



**A61K 39/395** (2006.01),  
**A61K 31/00** (2006.01),  
**A61K 38/00** (2006.01),  
**A61K 39/00** (2006.01),  
**A61P 35/00** (2006.01),  
**C07K 16/00** (2006.01),  
**C12N 1/00** (2006.01)

(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2004 00390**

(22) Data de depozit: **25.10.2002**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.04.2013** BOPI nr. **4/2013**

(30) Prioritate:

**01.11.2001 US 60/346,402;**  
**24.06.2002 US 60/391,478**

(41) Data publicării cererii:

**30.11.2004** BOPI nr. **11/2004**

(86) Cerere internațională PCT:

Nr. **US 2002/34420**

(87) Publicare internațională:

Nr. **WO 03/038043 08.05.2003**

(73) Titular:

• **UAB RESEARCH FOUNDATION,**  
**SUITE 1120G, 701 SOUTH 20TH STREET,**  
**BIRMINGHAM, AL, US**

(72) Inventatori:

• **ZHOU TONG, 332 WEST STONEBROOK**  
**PLACE, BIRMINGHAM, AL, US;**  
• **ICHIKAWA KIMIHISA, 1-3-42-205,**  
**TERAYA, TSURUMI-KU, YOKOHAMA-SHI,**  
**KANAGAWA-KEN, JP;**

• **KIMBERLY P. ROBERT, 2045 MAGNOLIA**  
**RIDGE, BIRMINGHAM, AL, US;**  
• **KOOPMAN J. WILLIAM, 187 WILDWOOD**  
**AVENUE, INDIAN SPRINGS, AL, US;**  
• **OSHUMI JUN, 21-38,**  
**EDAHIGASHI-2-CHOME, TUDUKI-KU,**  
**YOKOHAMA-SHI, KANAGAWA-KEN, JP;**  
• **LOBUGLIO F. ALBERT,**  
**2204 TANGLEWOOD ROAD, BIRMINGHAM,**  
**AL, US;**  
• **BUCHSBAUM J. DONALD,**  
**140 WINDWOOD CIRCLE, MONTEVALLO,**  
**AL, US**

(74) Mandatar:

**ROMINVENT S.A.,**  
**STR. ERMIL PANGRATTI NR.35,**  
**SECTOR 1, BUCUREȘTI**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

**WO 00/75191 A2; WO 01/83560 A1**

(54) **METODĂ IN VITRO DE INDUCERE SELECTIVĂ A**  
**APOPTOZEI SAU DE INHIBARE A PROLIFERĂRII**  
**CELULELOR ȚINTĂ CARE EXPRIMĂ DR5 ȘI COMPOZIȚIE**  
**PENTRU INDUCEREA SELECTIVĂ A APOPTOZEI**  
**CUPRINZÂND O COMBINAȚIE DE ANTICORPI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la combinații de anticorpi selectivi pentru un receptor al unui ligand care induce apoptoza, asociat cu un factor al necrozei tumorale. Un anticorp din prezenta invenție interacționează cu DR5 uman sau cu DR4 uman, pentru a produce efecte agoniste sau antagoniste în josul reacției cascade a receptorului, incluzând inhibiția proliferării celulare și apoptozei.

Metodele și utilizările anticorpilor, opțional, în combinație cu diferiți agenți terapeutici, conform invenției, sunt utilizate în tratamentul bolilor legate de apoptoză și în tratamentul creșterii celulare neregulate.

Revendicări: 19

Figuri: 28

Examinator: biochimist EREMA LAURA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

# RO 123525 B1

1 Inventția se referă la metode *in vitro* de inducere selectivă a apoptozei sau de inhibare  
a proliferării celulelor țintă care exprimă DR5 și la o compoziție care cuprinde o combinație  
3 de anticorpi, pentru inducerea selectivă a apoptozei. Inventția de față se referă la un anticorp  
capabil să lege specific un receptor pentru un ligand (la care se va face referire în continuare  
5 ca „TRAIL”) inductor al apoptozei, asociat cu un tip singular de factor al necrozei tumorale  
(la care se va face referire în continuare ca „TNF”), mai specific, la un anticorp monoclonal  
7 care induce apoptoza în celule *in vivo* și *in vitro* care exprimă receptorul de tip singular și la  
terapii bazate pe acesta.

9 TRAIL este un membru al familiei de proteine TNF, care include de asemenea TNF- $\alpha$   
și ligandul Fas (S. R. Wiley, K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C. P. Huang, J. K. Nicholl,  
11 G. R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch, C. A. Smith, et al., *Immunity*, 1995, Dec; 3(6):673-  
82). Aceste proteine sunt inductori eficace ai apoptozei. Au fost identificați până acum cinci  
13 receptori pentru TRAIL, dintre care doi, DR4 (TRAIL-R1) și DR5 (TRAIL-R2) (G. Pan, K.  
O'Rourke, A. M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni, V. M. Dixit, *Science*, 1997 4 Apr;  
15 276(5309): 111-3; H. Walczak, M. A. Degli-Esposti, R. S. Johnson, P. J. Smolak, J. Y. Waugh,  
N. Boiani, M. S. Timour, M. J. Gerhart, K. A. Schooley, C. A. Smith, R. G. Goodwin, C. T.  
17 Rauch., *EMBO J.*, 1997, 1 Sep; 16(17):5356-97; M. MacFarlane, M. Ahmad, S. M.  
Srinivasula, T. Femandes-Alnemri, G. M. Cohen, E. S. Alnemri., *J. Biol. Chem.*, 1997, 10 Oct;  
19 272(41):25417-20; M. A. Degli-Esposti, W. C. Dougall, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, C. A.  
Smith, R. G. Goodwin, *Immunity*, 1997, Dec; 7(6):813-20; P. M. Chaudhary, M. Eby, A.  
21 Tasmin, A. Bookwalter, J. Murray, L. Hood, *Immunity*, 1997, Dec; 7(6):821-30; P. Schneider,  
M. Thome, K. Burns, J. L. Bodmer, K. Hofmann, T. Kataoka, N. Holler, J. Tschopp., *Immunity*,  
23 1997 Dec; 7(6):831-6) sunt capabili de a traduce semnalul de apoptoză, în timp ce ceilalți  
trei DcR1 (TRAIL-R3), DcR2 (TRAIL-R4) și osteoprotegerina (OPG) nu traduc semnalul de  
25 apoptoză (M. A. Degli-Esposti, P. J. Smolak, H. Walczak, J. Waugh, C. P. Huang, R. F.  
DuBose, R. G. Goodwin, C. A. Smith, *J. Exp. Med.*, 1997, Get 6; 186(7):1165-70; J. P.  
27 Sheridan, S. A. Marsters, R. M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan,  
C. L. Gray, K. Baker, W. I. Wood, A. D. Goddard, P. Godowski, A. Ashkenazi, *Science*, 1997,  
29 8 Aug.; 277(5327):818-21; G. Pan, J. Ni, Y. F. Wei, G. Yu, R. Gentz, V. M. Dixit, *Science*,  
1997, 8 Aug; 277(5327):815-818; S. A. Marsters, J. P. Sheridan, R. M. Pitti, A. Huang, M.  
31 Skubatch, D. Baldwin, J. Yuan, A. Gurney, A. D. Goddard, P. Godowski, A. Ashkenazi., *Curr.*  
*Biol.*, 1997, 1 Dec; 7(12):1003-6; J. G. Emery, P. McDonnell, M. B. Burke, K. C. Deen, S. Lyn,  
33 C. Silverman, E. Dul, E. R. Appelbaum, C. Eichman, R. DiPrinzio, R. A. Dodds, I. E. James,  
M. Rosenberg, J. C. Lee, P. R. Young, *J. Biol. Chem.*, 1998, 5 Iunie; 273(23):14363-7). Toți  
35 cei cinci receptori pentru TRAIL au în comun o omologie semnificativă a domeniilor de legare  
a ligandului extracelular. Similar cu Fas și cu receptorul I al TNF (la care se va face referire  
37 în continuare ca „TNFRI”), segmentele intracelulare atât ale DR4, cât și ale DR5, conțin un  
domeniu al morții și traduc un semnal de apoptoză printr-o cale care implică o proteină a  
39 domeniului morții, asociată cu Fas (la care se va face referire în continuare ca „FADD”) și  
caspaza 8 (P. M. Chaudhary, M. Eby, A. Tasmin, A. Bookwalter, J. Murray, L. Hood,  
41 *Immunity*, 1997 Dec; 7(6):821-30; P. Schneider, M. Thome, K. Burns, J. L. Bodmer, K.  
Hofmann, T. Kataoka, N. Holler, J. Tschopp, *Immunity*, 1997, Dec; 7(6):831-6).

43 Suplimentar față de traducerea semnalului apoptozei, receptorii DR4 și DR5 pot de  
asemenea să activeze o cale care să implice NF $\kappa$ b (P. M. Chaudhary, M. Eby, A. Tasmin,  
45 A. Bookwalter, J. Murray, L. Hood, *Immunity*, 1997, Dec; 7(6):821-30; P. Schneider, M.  
Thome, K. Burns, J. L. Bodmer, K. Hofmann, T. Kataoka, N. Holler, J. Tschopp, *Immunity*,  
47 1997, Dec; 7(6):831-6).

# RO 123525 B1

Funcțiile biologice ale TRAIL, care au fost demonstrate, includ capacitatea TRAIL de a induce selectiv apoptoza celulelor tumorale transformate, celulele normale fiind relativ rezistente la apoptoza mediată de TRAIL (H. Walczak, R. E. Miller, K. Ariail, B. Gliniak, T. S. Griffith, M. Kubin, W. Chin, J. Jones, A. Woodward, T. Le, C. Smith, P. Smolak, R. G. Goodwin, C. T. Rauch, J. C. Schuh, D. H. Lynch, *Nat. Med.*, 1999, Feb; 5(2):157-63; Y. Gazitt, *Leukemia*, 1999, Noiembrie; 13(11): 1817-24; J. Rieger, U. Naumann, T. Glaser, A. Ashkenazi, M. Weller, *FEBS Lett.*, 1998, 1 Mai; 427(1): 124-8). Această selectivitate sugerează faptul că, în contrast cu ligandul Fas, administrarea lui TRAIL se asociază cu niveluri foarte scăzute de toxicitate, după cum s-a demonstrat prin administrarea sistemică a TRAIL pe un model animal, fără a induce o toxicitate semnificativă (H. Walczak, R. E. Miller, K. Ariail, B. Gliniak, T. S. Griffith, M. Kubin, W. Chin, J. Jones, A. Woodward, T. Le, C. Smith, P. Smolak, R. G. Goodwin, C. T. Rauch, J. C. Schuh, D. H. Lynch, *Nat. Med.*, 1999, Feb; 5(2):157-63). Astfel, TRAIL a fost propus ca agent eficace de inducție a apoptozei, care ar putea fi un agent terapeutic adecvat pentru tratamentul cancerului și al altor boli asociate cu proliferarea celulară anormală. TRAIL a fost de asemenea propus ca agent eficace de inducție a apoptozei, care ar fi adecvat pentru tratamentul bolilor autoimune și inflamatorii. S-a demonstrat că apoptoza mediată de TRAIL este implicată în moartea celulară indusă prin activarea celulelor T, astfel servind ca mecanism alternativ la ligandul Fas (I. Jeremias, I. Herr, T. Boehler, K. M. Debatin, *Eur. J. Immunol.*, 1998, Ianuarie; 28(1):143-52; M. J. Martinez-Lorenzo, M. A. Alava, S. Gamen, K. J. Kim, A. Chuntharapai, A. Pineiro, J. Naval, A. Anei, *Eur. J. Immunol.*, 1998, Sept; 28(9):2714-25). Apoptoza mediată de TRAIL poate de asemenea să funcționeze în inducția apoptozei celulelor T și a altor celule inflamatorii (T. A. Phillips, J. Ni, G. Pan, S. M. Ruben, Y. F. Wei, J. L. Pace, J. S. Hunt, *J. Immunol.*, 1999, 15 Mai; 162(10):6053-9) și joacă un rol în activitatea ucigașă a celulelor NK (N. Kayagaki, N. Yamaguchi, M. Nakayama, K. Takeda, H. Akiba, H. Tsutsui, H. Okamura, K. Nakanishi, K. Okumura, H. Yagita, *J. Immunol.*, 1999, 15 Aug; 163(4):1906-13; A. C. Johnsen, J. Haux, B. Steinkjer, U. Nonstad, K. Egeberg, A. Sundan, A. Ashkenazi, T. Espevik, *Cytokine*, 1999, Sept., 11(9):664-72; L. Zamai, M. Ahmad, I. M. Bennett, L. Azzoni, E. S. Alnemri, B. Perussia, *J. Exp. Med.*, 1998, 21 Dec; 188(12):2375-80), și în funcția imunomodulatoare a celulelor dendritice (N. A. Fanger, C. R. Maliszewski, K. Schooley, T. S. Griffith, *J. Exp. Med.*, 1999, 18 Oct; 190(8):1155-64, T. S. Griffith, S. R. Wiley, M. Z. Kubin, L. M. Sedger, C. R. Maliszewski, N. A. Fanger, *J. Exp. Med.*, 1999, 19 Apr; 189(8): 1343-54). Astfel, apoptoza mediată de TRAIL poate de asemenea funcționa în avantajul imunitar și în supravegherea imunologică.

