de marcaje) en lugar de la enzima TdT. Se añadió un tampón de detención durante 10

min. a temperatura ambiente para terminar la reacción de marcaje. Se añadió un conjugado anti-digoxigenina a cada portaobjeto durante 30 min. Se usó el cromágeno 3,3' DAB para visualizar el extremo 3' OH marcado de los fragmentos de ADN.

5 Después se aclararon los portaobjetos en agua desionizada y se tiñeron ligeramente con tinte de contraste con hematoxilina, se deshidrataron usando alcoholes graduados y xileno y se cubrieron usando Permount. Se evaluaron aproximadamente 10 campos aleatorios para el porcentaje de

10 cuerpos apoptóticos teñidos con Tunel y el porcentaje de cuerpos apoptóticos teñidos intensamente en todo el tejido.

6) Análisis estadístico

(A) Análisis de la interacción de TRA-8 con citotoxicidad de fármacos in vitro

15 Se evaluaron los datos de citotoxicidad para evaluar si los efectos citotóxicos de combinación eran aditivos, menos que aditivos (antagónicos), o más que aditivos (sinérgicos). Las relaciones de respuesta a dosis para los agentes solos o en combinación se modelaron usando un modelo superficial de

20 respuesta de segundo orden con términos lineales, cuadráticos y de interacción para cada una de las 9 líneas celulares (Montgomery, D.C. Design and Analysis of Experiments, Nueva York: Wiley, 2001), como se recomienda por Gennings (On Testing for Drug/Chemical Interactions: Definitions and

25 Inference, pág. 457-468, 2000). Un término de interacción significativo se clasificó como sinérgico o antagónico dependiendo de si el término de interacción era negativo con más que citotoxicidad aditiva, o positivo con menos que citotoxicidad negativa. Si el término de interacción no era

30 significativo, entonces la relación entre TRA-8 y adriamicina o TRA-8 y paclitaxel se consideraría aditiva, con la condición de que los términos aditivos fueran significativos.

(B) Análisis de TRA-8, quimioterapia, radiación y terapia de combinación de experimentos en animales individuales

Se analizaron los datos de 6 experimentos independientes por un experimento individual. Las combinaciones de tratamiento se compararon con respecto a la eficacia antitumoral in vivo, es decir, la inhibición del crecimiento tumoral, que se midió según tres puntos finales: extensión de los tiempos de duplicación tumoral, el porcentaje de regresiones tumorales, y las tasas de crecimiento en el tiempo. La cantidad real de días en la que el tumor se duplicaba en área superficial (producto de dos diámetros) con relación a la medida inicial en el día 7 después de la inyección de la célula tumoral se usó en el análisis del tiempo de duplicación. Se usó el ensayo no paramétrico de Kruskal-Wallis para comparaciones del tiempo medio de duplicación tumoral entre tratamientos. Se usó el ensayo exacto de Fisher para comparar las proporciones de las regresiones tumorales y las regresiones sin recaída entre los grupos de tratamiento. Para determinar si alguna terapia de combinación producía inhibición sinérgica significativa del crecimiento tumoral, es decir, más que aditiva, se compararon las curvas de crecimiento a partir de las mediciones de área en serie usando un enfoque de modelo mixto lineal sobre las 3 primeras semanas después del inicio de la terapia (Lindsey, J.K. Models for Repeated Measurements, pág. 100-142, Oxford, 1993). Para ensayar los efectos sinérgicos de las terapias de combinación, se incluyó un término de interacción en el modelo. Si el término de interacción era significativo y el efecto era inhibición del crecimiento a una velocidad mayor que aditiva entonces la interacción se consideraba sinérgica.

(C) Análisis de agregación de los efectos de la terapia

Se incluyó un total de 166 animales, 10 grupos de tratamiento, y 6 experimentos independientes en el análisis de agregación. Las combinaciones de tratamiento se compararon con respecto a la eficacia antitumoral in vivo. Se analizaron los tiempos medios de duplicación tumoral usando el ensayo de Kruskal-Wallis y el ensayo exacto de Fisher para comparar las proporciones de las regresiones tumorales y las regresiones sin recaída entre los grupos de tratamiento.

Todos los análisis estadísticos se realizaron 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 TRA-8 en líneas celulares de cáncer de mama

Como se ilustra en la Figura 22A, las nueve líneas celulares de cáncer de mama eran DR5 positivas con grados variables de expresión de fuertemente positivas (LCC6 y MDA-MB-453) a débilmente positivas (MDA-MB-468 y SK-BR-3). La Figura 22B ilustra la citotoxicidad inducida por TRA-8 de las nueve líneas celulares. Cuatro líneas celulares eran sensibles a citotoxicidad inducida por TRA-8 con concentraciones de IC₅₀ de 17 a 299 ng/ml (LCC6, 2LMP, MDA-MB-231, MDA-MB-468), mientras que otras eran bastante resistentes (DY36T2, BT-474, MDA-MB-453). No hubo buena correlación de la expresión de DR5 y el grado de citotoxicidad inducida por TRA-8 como se ilustra por las líneas celulares MDA-MB-453 y MDA-MB-468.

Después se examinaron los efectos de TRA-8 sobre la citotoxicidad inducida por quimioterapia con adriamicina (Figura 23A) y paclitaxel (Figura 23B). Un análisis para ensayar la interacción entre el anticuerpo y los efectos del fármaco se resume en la Tabla 5. No hubo interacciones

sinérgicas significativas entre TRA-8 y paclitaxel, siendo la mayoría de las interacciones aditivas. Cuatro de las nueve líneas celulares cumplieron los criterios para una interacción sinérgica entre TRA-8 y adriamicina. La línea celular 2LMP mostró buena sensibilidad a TRA-8, así como sensibilidad a adriamicina o paclitaxel. Esta línea celular se eligió para explorar la eficacia in vivo del anticuerpo y/o fármacos.

Tabla 5. Efectos de Interacción <i>In Vitro</i> para Tratamientos de Combinación				
		TRA-8 + Adriamicina		TRA-8 + Paclitaxel
Línea Celular	Interacción	Valor-p^a	Interacción	Valor-p^a
LCC6	Sinérgica	<0,001	Aditiva	0,624
MDA-MB-453	Sinérgica	<0,001	Sin	0,615
			respuestac	
2LMP	Aditiva	0,153	Aditiva	0,937
MDA-MB-231	Aditiva	0,663	Aditiva	0,064
BT-474	Sinérgica	<0,001	ND ^b	0,992
ZR-75-1	Sinérgica	0,013	Aditiva	0,172
DY36T2	ND ^b	0,808	ND ^b	0,798
MDA-MB-468	Aditiva	0,184	Aditiva	0,724
SK-BR-3	Aditiva	0,361	Sin	0,871
			respuesta^c	

^avalor p se refiere a la significancia del término de interacción sinérgica. Si los efectos tanto de TRA-8 como del fármaco eran significativos y el término de interacción era significativo, entonces los efectos de combinación se consideraban sinérgicos. Si el valor-p de la interacción no es < 0,05, entonces los efectos de combinación se consideraban aditivos.

^bNo determinado porque el efecto de TRA-8 no era significativo, pero el efecto de adriamicina/paclitaxel era

significativo.

^cNo hubo respuesta a dosis significativa para ningún agente.

5 **(7) Efectos antitumorales in vivo de TRA-8 solo o en
combinación con quimioterapia y/o radiación**

TRA-8 a dosis de 200 µg y 600 µg dos veces a la semana para 6 dosis produjo una inhibición similar del crecimiento tumoral para los tumores 2LMP s.c. bien establecidos (Figura 10 24). En tres experimentos independientes adicionales, la dosis/programa de 200 µg produjo una inhibición estadísticamente significativa del crecimiento tumoral ($p < 0,004$, ensayo de Kruskal-Wallis sobre los tiempos de duplicación tumoral) en comparación con controles no tratados 15 y esta dosis y programa se seleccionaron para estudios adicionales. La Figura 25 ilustra los efectos de TRA-8, adriamicina o una combinación de TRA-8 y adriamicina sobre la eficacia antitumoral. En comparación con los controles no tratados, la terapia con TRA-8 solo o TRA-8 más adriamicina 20 produjo inhibición significativa del crecimiento tumoral ($p = 0,002$ ensayo de Kruskal-Wallis), mientras que la adriamicina no difería de los controles. La combinación de TRA-8 más adriamicina produjo mayor inhibición del crecimiento que cualquier agente solo ($p = 0,002$), así como 25 regresiones significativamente más completas del tumor (cuatro) que cualquier agente solo donde no se observaron regresiones completas ($p < 0,001$, ensayo exacto de Fisher). Se evaluó la sinergia in vivo entre TRA-8 y adriamicina usando un análisis de curvas de crecimiento temprano. El término de 30 interacción fue significativo ($p < 0,001$) y sinérgico. La interacción sinérgica se corroboró en un segundo experimento independiente.

Se estudiaron los efectos de TRA-8 y paclitaxel en este mismo modelo con observaciones similares (Figura 26). En comparación con los controles no tratados, TRA-8 y TRA-8 más paclitaxel produjeron inhibición significativa del crecimiento tumoral ($p < 0,001$, ensayo de Kruskal-Wallis). El crecimiento tumoral en animales tratados con TRA-8 más paclitaxel fue significativamente diferente que con paclitaxel solo ($p = 0,008$) y produjo 3/8 regresiones completas en comparación con ninguno para cualquier agente solo. El análisis de las curvas de crecimiento tumoral temprano demostró que el efecto sinérgico era casi significativo ($p = 0,063$) mientras que los efectos aditivos eran significativos ($p < 0,001$).

Finalmente, se analizaron los efectos de TRA-8, adriamicina, y radiación con ^{60}Co como agentes individuales y en diversas combinaciones como se ilustra en la Figura 27. Hubo diferencias significativas globales con respecto a los tiempos de duplicación tumoral ($p < 0,001$) y comparaciones múltiples indicaron que la terapia triple con TRA-8, adriamicina, y ^{60}Co produjo una inhibición del crecimiento tumoral que era significativamente diferente de todos los otros grupos tratados, mientras que ambos grupos de terapia dual (adriamicina más TRA-8 o ^{60}Co más TRA-8) eran diferentes a cualquier grupo de agente individual ($p < 0,001$). Los animales tratados solamente con radiación de ^{60}Co no difirieron de los controles no tratados ($p = 0,926$). Todas las combinaciones de tratamiento de dos vías tuvieron efectos sinérgicos significativos ($p < 0,001$). Se observaron regresiones completas en 6/8 animales que recibieron terapia triple y 4 animales no tuvieron recurrencia tumoral durante los 180 días de seguimiento.

(8) Análisis de agregación de los efectos de la terapia

Los estudios anti-tumorales in vivo estaban compuestos por 166 animales, y se analizaron los tiempos de duplicación tumoral y la frecuencia de la regresión tumoral completa para todos los animales de cada grupo de tratamiento (Tabla 6). El análisis ANOVA para los tiempos medios de duplicación tumoral indicó diferencias significativas entre los grupos de tratamiento ($p < 0,001$), con múltiples comparaciones que indican que TRA-8 + paclitaxel, TRA-8 + adriamicina, y TRA-8 + adriamicina + ^{60}Co tenían tiempos medios de duplicación tumoral significativamente más largos que cualquier grupo de tratamiento que carezca de TRA-8. La adicción de TRA-8 a cualquier modalidad de tratamiento produjo un tiempo de duplicación tumoral más largo que cualquiera de las modalidades solas. Asimismo, el ensayo de Kruskal-Wallis sobre el tiempo medio para la duplicación tumoral indicó que las medias eran significativamente diferentes globalmente ($p < 0,001$). Las comparaciones por pares usando el ensayo de rango marcado de Wilcoxin produjeron patrones similares para el tiempo medio para la duplicación tumoral como las comparaciones ANOVA múltiples. Éste análisis subestima la inhibición del crecimiento producida por los tratamientos más eficaces ya que los grupos que no alcanzaron una duplicación tumoral al final del experimento se relegaron al día de terminación del experimento. La Tabla 6 también proporciona la frecuencia de regresión completa del tumor y la frecuencia de persistencia de esa regresión hasta el final del experimento. No se observaron regresiones completas del tumor en animales tratados con cualquier régimen de quimioterapia o radiación fehacientes del crecimiento tumoral bien establecido y la agresividad del tumor. A partir del ensayo exacto de Fisher, no hubo diferencias significativas en la

frecuencia de las regresiones completas del tumor entre los grupos de tratamiento ($p < 0,001$). Treinta de los 166 animales consiguieron una regresión completa, y 28 de éstos recibieron TRA-8 solo o en combinación con otras modalidades. Existió

5 regresión completa en 1/42 animales de control; 1/54 animales que recibieron quimioterapia, radiación o una combinación; y 26/68 de TRA-8 solo o regímenes de combinación con TRA-8. Los grupos tratados con TRA-8 tuvieron una frecuencia significativamente ($p < 0,001$) mayor de regresión completa.

10 Asimismo, 14/68 animales que recibieron TRA-8 o combinaciones de TRA-8 no tuvieron recrecimiento tumoral en comparación con 1/42 animales de control y 0/52 animales tratados con quimioterapia y/o radiación. Las regresiones sin recaída tuvieron periodos de observación de 99 a 171 días (146 ± 24

15 días).

Tabla 2. Resultados de Agregación del Tiempo de Duplicación y la Regresión Completa de Tumores 2LMP

5	Tratamiento	N° de Animales	Tiempo de Duplicación del Tumor (días) (media/mediana)	Regresiones Completas			Periodo Medio de Observación (días)	
				Total (%)	Sin recaída (%)			
10	Controles	44 (42) ^a	12/8	1	1 (2%)		177	
	No Tratados			(2%)				
	TRA-8		30 (26)	47/23	6 (20%)	5	159	-
						(17%)		-
	TRA-8 + ⁶⁰ Co		8 (8)	65/50	3 (38%)	- 1	186	-
15						(13%)		-
	TRA-8 + Paclitaxel		8 (8)	71/62	3 (38%)	1	148	-
						(13%)		-
	TRA-8 + Adriamicina		14 (12)	81/64	10	3	185	
					(71%)	(21%)		
20	TRA-8 + Adriamicina + ⁶⁰ Co		8 (6)	>140/179	6 (75%)	4	192	
						(50%)		

^a Los números entre paréntesis son la cantidad de animales no censurados.

25

(9) Apoptosis en tumores tratados

Se evaluó la inducción de la apoptosis en xenoinjertos 2LMP después del tratamiento con TRA-8, adriamicina, paclitaxel, TRA-8 + adriamicina, y TRA-8 + paclitaxel usando la técnica TUNEL. En animales no tratados, los tumores tuvieron un 4% de células teñidas (intensidad del 1%), mientras que el tratamiento con adriamicina o paclitaxel tuvo un 8% (intensidad del 6%) y un 7% (intensidad del 2%) de

30

células teñidas. Los animales tratados con TRA-8 solo tuvieron una apoptosis notable con un 25% (intensidad del 15%) de células teñidas. TRA-8 más adriamicina tuvo un 28% (intensidad del 22%) y TRA-8 más paclitaxel tuvo un 26% (intensidad del 12%) de células teñidas.

Referencias

1. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP,
10 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,
15 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
20 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
- 25 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
30 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
- 5 **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.
- 10 **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.
- 15 **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
- 20 **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
- 25 **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
- 30 **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
- 5 **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
- 10 **40.** Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan, Gray CL, Bake 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
- 15 **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.
- 20 **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. 189:1-1896.
- 25 **46.** Miiller-Ladner U, Gay RE, and Gay S, 1997 Arthritis and allied conditions, a textbook of rheumatology, 13th edition, Volume 1, 243-254.

30

LISTA DE SECUENCIAS

<110>The UAB Research Foundation

Zhou, Tong

Ichikawa, Kimihisa
Kimberly, Robert P.
Koopman, William J.
Oshumi, Jun
5 LoBuglio, Albert S.
Buchsbaum, Donald J.

<120> COMBINACIONES DE ANTICUERPOS SELECTIVOS PARA UN
RECEPTOR DE LIGANDO INDUCTOR DE APOPTOSIS RELACIONADO CON EL
10 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL Y OTROS AGENTES TERAPÉUTICOS

<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> ADN

<213> construcción sintética

221

<400> 1
gacgatgccc gatctacttt aaggg

25

<210> 2

<211> 22

<212> ADN

<213> construcción sintética

<400> 2
ccactgggtg atgttgatg gg

22

<210> 3

5 <211> 24

<212> ADN

<213> construcción sintética

<400> 3
ggatccgtgg acacattcga tgtc

24

<210> 4

<211> 20

10 <212> PRT

<213> construcción sintética

<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

222

<213> construcción sintética

<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> ADN

5 <213> construcción sintética

<400> 6

cagcactgaa cacggacccc

20

<210> 7

<211> 20

<212> ADN

<213> construcción sintética

10

<400> 7

aaaggtaatt tattgagaag

20

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> construcción sintética

<400> 8

cctcaccatg aacttcgggc

20

<210> 9

<211> 20

15

<212> ADN

223

<213> construcción sintética

<400> 9
ctgttgatg cacatgagac

20

<210> 10

<211> 20

<212> ADN

5 <213> construcción sintética

<400> 10
gaagtgatgc tggaggagtc

20

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

<213> construcción sintética

10

<400> 11
agtgtgaagt gatgctggtg

20

<210> 12

<211> 21

<212> ADN

15 <213> construcción sintética

<400> 12
tttaccagga gaggggaga g

21

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

224

<213> construcción sintética

<400> 13
tgcagagaca gtgaccagag

20

<210> 14

<211> 20

<212> ADN

5 <213> construcción sintética

<400> 14
tgttcaggac cagcatgggc

20

<210> 15

<211> 20

<212> ADN

10 <213> construcción sintética

<400> 15
aagacatttt ggattctaac

20

<210> 16

<211> 20

<212> ADN

<213> construcción sintética

15

<400> 16
tatcatgaag tctttgtatg

20

<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> construcción sintética

225

	<400> 17		
	gatggagaca cattctcagg		20
	<210> 18		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		
	<400> 18		
	gacattgtga tgaccagtc		20
	<210> 19		
5	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		
	<400> 19		
	ttaacactca ttcctgttga		20
	<210> 20		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		
	<400> 20		
	gactgggtca tcacaatgtc		20
	<210> 21		
15	<211> 1386		
	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		

<400> 21
 atgaacttcg ggotcagctt gatttttcctt gtccttggtt taaaagggtg ccagtgtgaa 60
 gtgatgctgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gaggggccct gaaactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac ttccagtagc tatgtaatgt cttgggttcg ccagactccg 180
 gagaagaggc tggagtgggt cgcaaccatt agtagtggtg gtagttacac ctactatcca 240
 gacagtgtga agggggcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
 caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcaag acgggggggac 360
 tctatgatta cgacggacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctacagccaaa 420
 acgacacccc catctgtcta tccactggcc cctggatctg ctgccccaac taactccatg 480
 gtgaccctgg gatgcctggt caagggtat ttccctgagc cagtgcaggt gacctggaac 540
 tctggatccc tgtccagcgg tgtgcacacc ttccagctg tctgcagtc tgacctctac 600
 actctgagca gtcagtgc tgtcccctcc agcacctggc ccagcgagac cgtcacctgc 660
 aacgttgccc acccgccag cagcaccaag gtggacaaga aaattgtgcc cagggtattgt 720
 ggttgtaagc cttgcatatg tacagtcoca gaagtatcat ctgtcttcat cttcccccca 780
 aagcccaagg atgtgctcac cattactctg actcctaagg tcacgtgtgt tgtggtagac 840
 atcagcaagg atgatccga ggtccagttc agctggtttg tagatgatgt ggaggtagac 900
 acagctcaga cgcaaccccg ggaggagcag ttcaacagca cttccgctc agtcagttaa 960
 cttcccatca tgcaccagga ctggctcaat ggcaaggagt tcaaatgcag ggtcaacagt 1020
 gcagctttcc ctgccccat 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
 5 <211> 705
 <212> ADN
 <213> construcción sintética

```

<400> 22
atgaagtctt tgtatgtgtt agtgtataca cattatctgt ttctgtttgc aggtgttgaa      60
ggagacattg tgatgacca gtctacaaa ttcattgtcca catcagtagg agacagggtc      120
agcatcacct gcaaggccag tcaggatgtg ggtactgctg tagcctggta tcaacagaaa      180
ccagggaat ctctaaact actgatttac tgggcatcca cccggcacac tggagtccct      240
gatcgcttca caggcagtgg atctgggaca gatttcactc tcaccattag caatgtgcag      300
tctgaagact tggcagatta ttctgttcag caatatagca gctatcggac gttcgggtgga      360
ggcaccaagc tggaaatcaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca      420
tccagtgagc agttaacatc tggagggtgc 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> construcción sintética

```

<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

```

[illegible]

<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

231

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> construcción sintética

<400> 25

5 Ser Tyr Val Met Ser
1 5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

10 <213> construcción sintética

232

<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> construcción sintética

5

<400> 27

Arg	Gly	Asp	Ser	Met	Ile	Thr	Thr	Asp	Tyr
1				5					10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> construcción sintética

<400> 28

Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Gly	Thr	Ala	Val	Ala
1				5					10	

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

10 <213> construcción sintética

233

<400> 29

Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	His	Thr
1				5		

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> construcción sintética

<400> 30

Gln	Gln	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Arg	Thr
1				5			

<210> 31

<211> 119

<212> PRT

5 <213> construcción sintética

234

<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> ADN

<213> construcción sintética

<400> 32
 ttggataagc ttggcttgac ctcacatgg gatggagctg tatcatctc ttcttggtag 60
 caacagctac aggtgtccac 80

<210> 33

5 <211> 80

<212> ADN

<213> construcción sintética

235

	<400> 33		
	tctgaagtaa tgctggtgga gtctggggga ggcttagtac agcctggagg gtccctgaga	60	
	ctctcctgtg cagcctctgg	80	
	<210> 34		
	<211> 80		
	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		
	<400> 34		
	attcactttc agtagttatg taatgtcttg gggtcggcag gcaccaggga agggctctgga	60	
	gtgggttgca accattagta	80	
	<210> 35		
5	<211> 80		
	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		
	<400> 35		
	gtgggtggtag ttacacctac tatccagaca gtgtgaaggg ccgattcacc atctccagag	60	
	acaatgccaa gaacaccctg	80	
	<210> 36		
	<211> 80		
10	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		
	<400> 36		
	tatctgcaaa tgaacagtct gagagcagag gacacggctg tttattactg tgcaagaagg	60	
	ggtgactcta tgattacgac	80	
	<210> 37		
	<211> 64		

236

<212> ADN
 <213> construcción sintética

<400> 37
 ggactactgg ggccaaggga ccctgggtcac agtctcctca gcctccacca agggcccatc 60
 ggtc 64

<210> 38
 <211> 60

5

<212> ADN
 <213> construcción sintética

<400> 38
 ctaccaagaa gaggatgata cagctccatc ccatgggtgag gtcaagccaa gcttatccaa 60

<210> 39
 <211> 80

10

<212> ADN
 <213> construcción sintética

<400> 39
 tctcaggac cctccaggct gtactaagcc tccccagac tccaccagca ttacttcaga 60
 gtggacacct gtagctgttg 80

<210> 40
 <211> 80

15

<212> ADN
 <213> construcción sintética

<400> 40
 tccagaccct tccctggtgc ctgccgaacc caagacatta cataactact gaaagtgaat 60
 ccagaggctg cacaggagag 80

<210> 41

<211> 80

<212> ADN

<213> construcción sintética

5

<400> 41
 ctctggagat ggtgaatcgg cccttcacac tgtctggata gtaggtgtaa ctaccaccac 60
 tactaatggt tgcaaccac 80

<210> 42

<211> 80

<212> ADN

<213> construcción sintética

<400> 42
 ccttcttgca cagtaataaa cagccgtgtc ctctgctctc agactgttca ttgcagata 60
 caggggtgttc ttggcattgt 80

<210> 43

10

<211> 84

<212> ADN

<213> construcción sintética

<400> 43
 gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtgacc agggccctt ggccccagta 60
 gtccgtcgta atcatagagt cacc 84

<210> 44

<211> 20

238

<212> ADN
 <213> construcción sintética

<400> 44
 ttggataagc ttggcttgac 20

<210> 45

<211> 21

5 <212> ADN
 <213> construcción sintética

<400> 45
 gaccgatggg cccttggtgg a 21

<210> 46

<211> 213

<212> PRT

<213> construcción sintética

<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

- 5 <212> ADN
 <213> construcción sintética

240

	<400> 47		
	cccaagctta agaagcatcc tctcatctag ttct		34
	<210> 48		
	<211> 45		
	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		
	<400> 48		
	cccgaattct tactaacact ctccctggt gaagctcttt gtgac		45
	<210> 49		
5	<211> 60		
	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		
	<400> 49		
	gtcccccaca gatgcagaca aagaacttgg agattgggtc atcacaatgt caccagtgga		60
	<210> 50		
	<211> 48		
10	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		
	<400> 50		
	ccaagttctt tgtctgcac agtaggagac agggtcacca tcacctgc		48
	<210> 51		
	<211> 57		
15	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		

241

<400> 51
 agtgtgccgg gtggatgccc agtaaatcag tagtttagga gctttccctg gtttctg 57

<210> 52

<211> 48

<212> ADN

<213> construcción sintética

<400> 52
 tgggcatcca ccgggcacac tgggggtccca agcagggtta gtggcagt 48

<210> 53

<211> 63

5

<212> ADN

<213> construcción sintética

<400> 53
 ataactacta tattgctgac agtaataggt tgcaaaatcc tccggctgca gactagagat 60
 ggt 63

<210> 54

<211> 63

10

<212> ADN

<213> construcción sintética

<400> 54
 cagcaatata gcagctatcg gacgttcggt caaggcacca aggtggaaat caaacggact 60
 gtg 63

<210> 55

<211> 711

15

242

<212> ADN

<213> construcción sintética