Sistemul receptor TRAIL este complex, și include cel puțin doi receptori ai morții, DR4 și DR5, și cel puțin doi receptori neapoptotici, DcR1 și DcR2. Toți acești receptori nu au doar o înaltă omologie a secvențelor de aminoacizi, ci prezintă de asemenea o afinitate de legare similară la TRAIL (G. Pan, K. O'Rourke, A. M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni, V. M. Dixit, *Science*, 1997, 4 Apr; 276(5309): 111-3; H. Walczak, M. A. Degli-Esposti, R. S. Johnson, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, M. S. Timour, M. J. Gerhart, K. A. Schooley, C. A. Smith, R. G. Goodwin, C. T. Rauch, *EMBO J.*, 1997, 1 Sep; 16(17):5356-97; M. MacFarlane, M. Ahmad, S. M. Srinivasula, T. Fernandes-Alnemri, G. M. Cohen, E. S. Alnemri, *J. Biol. Chem.*, 1997, 10 Oct; 272(41):25417-20; M. A. Degli-Esposti, W. C. Dougall, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, C. A. Smith, R. G. Goodwin, *Immunity*, 1997, Dec; 7(6):813-20; P. M. Chaudhary, M. Eby, A. Tasmin, A. Bookwalter, J. Murray, L. Hood, *Immunity*, 1997, Dec; 7(6):821-30; P. Schneider, M. Thome, K. Burns, J. L. Bodmer, K. Hofmann, T. Kataoka, N. Holler, J. Tschopp, *Immunity*, 1997, Dec; 7(6):831-6; M. A. Degli-Esposti, P. J. Smolak, H. Walczak, J. Waugh, C. P. Huang, R. F. DuBose, R. G. Goodwin, C. A. Smith, *J. Exp.*

# RO 123525 B1

1 *Med.*, 1997, Get 6; 186(7):1165-70; J. P. Sheridan, S. A. Marsters, R. M. Pitti, A. Gurney, M.  
Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C. L. Gray, K. Baker, W. I. Wood, A. D. Goddard,  
3 P. Godowski, A. Ashkenazi, *Science*, 1997, 8 Aug; 277(5327):818-21; G. Pan, J. Ni, Y. F.  
Wei, G. Yu, R. Gentz, V. M. Dixit, *Science*, 1997, 8 Aug; 277(5327):815-818; S. A. Marsters,  
5 J. P. Sheridan, R. M. Pitti, A. Huang, M. Skubatch, D. Baldwin, J. Yuan, A. Gurney, A. D.  
Goddard, P. Godowski, A. Ashkenazi, *Curr. Biol.*, 1997, 1 Dec; 7(12):1003-6; J. G. Emery,  
7 P. McDonnell, M. B. Burke, K. C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E. R. Appelbaum, C.  
Eichman, R. DiPrinzio, R. A. Dodds, I. E. James, M. Rosenberg, J. C. Lee, P. R. Young, *J.*  
9 *Biol. Chem.*, 1998, 5 Iunie; 273(23):14363-7). Capacitatea receptorilor DcR1 și DcR2 de a  
11 intra în competiție pentru TRAIL, fără a induce apoptoza, sugerează că aceștia se pot  
comporta ca receptori momeală, care blochează sau modulează activitatea ligandului TRAIL.  
13 Mai mult, s-a raportat că celulele netransformate exprimă niveluri mai mari ale receptorilor  
momeală decât o fac celulele transformate. Astfel, s-a propus ca modularea distinctivă a  
15 exprimării receptorilor morții și momelii să poată reprezenta un mecanism reglator cheie,  
care să determine susceptibilitatea celulei la apoptoza mediată de TRAIL, doar datorită lipsei  
17 de anticorpi receptor-specifici (G. Pan, K. O'Rourke, A. M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner,  
J. Ni, V. M. Dixit, *Science*, 1997, 4 Apr; 276(5309): 111-3). Deși exprimarea și funcționarea  
19 DR4 și DR5 a fost studiată pe larg, progresul a fost împiedicat de lipsa anticorpilor  
monoclonali receptor-specifici. Exprimarea la suprafața celulei a DR5 nu a fost documentată.  
21 S-a raportat faptul că a fost produs un grup de anticorpi antireceptor TRAIL, care este  
capabil de a induce apoptoza celulelor de melanom *in vitro*, dar doar după imobilizarea  
23 anticorpilor, pentru a promova legarea încrucișată, și, în unele cazuri, celulele necesită  
cultivarea cu actinomicină D (T. S. Griffith, C. T. Rauch, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N.  
Boiani, D. H. Lynch, C. A. Smith, R. G. Goodwin, M. Z. Kubin, *J. Immunology*, 1999, 162:  
25 2597-2605). Au fost produși câțiva anticorpi anti-DR5 (T. S. Griffith, C. T. Rauch, P. J.  
Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, D. H. Lynch, C. A. Smith, R. G. Goodwin, M. Z. Kubin, *J.*  
27 *Immunology*, 1999, 162: 2597-2605). Cu toate acestea, acești anticorpi monoclonali anti-  
DR5, produși anterior, au o activitate inductoare a apoptozei scăzută *in vitro*, chiar și în  
29 condițiile legării încrucișate (reticulării). Nu a fost raportată nicio activitate *in vivo*. Acești  
anticorpi nu au fost utilizați pentru examinarea exprimării la suprafața celulei a receptorilor  
31 TRAIL (T. S. Griffith, C. T. Rauch, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, D. H. Lynch, C. A.  
Smith, R. G. Goodwin, M. Z. Kubin, *J. Immunology*, 1999, 162: 2597-2605). Astfel, există  
33 necesitatea unui anticorp monoclonal care să fie selectiv pentru fiecare receptor TRAIL  
specific, care nu este doar capabil să lege receptorul de pe suprafața celulei, ci, de  
35 asemenea, de a induce puternic apoptoza a numeroase tipuri de celule anormale, incluzând  
celulele tumorale, atât *in vivo*, cât și *in vitro*, fără necesitatea legării încrucișate (reticulării)  
37 sau a imobilizării. Un asemenea anticorp nu ar asigura doar un potențial agent terapeutic,  
ci și un instrument de diagnostic pentru analiza funcțională a receptorului TRAIL. Există o  
39 necesitate specială pentru un anticorp specific împotriva fiecăruia dintre receptorii inductori  
ai morții DR4 și DR5.

41 În dezvoltarea sau progresia multor boli, există adesea cazul în care celulele nu sunt  
eliminate. În multe boli autoimune și în multe stări inflamatorii, celulele activate care  
43 supraviețuiesc atacă celulele sau țesuturile normale. În plus, progresia tumorigenezei și  
formarea panusului proliferativ al artritei reumatoide sunt caracterizate prin proliferarea  
45 necontrolată a celulelor. Astfel, apoptoza insuficientă conduce la dezvoltarea bolii, iar  
utilizarea ligandului inductor al apoptozei sau a anticorpului monoclonal agonist pentru a  
47 îmbunătăți apoptoza sunt considerate ca o strategie terapeutică potențială, pentru eliminarea  
acelor celule nedorite.

# RO 123525 B1

De exemplu, artrita reumatoidă (la care se va face referire în continuare ca „RA”) este o boală umană, autoimună, comună. Modul curent de înțelegere a fiziopatologiei RA este acela că celulele T autoimune și celulele B inițiază un răspuns inflamator în articulații, care conduce la hiperproliferarea sinoviocitelor. Ca o consecință a hiperproliferării celulelor sinoviale, metaloproteinazele (la care se va face referire în continuare ca „MMP-uri”) sunt produse în mod excedentar, ceea ce conduce mai departe la distrugerea erozivă a cartilajului și a oaselor, ceea ce este caracteristic pentru RA (S. Albani și D. A. Carson, 1997, *Arthritis and allied conditions, a textbook of rheumatology*, Ediția a 13-a, volumul 2, 979-992). Astfel, controlul hiperproliferării celulelor inflamatorii sinoviale este o etapă cheie în tratamentul RA. Mecanismele moleculare, care conduc la hiperproliferarea celulelor sinoviale, sunt încă necunoscute. Deși celulele sinoviale hiperproliferative nu sunt maligne și nu sunt transformate, multe studii au sugerat faptul că acestea prezintă caracteristici comune cu celulele transformate (U. Miller-Ladner, R. E. Gay și S. Gay, 1997, *Arthritis and allied conditions, a textbook of rheumatology*, Ediția a 13-a, volumul 1, 243-254). Aceste celule, așa-numitele „sinoviocite care apar transformate”, sunt caracterizate printr-un reticul endoplasmatic rugos, dens, numeroși nuclei neregulați și modificări ale scheletului celular, în mod normal în formă de fus. S-a presupus că încorporarea oncogenelor și a genelor derivate de la virusuri ar putea fi declanșatorii primari ai formei transformate a celulelor sinoviale de RA (U. Miller-Ladner, R. E. Gay și S. Gay, 1997, *Arthritis and allied conditions, a textbook of rheumatology*, ediția a 13-a, volumul 1, 243-254).

Cel puțin două aspecte ale RA sugerează că apoptoza neregulată poate contribui la procesul bolii și că provocarea terapeutică a apoptozei poate fi un tratament eficient: eșecul eliminării celulelor T activate sugerează faptul că există o moarte celulară defectuoasă, indusă de activarea acestor celule T, care este un proces care implică apoptoza mediată de Fas și apoptoza mediată de TRAIL, iar natura hiperproliferativă a celulelor sinoviale RA este un factor care contribuie la etapele ulterioare ale fiziopatologiei RA. Într-adevăr, s-a demonstrat faptul că administrarea anticorpului anti-Fas, în articulațiile inflamatoare, inhibă dezvoltarea artritei cronice la șoarecii transgenici *tax*, care sunt un model animal pentru RA umană (K. Fujisawa, H. Asahara, K. Okamoto, H. Aono, T. Hasunuma, T. Kobata, Y. Iwakura, S. Yonehara, T. Sumida și K. J. Nishioka, *Clin. Invest.* 1996, 98(2): 271-278). Mai mult, transducția localizată cu gena care codifică pentru ligandul fas, printr-un vector adenoviral, este eficientă pentru prevenirea artritei induse de colagen (H. Zhang, Y. Yang, J. L. Horton, E. B. Samoilova, T. A. Judge, L. A. Turka, J. M. Wilson, și Y. Chen, 1997, *J. Clin. Invest.*, 100(8), 1951-1957). Inhibiția proliferării celulelor inflamatorii sinoviale prin îmbunătățirea apoptozei mediate de Fas este observată în ambele cazuri. Deși ligandul Fas este un puternic inductor al apoptozei în celulele sinoviale RA, aplicarea apoptozei mediate de ligandul Fas, ca terapie pentru oameni, a fost limitată de toxicitatea letală asupra ficatului. Astfel, apoptoza indusă de receptorul TRAIL reprezintă o terapie mai sigură și mai eficientă pentru tratamentul RA decât apoptoza indusă de ligandul Fas.