```

<400> 55
atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt      60
gacattgtga tgaccaatc tccaagttct ttgtctgcat ctgtggggga cagggtcacc      120
atcacctgca aggccagtca ggatgtgggt actgctgtag cctggtatca acagaaacca      180
gggaaagctc cttaaactact gatttactgg gcattccacc ggcacactgg ggtccaagc      240
aggttttagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcaccctca ccatctctag tctgcagccg      300
gaggattttg caacctatta ctgtcagcaa tatagtagtt atcggacgtt cggccaaggc      360
accaaggtgg aatcaaacg gactgtgggt gcaccatctg tottcatctt 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 aagtcacca tcagggcctg      660
agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt agtaagaatt c              711

```

<210> 56

<211> 119

<212> PRT

5 <213> construcción sintética

243

<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> ADN

5 <213> construcción sintética

<400> 57

tctgaagtac agctggtgga gtctggggga ggcttagtac agcctggagg gtcctgaga 60
 ctctcctgtg cagcctctgg 80

<210> 58

<211> 80

<212> ADN

10 <213> construcción sintética

244

<400> 58
 tctcagggac cctccaggct gtactaagcc tccccagac tccaccagct gtacttcaga 60
 gtggacacct gtagctgttg 80

<210> 59

<211> 119

<212> PRT

<213> construcción sintética

<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

<400> 60

[illegible]

<210> 61

<211> 119

<212> PRT

5

<213> construcción sintética

246

<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> ADN

<213> construcción sintética

5

<400> 62
 tatctgcaaa tgagcagtct gagagcagag gacacggctg tttattactg tgcaagaagg 60
 ggtgactcta tgattacgac 80

<210> 63

<211> 80

<212> ADN

<213> construcción sintética

10

247

<400> 63
 ccttcttgca cagtaataaa cagccgtgtc ctctgtcttc agactgttca tttgcagata 60
 cagggtgttc ttggcattgt 80

<210> 64

<211> 80

<212> ADN

<213> construcción sintética

<400> 64
 attcactttc agtagttatg taatgtcttg ggttcggcag actccagaga agaggctgga 60
 gtgggttgca accattagta 80

<210> 65

<211> 80

5

<212> ADN

<213> construcción sintética

<400> 65
 tccagcctct tctctggagt ctgccgaacc caagacatta cataactact gaaagtgaat 60
 ccagaggctg cacaggagag 80

<210> 66

<211> 80

10

<212> ADN

<213> construcción sintética

<400> 66
 tctgaagtaa tgctggtgga gtctggggga ggcttagtaa agcctggagg gtcctgaaa 60
 ctctcctgtg cagcctctgg 80

<210> 67

<211> 80

248

<212> ADN
 <213> construcción sintética

<400> 67
 tatctgcaaa tgagcagtct gagatctgag gacacggcta tgtattactg tgcaagaagg 60
 ggtgactcta tgattacgac 80

<210> 68
 5 <211> 64
 <212> ADN
 <213> construcción sintética

<400> 68
 ggactactgg ggccaaggga ccactctcac agtctcctca gcctccacca agggcccatc 60
 ggtc 64

<210> 69
 <211> 80
 10 <212> ADN
 <213> construcción sintética

<400> 69
 ttccaggac cctccaggct ttactaagcc tccccagac tccaccagca ttacttcaga 60
 gtggacacct gtagctgttg 80

<210> 70
 <211> 80
 <212> ADN
 15 <213> construcción sintética

249

<400> 70
ccttcttgca cagtaataca tagcogtgte ctcagatctc agactgctca tttgcagata 60
caggggtgtc ttggcattgt 80

<210> 71

<211> 70

<212> ADN

<213> construcción sintética

<400> 71
gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtgaga gtggtcctt ggccccagta 60
gtccgtcgta 70

5

<210> 72

<211> 212

<212> PRT

<213> construcción sintética

250

<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> construcción sintética

251

<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> construcción sintética

<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> construcción sintética

<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

254

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> construcción sintética

255

<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

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

256

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> ADN

<213> construcción sintética

<400> 77
 gtccccaca gatgcagaca aagaacttgg agattgggtc atctgaatgt caccagtgga 60

<210> 78

<211> 65

<212> ADN

<213> construcción sintética

257

<400> 78
 atctagttct cagagatgga gacagacaca atcctgctat gggtgctgct gctctgggtt 60
 ccagg 65

<210> 79

<211> 69

<212> ADN

<213> construcción sintética

<400> 79
 cagcaccat agcaggattg tgtctgtctc catctctgag aactagatga gaggatgctt 60
 cttaagctt 69

<210> 80

5 <211> 67

<212> ADN

<213> construcción sintética

<400> 80
 ctccactggg gacattgtga tgacccaatc tccaagttct ttgtctgcat ctgtggggga 60
 cagggtc 67

<210> 81