Apoptoza indusă de receptorul TRAIL reprezintă de asemenea o terapie mai sigură și mai eficientă pentru tratamentul cancerului decât apoptoza indusă de ligandul Fas. Apoptoza mediată de TRAIL este cunoscută a induce în mod specific apoptoza celulelor tumorale transformate, fără afectarea celulelor normale. S-a arătat că administrarea sistemică a TRAIL solubil trimerizat nu produce toxicitate la animalele experimentale, și a fost chiar capabil de a induce regresia tumorilor implantate (H. Walczak, R. E. Miller, K. Ariail, B. Gliniak, T. S. Griffith, M. Kubin, W. Chin, J. Jones, A. Woodward, T. Le, C. Smith, P. Smolak, R. G. Goodwin, C. T. Rauch, J. C. Schuh, D. H. Lynch, *Nat. Med.*, 1999, Feb.; 5(2):157-63; W. Roth, S. Isenmann, U. Naumann, S. Kugler, M. Bahr, J. Dichgans, A.

# RO 123525 B1

1 Ashkenazi, M. Weller, *Locoregional. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 19 Nov.;  
265(2):479-83). Potențialul acestuia ca terapie adjuvantă pentru tratamentele tradiționale a  
3 fost subliniat de descoperirea recentă a faptului că exprimarea DR5 și susceptibilitatea la  
4 apoptoza indusă de TRAIL a celulelor de cancer de sân este îmbunătățită prin iradiere,  
5 sugerând faptul că eficiența TRAIL în terapia cancerului ar fi crescută în combinație cu  
6 iradierea (A. M. Chinnaiyan, U. Prasad, S. Shankar, D. A. Hamstra, M. Shanaiah, T. L.  
7 Chenevert, B. D. Ross, A. Rehemtulla, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 15 Feb.; 97(4):1754-  
1759).

8 În plus, gena care codifică receptorul DR5 pentru TRAIL, a fost cartografiată până  
9 la cromozomul 8p21-22, loc cu o înaltă frecvență a mutațiilor la unele celule canceroase (T.  
10 Arai, Y. Akiyama, S. Okabe, K. Saito, T. Iwai, Y. Yuasa, *Cancer Lett.*, 1998, 27 Nov; 133(2):  
11 197-204). S-a raportat faptul că cel puțin două tipuri de celule tumorale, adică cancerul de  
12 plămân cu celule mici (S. H. Lee, M. S. Shin, H. S. Kim, H. K. Lee, W. S. Park, S. Y. Kim, J.  
13 H. Lee, S. Y. Han, J. Y. Park, R. R. Oh, J. J. Jang, J. Y. Han, J. Y. Lee, N. J. Yoo, *Cancer  
14 Res.*, 1999, 15 Nov; 59(22):5683-5686) și cancerul capului și al gâtului (S. I. Pai, G. S. Wu,  
15 N. Ozoren, L. Wu, J. Jen, D. Sidransky, W. S. El-Deiry, 1998, *Cancer Res.*, 15 Aug;  
16 58(16):3513-3518) prezintă mutații în domeniul morții genei DR5. Astfel, există necesitatea  
17 unui anticorp anti-DR5 în cercetările asupra cancerului, pentru a determina efectul variației  
18 determinantului antigenic al receptorului asupra dezvoltării și progresiei cancerelor. În plus,  
19 funcționalitatea mutațiilor receptorului TRAIL s-ar dovedi un instrument de diagnostic util,  
20 atunci când este utilizată împreună cu alți biomarkeri, în detectarea timpurie a cancerului și  
21 ca instrument de predicție a agresivității tumorilor.

22 Un obiect al prezentei invenții este o metodă *in vitro* de inducere selectivă a  
23 apoptozei în celulele țintă care exprimă DR5, care cuprinde etapele: a. contactarea celulelor  
24 țintă cu o cantitate terapeutică dintr-un anticorp care se leagă în mod specific la un receptor  
25 DR5 TRAIL, în care anticorpul este un anticorp care are aceeași specificitate pentru epitop  
26 ca TRA-8 al hibridomului șoarece-șoarece, care are numărul de acces ATCC PTA-1428, în  
27 care anticorpul respectiv, în forma sa solubilă, are activitate de inducere a apoptozei *in vivo*  
28 și *in vitro*, în celulele țintă care exprimă DR5, și b. contactarea celulelor țintă cu o cantitate  
29 terapeutică dintr-un anticorp care se leagă în mod specific la un receptor DR4 TRAIL, în care  
30 anticorpul este un anticorp care are aceeași specificitate pentru epitop ca 2E12 al  
31 hibridomului șoarece-șoarece. care are numărul de acces ATCC PTA-3798, în care  
32 anticorpul respectiv, în forma sa solubilă, are o activitate de inducere a apoptozei *in vivo* și  
33 *in vitro*, în celulele țintă care exprimă DR4.

34 Un alt obiect al prezentei invenții este o metodă *in vitro* de inhibare a proliferării  
35 celulelor țintă care exprimă DR5, care cuprinde etapele: a. contactarea celulelor țintă cu o  
36 cantitate terapeutică dintr-un anticorp care se leagă în mod specific la un receptor DR5  
37 TRAIL, în care anticorpul este un anticorp care are aceeași specificitate pentru epitop ca  
38 TRA-8 al hibridomului șoarece-șoarece, care are numărul de acces ATCC PTA-1428, în care  
39 anticorpul respectiv, în forma sa solubilă, are activitate de inducere a apoptozei *in vivo* și *in  
40 vitro*, în celulele țintă care exprimă DR5, și b. contactarea celulelor țintă cu o cantitate  
41 terapeutică dintr-un anticorp care se leagă în mod specific la un receptor DR4 TRAIL, în care  
42 anticorpul este un anticorp care are aceeași specificitate pentru epitop ca 2E12 al  
43 hibridomului șoarece-șoarece, care are numărul de acces ATCC PTA-3798, în care  
44 anticorpul respectiv, în forma sa solubilă, are o activitate de inducere a apoptozei *in vivo* și  
45 *in vitro*, în celulele țintă care exprimă DR4.

46 Invenția se mai referă la o compoziție care cuprinde o combinație alcătuită din:  
47 a. o cantitate terapeutică dintr-un anticorp care se leagă, în mod specific, la un  
48 receptor DR5 TRAIL, în care anticorpul este un anticorp cu aceeași specificitate pentru  
49

# RO 123525 B1

epitop ca TRA-8 al hibridomului șoarece-șoarece, care are numărul de acces ATCC PTA-1428, în care anticorpul respectiv, în forma sa solubilă, are activitate de inducere a apoptozei <i>in vivo</i> și <i>in vitro</i> , în celulele țintă care exprimă DR5,	1
și	3
b. o cantitate terapeutică dintr-un anticorp care se leagă, în mod specific, la un receptor DR4 TRAIL, în care anticorpul este un anticorp care are aceeași specificitate pentru epitop ca 2E12 al hibridomului șoarece-șoarece, care are numărul de acces ATCC PTA-3798, în care anticorpul respectiv, în forma sa solubilă, are o activitate de inducere a apoptozei <i>in vivo</i> și <i>in vitro</i> , în celulele țintă care exprimă DR4.	5
Într-una dintre concretizări, invenția se referă la un anticorp care recunoaște un receptor TRAIL DR5 și care induce apoptoza într-o celulă care îl exprimă pe DR5 <i>in vivo</i> sau <i>in vitro</i> . Mai departe, este descris un anticorp care recunoaște DR5, dar nu și DR4, DcR1 sau DcR2. În mod specific este detaliat un anticorp monoclonal pentru DR5 produs de un hibridom.	7
Într-o altă concretizare, invenția se referă la un anticorp care recunoaște un receptor TRAIL DR4 și care induce apoptoza într-o celulă care exprimă DR4 <i>in vivo</i> sau <i>in vitro</i> . Este descris în continuare un anticorp care recunoaște DR4, dar nu și DR5, DcR1 sau DcR2. Este descris în mod specific un anticorp monoclonal pentru DR4 produs de un hibridom.	9
Una dintre metodele furnizate este inducția apoptozei în celulele țintă sau inhibiția proliferării celulelor țintă prin punerea în contact a celulelor cu o cantitate terapeutică de anticorp capabil de a se lega la DR5 sau DR4. În diferite concretizări ale metodei, apoptoza poate fi indusă sau proliferarea celulelor poate fi inhibată prin punerea în contact a celulelor țintă cu anticorpi împotriva altor receptori ai morții.	11
Mai este descrisă o compoziție farmaceutică care include o cantitate terapeutică de anticorp monoclonal activ împotriva DR5, un transportor farmaceutic acceptabil și, opțional, un recipient care conține anticorpul și transportorul. Este furnizată în continuare de către invenție utilizarea unui anticorp care să recunoască DR5 sau un anticorp care să recunoască DR4, pentru prepararea unui agent terapeutic pentru apoptoza selectivă a celulelor anormale sau neregulate.	13
Un anticorp din invenția de față interacționează cu un receptor al unui ligand inductor al apoptozei, asociat cu un factor al necrozei tumorale, cum ar fi DR4, DR5, DrR1, DrR2 și OPG, care induce apoptoza într-o celulă care exprimă un asemenea receptor. Este descris un anticorp din invenție, capabil de a lega selectiv un determinant antigenic al unui receptor agonist sau antagonist al unui ligand al unui factor al necrozei tumorale.	15
Invenția de față furnizează un tratament pentru o boală asociată cu apoptoza, pentru cancer, pentru o boală inflamatorie sau pentru o boală autoimună, printr-o metodă care include punerea în contact a unui țesut țintă bolnav cu o cantitate terapeutică de anticorp din invenție, singur sau în combinație cu alți anticorpi inductori ai apoptozei, și/sau cu alți agenți terapeutici sau tratamente.	17
Este descrisă, în continuare, o proteină de fuziune, care include o secvență antigenică a unui aminoacid al unui receptor al TRAIL care are cel puțin zece baze, cuplată la o proteină imunoglobulină sau la un fragment al acesteia, capabilă de a provoca un răspuns imun la un subiect.	19
Invenția de față furnizează o metodă de terapie genică, în care o celulă țintă este transfectată cu o secvență de acid nucleic al unui receptor TRAIL într-un vector de expresie, astfel încât receptorul TRAIL este exprimat pe celula țintă. Celula țintă este apoi expusă la un anticorp care leagă selectiv receptorul TRAIL.	21
	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

# RO 123525 B1

1 Sunt furnizate secvențe de acid nucleic și secvențe de aminoacid care codifică  
2 imunoglobulinele cu lanț ușor și greu ale unui anticorp selectiv pentru DR5. Sunt furnizate,  
3 de asemenea, secvențe ale unui anticorp care leagă selectiv DR4. Sunt de asemenea  
4 detaliați vectori care includ o secvență a unui acid nucleic din invenție și celule gazdă  
5 transformate cu un vector din invenție.

6 Invenția de față furnizează un anticorp DR5 umanizat (de exemplu, TRA-8) și un DR4  
7 umanizat (de exemplu, 2E12), precum și o celulă transfectată care produce anticorpul DR5  
8 umanizat și o celulă transfectată care produce anticorpul DR4 umanizat.

9 Este descris un procedeu de producere a unui anticorp DR5 umanizat sau a unui  
10 anticorp DR4, în care o gazdă este transformată cu secvențe de acid nucleic care codifică  
11 un lanț ușor de imunoglobulină umanizată și un lanț greu de imunoglobulină umanizată, după  
12 care gazda transformată este incubată pentru o perioadă de timp predeterminată.

13 Se mai descrie un procedeu de inducție a apoptozei în celulele țintă sau de inhibare  
14 a proliferării celulelor, care include punerea în contact a unei celule țintă cu o cantitate  
15 farmaceutic eficace de anticorp DR5 umanizat, de anticorp DR4 umanizat, sau a unei combi-  
16 nații de anticorp DR5 și de anticorp pentru un alt receptor al morții (de exemplu, un anticorp  
17 pentru DR4), în prezența sau în absența altor agenți terapeutici sau tratamente.