<211> 54

10 <212> ADN

<213> construcción sintética

<400> 81
 acttgagat tgggtcatca caatgtcacc agtggagcct ggaaccaga gcag 54

<210> 82

<211> 67

<212> ADN

258

<213> construcción sintética

<400> 82
 accatcacct gcaaggccag tcaggatgtg ggtactgctg tagcctggta ccaacagaaa 60
 ccaggaa 67

<210> 83

<211> 72

<212> ADN

5 <213> construcción sintética

<400> 83
 tacagcagta cccacatcct gactggcctt gcaggtgatg gtgaccctgt cccccacaga 60
 tgcagacaaa ga 72

<210> 84

<211> 71

<212> ADN

<213> construcción sintética

10

<400> 84
 aagcacccaa actcctcctc tattgggcat ccaccggca cactggggtc ccagataggt 60
 ttacaggcag t 71

<210> 85

<211> 72

<212> ADN

<213> construcción sintética

259

	<400> 85		
	cccagtgtgc cgggtggatg cccaatagat gaggagtttg ggtgcttttc ctggttttctg	60	
	ttggtaccag gc	72	
5	<210> 86		
	<211> 63		
	<212>	ADN	
	<213>	construcción sintética	
	<400> 86		
	gggtctggga cagacttcac cctcaccatc tctagtctgc agccggagga ttttgcaacc	60	
	tat	63	
10	<210> 87		
	<211>	60	
	<212>	ADN	
	<213>	construcción sintética	
	<400> 87		
	actagagatg gtgaggggtga agtctgtccc agaccactg cctgtaaacc tatctgggac	60	
15	<210> 88		
	<211> 57		
	<212>	ADN	
	<213>	construcción sintética	
	<400> 88		
	tactgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttcggtcaag gcaccaaggt ggaaatc	57	
	<210> 89		
	<211> 57		
	<212>	ADN	
	<213>	construcción sintética	

260

	<400> 89		
	cgtcogatag ctgctatatt gctgacagta atagggtgca aaatcctccg gctgcac	57	
	<210> 90		
	<211> 51		
	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		
5			
	<400> 90		
	aaacggactg tggctgcacc atctgtcttc atcttcccgc catctgatga g	51	
	<210> 91		
	<211> 63		
	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		
	<400> 91		
	gaagatgaag acagatggtg cagccacagt ccgtttgatt tccaccttgg tgccttgacc	60	
	gaa	63	
	<210> 92		
10	<211> 57		
	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		
	<400> 92		
	ttctgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttccgtcaag gcaccaaggt ggaaatc	57	
	<210> 93		
	<211> 57		
15	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		

	<400> 93		
	cgctccgatag ctgctatatt gctgacagaa atagggtgca aaatcctccg gctgcag	57	
	<210> 94		
	<211> 63		
	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		
5			
	<400> 94		
	gggtctggga cagacttcac cctcaccatc tctagtctgc agccggagga ttttgcagat	60	
	tat	63	
	<210> 95		
	<211> 57		
	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		
	<400> 95		
	ttctgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttcggtggag gcaccaaggt ggaaatc	57	
	<210> 96		
10	<211> 57		
	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		
	<400> 96		
	cgctccgatag ctgctatatt gctgacagaa ataatctgca aaatcctccg gctgcag	57	
	<210> 97		
	<211> 51		
15	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		

262

	<400> 97		
	tgatgtggac atgaatttgt gagactgggt catcacaatg tcaccagtgg a		51
	<210> 98		
	<211> 51		
	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		
	<400> 98		
	tgggttcag gctccactgg tgacattgtg atgaccagct ctcaaaatt c		51
	<210> 99		
5	<211> 49		
	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		
	<400> 99		
	aagacagatg gtgcagccac agcccgtttg atttcagct tgggtgcctc		49
	<210> 100		
10	<211> 45		
	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		
	<400> 100		
	aagctggaaa tcaaacgggc tgtggctgca ccatotgtct tcate		45
	<210> 101		
	<211> 30		
15	<212> ADN		
	<213> construcción sintética		

263

<400> 101
agatttcaac tgctcatcag atggcgggaa 30

<210> 102

<211> 63

<212> ADN

<213> construcción sintética

<400> 102
gaagatgaag acagatgggtg cagccacagt ccgtttgatt tccaccttgg tgcctccacc 60

gaa 63

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para inducir selectivamente la apoptosis en células diana que expresan DR5, que comprende la etapas de
- 5 (a) poner en contacto las células diana con una cantidad terapéutica de un anticuerpo que se une específicamente al receptor DR5 de TRAIL, donde el anticuerpo es un anticuerpo que tiene la misma especificidad de epítipo que el hibridoma de ratón-ratón TRA-8 que tiene el número de acceso a la ATCC
- 10 PTA-1428, donde dicho anticuerpo, en su forma soluble, tiene actividad inductora de la apoptosis *in vivo* e *in vitro* en células diana que expresan DR5 y (b) poner en contacto las célula diana con una cantidad terapéutica de un anticuerpo que se une específicamente a un receptor DR4 de TRAIL, donde