18 Se furnizează o trusă comercială pentru inducția apoptozei, care include un anticorp  
19 TRA-8 umanizat, selectiv pentru DR5 sau un anticorp umanizat pentru DR4 (de exemplu,  
20 2E12 umanizat), ambalat într-un recipient adecvat și, opțional, cu instrucțiuni de utilizare.

21 Fig. 1. Caracterizarea TRA-8. a. Specificitatea de legare a TRA-8: analiza Western  
22 blot (panoul superior): Proteinele de fuziune recombinante ale familiei TNFR examinate cu  
23 TRA-8 sau cu IgG antiumană. Linia 1: proteina de fuziune DR5/hlgG1 (imunogen); Linia 2:  
24 DR4/hlgG1 (TRAIL-R1); Linia 3: DR5/hlgG1; Linia 4: TRAIL-R3 (DcR-1)/hlgG1; Linia 5:  
25 TRAIL-R4 (DcR-2)/hlgG1; Linia 6, CD95/hlgG1; Linia 7: TNFR1 solubil. Analiza ELISA  
26 (panoul inferior): numărul godeurilor se potrivește cu cel al Western blot cu excepția godeului  
27 8 care este o proteină de fuziune DR5/hlgG1 murină. b. Activitatea de legare a TRAIL solubil  
28 și a TRA-8 la DR5 și DR4: plăcile ELISA au fost acoperite cu DR5/hlgG1 (panoul din stânga)  
29 sau cu DR4/hlgG1 (panoul din mijloc) și apoi au fost incubate cu TRAIL sau cu TRA-8.  
30 c. Analiza de citometrie în flux a exprimării de suprafață a DR5. Celule Cos-7 transfectate  
31 cu vectorul de expresie pcADN3 care conține cADN-ul lui DR5 cu lungime completă  
32 (histograma continuă), cADN-ul lui DR4 (histograma deschisă, linia continuă) sau vectorul  
33 gol (histograma deschisă, linia întreruptă). La patruzeci și opt de ore după transfecție,  
34 celulele au fost colorate cu TRA-8, urmată de IgG1 antișoarece conjugată cu PE.  
35 d. Reactivitatea imunohistochimică in situ a DR5: Lamele centrifugate ale celulelor Cos-7  
36 transfectate cu exprimarea DR5 sau vectorul de control au fost colorate cu TRA-8 la 48 h  
37 după transfectare. e. Activitatea ucigașă a TRA-8: celulele Jurkat au fost incubate cu  
38 concentrațiile indicate de TRA-8. Viabilitatea celulelor a fost determinată prin analizele  
39 ATPLite, MTT, și de excludere PI, după cultivare peste noapte. Rezultatele analizelor  
40 ATPLite și MTT sunt prezentate ca procent al mediului de control, și analiza PI este prezen-  
41 tată ca procent de celule PI negative f. Analiza Western blot a activării caspazei: celulele  
42 Jurkat au fost incubate cu 500 ng/ml TRA-8 pe perioada indicată. Lizatele de celule au fost  
43 separate cu SDS-PAGE 15%, colorate și examinate cu anticorpi anticaspază. Săgețile indică  
44 subunitățile clivate ale fiecărei caspaze. g. Analiza inhibiției caspazei: Celulele Jurkat au fost  
45 incubate cu TRA-8 50 ng/ml peste noapte în prezența a diferite concentrații de inhibitori ai  
46 caspazei indicați. Viabilitatea celulelor a fost determinată prin analiza ATPLite.

47 Fig 2. Exprimarea, la suprafața celulei, a DR5 și susceptibilitatea la apoptoza mediată  
48 de DR5. Linii de celule T și B normale, proaspăt izolate din sânge periferic, celule T (a și a'),  
49 gliom (b și b'), celule de cancer prostatic (c) și linii celulare de celule B (d) au fost incubate

# RO 123525 B1

cu TRA-8 sau cu anticorp martor izotip IgG1 murin, urmat de IgG1 de capră antișoarece, conjugat cu PE. Histogramele deschise reprezintă martorul anticorp izotopic, în timp ce histogramele continue reprezintă colorarea TRA-8. Apoptoza a fost determinată prin analiza ATPLite, după incubare peste noapte cu TRAIL solubil (cercurile deschise) sau cu TRA-8 (cercurile închise), după cum se arată în a, b' și d.

Fig. 3a'. Linia de celule T U937 a fost incubată cu TRA-8 sau anticorp martor izotip IgG1 murin. Apoptoza a fost determinată prin analiza ATPLite, după incubare peste noapte cu TRAIL solubil (cercurile deschise) sau cu TRA-8 (cercurile închise).

Fig. 3. Linii de celule de gliom (b) și de cancer de prostată (c) au fost incubate cu TRA-8 sau anticorp martor izotip IgG1 murin. Apoptoza a fost determinată prin analiza ATPLite, după incubare peste noapte cu TRAIL solubil (cercurile deschise) sau cu TRA-8 (cercurile închise).

Fig. 4 prezintă o serie de grafice care prezintă viabilitatea celulei pentru celulele Jurkat umane după expunere la concentrațiile indicate de (A) tulpini de anticorpi TRA-1, -8 și -10, și (B) TRAIL în prezența unei concentrații fixe de tulpini de anticorp din invenție descrise în fig. 4A.

Fig. 5. Expresia DR5 în țesuturile normale și canceroase: omogenate normale și canceroase au fost examinate cu TRA-8 și au fost dezvoltate prin chemiluminescență. a. Analiza Western blot a proteinei DR5 în țesuturile normale: linia 1: ficat, linia 2: creier, linia 3: plămân, linia 4: rinichi, linia 5: splină, linia 6: testicule, linia 7: ovar, linia 8: inimă, linia 9: pancreas, b. Analiza Western blot a proteinei DR5 în țesuturile canceroase. A fost examinat preparatul de țesut canceros care conține cancere de la ovar (linia 1), plămân (linia 2), ficat (linia 3), rect (linia 4), cervix (linia 5), piele (linia 6), testicule (linia 7), tiroidă (linia 8), uter (linia 10), stomac (linia 11), laringofaringe (linia 12) și pancreas (linia 13). Imunochimia *in situ* a țesuturilor umane normale (c.) și a țesuturilor canceroase (d.). Secțiunile înghețate au fost imunocolorate cu TRA-8.

Fig. 6. Activitatea tumoricidă a TRA-8. Șoareci SCID au fost inoculați subcutanat cu celule 1321N1. Șoarecii au fost injectați intravenos cu o doză unică de 100 μg TRA-8 în ziua a doua după inocularea tumorii (a.), sau cu trei doze de 100 μg TRA-8, începând la 7 zile după inocularea tumorii (b). Creșterea tumorii a fost determinată prin greutate și a fost examinată histologic prin colorare H&E. Fotografiiile au arătat o creștere tumorală viabilă la șoarecii martor, dar nu și la șoarecii tratați cu TRA-8 (a, panoul superior), și colorarea H&E a tumorii (a, panoul inferior). Șoareci SCID au fost injectați intravenos cu 10<sup>6</sup> celule Jurkat și au fost tratați cu o doză unică de TRA-8, în a doua zi după injecție. Șapte zile mai târziu, celulele splenice au fost recoltate, colorate cu anticorp CD3 antiuman și au fost analizate prin citometrie în flux (d.) sau prin imunochimie (e).

Fig. 7 prezintă expresia DR5 de la suprafața celulei în celulele sinoviale RA (A) și OA (B). 1 x 10<sup>6</sup> celule sinoviale primare cultivate au fost colorate cu TRA-8 purificat prin afinitate și urmat de anticorp IgG1 de capră antișoarece, conjugat cu PE. 10000 celule viabile au fost analizate prin FACSvantage.

Fig. 8 prezintă o serie de grafice prezentând viabilitatea celulei în funcție de apoptoza indusă de concentrația TRAIL și TRA-8 a tulpinilor reprezentative de celule sinoviale RA (A) și OA (B) cu diferite concentrații de TRAIL solubil recombinat (cercurile deschise) sau de TRA-8 purificat prin afinitate (cercurile închise). Viabilitatea celulară reprezintă procentajul cpm-ului de celule tratate față de cpm-ul de celule netratate.

Fig. 9 prezintă o serie de grafice prezentând dependența de caspază a apoptozei mediate de DR5, a celulelor sinoviale RA. Celulele sinoviale RA (RA512) sunt incubate cu ligand Fas solubil 50 ng/ml (pătratele deschise), cu anticorp anti-Fas (CH-11) (pătratele

# RO 123525 B1

1 închise), cu TRAIL solubil (cercurile deschise) sau cu anticorp anti-DR5 (TRA-8) (cercurile  
închise), în prezența a diferite concentrații de inhibitori ai caspazei. După cultivare peste  
3 noapte, viabilitatea celulelor este determinată prin ATPLite.

Fig. 10A prezintă o analiză electroforetică de deplasare în gel, care indică activarea  
5 NFkb. Celulele RA1016 sunt incubate cu TNF-a 20 ng/ml, cu TRAIL solubil 50 ng/ml sau cu  
TRA-8 50 ng/ml, pe perioada de timp indicată înainte de a fi supuse electroforezei. Fig. 10B  
7 și C sunt grafice care arată producerea MMP-1 și MMP-3.  $1 \times 10^6$ /ml celulele sinoviale RA  
indicate sunt incubate cu concentrațiile indicate de TNF-a (cercurile deschise), TRAIL  
9 (triunghiurile deschise) sau cu TRA-8 (cercul închis). După cultivare peste noapte,  
supernatantele culturilor sunt colectate. Nivelurile MMP-urilor în supernatantele culturilor sunt  
11 determinate prin ELISA.

Fig. 11. TRA-8 nu induce toxicitatea hepatocelulară. a. Țesuturile de ficat normal nu  
13 exprimă DR5. Au fost preparate secțiuni în parafină din două țesuturi de ficat normal, unul  
din țesut de carcinom hepatocelular, și preparatul de celule centrifugate din celule HepG2  
15 a fost pregătit pentru colorarea H&E și secțiunile înghețate corespunzătoare au fost colorate  
cu TRA-8. b. Analiza citometrică în flux a expresiei la suprafața celulei a DR5. Hepatocite  
17 izolate din două țesuturi de ficat normal și dintr-un caz de țesut de carcinom hepatocelular  
și celule HepG2 au fost colorate cu TRA-8, anticorp anti-Fas (DX2) sau cu un anticorp martor  
19 izotip. Histogramele continue indică colorarea TRA-8 sau DX2, iar histogramele deschise  
sunt martorii izotipici corespunzători.

Fig. 12. TRAIL, nu TRA-8, induce toxicitatea hepatocelulară. Hepatocite umane  
21 normale proaspete au fost menținute în Mediu de Cultură pentru Hepatocite. (a.) Apoptoza  
23 hepatocitelor a fost indusă cu  $1 \mu\text{g/ml}$  TRAIL solubil plus agentul de reticulare sau cu TRA-8,  
la momentele de timp indicate. Viabilitatea celulelor a fost determinată prin ATPLite.  
25 Rezultatele sunt prezentate ca procent de celule viabile comparativ cu martorul de mediu.  
Barele întunecate indică TRAIL, iar barele negre indică TRA-8. (b.) Nucleele condensate ale  
27 hepatocitelor au fost colorate cu Hoechst 33352 și au fost analizate prin citometrie în flux.  
c. Efectul cicloheximidei asupra apoptozei hepatocitelor. Hepatocitele au fost cultivate în  
29 mediul martor sau cu TRAIL  $1 \mu\text{g/ml}$  sau cu TRA-8 în prezența (barele închise) sau în  
absența (barele deschise) cicloheximidei  $1 \mu\text{g/ml}$ , timp de 8 h. Viabilitatea celulară a fost  
31 determinată prin ATPLite. Rezultatele sunt prezentate sub formă de medie  $\pm$  EMS a culturilor  
în triplicat din două experimente. d. O comparație a susceptibilității hepatocitelor normale la  
33 apoptoza mediată de DR5 și de Fas. Hepatocite proaspăt izolate au fost incubate cu  
concentrațiile indicate de TRAIL solubil, TRA-8, FasL solubil sau de mAc anti-Fas CH11,  
35 timp de 6 h. Viabilitatea celulară a fost determinată prin analiza ATPLite. Rezultatele sunt  
prezentate ca procent de celule viabile comparativ cu martorul de mediu. Pentru hepatocitele  
37 normale, este prezentată media  $\pm$  EMS a patru indivizi normali. Rezultatele celulelor de  
carcinom hepatocelular de la un pacient și celulele HepG2 sunt prezentate sub formă de  
39 medie a culturilor în triplicat.