- 15 el anticuerpo es un anticuerpo que tiene la misma especificidad de epítipo que el hibridoma de ratón-ratón 2E12 que tiene el número de acceso a la ATCC PTA-3798, donde dicho anticuerpo tiene actividad inductora de la apoptosis *in vivo* e *in vitro* en células diana que expresan DR4.
- 20
2. Composición que comprende una combinación de
- (a) una cantidad terapéutica de un anticuerpo que se une específicamente a un receptor DR5 de TRAIL, donde el anticuerpo es un anticuerpo que tiene la misma especificidad
- 25 de epítipo que el hibridoma de ratón-ratón TRA-8 que tiene el número de acceso a la ATCC PTA-1428, donde dicho anticuerpo, en su forma soluble, tiene actividad inductora de la apoptosis *in vivo* e *in vitro* en células diana que expresan DR5 y
- 30 (b) una cantidad terapéutica de un anticuerpo que se une específicamente a un receptor DR4 de TRAIL, donde el anticuerpo es un anticuerpo que tiene la misma especificidad de epítipo que el hibridoma de ratón-ratón 2E12 que tiene el

número de acceso a la ATCC PTA-3798, donde dicho anticuerpo tiene actividad inductora de la apoptosis *in vivo* e *in vitro* en células diana que expresan DR4 para su uso para inducir de forma selectiva la apoptosis en
5 células diana que expresan DR5 y DR4.

3. Composición de la reivindicación 2 que comprende, además, agentes terapéuticos.

10 4. Composición de la reivindicación 3, en la que el agente o agentes terapéuticos adicionales son miembros de la familia de TNF.

5. Composición de la reivindicación 4, en la que el miembro
15 o miembros de la familia de TNF son ligandos de CD40, o fragmentos o derivados de los mismos.

6. Composición de la reivindicación 4, en la que el miembro o miembros de la familia de TNF son ligandos de Fas, o
20 fragmentos o derivados de los mismos.

7. Composición de la reivindicación 3, en la que el agente o agentes terapéuticos adicionales son agentes anti-inflamatorios.
25

8. Composición de la reivindicación 7, en la que el agente o agentes anti-inflamatorios son agentes anti-inflamatorios no esteroideos.

30 9. Composición de la reivindicación 8, en la que los agentes anti-inflamatorios no esteroideos son inhibidores de COX-1 o inhibidores de COX-2.

10. Composición de la reivindicación 7, en la que el agente o agentes anti-inflamatorios son agentes anti-inflamatorios esteroideos.
- 5 11. Composición de la reivindicación 3, en la que el agente o agentes terapéuticos adicionales son agentes antivirales.
12. Composición de la reivindicación 3, en la que el agente o agentes terapéuticos adicionales son agentes anti-
10 retrovirales.
13. Composición de la reivindicación 3, en la que el agente o agentes terapéuticos adicionales son agentes anti-
15 oportunistas.
14. Composición de la reivindicación 3, en la que el agente o agentes terapéuticos adicionales son antibióticos.
15. Composición de la reivindicación 3, en la que el agente
20 o agentes terapéuticos adicionales son agentes inmunosupresores.
16. Composición de la reivindicación 3, en la que el agente o agentes terapéuticos adicionales son preparaciones de
25 inmunoglobulina.
17. Composición de la reivindicación 3, en la que el agente o agentes terapéuticos adicionales son agentes antimalariales.
30
18. Composición de la reivindicación 3, en la que el agente o agentes terapéuticos adicionales son fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad.

19. Composición de la reivindicación 3, en la que el agente o agentes terapéuticos adicionales son citoquinas.
20. Composición de la reivindicación 3, en la que el agente
5 o agentes terapéuticos adicionales son quimioquinas.
21. Composición de la reivindicación 3, en la que el agente o agentes terapéuticos adicionales son factores de crecimiento.
- 10 22. Composición de la reivindicación 3, en la que el agente terapéutico adicional es un compuesto inductor de la apoptosis y en la que el compuesto inductor de la apoptosis es SN-50 o LY294002.
- 15 23. Composición de la reivindicación 2, en la que la célula diana es una célula sinovial de proliferación anormal.
24. Composición de la reivindicación 23, en la que la célula
20 sinovial es una célula sinovial de artritis reumatoide.
25. Composición de la reivindicación 2, en la que la célula diana es una célula inmune activada.
- 25 26. Composición de la reivindicación 25, en la que la célula inmune activada es un linfocito activado.
27. Composición de la reivindicación 2, en la que la célula
diana es un neutrófilo.
- 30 28. Composición de la reivindicación 2, en la que la célula diana es una célula infectada por virus.

29. Composición de la reivindicación 2, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30. Método de la reivindicación 1 o composición de la
5 reivindicación 2, en la que el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado.

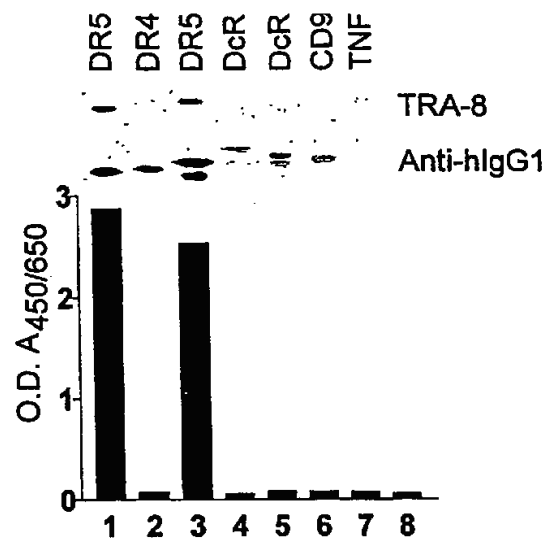


FIG.1A



FIG.1D

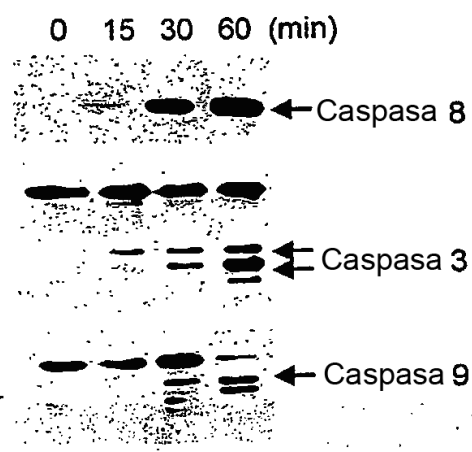
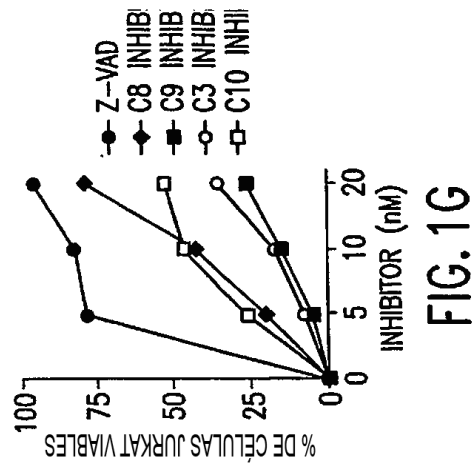
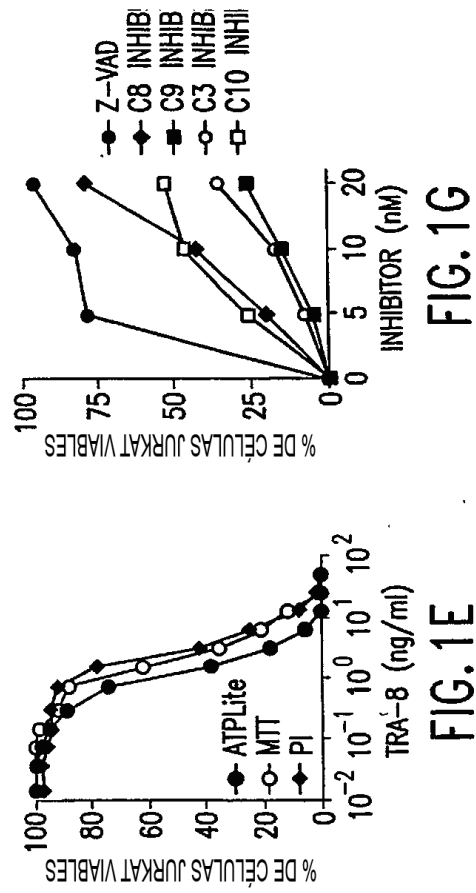
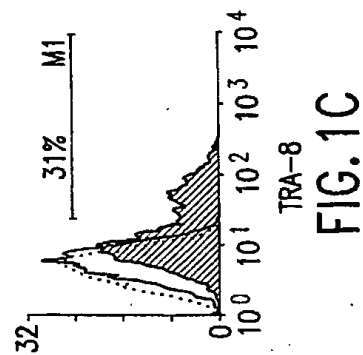
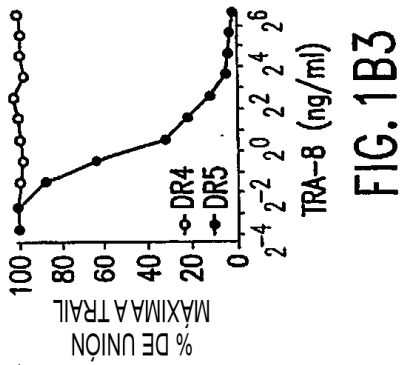
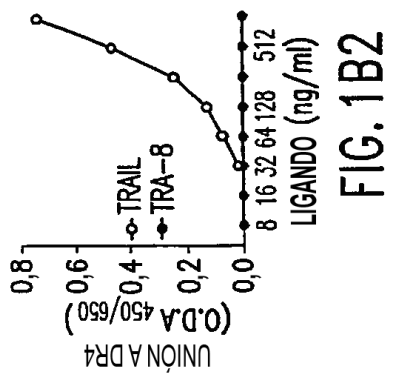
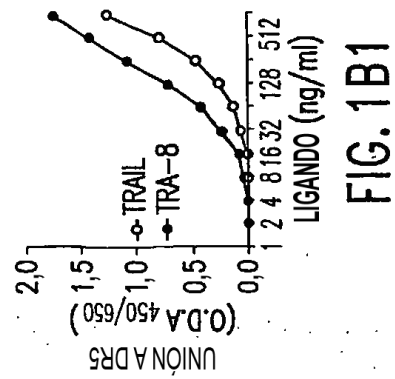


FIG 1F



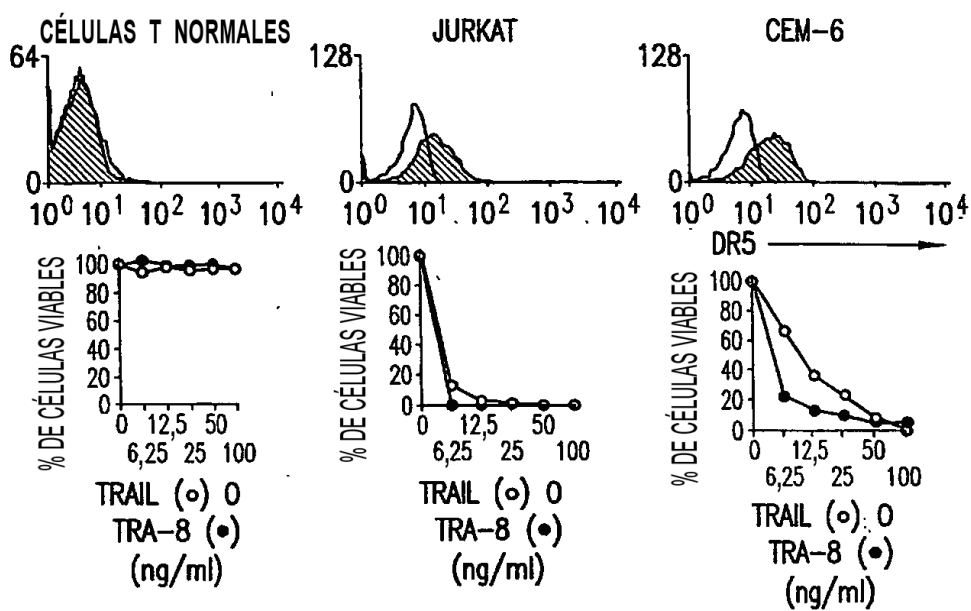


FIG. 2A1

FIG. 2A2

FIG. 2A3

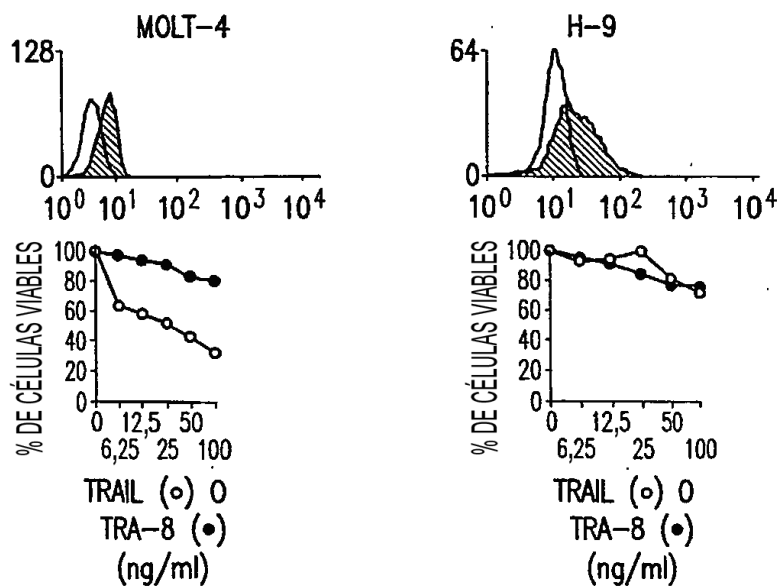


FIG. 2A4

FIG. 2A5

CÉLULAS DE GLIOMAS

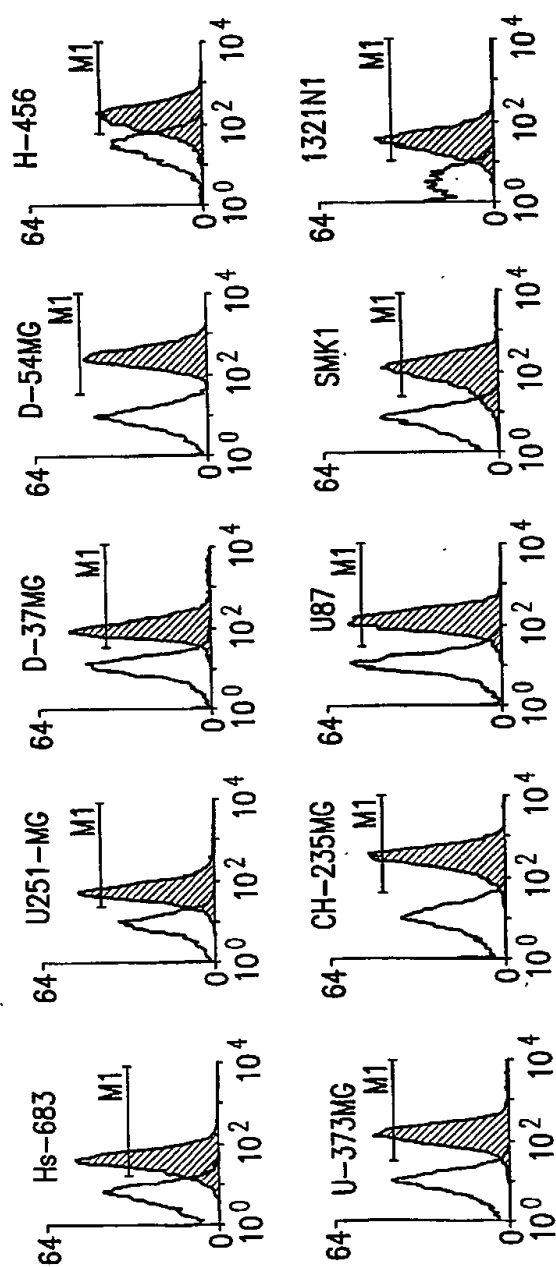
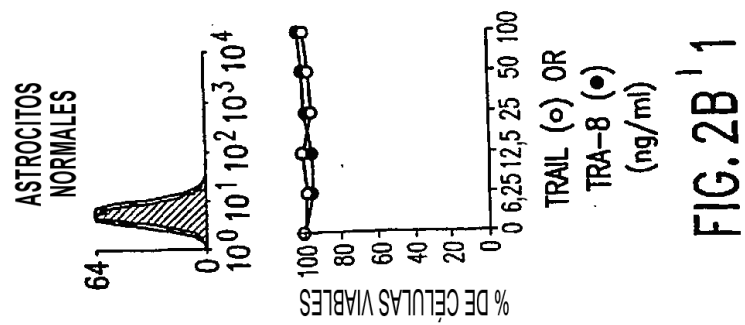
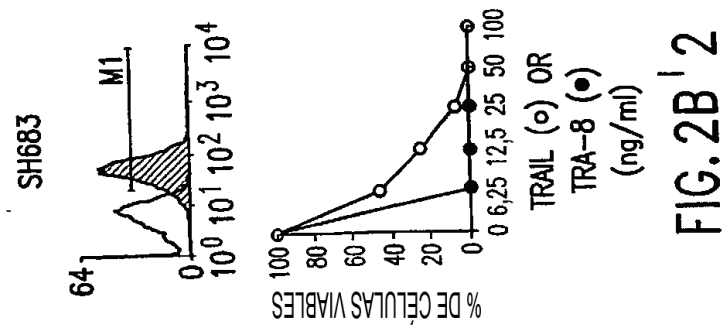
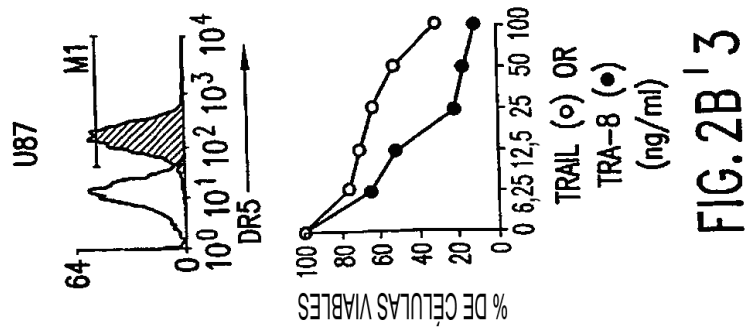


FIG. 2B



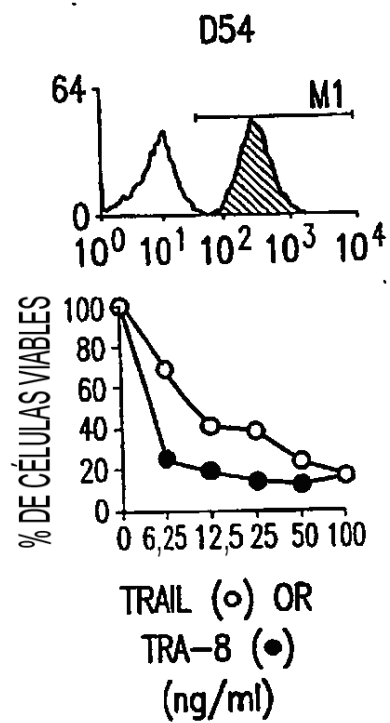


FIG. 2B¹ 4

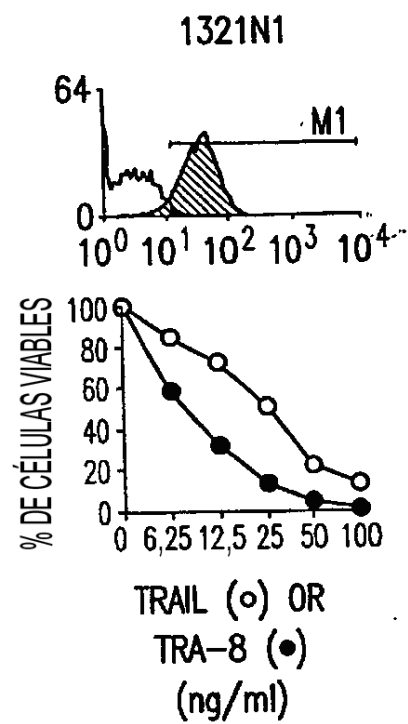
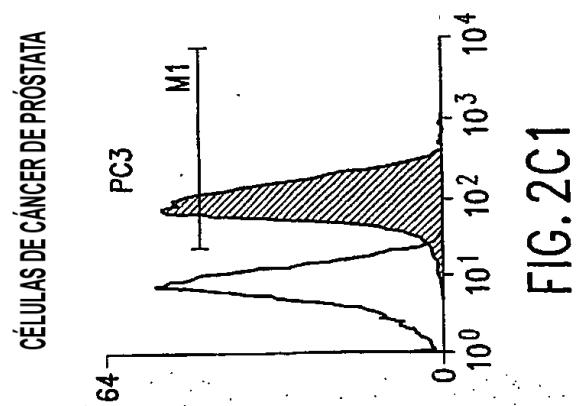
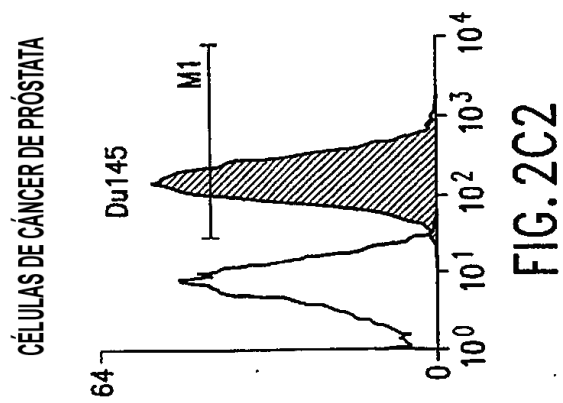
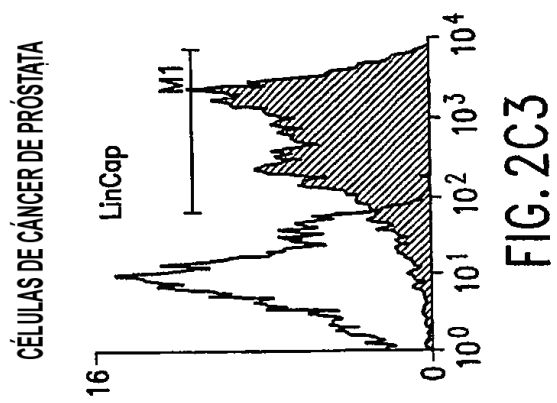
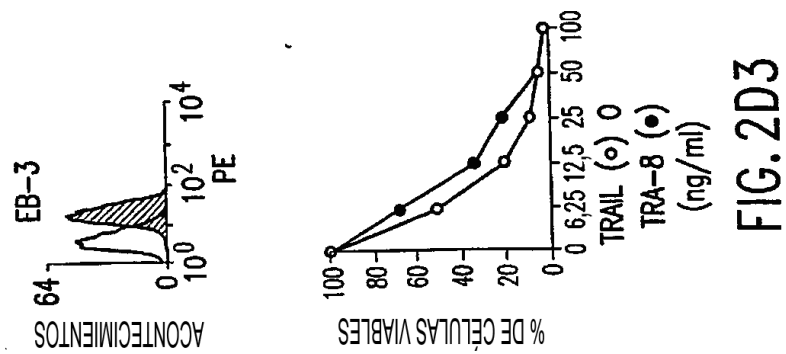
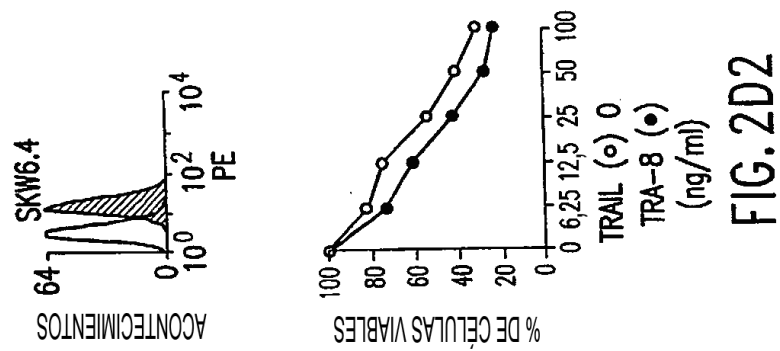
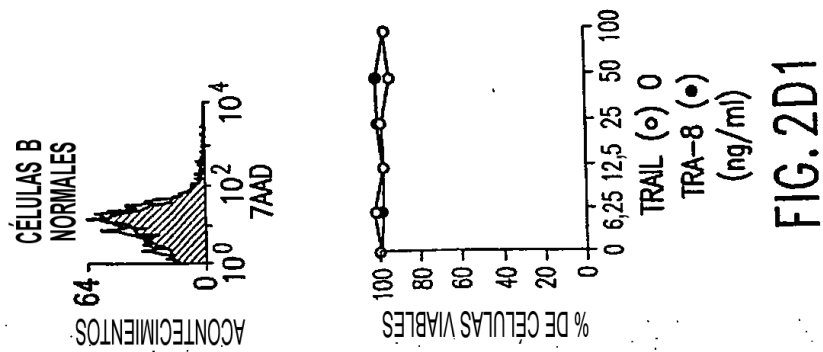


FIG. 2B¹ 5





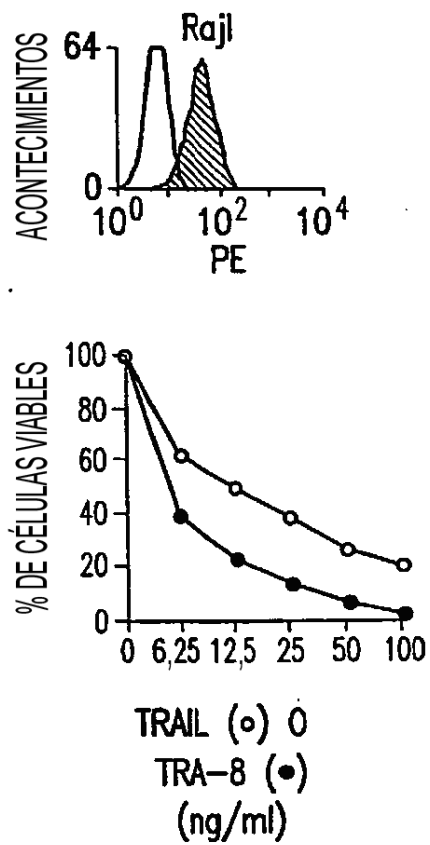


FIG. 2D4

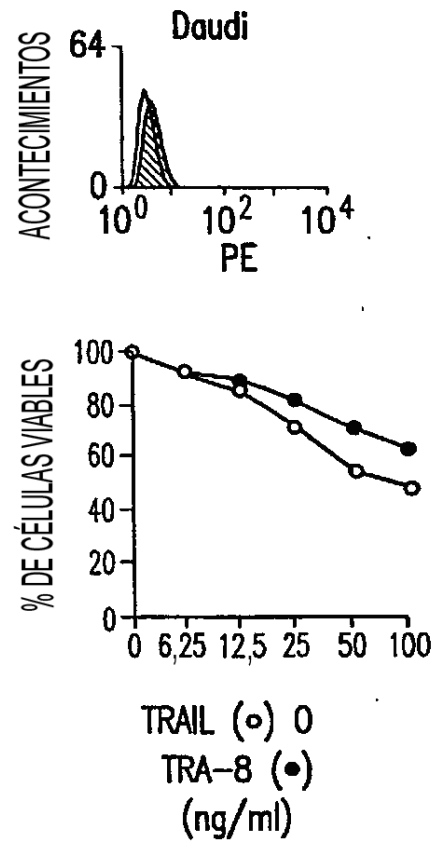


FIG. 2D5

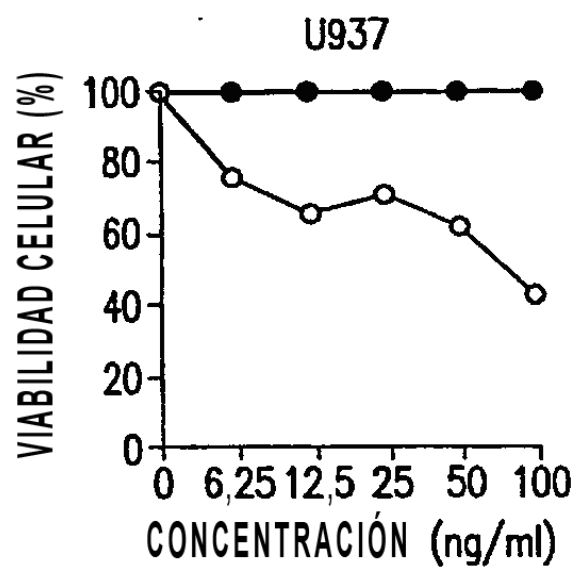


FIG. 3A

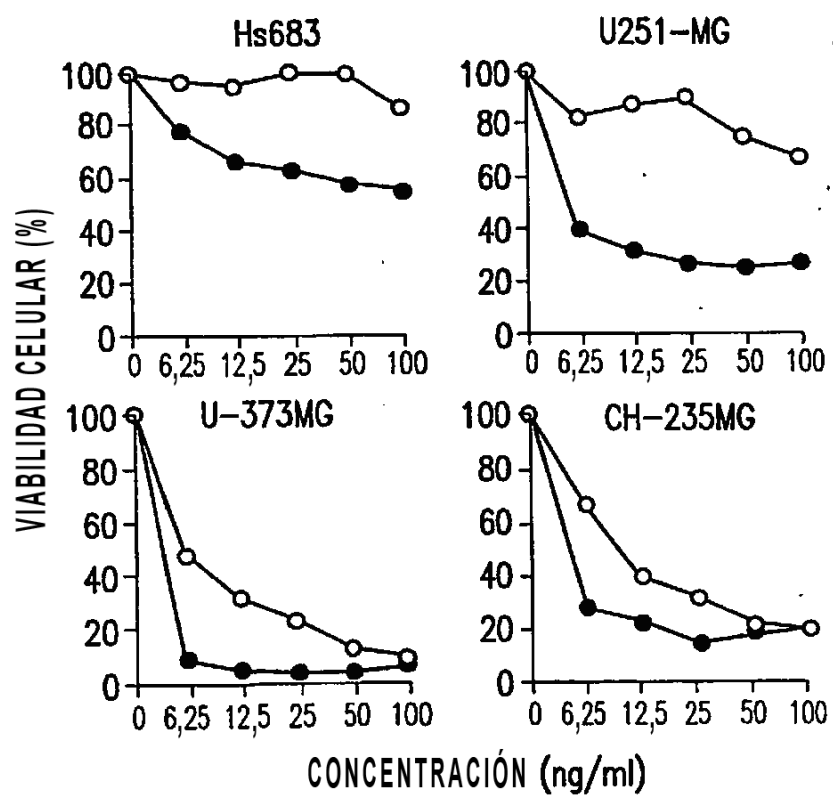


FIG. 3B1

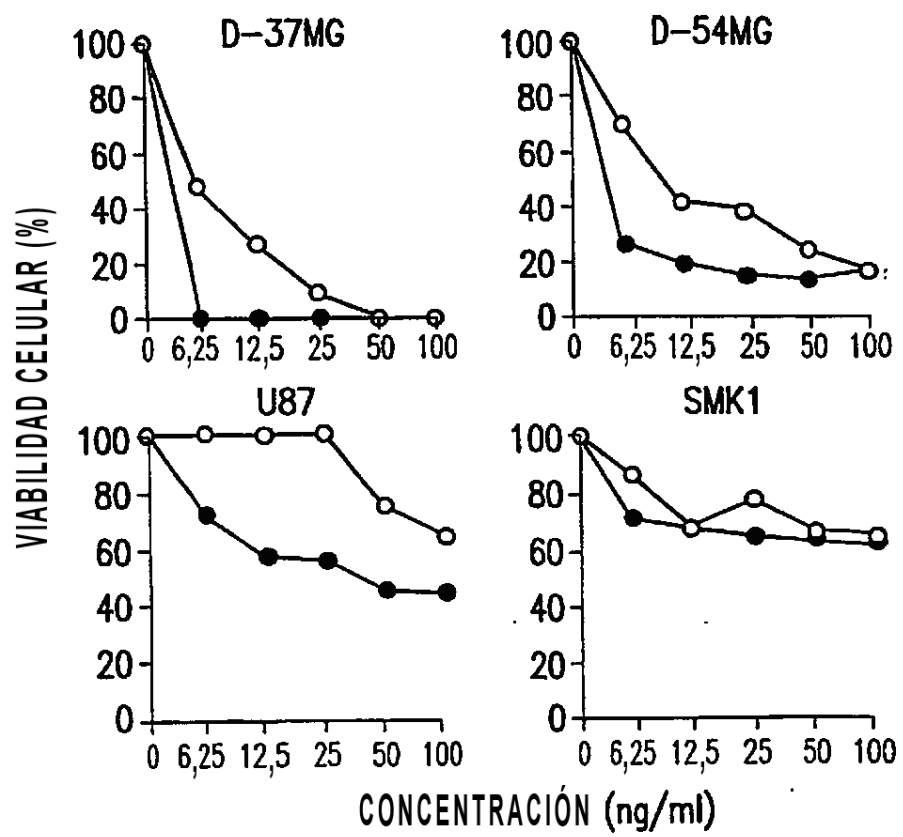


FIG. 3B2

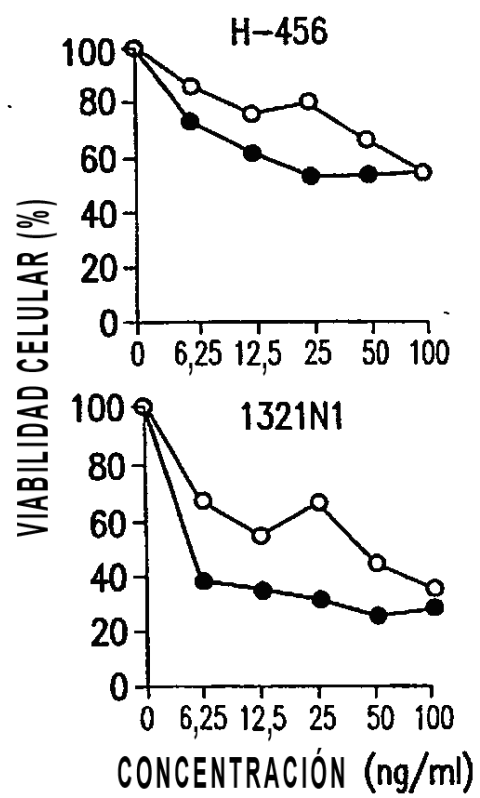


FIG. 3B3

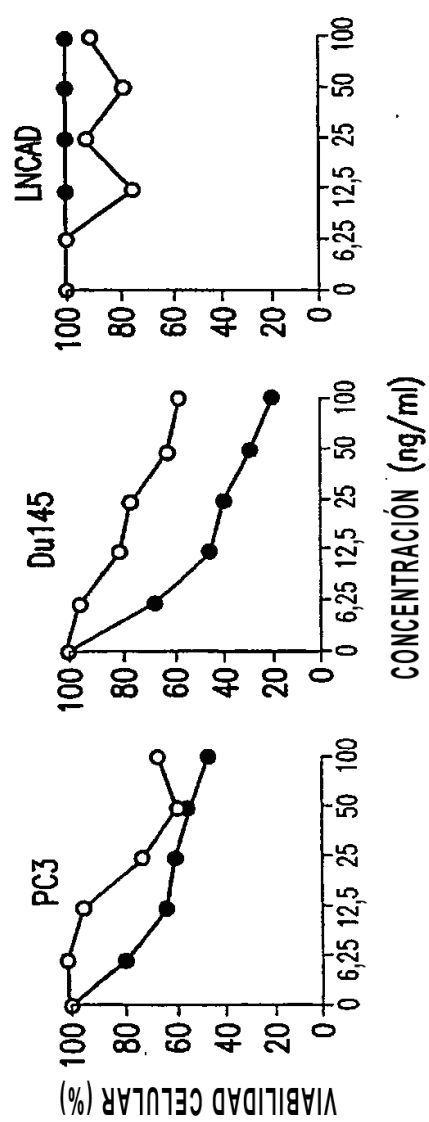


FIG. 3C

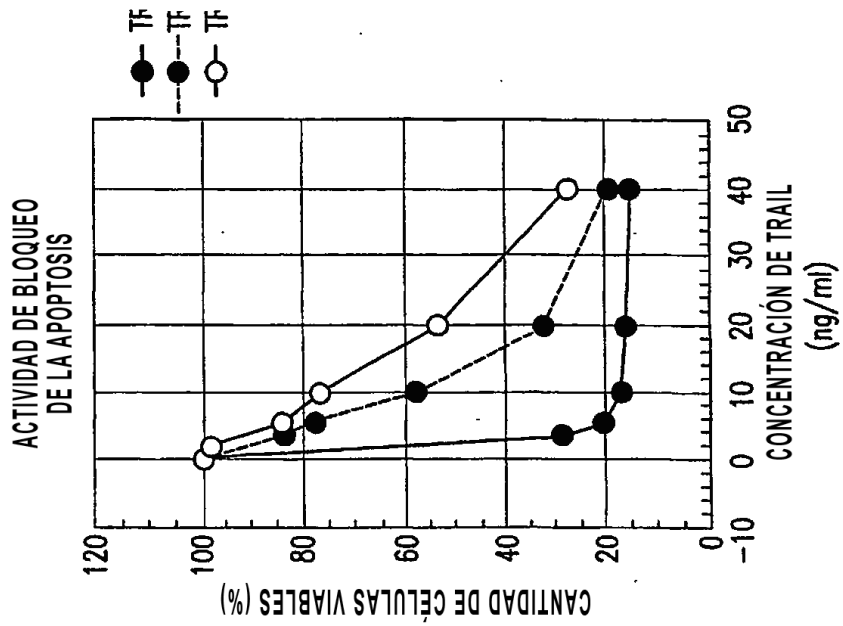


FIG. 4B

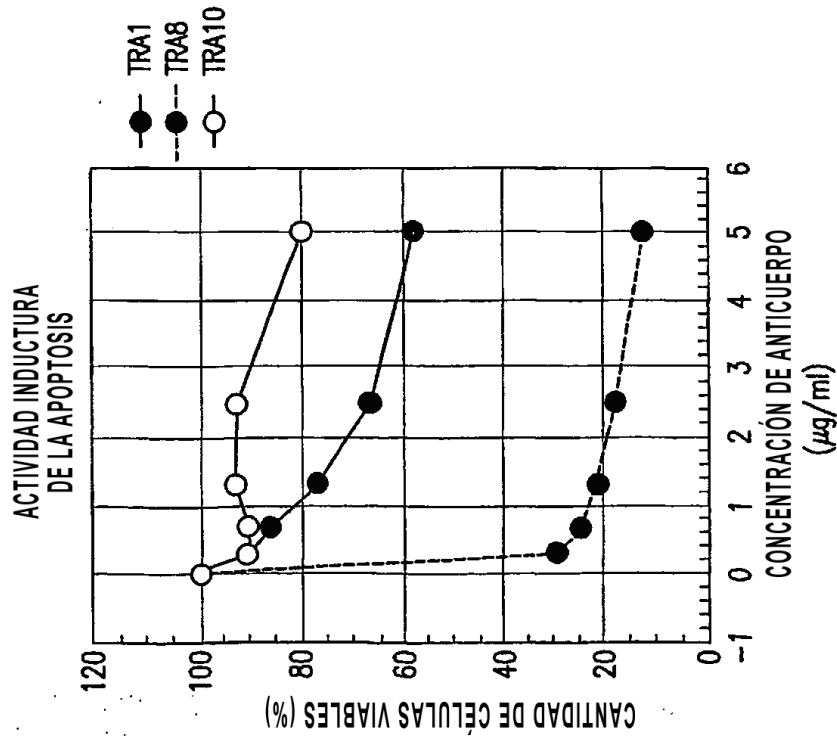


FIG. 4A

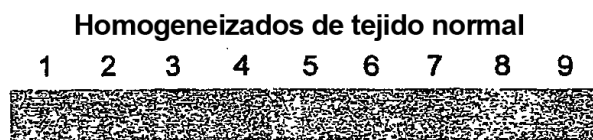


FIG.5A

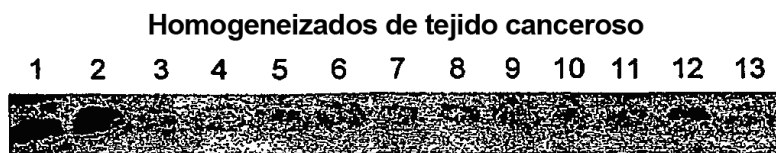


FIG.5B

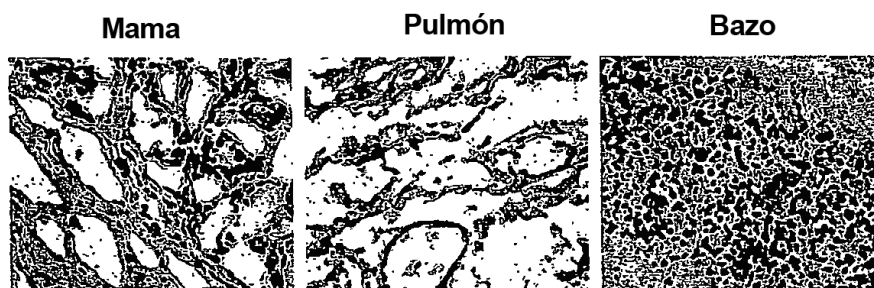


FIG.5C

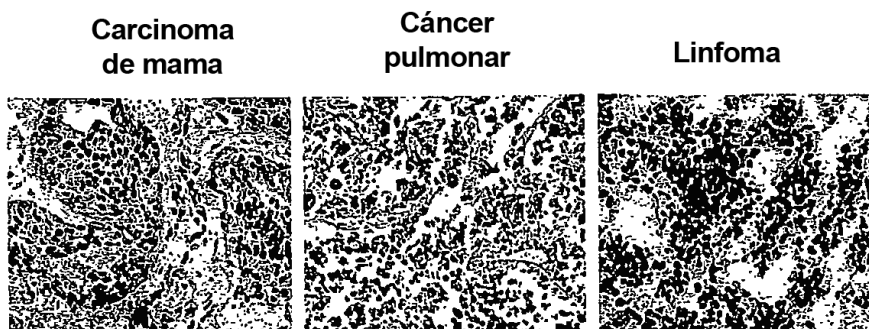


FIG.5D

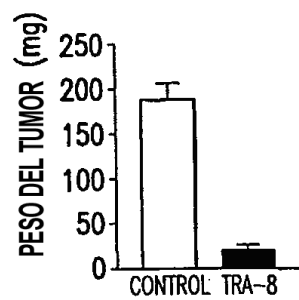


FIG. 6A

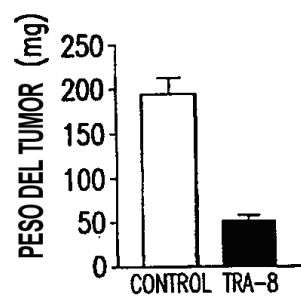


FIG. 6B

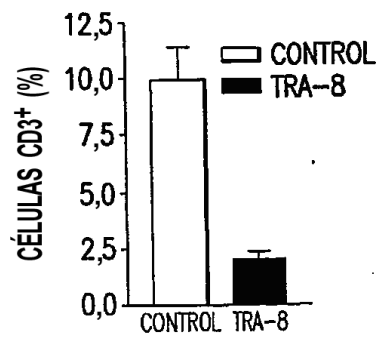


FIG. 6D

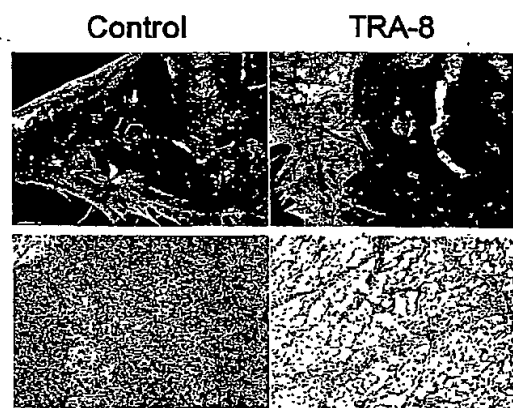


FIG.6C

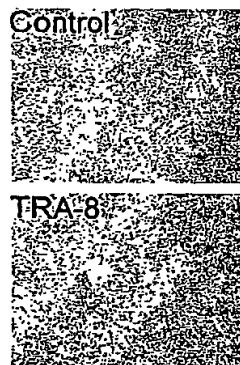
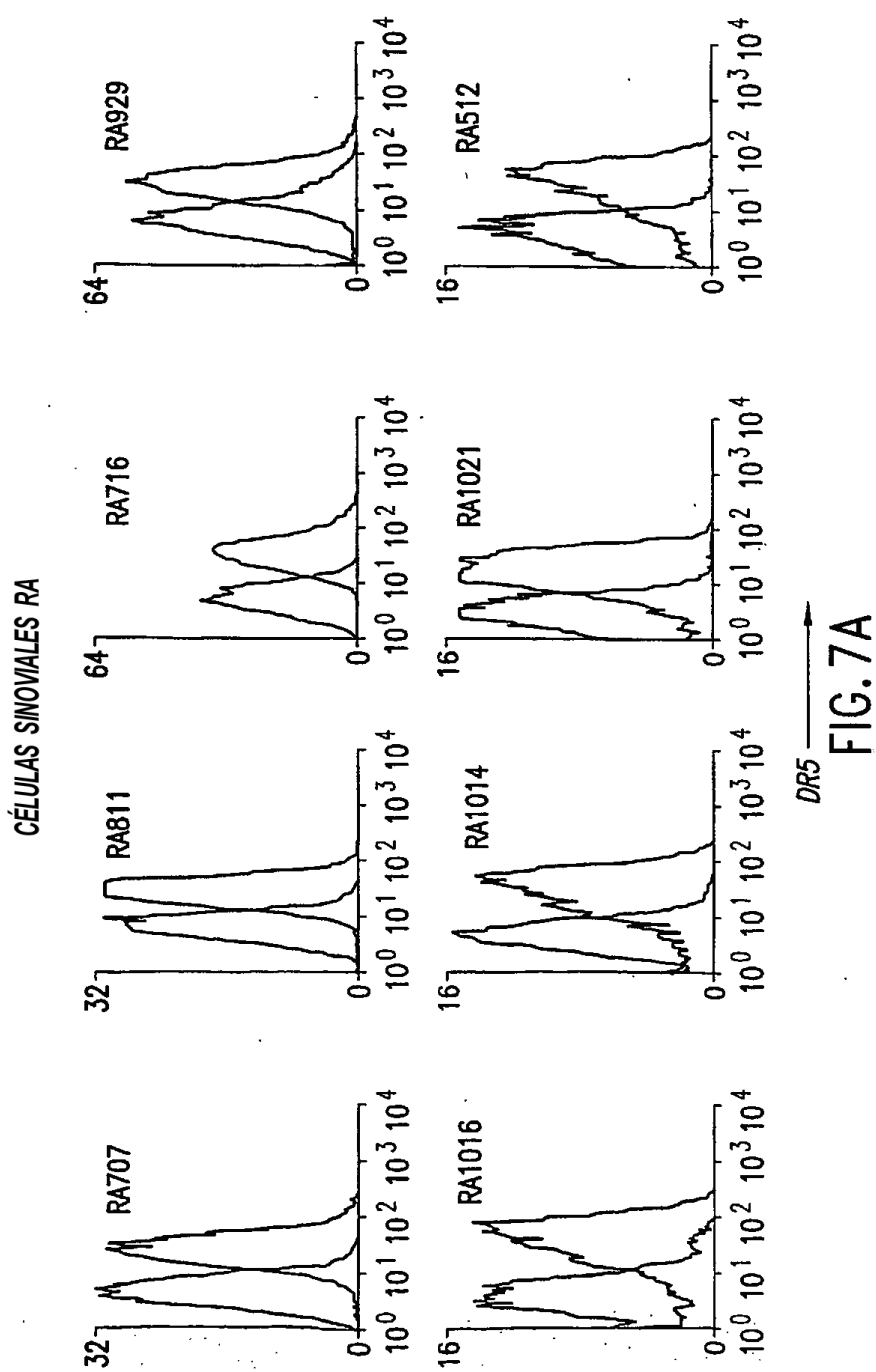


FIG.6E



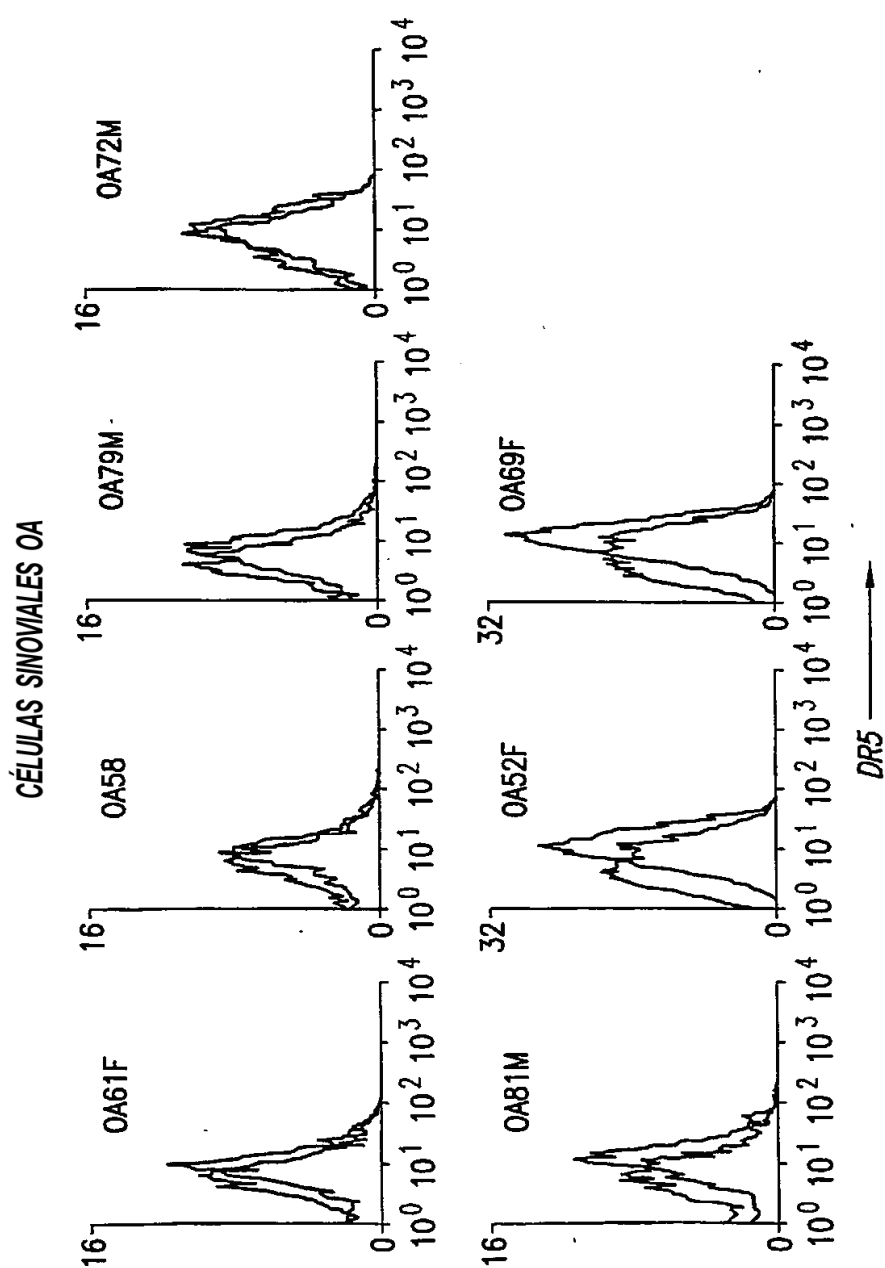
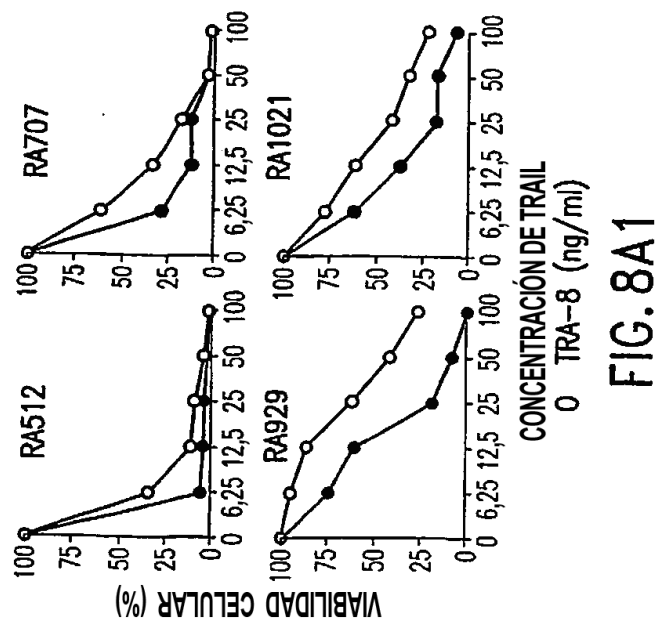
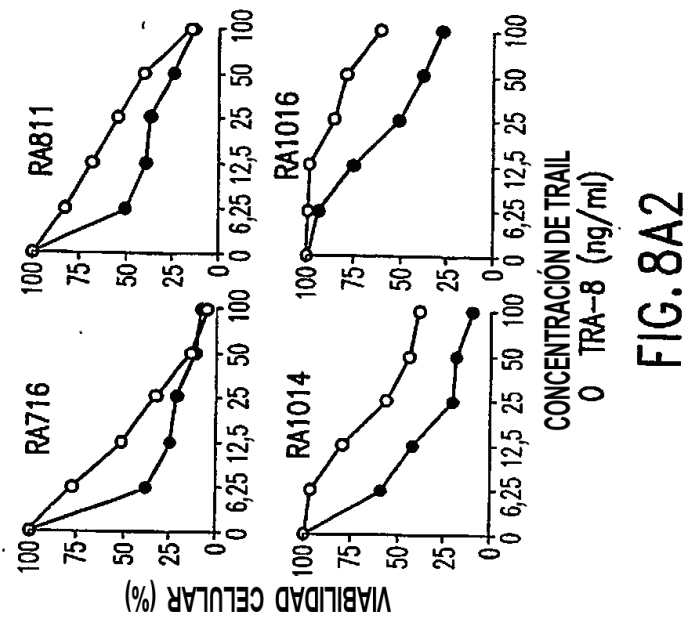


FIG. 7B



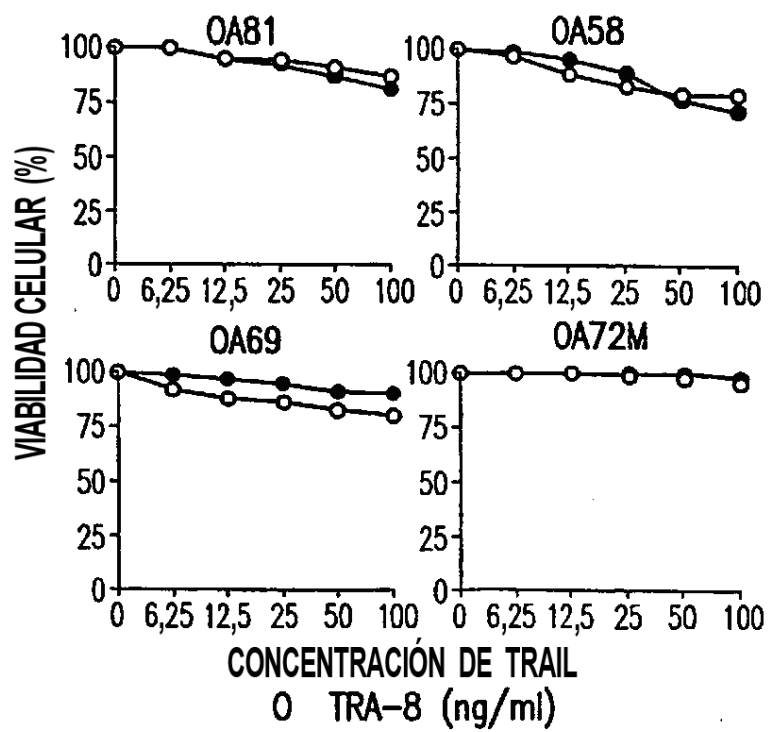


FIG. 8B

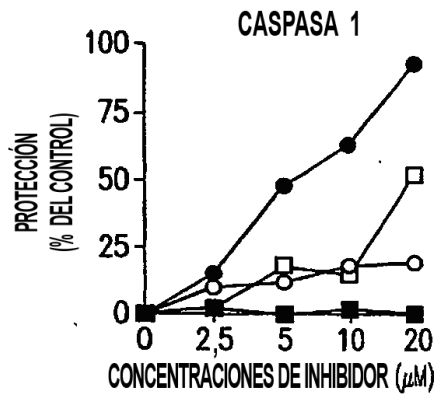


FIG. 9A

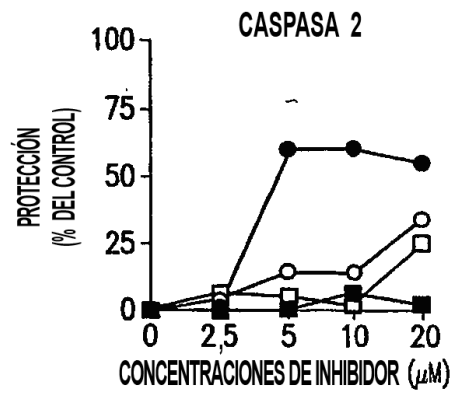


FIG. 9B

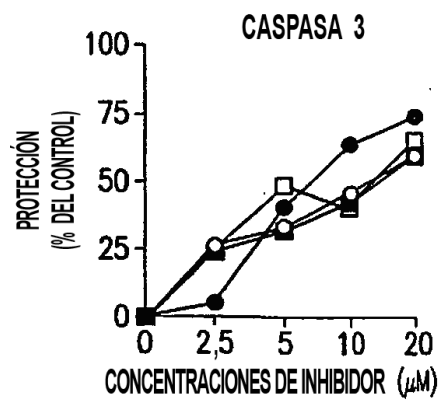


FIG. 9C

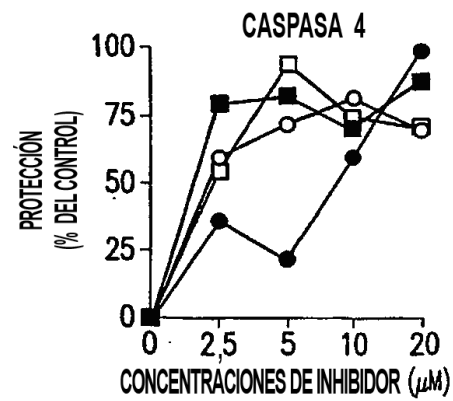


FIG. 9D

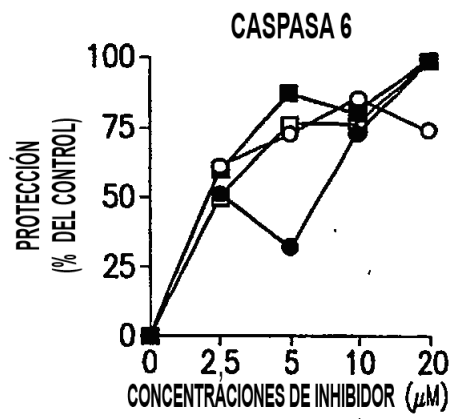


FIG. 9E

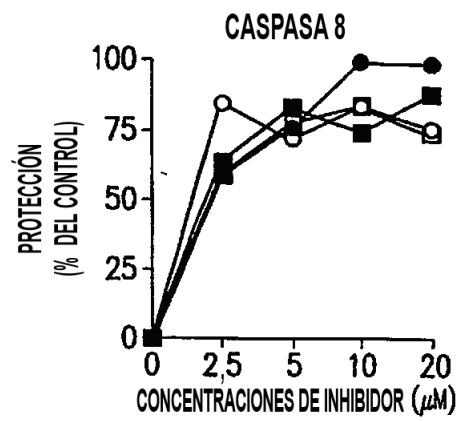


FIG. 9F

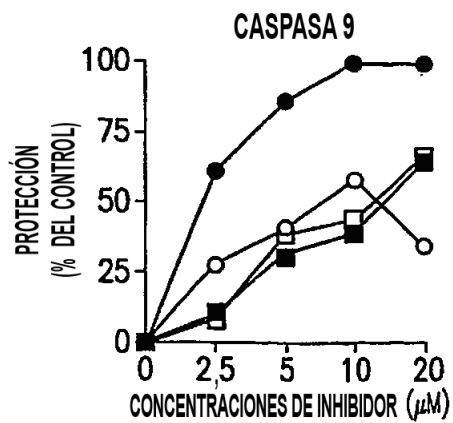


FIG. 9G

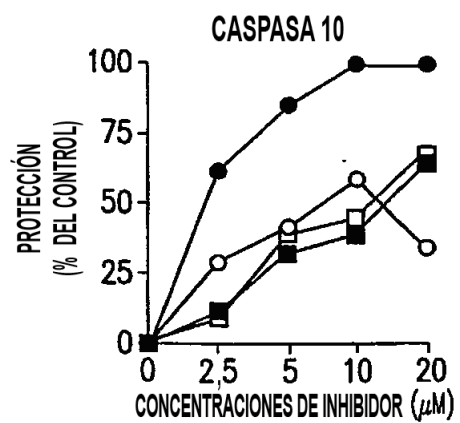


FIG. 9H

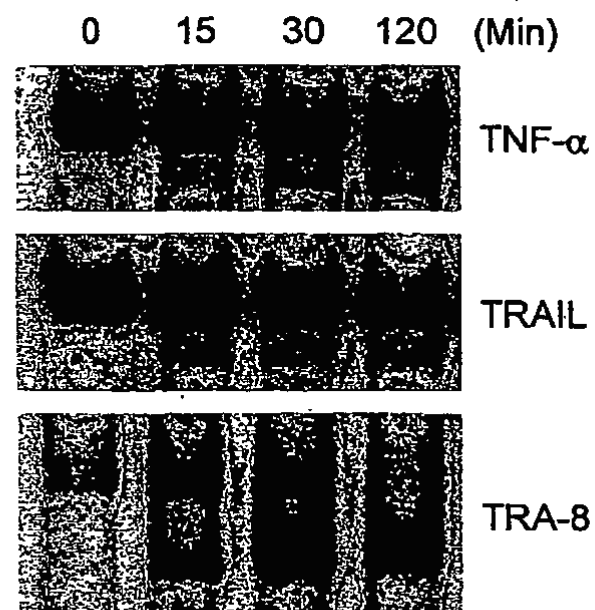


FIG.10A

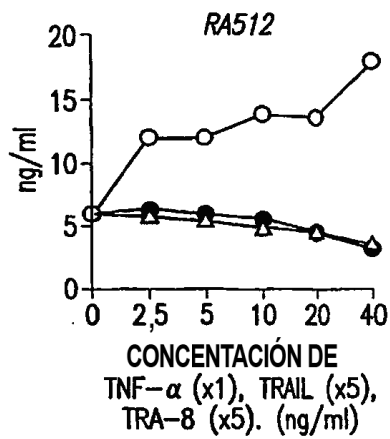


FIG. 10B1

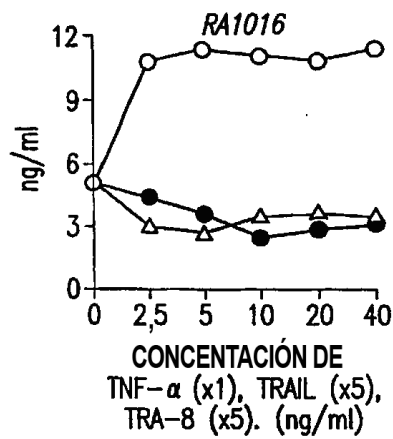


FIG. 10B2

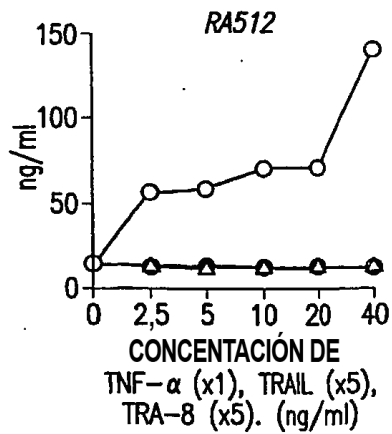


FIG. 10C1

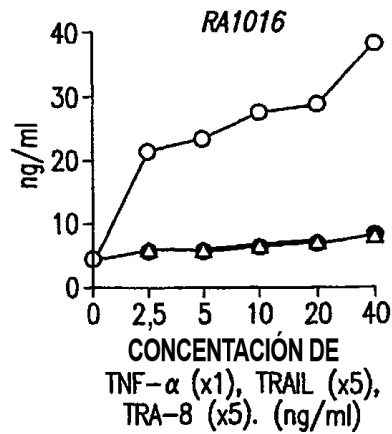


FIG. 10C2

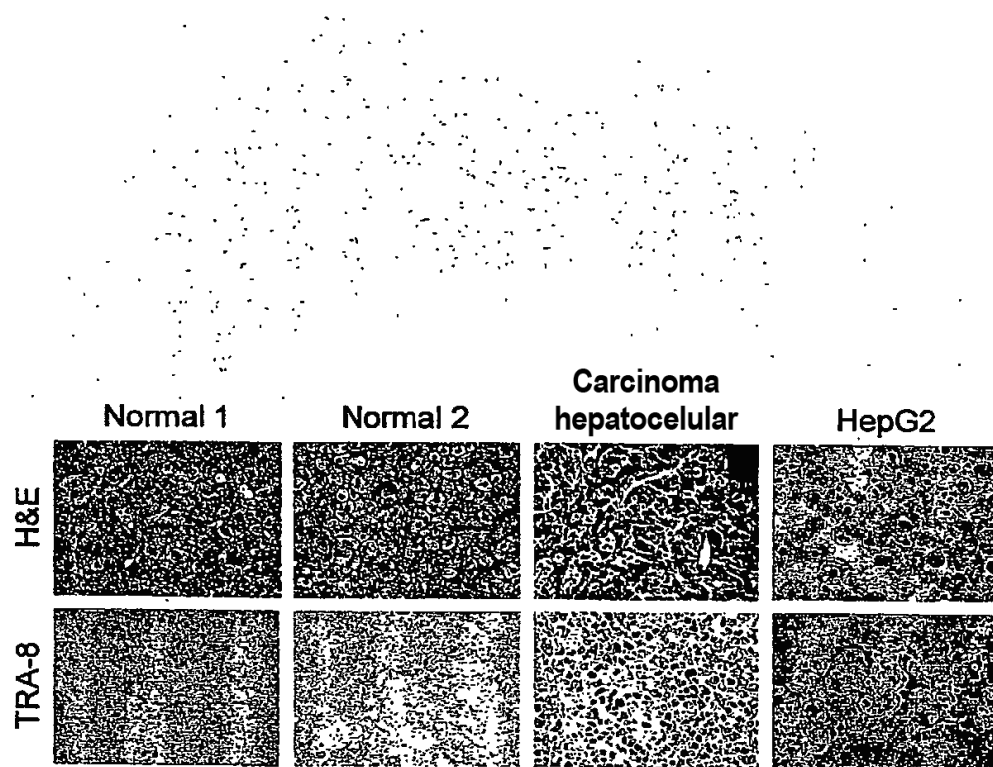


FIG.11A

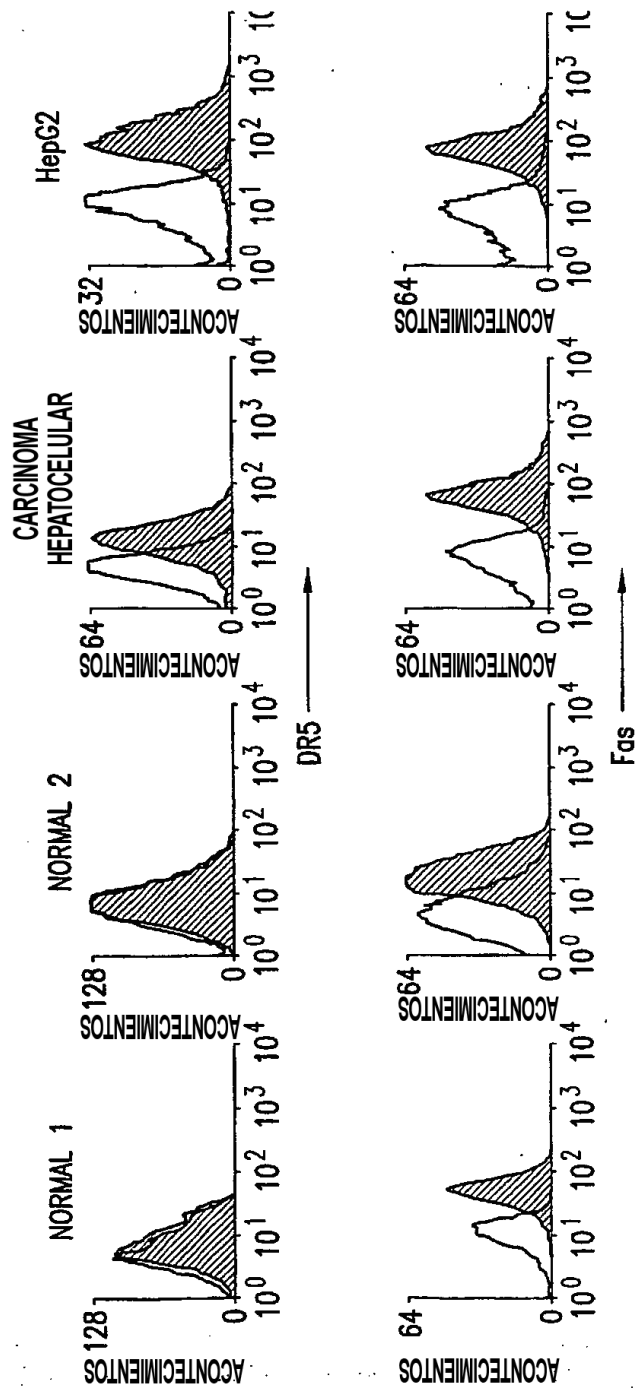
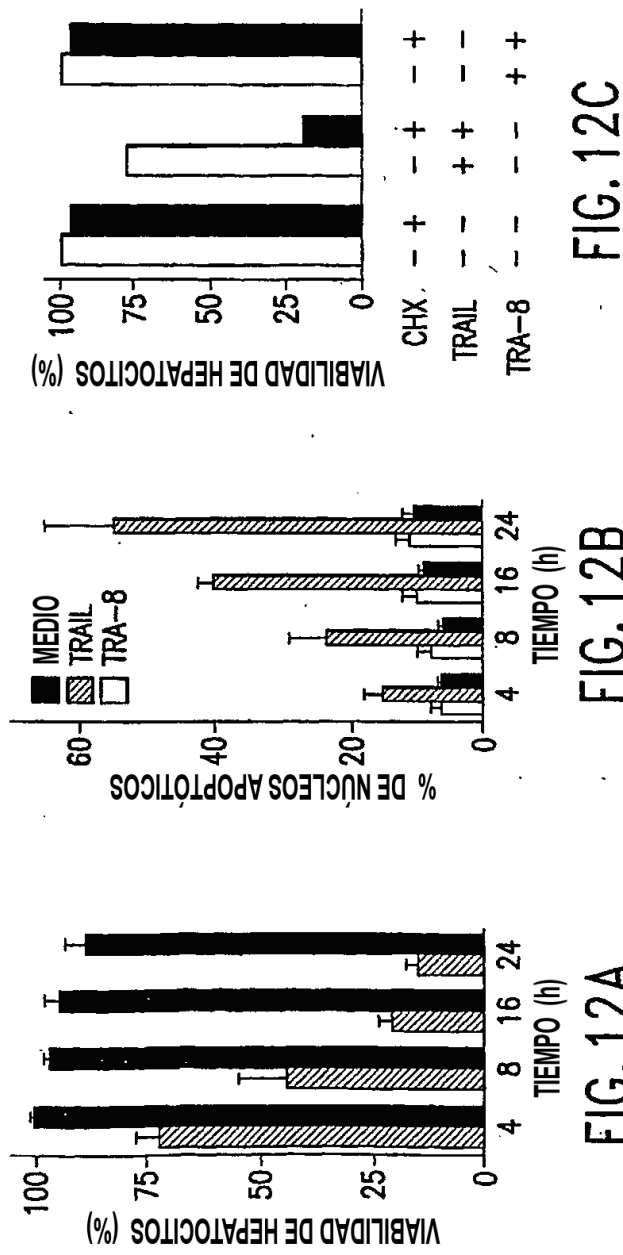


FIG. 11B



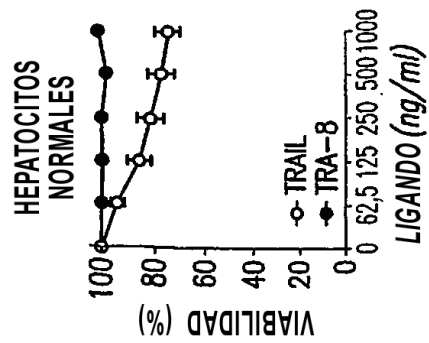


FIG. 12D1

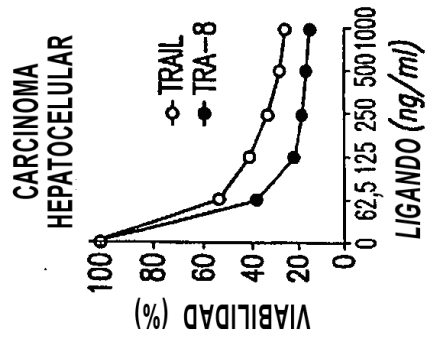


FIG. 12D2

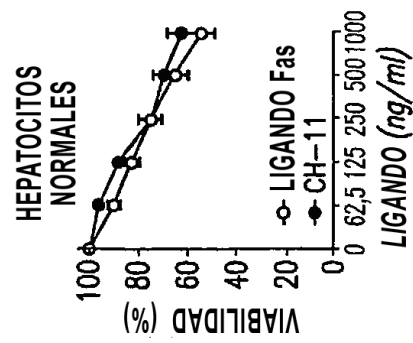


FIG. 12D4

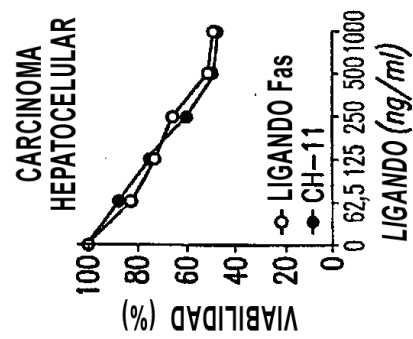


FIG. 12D5

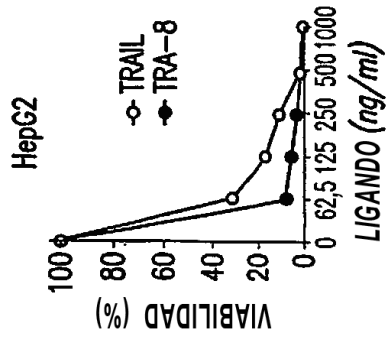


FIG. 12D3

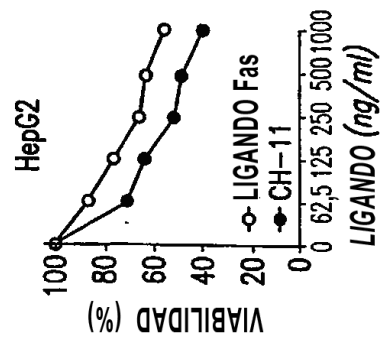


FIG. 12D6

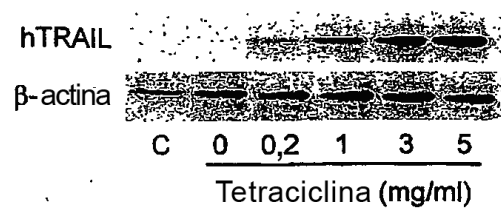


FIG.13A

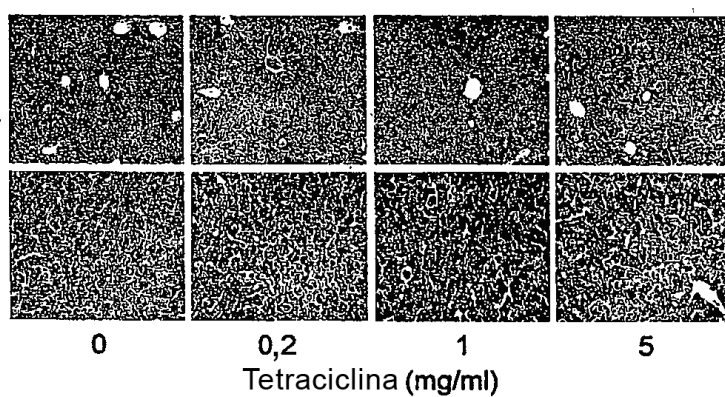


FIG.13D

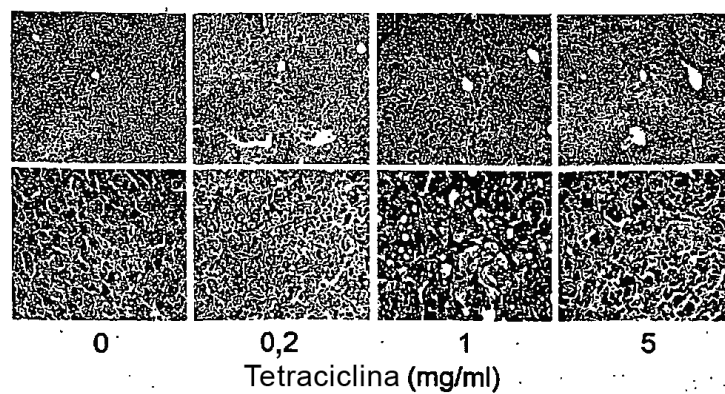


FIG. 13E

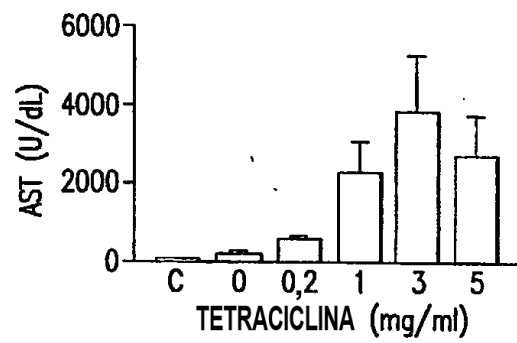


FIG. 13B

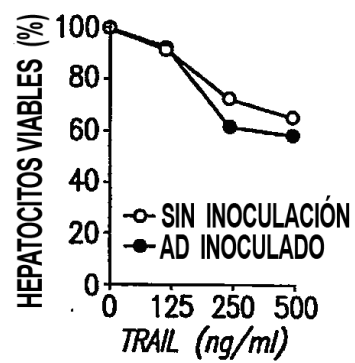


FIG. 13C1

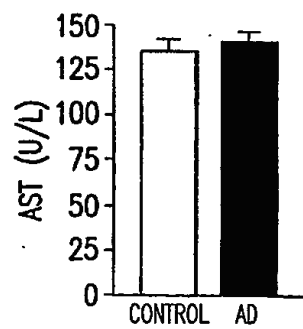


FIG. 13C2

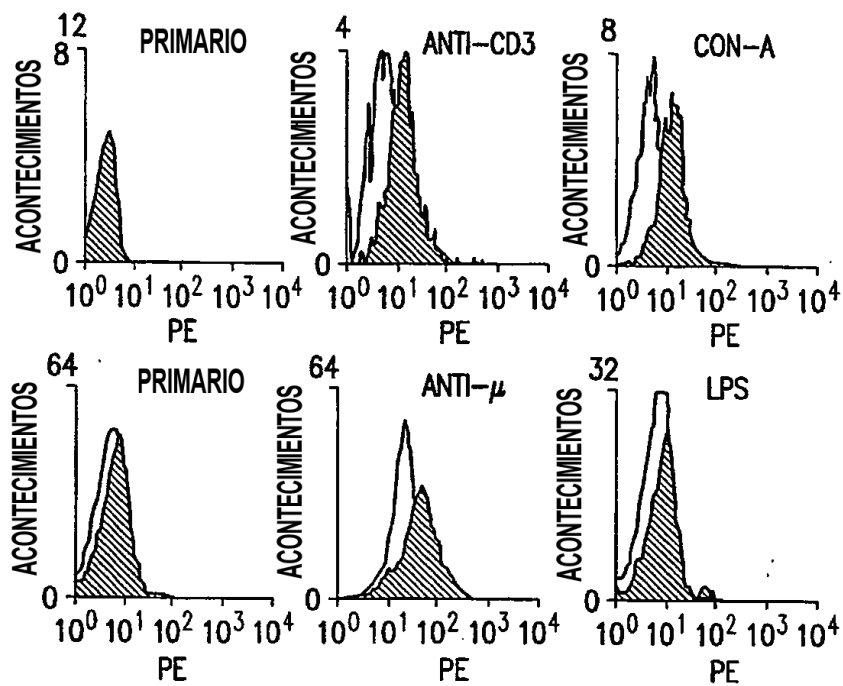


FIG. 14

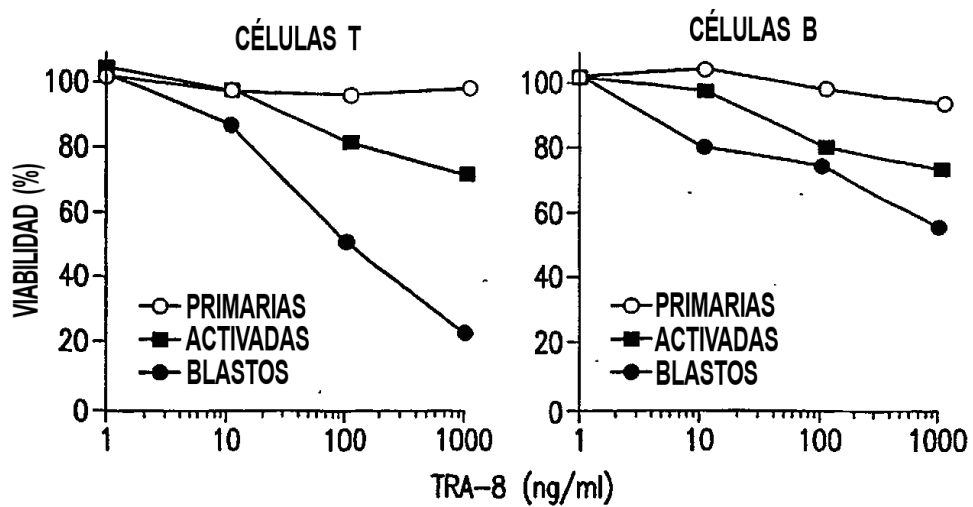