Fig. 13. TRAIL induce hepatita. Șoareci B6 au fost inoculați intravenos cu  $10^9$  pfu de  
41 vector adenoviral, care codifică întreaga lungime a TRAIL uman sub controlul elementului  
transcripțional „Tet-on”. Expresia TRAIL a fost indusă de doza de tetraciclină indicată. a.  
43 Analiza Northern blot a exprimării TRAIL uman în ficat. La 24 h după inocularea vectorului  
și inducția cu tetraciclină, ARN total a fost izolat din ficat și a fost examinat cu cADN al TRAIL  
45 uman sau cu  $\beta$ -actină. b. Nivelurile serice ale AST. 24 h după transducția TRAIL, au fost  
determinate nivelurile serice ale AST. c. Moartea celulară mediată de TRAIL a hepatocitelor  
47 infectate cu vectorul adenoviral: șoareci B6 au fost inoculați intravenos cu vector adenoviral  
inductibil cu tetraciclină. La 48 h după inoculare, hepatocite de la șoarecii martor inoculați

și neinoculați au fost izolate și incubate cu concentrațiile de TRAIL indicate, timp de 8 h (panoul stâng). Viabilitatea celulară a hepatocitelor a fost determinată prin analiza ATPLite.	1
Șoarecii inoculați cu vector adenoviral ca mai sus au fost injectați intravenos cu 10 μg TRAIL uman solubil, 48 h mai târziu. Nivelurile serice de AST au fost măsurate la 24 h după injectarea TRAIL (panoul din dreapta), (d. și e.) Analiza histologică a leziunilor ficatului induse de TRAIL. Ficatul a fost colectat la 24 h (d.) sau 7 zile (e.) după transducția cu TRAIL. Secțiunile parafinice au fost colorate cu H&E și fotografiate la 100X (panoul superior) și la 400X (panoul inferior).	3 5 7
Fig. 14 prezintă o serie de grafice, arătând faptul că celulele T activate și celulele B purificate din PMBC uman exprimă niveluri ridicate de DR5, după cum se determină prin citometrie în flux, pentru celulele rămase (neumplute) și activate (umbrite).	9 11
Fig. 15 reprezintă graficele de viabilitate ca funcție a concentrației TRA-8, pentru celulele T și celulele B purificate descrise în fig. 14, care au fost stimulate timp de 48 h cu anti-CD3 sau cu anti-μ, cu celule activate sau distruse (bolnave), colectate prin densitatea diferită a Ficoll-Paque. Viabilitatea se determină prin analiza ATPLite.	13 15
Fig. 16 prezintă o histogramă și graficele de citometrie în flux care prezintă exprimarea CD3 într-o populație poartă de limfocite la șoarecii NOD/SCID, lipsiți de celule NK, injectați cu PMBC uman și cu TRA-8 sau cu IgG (martor).	17
Fig. 17 prezintă micrograficele celulare colorate cu TUNEL și CD3 ale țesutului splenic de șoarece, după cum este detaliat în exemplul 13.	19
Fig. 18 prezintă punctele de citotoxicitate pentru oamenii cu leucemie limfolică cronică (CCL) și pentru cei cu celule B normale în prezența TRA-8, BISVIII și a unor combinații ale acestora.	21 23
Fig. 19. a. Legarea specifică a 2E12 la DR4. Plăcile ELISA au fost acoperite cu forma solubilă a receptorului TRAIL uman-proteine de fuziune Fc IgG1 umane, după cum s-a indicat și au fost incubate cu concentrația indicată de mAc 2E12, urmată de IgG1 antișoarece conjugată cu HRP. Reacția a fost dezvoltată cu tampon de substrat TMB și au fost măsurate valorile DO la 450/650 nM.	25 27
Fig. 19. b. 2E12 leagă DR4 de la suprafața celulei. Celulele Cos-7 au fost transfectate cu vectorul care conține cADN cu lungime integrală pentru DR4 (histograma continuă) sau cu vectorul martor (histograma deschisă). Celulele transfectate au fost colorate cu 2E12 10 μg/ml și cu IgG1 antișoarece, conjugată cu PE. Celulele au fost analizate prin citometrie în flux.	29 31 33
Fig. 19. c. Activitatea de inducție a apoptozei a 2E12. Celule umane Ramos B de limfom au fost incubate peste noapte cu concentrațiile indicate de 2E12, în prezența a 2 μg/ml IgG1 antișoarece. Viabilitatea celulară a fost determinată prin analiza ATPLite. d. Activarea caspazei indusă prin 2E12. Celulele Ramos au fost tratate cu 2E12 și cu anticorp IgG antișoarece, la momentele de timp indicate. Activarea caspazei și clivajul PARP au fost determinate prin analiza Western blot, utilizând anticorpi specifici anticaspază sau PARP.	35 37 39
Fig. 20. Efectul 2E12 și al Adriamicinei la șoareci nuzi atimici care poartă xenogrefe de cancer de sân. Celule 2LMP ( $3 \times 10^7$ ) au fost injectate subcutanat la șoareci nuzi atimici în ziua 0. Două grupe de șoareci au fost injectați intraperitoneal cu 200 μg de 2E12, în zilele 7, 10, 14, 17, 21 și 24. Două grupe de șoareci au primit Adriamicină <i>i. v.</i> (6 mg/kg), în zilele 8, 12 și 16. Un grup de șoareci nu a primit anticorp. Datele sunt exprimate ca modificare medie a mărimii tumorii relativ la mărimea din ziua 7 (n=8 șoareci/grup).	41 43 45
Fig. 21. Efectul TRA-8, 2E12 și al Adriamicinei asupra șoarecilor nuzi atimici care poartă xenogrefe de cancer de sân. Celule 2LMP ( $3 \times 10^7$ ) au fost injectate <i>s.c.</i> la șoareci nuzi atimici în ziua 0. Două grupuri de șoareci au fost injectate <i>i.p.</i> cu 200 μg TRA-8 și 2E12, în	47

# RO 123525 B1

1 zilele 7, 10, 14, 17, 21 și 24. Două grupuri de șoareci au primit *i. v.* Adriamicină (6 mg/kg),  
în zilele 8, 12 și 16. Un grup de șoareci nu a primit anticorp. Datele sunt exprimate ca  
3 modificare medie a mărimii tumorii relativ la mărimea în ziua 7 (n=8 șoareci/grup).

Fig. 22A prezintă analiza citometrică în flux a exprimării la suprafața celulei a DR5  
5 într-un grup de linii de celule umane canceroase de sân. Celulele de cancer de sân au fost  
recoltate utilizând EDTA și colorate cu mAb TRA-8 10 Mg/ml. timp de o oră, la 4°C, urmat  
7 de IgG1 antișoarece de capră, conjugat cu PE, apoi au fost analizate, utilizând FACScan și  
softul CellQuest. Histogramele groase indică colorarea TRA-8 și histogramele subțiri indică  
9 incubarea cu anticorpul martor izotip IgG1 de șoarece.

Fig. 22B prezintă citotoxicitatea TRA-8 asupra liniilor de celule umane de cancer de  
11 sân. Celulele au fost tripsinizate și reînsămânțate la o densitate de 1000 celule/godeu, pe  
o placă cu 96 de godeuri. Anticorpul TRA-8 a fost adăugat după însămânțarea celulelor și  
13 a fost incubat timp de 24 h, la 37°C. Viabilitatea celulară a fost determinată la 24 h după  
adăugarea TRA-8, utilizând analiza ATPLite. Nivelurile de ATP se raportează față de celulele  
15 martor netratate ca medie și ES din 2-3 experimente independente, fiecare realizat în  
triplicat.

Fig. 23A prezintă citotoxicitatea tratamentului cu combinație de TRA-8 și Adriamicină  
17 asupra liniilor de celule umane de cancer de sân. Celulele (1000/godeu) au fost expuse la  
diferite concentrații de Adriamicină, timp de 24 h, la 37°C, începând la 24 h după însămân-  
19 țarea celulelor. TRA-8 a fost adăugat la 24 h după adăugarea Adriamicinei și nivelurile de  
ATP au fost determinate 24 h mai târziu. Valorile reprezintă media și ES a determinărilor în  
21 triplicat de la 2-4 experimente independente, fiecare realizat în triplicat, și sunt raportate față  
de celulele martor netratate.

Fig. 23B prezintă citotoxicitatea tratamentului cu combinație de TRA-8 și Paclitaxel  
25 asupra liniilor de celule umane de cancer de sân. Celulele (1000/godeu) au fost expuse la  
diferite concentrații de Paclitaxel, timp de 24 h, la 37°C, începând la 24 h după însămânțarea  
27 celulelor. TRA-8 a fost adăugat la 24 h după adăugarea Paclitaxelului și nivelurile de ATP  
au fost determinate 24 h mai târziu. Valorile reprezintă media și ES a determinărilor în  
29 triplicat de la 2-4 experimente independente, fiecare realizat în triplicat, și sunt raportate față  
de celulele martor netratate.

Fig. 24 prezintă efectul TRA-8 asupra creșterii tumorii la șoareci nuzi atimici care  
31 poartă xenogrefe 2LMP stabilizate de cancer uman de sân. Celulele 2LMP ( $3 \times 10^7$ ) au fost  
injecate s.c. în ziua 0. Două grupuri de șoareci au fost injectate *i.p.* cu 200 ug sau 600 pg de  
33 TRA-8, în zilele 7, 10, 14, 17, 21 și 24. Una dintre grupele de șoareci nu a primit niciun  
anticorp. Datele reprezintă modificarea medie a mărimii tumorii (produsul a două diametre)  
35 față de mărimea în ziua a 7-a (n=8 șoareci/grup).

Fig. 25 prezintă efectul TRA-8 și al Adriamicinei asupra creșterii tumorii la șoarecii  
37 nuzi atimici care poartă xenogrefe de cancer uman de sân. Celulele 2LMP ( $3 \times 10^7$ ) au fost  
injecate s.c. la șoareci nuzi atimici în ziua 0. Două grupe de șoareci au fost injectate *i.p.* cu  
39 200 ug TRA-8 în zilele 7, 10, 14, 17, 21 și 24. Două grupe de șoareci au primit Adriamicină  
41 *i.v.* (6 mg/kg) în zilele 8, 12 și 16. Unul dintre grupurile de șoareci nu a primit niciun anticorp.  
Datele sunt exprimate ca modificarea medie a mărimii tumorii (produsul a două diametre)  
43 față de mărimea în ziua a 7-a (n=6-8 șoareci/grupă).