FIG. 15

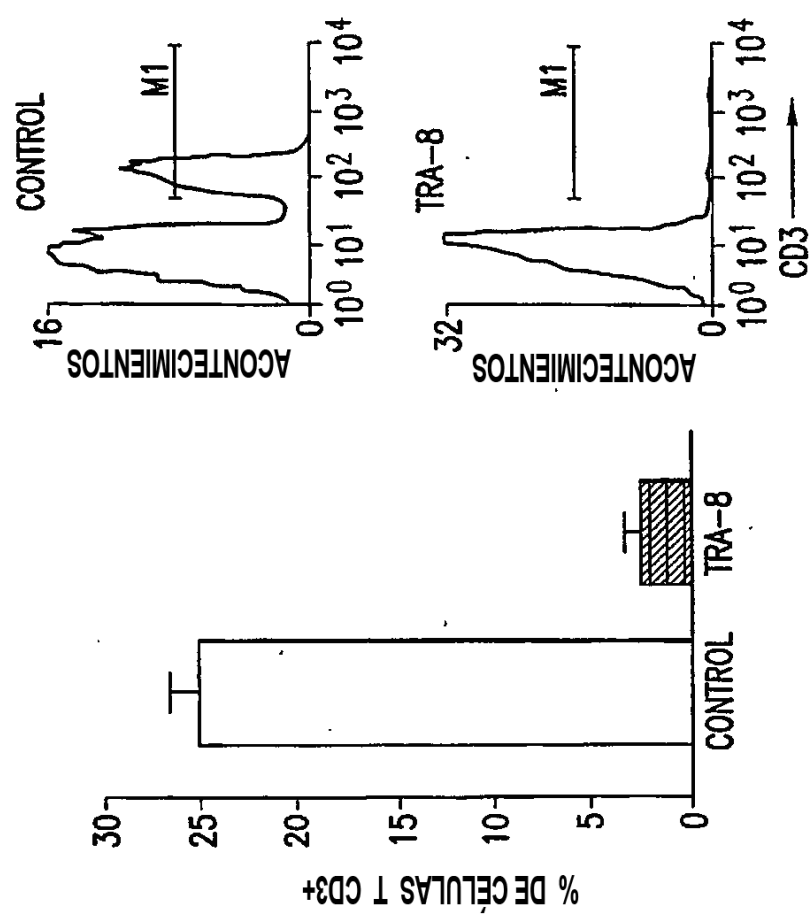


FIG. 16

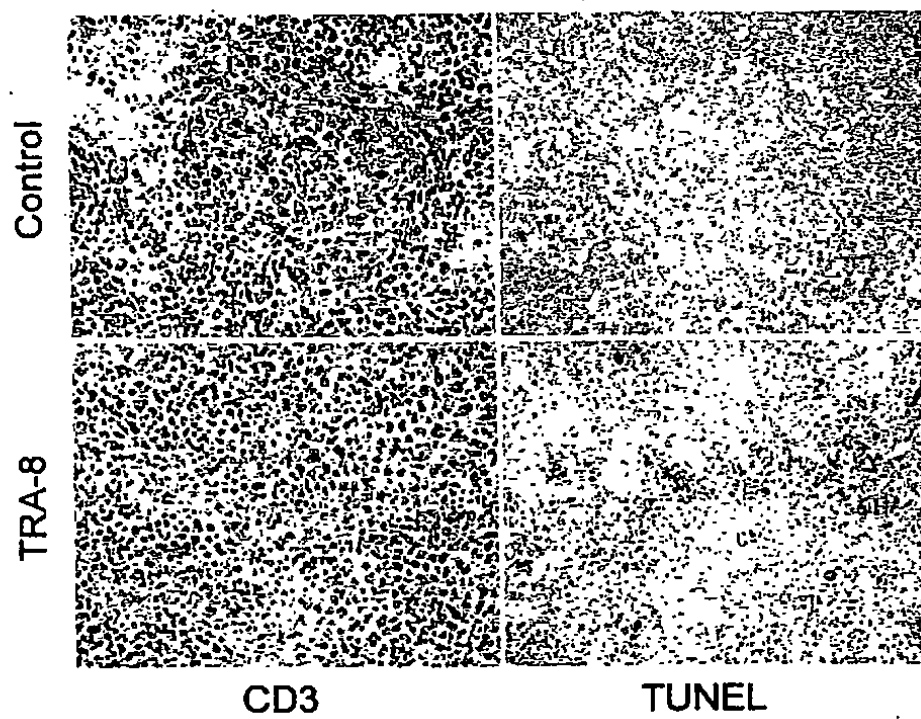


FIG.17

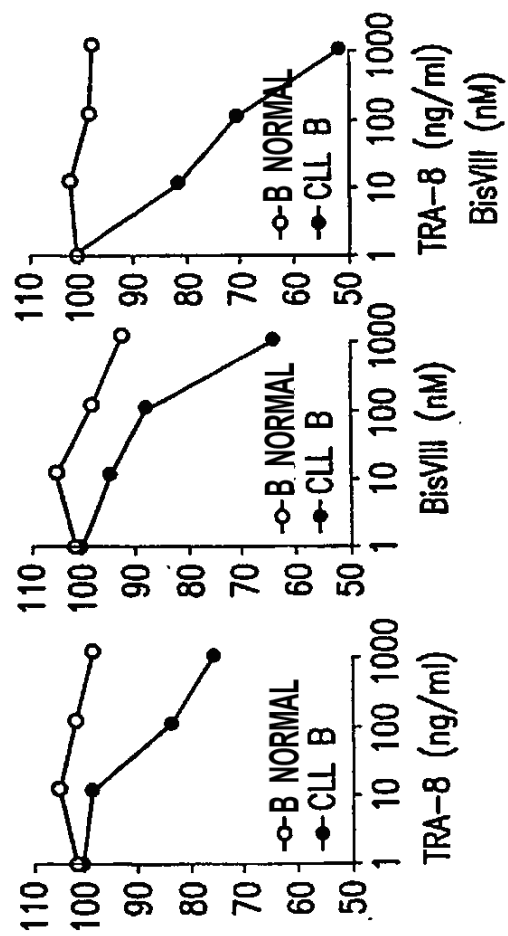


FIG. 18

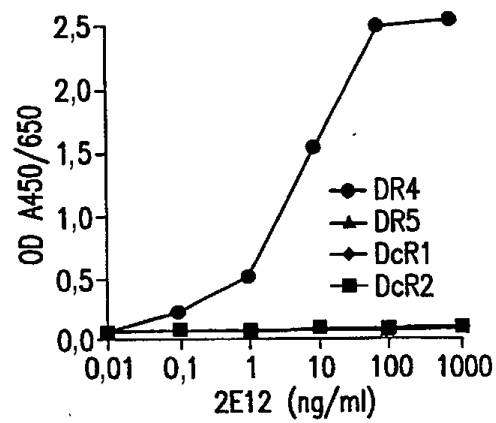


FIG. 19A

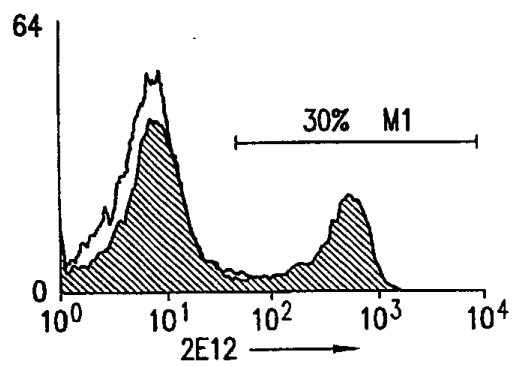


FIG. 19B

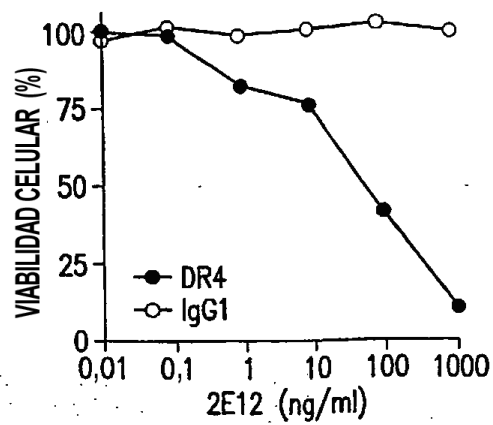


FIG. 19C

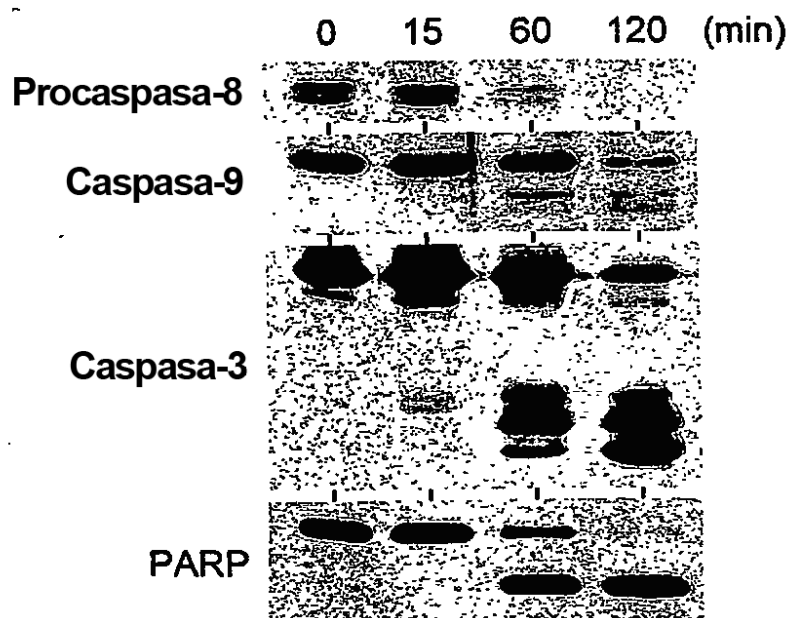


FIG.19D

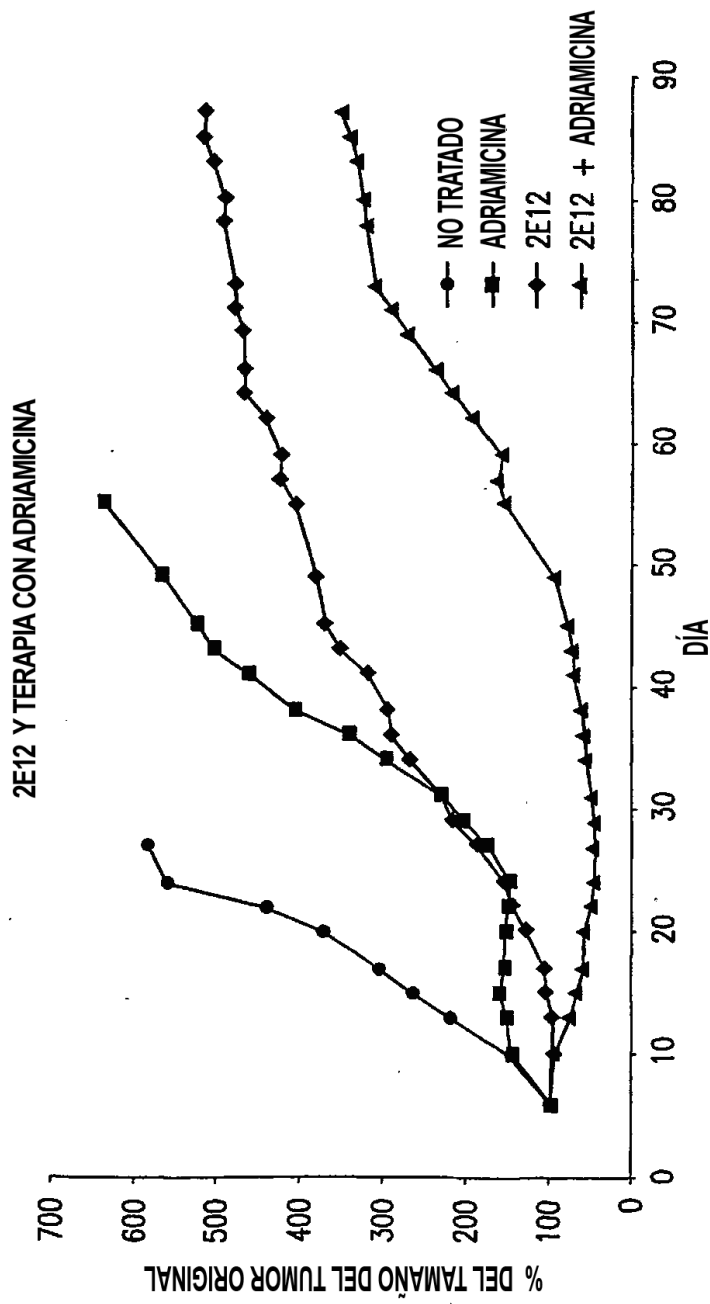
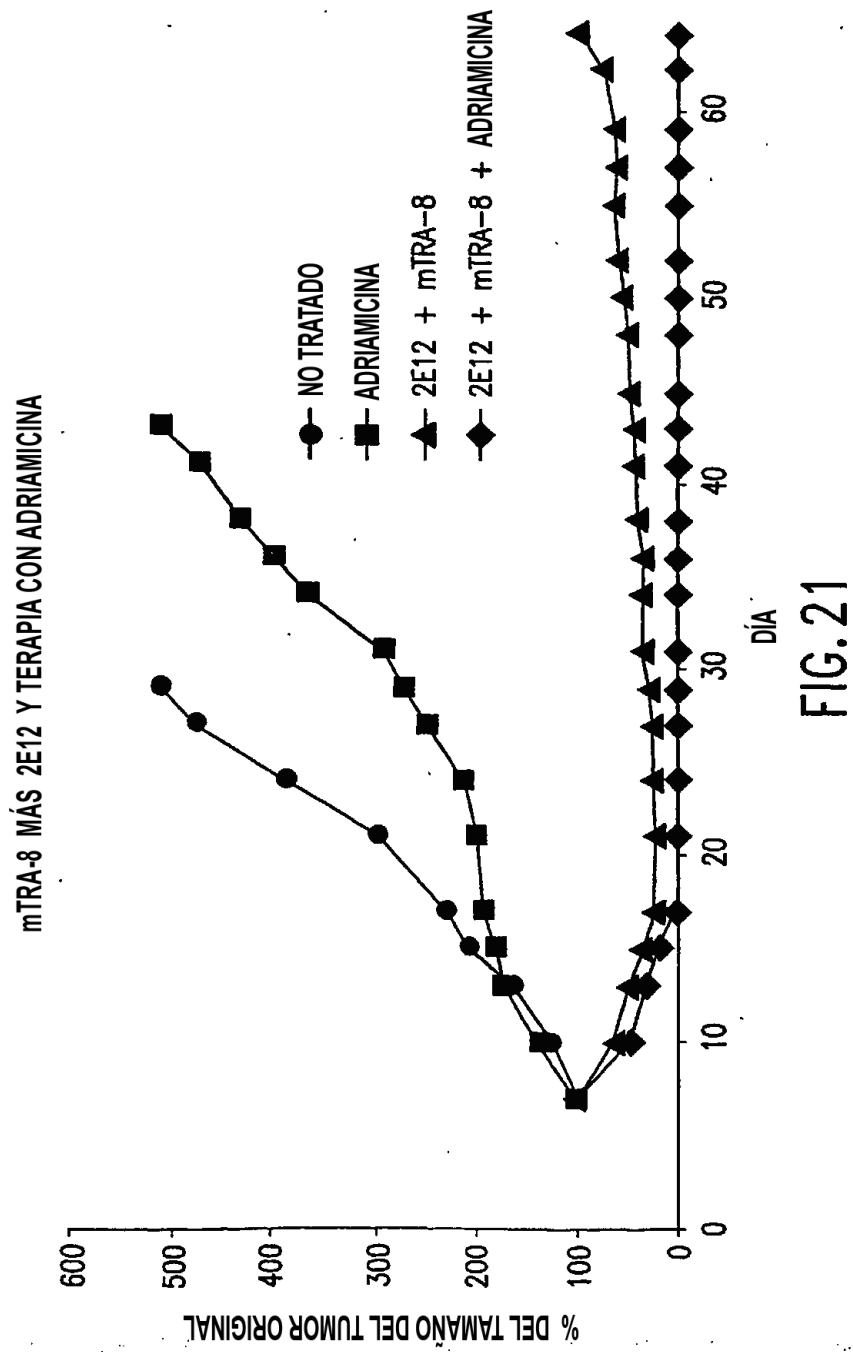


FIG. 20



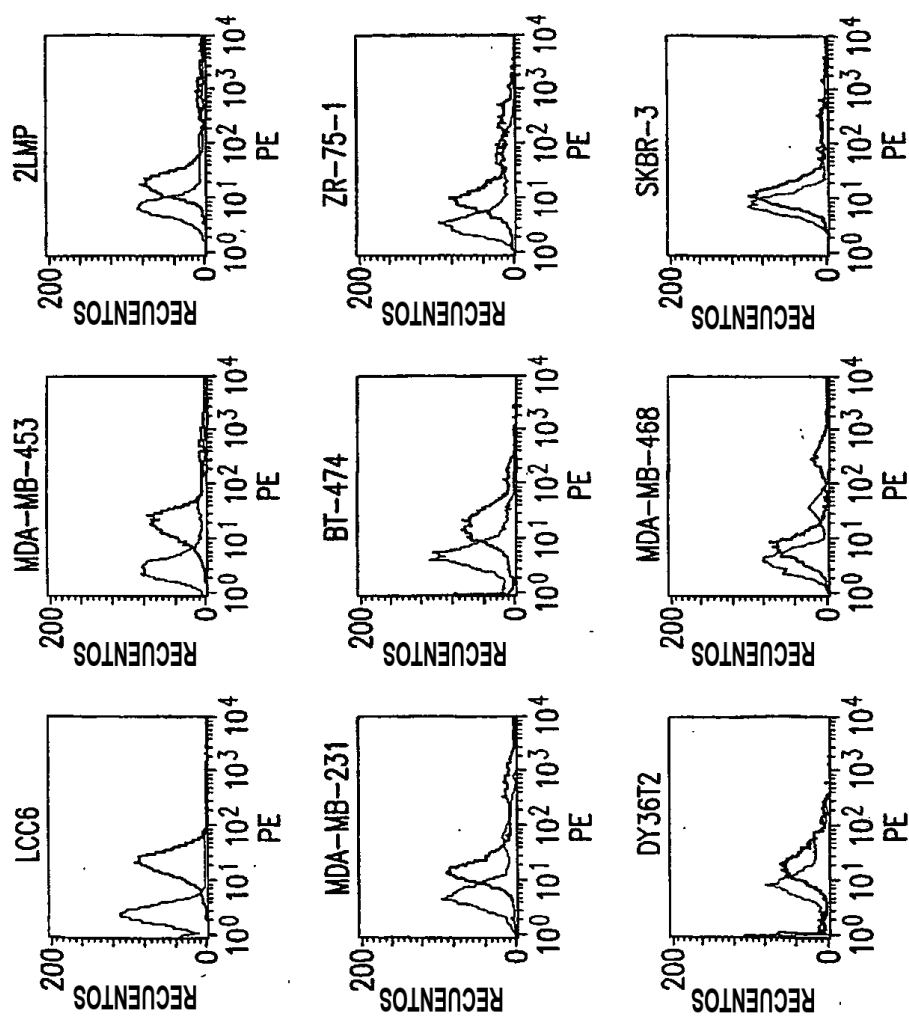


FIG. 22A

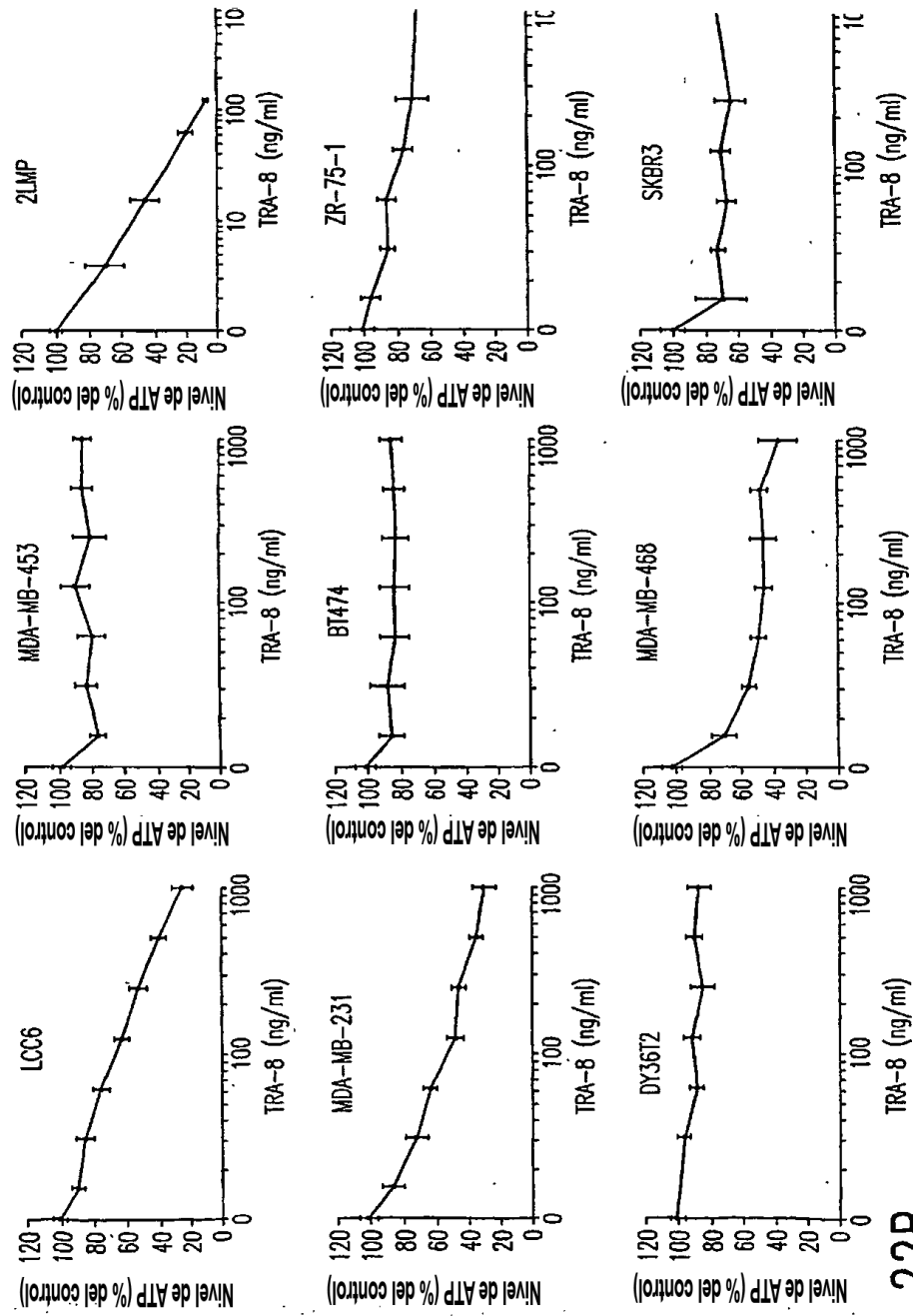


FIG. 22B

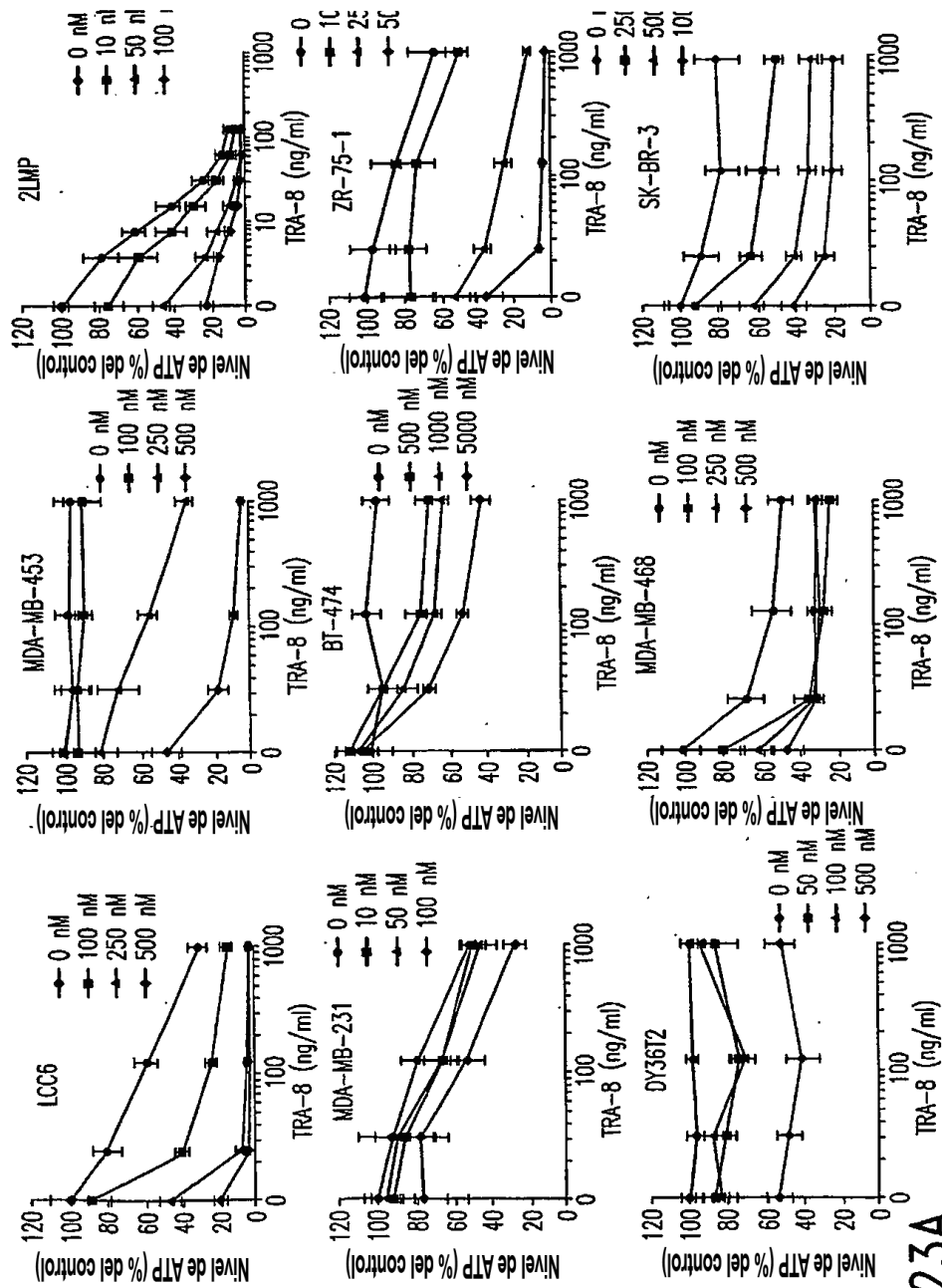


FIG. 23A

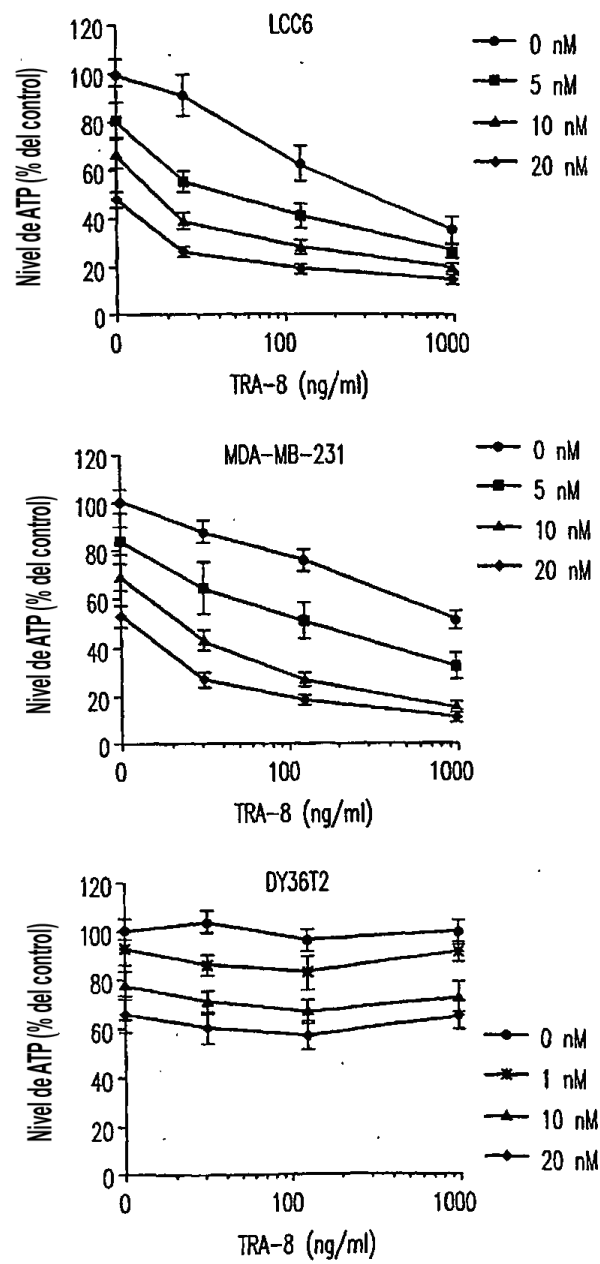


FIG. 23B1

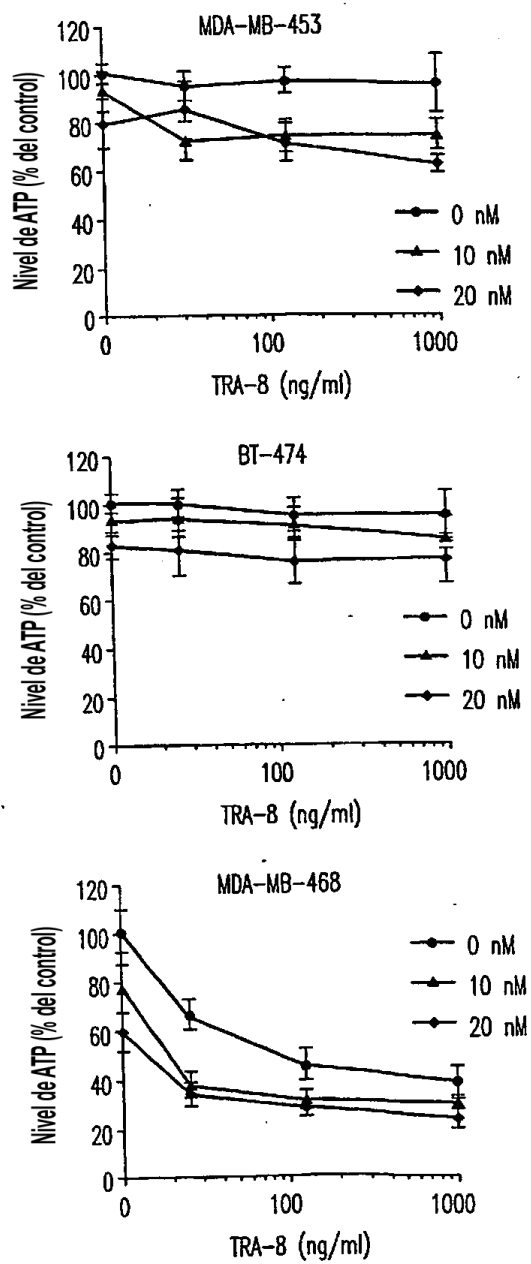


FIG. 23B2

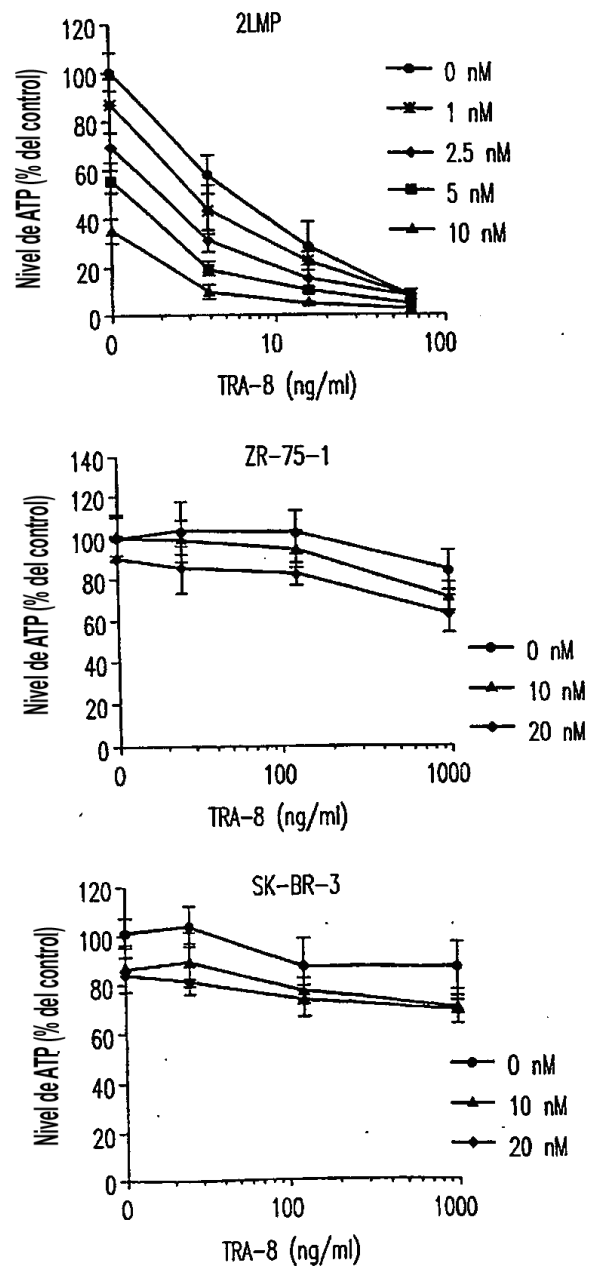


FIG. 23B3

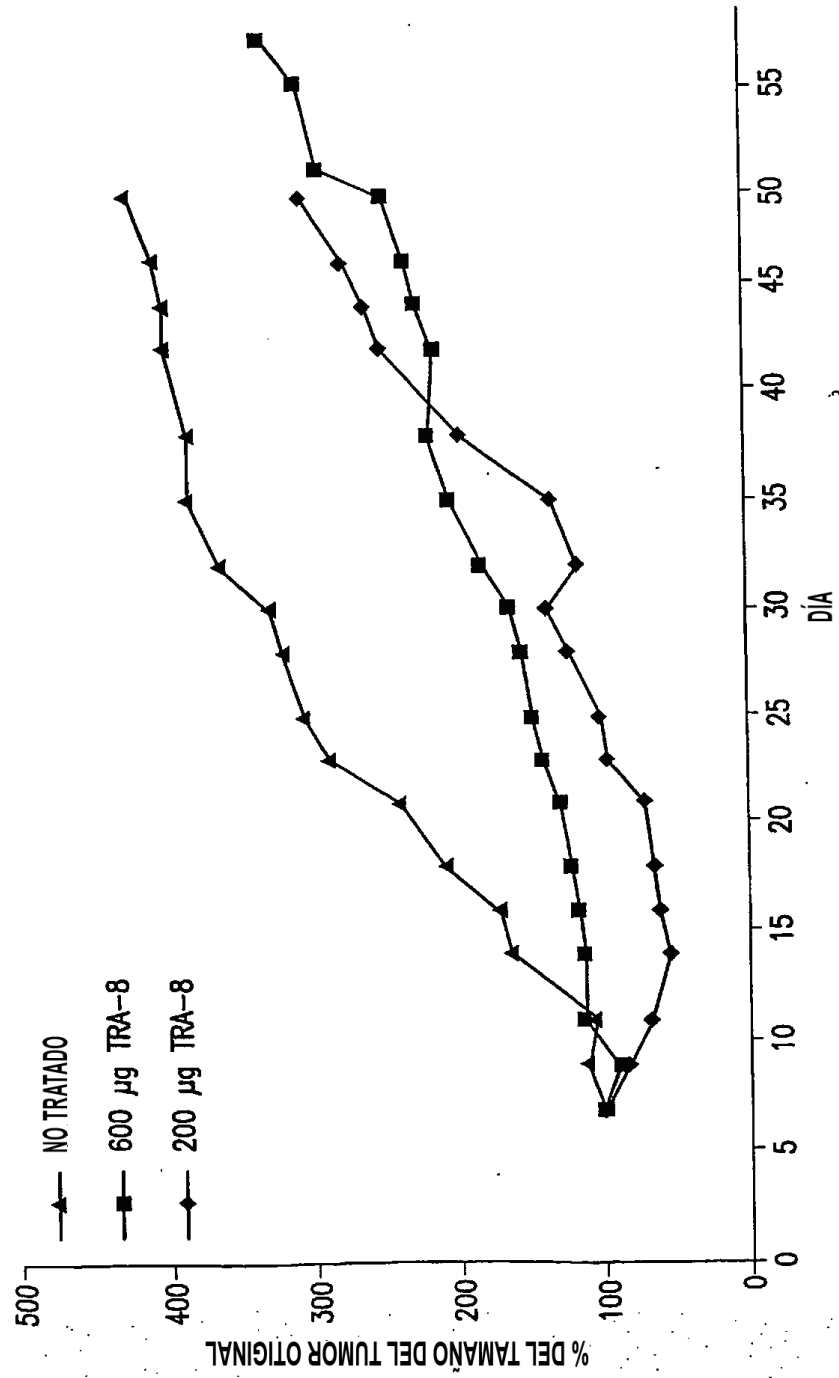


FIG. 24

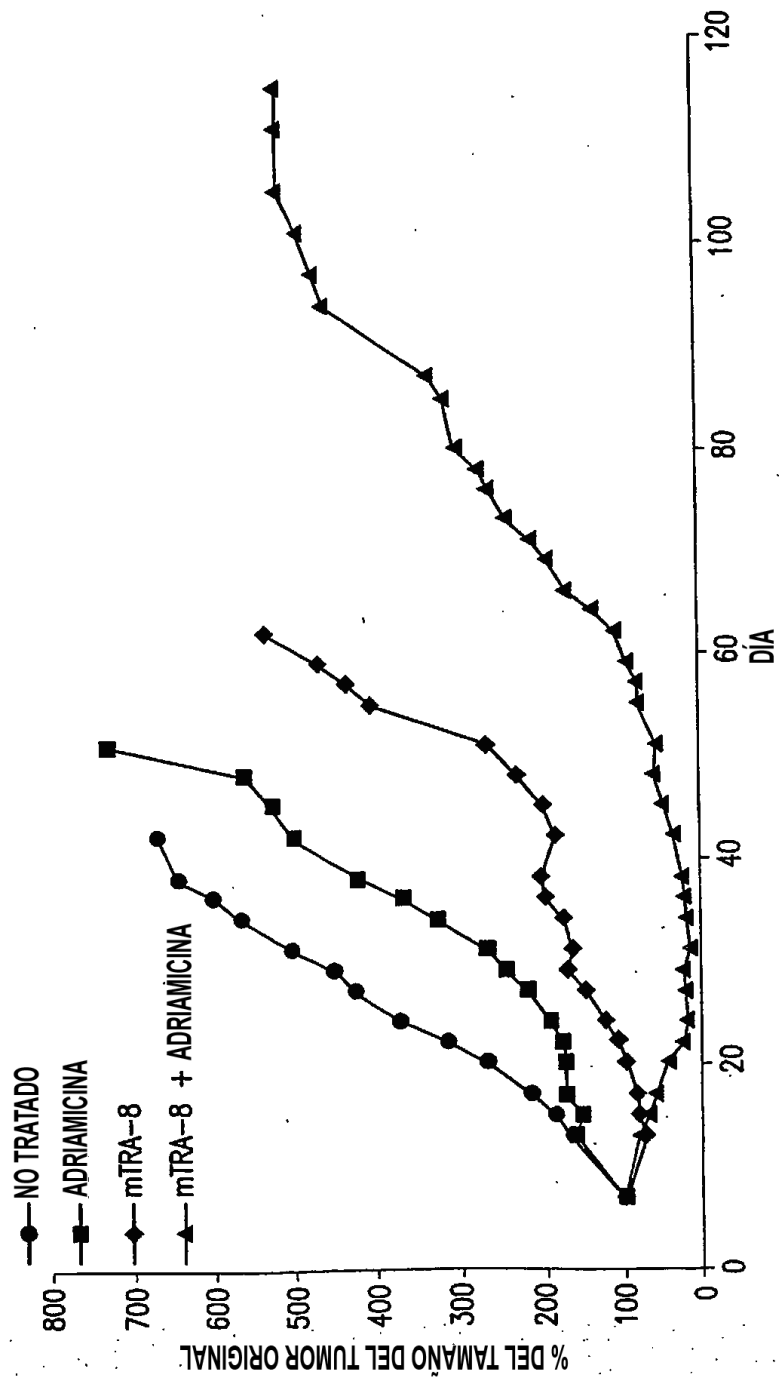


FIG.25

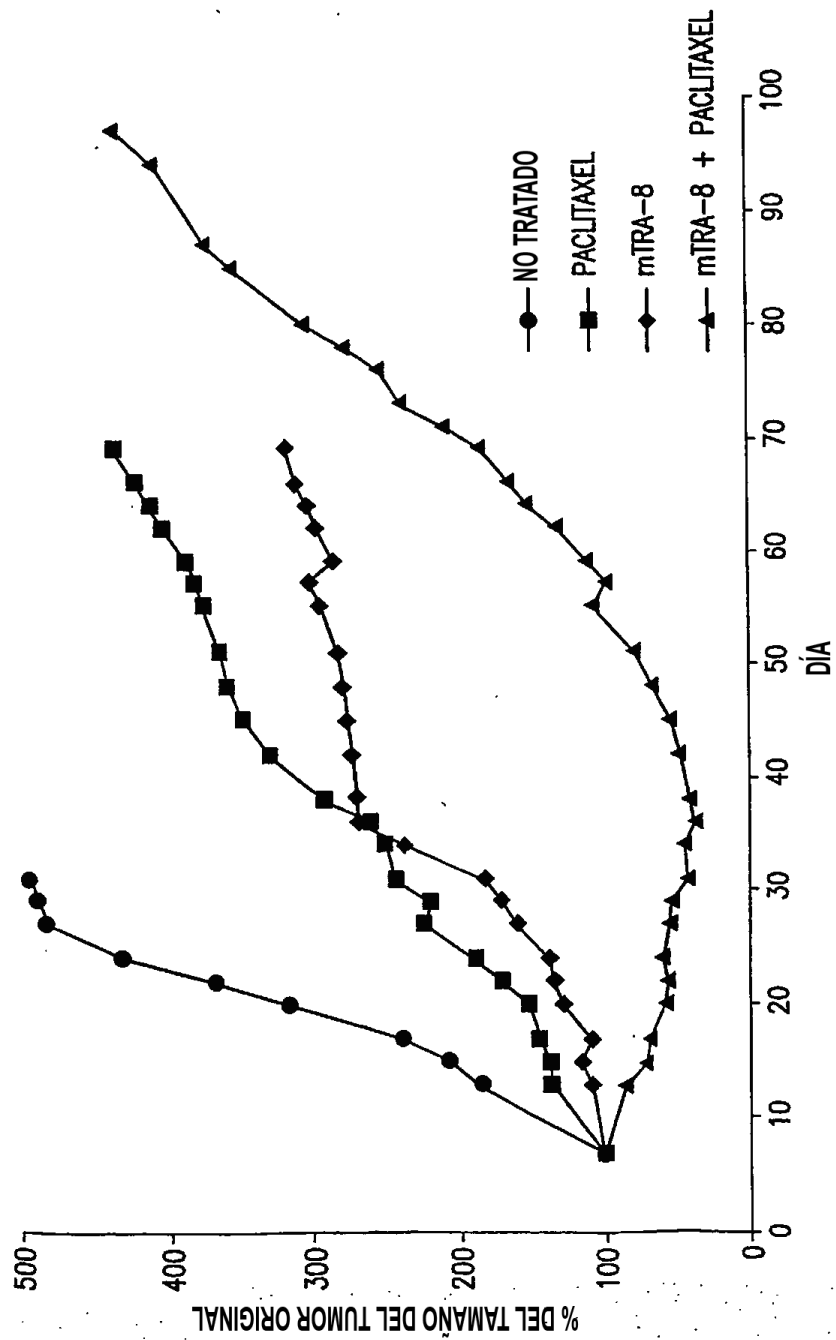


FIG. 26

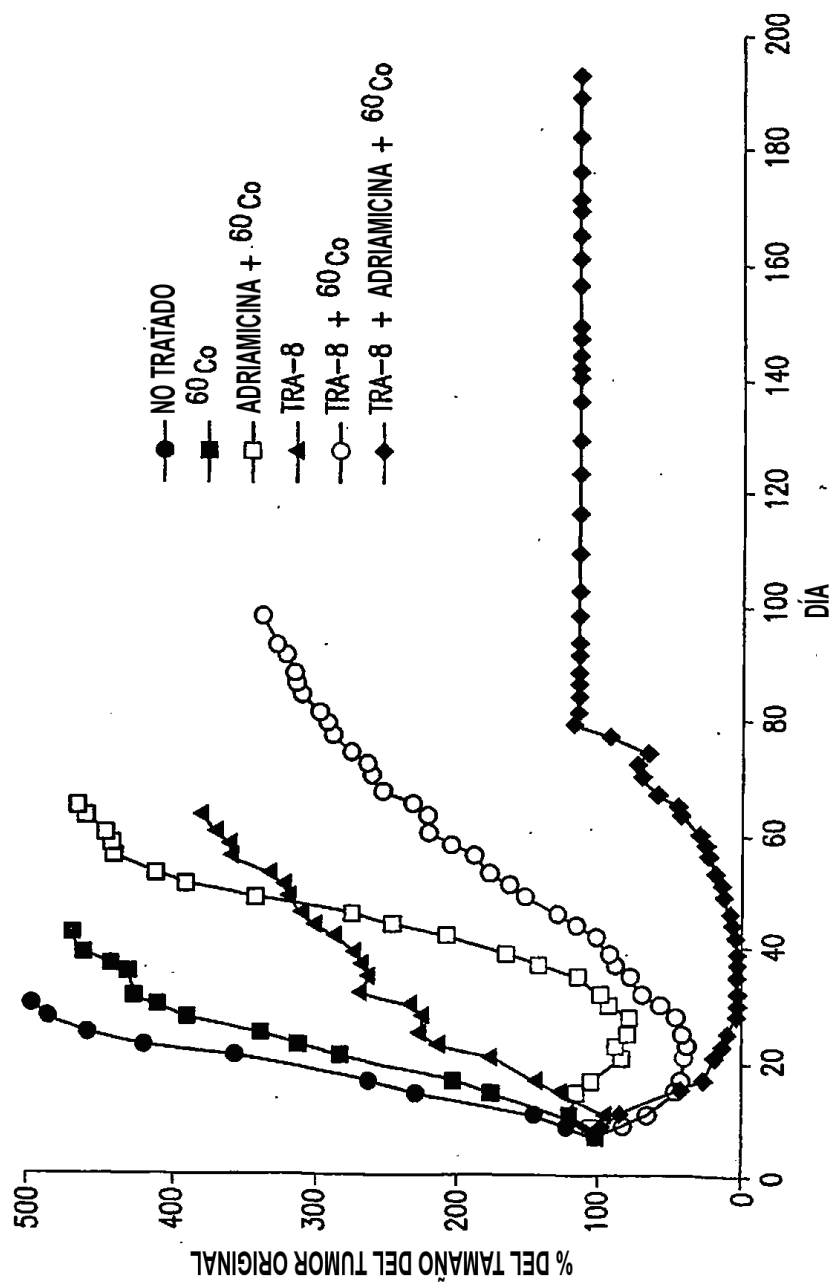


FIG. 27

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO0075191A [0010]
- WO0119861A [0010] [0010]
- WO0177342A [0010]
- WO03037913A [0044]
- WO9614328A [0109]
- WO9734911A [0109]
- WO9807880A [0109]
- WO9830694A [0109]
- WO9634095A [0109]
- WO9733904A [0109]
- WO9832856A [0109]
- WO9830693A [0109]
- WO9856892A [0109]
- WO9854202A [0109]
- WO9806842A [0109]
- EP0909816A1 [0264] [0272] [0273] [0281] [0299] [0363] [0372] [0399] [0411] [0426] [0438] [0453] [0464] [0479] [0486]
- US60391478B [0550]
- US60346402B [0550]
- US0114151W [0550]
- US60201344B [0550]

Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- K. Ichikawa et al. Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity *Nature Medicine*, 2001, vol. 7, 8954-960 [0011]
- Lonberg-Huszar Human antibodies from transgenic mice *Int. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0046]
- Current Methods in Sequence Comparison and Analysis *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications* Alan R. Liss, Inc. 1998 0000127-149 [0047]
- Yang et al. *J. Mol. Biol.*, 1995, vol. 254, 392-403 [0047]
- *J. Biol. Chem.*, vol. 253, 6551- [0047]
- S.M. Barge et al. *Pharmaceutical Salts* *J. Pharm. Sci.*, 1977, vol. 66, 1-19 [0101]
- Pro-drugs as Novel Delivery Systems T. Higuchi V. Stella *Bioreversible Carriers in Drug Design* American Pharmaceutical Association and Pergamon Press 1987 0000 vol. 14, [0102]
- *J. Exp. Med.*, vol. 188, 1185-90 [0109]
- The Merck Manual of Diagnosis and Therapy 1987 0000 [0137]
- Sladek et al. *Metabolism and Action of Anti-Cancer Drugs* Taylor and Francis 1987 0000 [0137]
- Edman, P. et al. *Eur. J. Biochem.*, 1967, vol. 1, 80-[0229]
- Kabat E.A. et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest* U.S. Department of Health and Human Services 1991 0000 vol. II, [0231]
- Sanger, F. S. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, vol. 74, 5463-5467 [0240] [0261] [0293] [0360] [0393] [0420] [0447] [0473]

- Methods in Enzymology, 1991, vol. 203, 121-153 [0242]
- Nuc. Acid Res., 2000, vol. 28, 235-242 [0242]
- Thornton et al. J. Mol. Biol., 1996, vol. 263, 800-815 [0242]
- FEBS letter, 1999, vol. 455, 188-197 [0242]
- J. Appl. Cryst., 1993, vol. 26, 283-291 [0243]
- Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, vol. 86, 10029-10033 [0244]
- Nuc. Acid Res., 2001, vol. 29, 205-206 [0244]
- Queen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, vol. 86, 10029-10033 [0244] [0329]
- Montgomery, D.C. Design and Analysis of Experiments Wiley 2001 0000 [0538]
- Gennings On Testing for Drug/Chemical Interactions: Definitions and Inference, 2000, 457-468 [0538]
- Lindsey, J.K. Models for Repeated Measurements, 1993, 100-142 [0539]
- Sas/Stat User's Guide, SAS Online Doc Cary NC: SAS Institute Inc. 1999 0000 [0541]
- Wiley SRSchooley KSmolak PJDin WSHuang CPNicholl JK Sutherland GR Smith TDRauch CSmith CA et al. Immunity, 1995, vol. 3, 6673-82 [0549]
- Pan GO'Rourke KChinnaiyan AMGentz REbner RNi JDixit VM Science, 1997, vol. 276, 5309111-3 [0549]
- Walczak H Degli-Esposti MA Johnson RSSmolak PJ Waugh JY Boiani N Timour MS Gerhart MJ Schooley KASmith CA EMBO J, 1997, vol. 16, 175386-97 [0549]
- MacFarlane MAhmad MSrinivasula SM Fernandes-Alnemri TCohen GM Alnemri ESJ Biol Chem, 1997, vol. 272, 4125417-20 [0549]