Fig. 26 prezintă efectul TRA-8 și al Paclitaxelului la șoarecii nuzi atimici care poartă  
45 xenogrefe de cancer uman de sân. Celulele 2LMP ( $3 \times 10^7$ ) au fost injectate s.c. la șoareci nuzi  
atimici în ziua 0. Două grupe de șoareci au fost injectate *i.p.* cu 200 Mg de TRA-8 în zilele 7,

# RO 123525 B1

10, 14, 17, 21 și 24. Două grupe de șoareci au primit Paclitaxel *i.v.* (20 mg/kg) în zilele 8, 12, 16, 20 și 24. Una dintre grupele de șoareci nu a primit niciun anticorp. Datele sunt exprimate ca modificarea medie a mărimii tumorii (produsul a două diametre) față de mărimea în ziua a 7-a (n=8 șoareci/grupă). 1 3

Fig. 27 prezintă efectul TRA-8, al Adriamicinei și al radiației <sup>60</sup>Co asupra creșterii tumorii la șoareci nuzi atimici care poartă xenogrefe de cancer de sân. Celulele 2LMP (3x10<sup>7</sup>) au fost injectate *s.c.* la șoareci nuzi atimici în ziua 0. Trei grupe de șoareci au fost injectate *i. p.* cu 200 ug TRA-8, în zilele 7, 10, 14, 17, 21 și 24. Două grupe de șoareci au primit Adriamicină *i.v.* (6 mg/kg) în zilele 8, 12 și 16. Patru grupe de șoareci au primit 3 Gy de radiație de <sup>60</sup>Co în zilele 9 și 17. Una dintre grupele de șoareci nu a primit niciun anticorp. Datele sunt exprimate ca modificarea medie a mărimii tumorii (produsul a două diametre) față de mărimea în ziua a 7-a (n=8 șoareci/grupă). 5 7 9 11

Fig. 28 prezintă efectul anticorpilor TRA-8 și 2E12 administrați la celule canceroase în aceeași compoziție *in vitro*. Celulele au fost incubate 24 h cu TRA-8, 2E12 sau 2E12±TRA-8, la doza TRA-8 arătată, apoi s-au determinat nivelurile de ATP. Valorile sunt arătate ca medie și deviație standard (n=4). 13 15

Eșecul eliminării celulelor este datorat defectelor sistemului inductor al apoptozei, care este asociat cu defectele care includ ilustrativ expresia sau funcționarea ligandului, receptorului sau a moleculelor reglatoare intracelulare sau efectoare. Invenția de față produce o metodă de corecție a sistemului deficient de inducție a apoptozei, precum și elucidarea defectelor specifice inerente unui sistem defect de inducție al apoptozei. 17 19 21

Invenția de față se referă la o nouă clasă de anticorpi monoclonali, care au o activitate de inducție a apoptozei selectivă *in vivo* și *in vitro*, împotriva receptorilor TRAIL specifici, incluzând DR5, DR4, DcR1 și DcR2. Astfel, anticorpii din invenția de față leagă în mod specific unul dintre receptorii TRAIL. Prin „legare selectivă” sau „recunoaștere specifică” înțelegem faptul că anticorpul leagă doar un receptor TRAIL și prezintă o legare slabă sau nu se leagă deloc de alți receptori TRAIL, utilizând analiza Western blot tradițională. Un anticorp DR5 din invenția de față leagă selectiv DR5 și nu prezintă legare peste 1,5 ori față de fond pentru DR4, DcR1 sau DcR2. În mod similar, un anticorp DR4 din invenția de față leagă selectiv DR4 și nu prezintă legare peste 1,5 ori față de fond pentru DR5, DcR1 sau DcR2. Invenția de față prezintă utilitate ca reactiv pentru cercetarea semnalizării apoptozei, precum și utilitate ca agent terapeutic eficace împotriva celulelor care exprimă receptorii TRAIL, incluzând în mod ilustrativ multe clase de celule canceroase, celule care prezintă nereguli în sistemul de apoptoză, limfocite activate sau alte celule imunitare activate (de exemplu celule limfoide și celule mieloide), celule infectate viral, și celule sinoviale care proliferază anormal (de exemplu celulele sinoviale din artrita reumatoidă, incluzând celulele sinoviale inflamatorii, celulele mieloide și limfoide activate din lichidul sinovial, sinoviocitele asemănătoare macrofagelor, și sinoviocitele asemănătoare fibroblaștilor) ale bolilor autoimune. Anticorpii conformi cu invenția de față sunt specifici în legarea tipurilor particulare de receptori TRAIL, în ciuda omologiei dintre ei. Anticorpii din invenție produc o apoptoză țintită, doar a celulelor care exprimă un receptor TRAIL țintă sau alternativ, blocând apoptoza TRAIL a celulelor care exprimă un receptor țintă. 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41

Un anticorp monoclonal DR5 sau un anticorp monoclonal DR4 din invenția de față servește ca inductor eficace al apoptozei în celulele care exprimă DR5 sau DR4, respectiv, *in vitro*, și ca inhibitor eficace al apoptozei *in vivo*. Secvențele CDR fragmentare umanizate, 43 45

# RO 123525 B1

1 grefate pe catena de bază a anticorpului umanizat și proteina de fuziune DR5 sau anticorpii  
DR4, din invenția de față, prezintă proprietăți apoptotice similare.

3 Până în prezent, nu este disponibil niciun anticorp monoclonal care se leagă la DR5  
de la suprafața celulei, și care, chiar și în concentrații mici, să inducă apoptoză celulelor care  
5 exprimă DR5 atât *in vitro*, cât și *in vivo*, în absența unui agent de legare încrucișată (agent  
de reticulare). Invenția de față include un anticorp DR5 operativ ca agent terapeutic în  
7 tratamentul unor multitudini de boli. Deși TRAIL solubil s-a dovedit a fi eficace în inducția  
apoptozei celulelor tumorale *in vivo*, activitatea ucigașă pare a fi foarte scăzută în comparație  
9 cu dozele mari și repetate, care adesea sunt necesare (H. Walczak, R. E. Miller, K. Ariail,  
B. Gliniak, T. S. Griffith, M. Kubin, W. Chin, J. Jones, A. Woodward, T. Le, C. Smith, P.  
11 Smolak, R. G. Goodwin, C. T. Rauch, J. C. Schuh, D. H. Lynch, *Nat. Med.*, Feb 1999;  
5(2):157-63). Invenția de față furnizează un anticorp purificat, care leagă receptorul TRAIL  
13 DR5, în care anticorpul menționat, în forma sa solubilă la concentrații mici, are o activitate  
inductoare a apoptozei *in vivo* și *in vitro*, în celulele țintă care exprimă DR5. Într-o  
15 concretizare preferată, anticorpul purificat se leagă la receptorul TRAIL DR5, în absența  
legării încrucișate a (reticulării) anticorpului. De preferință, anticorpul nu induce apoptoza  
17 semnificativă a celulelor fibroblastice normale. De preferință, activitatea de inducție a  
apoptozei este caracterizată prin mai puțin de 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%  
19 viabilitate sau orice procent între acestea, a celulelor țintă, la concentrații de anticorp mai  
mici de aproximativ 0,1, 1, 5, 10 sau 20 μg/ml sau orice concentrație între acestea.  
21 Anticorpul purificat leagă specific receptorul TRAIL DR5 și nu leagă receptorii TRAIL DR4,  
DcR1 sau DcR2, conform unei analize Western blot de rutină. Într-o concretizare preferată,  
23 anticorpul este un anticorp monoclonal, de preferință, având aceeași specificitate a  
determinantului antigenic ca și hibridomul TRA-8 de șoarece-șoarece, care are numărul de  
25 acces ATCC PTA-1428.

27 TRA-8, unul dintr-o serie de anticorpi DR5, în conformitate cu invenția de față, este  
eficace farmaceutic la animale care poartă o transgenă DR5 umană și are, de asemenea,  
utilitate, în stabilirea unui model pentru investigarea rolului DR5 și TRAIL.

29 Diferite concretizări ale invenției furnizează anticorpi care induc apoptoza în prezența  
sau în absența legării încrucișate (reticulării). De exemplu, o concretizare preferată a  
31 anticorpului DR5 (de exemplu, TRA-8) induce apoptoza în absența legării încrucișate  
(reticulării). „Legarea încrucișată” (“reticularea”) include, de exemplu, legarea încrucișată  
33 (reticularea) printr-un anticorp secundar. Alte concretizări furnizează anticorpi care induc  
apoptoza în prezența agenților de legare încrucișată (de reticulare), incluzând, de exemplu,  
35 o concretizare preferată a anticorpului DR4 (2E12).

37 Astfel, invenția furnizează un anticorp purificat care leagă specific un receptor TRAIL  
DR4, în care anticorpul menționat, în forma sa solubilă, are o activitate de inducție a  
apoptozei *in vitro* și *in vivo*, în celulele țintă care exprimă DR4. Ca o concretizare, anticorpul  
39 este un anticorp monoclonal, care are aceeași specificitate a determinantului antigenic ca  
și hibridomul 2E12, având numărul de acces ATCC PTA-3798, depozitat în 24 octombrie  
41 2001, având desemnat numele „Clona hibridomului 2E12 împotriva DR4 Uman”, cu sprijinul  
Fundăției de Cercetare UAB. 2E12, unul dintr-o serie de anticorpi DR4 din invenția de față  
43 este farmaceutic activ în reducerea mărimii tumorilor, comparativ cu animalele de control sau  
comparativ cu mărirea tumorii înainte de tratament, *in vivo*, la animale care au cancere care  
45 exprimă DR4.

# RO 123525 B1

Anticorpul față de DR5 sunt eficiente sub formă solubilă la doze mici, prin doze mici se înțelege la doze sau la concentrații mai mici de aproximativ 0,01 până la 1  $\mu\text{g/ml}$  *in vitro* și mai mici de aproximativ 1-10 mg/kg *in vivo*. O caracteristică preferată a anticorpilor din invenția de față este aceea că aceștia induc apoptoza selectiv în celulele care exprimă receptorii DR5, fără a induce apoptoza în hepatocitele, fibrocitele, sinoviocitele etc., normale, neactivate, netransformate. Un anticorp conform cu invenția de față, crescut împotriva unui receptor TRAIL, este recoltat, în conformitate cu invenția de față, de la un animal experimental, dar poate fi făcut prin orice metodă de producere sau de sinteză a anticorpilor cunoscută în domeniu. Prin umanizarea anticorpului în conformitate cu invenția de față, pentru a menține activitatea de legare a receptorului în paralel, provocând un răspuns imun diminuat și tolerabil terapeutic la un subiect uman, un anticorp umanizat antireceptor TRAIL, în conformitate cu invenția de față, se utilizează ca agonist terapeutic sau antagonist, pentru un receptor TRAIL dat. Invenția de față este operativă ca agent terapeutic *in vivo*, deoarece legarea încrucișată (reticularea), secundară, a anticorpului antireceptor TRAIL, opțional, nu este necesară.

Invenția de față are o extindere mai mare decât asupra unui singur anticorp antireceptor TRAIL, având efecte apoptotice agoniste sau antagoniste. Mai degrabă, doi sau mai mulți anticorpi antireceptor TRAIL sunt aduși în contact cu o cultură de celule *in vitro* sau cu un țesut din corp aflat în cercetare *in vivo*, pentru a crea un tratament îmbunătățit. Prin „tratament îmbunătățit”, se înțelege orice efect aditiv, sinergic sau de potențare. De exemplu, linia de celule de gliom U87 și liniile de celule hematopoietice U937 și Molt-4 sunt receptive la expunerea sinergică la anticorpul agonist anti-DR4 și anti-DR5, în timp ce expunerea numai la anticorpul agonist DR5 demonstrează numai un succes limitat în inducția apoptozei.

În plus, anticorpul agonist pe receptorii anti-TRAIL au o utilitate particulară în invenția de față când un anticorp este specific față de legarea unuia dintre receptorii momeală DcR1, DcR2 sau OPG. Blocarea selectivă a unui receptor momeală cu un anticorp conform cu invenția de față are efect în tipurile de celule care exprimă receptorii momeală de deplasare a echilibrului de legare a TRAIL către acei receptori TRAIL capabili de a traduce semnalul de apoptoză. Astfel, într-o altă terapie combinată, conformă cu invenția de față, un anticorp de legare a unui receptor momeală sensibilizează o celulă de expresie față de semnalul de apoptoză agonist care traduce legarea receptorului TRAIL.

Într-o altă concretizare, invenția de față produce o metodă de elucidare a determinantilor antigenici (epitopi) agonisti și antagonisti ai unui receptor TRAIL dat. În plus, polimorfismele între indivizi asociați cu un receptor TRAIL, dat sunt elucidate în conformitate cu invenția de față prin utilizarea unui grup de anticorpi monoclonali fiecare având o regiune variabilă sau CDR diferită. Un grup caracterizat de anticorpi monoclonali asigură capacitatea de a defini determinantii antigenici agonisti și antagonisti și polimorfismele. Astfel, un grup de anticorpi monoclonali conformi cu invenția de față are utilitate în descoperirea de medicamente și/sau în screening-ul subiecților pentru predispoziția la boală.

O altă concretizare a invenției de față implică proteine de fuziune care includ un fragment antigenic al unui receptor TRAIL, cuplat cu o proteină imunoglobulină, polipeptidă sau un fragment al acestora. Un fragment de receptor TRAIL este definit ca și conținând un număr suficient de baze, pentru a provoca un răspuns imun la un receptor TRAIL nativ, exprimat pe suprafața celulei în cauză. Un fragment de fuziune al unui receptor TRAIL include

# RO 123525 B1

1 cel puțin zece aminoacizi. O proteină de fuziune imunoglobulină sau un fragment al acesteia  
este definit aici ca incluzând o proteină nativă sau sintetică, sau un segment polipeptidic având  
3 un număr suficient de baze de aminoacid, pentru a activa un răspuns imun, în cascadă, la  
un subiect. Un imunogen din invenția de față include fuziunea unui fragment de receptor  
5 TRAIL, cuplat cu un fragment de imunoglobulină și prezintă utilitate ca agent terapeutic *in*  
*vivo*, pentru a provoca apariția unui anticorp antireceptor TRAIL *in situ* la un subiect.

7 Într-o altă concretizare suplimentară, invenția de față este operativă ca terapie  
genică. Astfel, invenția furnizează o metodă de inducție selectivă a apoptozei în celulele  
9 țintă, cuprinzând etapele de transfectare a celulelor țintă, cu un vector care conține o  
secvență exprimabilă de acid nucleic al unui receptor TRAIL; exprimarea, pe celulele  
11 menționate, a unui receptor TRAIL, codificat de secvența de acid nucleic a receptorului  
TRAIL, menționată; și punerea în contact a celulelor menționate cu un anticorp inductor al  
13 apoptozei, selectiv pentru legarea receptorului TRAIL, menționat. Într-un aspect de terapie  
genică, al invenției de față, celulele țintite sunt transfectate cu un vector care poartă o  
15 secvență exprimabilă care corespunde unui receptor TRAIL, vectorul fiind convențional și  
ales pe baza susceptibilității celulei țintite la vector. Vectorii de terapie genică includ, ca  
17 ilustrare, adenovirusurile, pAdCMV5. După ce celulele țintite sau țesutul exprimă receptorul  
TRAIL transfectat, celulele sau țesutul sunt expuse la un anticorp conform cu invenția de  
19 față, specific pentru legarea receptorului TRAIL transfectat. Se apreciază că anticorpul  
antireceptor TRAIL este fie agonist fie antagonist față de acesta, în acord cu rezultatul  
21 terapeutic dorit.

Anticorpul din invenția de față sunt, de asemenea, operativi, împreună cu un sensibilizator.  
23 Un sensibilizator utilizat aici este definit a include orice stimul care induce apoptoza,  
incluzând lumina ultravioletă, moleculele organice, incluzând în mod specific clasa  
25 bisindolmaleimidelor, metalele grele și speciile de radicali liberi.

În contextul terapiei cancerului, TRA-8 este capabil de a induce apoptoza celor mai  
27 multe celule tumorale, sensibile la TRAIL, într-un mod dependent de caspaze, în absența  
unei legări transversale (reticulări) secundare. TRA-8 sau 2E12, singuri sau în combinație  
29 cu alți anticorpi, prezintă o puternică activitate tumoricidă *in vivo*. Capacitatea TRA-8 sau a  
2E12 de a induce apoptoza celor mai multe celule sensibile la TRAIL confirmă faptul că  
31 numai DR5 singur sau numai DR4 singur este suficient pentru a declanșa apoptoza.  
Majoritatea celulelor tumorale detaliate aici exprimă DR5 de la suprafața celulei și  
33 susceptibilitatea acestora față de moartea celulară, indusă de TRA-8, pune în paralel  
susceptibilitatea acestora la TRAIL, indicând faptul că DR5 este un receptor primar al morții,  
35 pentru apoptoza mediată de TRAIL, în majoritatea celulelor tumorale. Rezultate similare au  
fost obținute cu anticorpi specifici pentru DR4 (de exemplu, 2E12). Astfel, exprimarea  
37 distinctivă a DR5 sau a DR4 de către celule normale și canceroase este operativă din punct  
de vedere al selectivității apoptozei mediate de TRAIL. TRA-8 scurtcircuitează receptorii  
39 momeală, pentru a induce apoptoza mediată de TRAIL. Cu toate acestea, doar o minoritate  
de celule tumorale rezistente la TRAIL sunt sensibile la TRA-8, indicând faptul că receptorii  
41 momeală nu par a juca un rol major în rezistența celulelor tumorale la apoptoza mediată de  
TRAIL.

43 Deși studiile anterioare au indicat faptul că administrarea sistemică a formei solubile  
a TRAIL la animale induce regresia tumorii, fără a cauza toxicitatea (H. Walczak, M. A. Degli-  
45 Esposti, R. S. Johnson, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, M. S. Timour, M. J. Gerhart,

# RO 123525 B1

K. A. Schooley, C. A. Smith, R. G. Goodwin, C. T. Rauch, MBO J 1 Sep 1997; 16(17):5356-97; M. MacFarlane, M. Ahmad, S. M. Srinivasula, T. Fernandes-Alnemri, G. M. Cohen, E. S. Alnemri, *J. Biol. Chem.*, 10 Oct., 1997; 272(41):25417-20; N. A. Fanger, C. R. Maliszewski, K. Schooley, T. S. Griffith, *J. Exp. Med.*, 18 Oct., 1999; 190(8):1155-64), forma legată de membrană a TRAIL uman induce leziuni hepatice la șoareci, după cum este prezentat aici. Cu toate acestea, toxicitatea hepatică a TRAIL este mult mai puțin eficace decât cea a ligandului Fas, după cum s-a demonstrat prin susceptibilitate mai mică a hepatocitelor normale la leziunile induse de TRAIL comparativ cu ligandul Fas și prin lipsa letalității TRAIL *in vivo*. Astfel, titrarea TRAIL are utilitate în terapia cancerului.

După cum s-a detaliat aici, este prezentată absența unor niveluri semnificative de expresie a proteinei DR5 de către hepatocitele normale și este asociată cu rezistența hepatocitului la apoptoza indusă de TRA-8. Legarea încrucișată a (reticularea) lui DR5 cu anticorpul monoclonal este insuficientă pentru a organiza formele homopolimere ale receptorului morții, capabile de a declanșa apoptoza. Experimentele pe saguini nu au indicat vreo probă a toxicității hepatice la administrarea TRA-8. Astfel, un anticorp monoclonal DR5 agonist este probabil mai selectiv și mai sigur ca agent terapeutic decât TRAIL solubil. În mod similar, DR4 este exprimat de celulele transformate sau activate și nu este exprimat în cantități apreciabile sau este exprimat, doar în cantități mult mai mici de celulele normale, de exemplu, de fibroblaști. DR4 din invenția de față induce apoptoza anumitor celule țintă, fără o moarte apreciabilă a celulelor non-țintă, cum ar fi fibroblaștii etc. După cum se utilizează aici, absența unui efect sau lipsa unui efect apreciabil sau semnificativ se referă la, și include absența completă a efectului sau un efect care este mai mic sau egal cu fondul sau cu nivelurile martor și nu depășește fondul și nivelurile martor de mai mult de 1,5 ori.

Ca analiză screening sau ca instrument de imagistică, invenția de față este adecvată pentru detectarea unor mici grupuri de celule DR4 sau DR5 care mai pot prezenta morfologia celulelor normale. De exemplu, colorarea *in situ* a secțiunilor de celule canceroase umane, incluzând cancerule de plămân, prostată și ficat cu anticorpi marcați în conformitate cu invenția de față, identifică rapid celulele canceroase. Anticorpii din invenția de față sunt de asemenea utili în screening-ul altor manifestări de boală, incluzând, de exemplu, diferite boli inflamatorii și autoimune, cum ar fi artrita reumatoidă. Un asemenea screening poate fi util chiar și înainte de apariția simptomelor clinice, și poate fi util pentru screening-ul subiecților cu risc de boală, astfel încât tratamentul profilactic poate fi început înainte de manifestarea altor semne sau simptome. În mod specific, se observă că celulele canceroase exprimă niveluri foarte înalte de DR5, comparativ cu celulele normale de același tip. Astfel, invenția de față are utilitate ca metodă de screening sensibilă pentru malignitățile aflate într-o etapă inițială în țesuturi, incluzând cel puțin plămânul, prostata, sângele, cervixul, sânul și ficatul. Este detaliat aici un procedeu terapeutic pentru inhibiția proliferării celulelor anormale asociate cu boli, în mod ilustrativ, cu cancerule maligne și cu leucemiile limfatice, printre altele.

Invenția de față este detaliată aici, în special, referitor la anticorpul monoclonal DR5 antiuman, desemnat ca TRA-8, având numărul de acces ATCC PTA-1428. Se apreciază că tehnicile și rezultatele detaliate cu privire la anticorpul monoclonal DR5 antiuman TRA-8 sunt complet extrapolabile și aplicabile la anticorpii antagoniști DR5, la fel ca și la anticorpii crescuți împotriva DR4, DcR1 și DcR2, acționând atât în mod agonist, cât și mod antagonist. Astfel, invenția de față este detaliată aici, în privința unui anticorp care induce apoptoza,

# RO 123525 B1

1 specific pentru DR4 uman. Într-una dintre concretizări, anticorpul are aceeași specificitate  
a determinantului antigenic ca și hibridomul 2E12, care a fost depozitat în 24 octombrie  
3 2001, pentru a procura un număr de acces în favoarea Fundației de Cercetare UAB, în  
Colecția Americană de Tipuri de Culturi, Rockville, Mc. Descrierea materialelor depozitate  
5 a fost „Clona Hibridomului 2E12 împotriva DR4 Uman” („2E12 Hybridoma Clone Against  
Human DR4”), tulpina fiind desemnată 2E12 și cu numărul de referință de etichetă  
7 PCT/US01/14151. Nivelurile de expresie a unui receptor al apoptozei, cum ar fi Fas, nu se  
corelează în mod necesar cu susceptibilitatea celulelor la apoptoză. Pentru apoptoza  
9 mediată de TRAIL, s-a sugerat faptul că exprimarea receptorilor momeală pentru TRAIL  
influențează susceptibilitatea celulelor. Mai mult, s-a sugerat faptul că DR5 trebuie să fie  
11 asociat cu DR4, pentru o traducere eficace a semnalului de apoptoză pe calea FADD și a  
caspazei 8. Disponibilitatea anticorpului agonist monoclonal anti-DR5 a permis evaluarea  
13 reglării semnalizării DR5 și rolul relativ al acestuia în apoptoza mediată de TRAIL.  
Compararea susceptibilității celulelor față de apoptoza mediată de TRA-8 cu susceptibilitatea  
15 acestora la apoptoza mediată de TRAIL oferă o înțelegere a rolului DR5 în apoptoza mediată  
de TRAIL și în mecanismele care pot afecta susceptibilitatea. Avantaje similare sunt furnizate  
17 de anticorpul DR4.

Acest avantaj se extinde în general asupra anticorpilor DR4 și DR5 umanizați din  
19 invenția de față. O clonă moleculară a unui anticorp al DR5, de exemplu, se prepară prin  
tehnici cunoscute, așa cum se va detalia în exemplele care urmează. Metodologia ADN-ului  
21 recombinat (Maniatis et al., 1982, *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Cold Sp Harbor  
Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) este operativă aici, pentru a construi secvențele de acid  
23 nucleic, care codifică o moleculă de anticorp monoclonal sau regiunea de legare a antige-  
nului acestuia.

Invenția de față permite construirea anticorpilor TRAIL umanizați, care este  
25 improbabil să inducă un răspuns la anticorpul uman antișoarece (la care se va face referire  
de acum înainte ca „HAMA”) (Schroff et al., 1985, *Cancer Res.*, 45, 879-885), și să aibă în  
27 paralel o funcție eficace a efectorului anticorpului. Anticorpii umani integrali pot fi de  
asemenea produși prin imunizarea șoarecilor capabili de a produce un anticorp uman  
29 integral (de exemplu, șoarecii modificați genetic, pentru a produce anticorpi umani), realizând  
screening-ul clonelor care leagă DR5 sau DR4, inducând apoptoza, și intrând în competiție  
31 pentru determinantul antigenic al TRA-8 sau 2E12. Vezi, de exemplu, Lonberg și Huszar  
(1995), *Human antibodies from transgenic mice*, *Int. Rev. Immunol.*, 13:65-93, care este  
33 încorporat aici prin referință în întregime, pentru metodele de producere a anticorpilor umani  
integrali. După cum se utilizează aici, termenii „uman” și „umanizat”, referitor la anticorpi, se  
35 referă la orice anticorp care se așteaptă să provoace un răspuns imunogen slab terapeutic,  
37 tolerabil la un subiect uman.