- Degli-Esposti MA Dougall WCSmolak PJ Waugh JY Smith CAGoodwin RGI Immunity, 1997, vol. 7, 6813-20 [0549]

- Chaudhary PMEby MJasmin ABookwalter AMurray JHood
LImmunity, 1997, vol. 7, 6821-30 [0549]
- Schneider PThome MBurns KBodmer JLFhofmann KKataoka
THoller NTschopp JImmunity, 1997, vol. 7, 6831-6 [0549]
- Degli-Esposti MASmolak PJWalczak HWAugh JHuang CPDuBose
RFGoodwin RGSmith CAJ Exp Med, 1997, vol. 186, 71165-
70 [0549]
- Sheridan JPMarsters SAPitti RMGurney ASkubatch MBaldwin
DRamakrishnan LGray CLBaker KWood WIScience, 1997, vol.
277, 5327818-21 [0549]
- Pan GNi JWei YFYu GGentz RDixit VMScience, 1997, vol.
277, 5327815-818 [0549]
- Marsters SASheridan JPPitti RMHuang ASkubatch MBaldwin
DYuan JGurney AGoddard ADGodowski PCurr Biol, 1997, vol.
7, 121003-6 [0549]
- Emery JGMcDonnell PBurke MBDeen KCLyn SSilverman CDul
EAppelbaum EREichman CDiPrinzio RJ Biol Chem, 1998, vol.
273, 2314363-7 [0549]
- Walczak HMiller REAriail KGliniak BGriffith TSKubin
MChin WJones JWoodward ALe TNat Med, 1999, vol. 5, 2157-
63 [0549]
- Gazitt YLeukemia, 1999, vol. 13, 111817-24 [0549]
- Rieger JNaumann UGlaser TAshkenazi AWeller MFEBS Lett,
1998, vol. 427, 1124-8 [0549]
- Jeremias IHerr IBoehler TDebatin KMEur J Immunol, 1998,
vol. 28, 1143-52 [0549]
- Martinez-Lorenzo MJAlava MAGamen SKim KJChuntharapai
APineiro ANaval JAnel AEur J Immunol, 1998, vol. 28,
92714-25 [0549]
- Phillips TANI JPan GRuben SMWei YFPace JLFHunt JSJ
Immunol, 1999, vol. 162, 106053-9 [0549]

- Kayagaki NYamaguchi NNakayama MTakeda KAKiba HTsutsui
HOkamura HNakanishi KOkumura KYagita H.J Immunol, 1999,
vol. 163, 41906-13 [0549]
- Johnsen ACHaux JSteinkjer BNonstad UGeberg KSundan
AAshkenazi AEspevik TCytokine, 1999, vol. 11, 9664-
72 [0549]
- Zamai LAhmad MBennett IMazzoni LAlnemri ESPerussia BJ
Exp Med, 1998, vol. 188, 122375-80 [0549]
- Fanger NAMaliszewski CRSchooley KGriffith TSJ Exp Med,
1999, vol. 190, 81155-64 [0549]
- Griffith TSWiley SRKubin MZSedger LMMaliszewski CRFanger
NAJ Exp Med, 1999, vol. 189, 81343-54 [0549]
- Griffith TSRauch CTSmolak PJWaugh JYBoiani NLYnch
DHSmith CAGoodwin RGKubin MZJ. Immunology, 1999, vol.
162, 2597-2605 [0549]
- Albani SCarson DAArthritis and allied conditions, a
textbook of rheumatology19970000vol. 2, 979-992 [0549]
- Fujisawa KAsahara HOkamoto KAono HHasunuma TKobata
TIwakura YYonehara SSumida TNishioka KJ. Clin. Invest.,
1996, vol. 98, 2271-278 [0549]
- Zhang HYang YHorton JLSamoilova EBJudge TATurka LAWilson
JMChen YJ. Clin. Invest., vol. 100, 81951-1957 [0549]
- Roth WIsenmann SNaumann UKugler SBahr MDichgans
JAshkenazi AWeller MLocoregionalBiochem Biophys Res
Commun, 1999, vol. 265, 2479-83 [0549]
- Chinnaiyan AMPrasad UShankar SHamstra DASHanaiah
MChenevert TLRoss BDRehemtulla AProc. Natl. Acad. Sci.,
2000, vol. 97, 41754-1759 [0549]
- Arai TAKiyama YOkabe SSaito KIwai TYuasa YCancer Lett,
1998, vol. 133, 2197-204 [0549]
- Lee SHShin MSKim HSlee HKPark WSKim SYLee JHHan SYPark
JYOh RRCancer Res, 1999, vol. 59, 225683-5686 [0549]

- Pai SIWu GSOzoren NWu LJen JSidransky DEl-Deiry WSCancer Res, 1998, vol. 58, 163513-3518 [0549]
- Maniatis et al.Molecular Cloning, a Laboratory ManualCold Spring Harbor Laboratory19820000 [0549]
- Schroff et al.Cancer Res., 1985, vol. 45, 879-885 [0549]
- Yelton, D. E. et al.Current Topics in Microbiology and Immunology, 1978, vol. 81, 1-7 [0549]
- Kohler, G. et al.European J. Immunology, 1976, vol. 6, 511-519 [0549]
- Shulman, M. et al.Nature, 1978, vol. 276, 269-270 [0549]
- Kearney, J. F. et al.J. Immunology, 1979, vol. 123, 1548-1550 [0549]
- Horibata, K.Harris, A. W.Nature, 1975, vol. 256, 495-497 [0549]
- Sheridan JPMarsters SAPitti RMGurney ASkubatch MBaldwin DRamakrishnanGray CLBake KWood WIScience, 1997, vol. 277, 818-821 [0549]
- Cheng J et al.Science, 1994, vol. 263, 1759-1762 [0549]
- Bendele AM et al.Clin Exp Rheumatol, 1999, vol. 17, 5553-560 [0549]
- Sheridan JPMarsters ASPitti RMGurney ASkubatch MBaldwin DRamakrishnan LGray CJBaker KWood WIScience, 1997, vol. 277, 818-821 [0549]
- Schneider PThome MBurns KBodmer JLFhofmann KKataoka THoller NTschopp J.Immunity, 1997, vol. 7, 6831-836 [0549]
- Kennedy NJKataoka TTschopp JBudd RCJ. Exp. Med., 1999, 1891-1896 [0549]
- Miiler-Ladner UGay REGay SARthritis and allied conditions, a textbook of rheumatology19970000vol. 1, 243-254 [0549]