Invenția de față furnizează un anticorp uman DR5, un anticorp umanizat anti-DR5,  
39 imunoglobuline TRA-8 cu lanț greu și ușor și imunoglobuline umanizate cu lanț greu și ușor.  
Invenția mai furnizează un anticorp DR4, un anticorp umanizat DR4, imunoglobuline cu lanț  
41 greu și ușor ale anticorpului DR4, și imunoglobuline umanizate cu lanț greu și ușor, acizi  
nucleici care codifică anticorpii și lanțurile grele și ușoare, vectori care cuprind acești acizi  
43 nucleici, și celule care cuprind vectorii. Anumite fragmente ale acestor proteine sau gene  
realizează funcțiile de reglare sau enzimatică ale proteinei sau genei cu secvență integrală.  
45 De exemplu, secvențele de acid nucleic care le codifică pot fi modificate prin substituții, adiiții,

# RO 123525 B1

suprimări sau exprimări multimerice, care furnizează echivalente funcționale ale proteinelor sau genelor. Datorită degenerării secvențelor codificatoare ale acidului nucleic, se pot utiliza, în practica invenției de față, și alte secvențe care codifică aproape aceleași secvențe ale aminoacidului, ca și cele care apar în mod natural în proteine. Acestea includ, dar nu se limitează la secvențe de acid nucleic care includ toate porțiunile de acid nucleic care codifică polipeptidele de mai sus, care sunt modificate prin substituția a diferiți codoni care codifică un rest de aminoacid echivalent din punct de vedere al funcției din secvență, producând astfel o modificare silențioasă. Se apreciază că secvența de nucleotide a unei imunoglobuline conforme cu invenția de față tolerează variații de omologie a secvenței până la 25%, după cum se calculează prin metode standard („Current Methods in Sequence Comparison and Analysis”, *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, pp. 127-149, 1998, Alan R. Liss, Inc.), atât timp cât o asemenea variantă formează un anticorp operativ care recunoaște un receptor TRAIL DR5. De exemplu, unul sau mai multe resturi din secvența polipeptidică pot fi substituite cu alt aminoacid de aceeași polaritate, care se comportă ca un echivalent funcțional, având ca rezultat modificări silențioase. Substituenții pentru aminoacizii din secvență pot fi selectați dintre alți membrii ai clasei din care aminoacidul face parte (adică o substituție conservativă). De exemplu, aminoacizii nepolari (hidrofobi) includ alanina, leucina, izoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofanul și metionina. Aminoacizii polari neutri includ glicina, serina, treonina, cisteina, tirozina, asparagina și glutamina. Aminoacizii încărcăți pozitiv (bazici) includ arginina, lizina și histidina. Aminoacizii încărcăți negativ (acizi) includ acidul aspartic și acidul glutamic. Sunt de asemenea incluse, în scopul acestei invenții, proteinele sau fragmente sau derivați ai acestora care sunt modificate în mod distinctiv în timpul sau după translație, de exemplu, prin glicozilare, clivaj proteolitic, legare la o moleculă de anticorp sau la alți liganzi celulari etc. În plus, vectorul recombinat, care codifică secvențele de acid nucleic ale anticorpilor din invenția de față, pot fi supuși ingineriei, astfel încât să se modifice prelucrarea sau exprimarea unui vector. Se pot face și alte modificări fie în secvența de acid nucleic, fie în cea de aminoacid, fără a reduce sau fără a reduce în mod substanțial activitatea de apoptoză în anticorp. Astfel de modificări pot apărea în regiunile CDR sau non-CDR, utilizând tehnici de rutină din domeniu. Vezi, de exemplu, Yang et al., (1995), *J. Mol. Biol.* 254:392-403, care este încorporat aici prin referință în întregime, pentru metode de mutagenză ambulantă (*ib. engl., walking mutagenesis*) a CDR.

În plus, un inhibitor care codifică secvențe de acid nucleic, poate fi supus mutațiilor *in vivo* sau *in vitro*. pentru a crea sau distruge secvențele de translație, inițiere, și/sau terminare, sau pentru a crea variații în regiunile de codificare și/sau pentru a forma situsuri pentru endonucleaze de restricție sau pentru a le distruge pe cele existente, pentru a facilita modificarea *in vitro* suplimentară. Se poate utiliza orice tehnică de mutagenză cunoscută în domeniu, incluzând, dar nelimitându-se la mutagenză *in vitro*, direcționată la situs, *J. Biol. Chem.* 253:6551, utilizarea linker-ilor Tab (Pharmacia), și altele asemenea.

Datele de cristalografie cu raze X indică faptul că pliul imunoglobulinei anticorpului formează, în general, o structură cilindrică, lungă, ce cuprinde două straturi antiparalele de foi b, fiecare constând din trei sau patru lanțuri b. În regiunea variabilă, trei bucle din fiecare dintre domeniile V ale lanțurilor H și L se aglomerează împreună, pentru a forma un situs de legare a antigenului. Fiecare dintre aceste bucle este denumită regiune de determinare complementară (CDR). CDR-urile au cea mai mare variabilitate a secvenței de aminoacizi

# RO 123525 B1

1 din anticorp. Porțiunile regiunii variabile, care nu sunt parte a CDR, se numesc „regiuni  
schelet” (regiuni „FR”) și joacă în general un rol în menținerea structurii CDR. De preferință,  
3 toate CDR-urile dintr-un anticorp dat sunt grefate într-un anticorp acceptor, pentru a păstra  
regiunea de legare a regiunii determinantului antigenic al receptorului TRAIL. Se apreciază  
5 că grefarea unei porțiuni din cantitatea totală a CDR-urilor într-un donor este operativă în  
cazul de față. Se înțelege că grefarea cuprinde, în general, înlocuirea, rest cu rest, a unei  
7 regiuni sau a unui aminoacid cu altul/alta. Cu toate acestea, ocazional, în special, prin  
transferul regiunii, unul sau mai multe resturi pot fi adăugate sau omise sau substituite, după  
9 dorință, și astfel de deleții și inserții, la fel ca și înlocuirile și inversiunile adecvate sunt  
apanajul celor cu calificare în domeniu.

11 Un anticorp din invenția de față se obține, de exemplu, prin grefarea fiecărei CDR al  
subunității lanțului L și H, ale unui anticorp monoclonal, al unui receptor anti-TRAIL, într-o  
13 regiune CDR corespunzătoare a unui anticorp uman, prin aceasta, umanizând un anticorp  
monoclonal de șoarece, eficace împotriva unui receptor TRAIL.

15 Fragmente de anticorp care conțin idiotipul moleculei sunt de asemenea generate  
și sunt operative în cazul de față, utilizând tehnici cunoscute. De exemplu, astfel de  
17 fragmente includ, ca ilustrare, fragmentul de receptor anti-TRAIL (AB')<sub>2</sub> care poate fi produs  
prin digestia cu pepsină a moleculei de anticorp, fragmentele AB' de receptor TRAIL  
19 generate prin reducerea punților disulfurice ale fragmentului (AB')<sub>2</sub> al receptorului TRAIL, și  
ale fragmentului de anticorp care sunt generate prin tratarea moleculei anticorpului cu  
21 papaină și cu un agent reducător.

Anticorpii din invenția de față se pot obține utilizând numeroase tehnici cunoscute în  
23 domeniu. De exemplu, anticorpul monoclonal TRA-8 anti-DR5 poate fi obținut cultivând un  
hibridom care, la rândul său, să fie obținut prin imunizarea unui șoarece cu DR5 uman și  
25 ulterior fuzionând celulele splenice sau celulele de nodul limfatic de la șoarece cu celule de  
mielom de șoarece.

27 Prepararea unui anticorp monoclonal, ca ilustrare, implică următoarele etape:

- 29 a. purificarea unei biomacromolecule de utilizat ca antigen;
- 31 b. prepararea unor celule producătoare de anticorpi, întâi imunizând un animal,  
utilizând injecții cu antigen, exsanguinând animalul și determinând titrul anticorpului, pentru  
a determina când să se îndepărteze splina;
- 33 c. prepararea celulelor de mielom;
- 35 d. fuzionarea celulelor producătoare de anticorp și a celulelor de mielom;
- 37 e. selectarea unui hibridom care produce un anticorp dorit;
- 39 f. prepararea unei singure clone de celule (clonarea);
- g. opțional, cultivarea celulelor de hibridom sau ale animalelor în creștere în care au  
fost transplantate celulele de hibridom, pentru prepararea pe scară largă a anticorpului  
monoclonal; și
- h. testarea activității biologice și a specificității sau determinarea proprietăților de  
agent marker ale anticorpului monoclonal astfel preparat.

41 Procedura de preparare a unui anticorp monoclonal este detaliată mai jos, cu referire  
la etapele descrise mai sus. Această metodă de preparare a unui anticorp din invenția de față  
43 se intenționează să fie numai ilustrativă pentru metodele de preparare, și nu se limitează la  
acestea. Pot fi urmate și alte proceduri sau poate fi modificată metoda care urmează, de exemplu,  
45 prin utilizarea, ca celule producătoare de anticorpi, altele decât cele de splină sau de mielom.

# RO 123525 B1

<i>a. Prepararea antigenului</i>	1
O proteină recombinată (la care se va face referire de acum înainte ca „DR5 uman recombinat” sau „DR4 uman recombinat”), eficace ca antigen, se obține prin transfecția celulelor QBI-293A cu vectorul de exprimare pAdDR5-IgG, pentru o proteină de fuziune care conține domeniul extracelular al DR5 sau DR4 uman și regiunea Fc a anticorpului uman IgG1 (la care se va face referire de acum înainte ca „IgG”), (cf. PTA-1428), pentru a o exprima prin utilizarea trusei ADENO-Quest (Quantum Biotechnologies Inc., Canada), și colectând și purificând parțial produsul de exprimare. Plasmida pAdDR5-IgG este construită prin inserarea unui ADN care codifică un DR5 sau un DR4 uman și a unei proteine de fuziune umane IgG în pAdCMV5, care este un vector de exprimare pentru celulele animale. Sunt operative în cazul de față și alte materiale, cum ar fi ADN care codifică DR5 sau DR4, vectorul și gazda.	3 5 7 9 11
DR5 sau DR4 uman și proteina de fuziune IgG, produși în supernatantul de cultură a celulelor QBI-293A, transfectat cu vectorul pAdDR5-IgG, pot fi parțial purificați prin cromatografie de afinitate ProteinA-Sepharose sau prin cromatografie de afinitate ProteinG-Sepharose, sau prin cromatografie de schimb ionic, utilizând o coloană Resource Q (denumire comercială; Pharmacia).	13 15 17
Ca alternativă, se utilizează, ca antigen DR5 sau DR4 purificați, obținuți din membranele celulare de linii celulare umane. În plus, deoarece structurile primare ale DR4 și DR5 sunt cunoscute (cf. PTA-1428), o peptidă care să conțină secvența de aminoacid SECV ID NR. 1 poate fi sintetizată chimic, printr-o metodă cunoscută, cum ar fi metoda Sanger, și poate fi utilizată ca antigen.	19 21
<i>b. Prepararea celulelor producătoare de anticorp</i>	23
Un șoarece se imunizează cu imunogenul produs în etapa a., se amestecă cu un adjuvant, cum ar fi adjuvantul complet sau incomplet al lui Freund sau alaun. Alte animale experimentale includ în mod ilustrativ șobolanii, cobaii, iepurii, câinii, puii, caii, porcii, vacile și oile.	25 27
Căile de administrare adecvate pentru a imuniza un animal experimental includ căile de injectare subcutanată, intraperitoneală, intravenoasă, intradermică și intramusculară, fiind preferate injecțiile subcutanate și intraperitoneale.	29
Imunizarea se realizează opțional printr-o doză unică sau prin câteva doze repetate la intervale adecvate (de preferință, de la 1 la 5 săptămâni). Animalelor imunizate, li se monitorizează titrul anticorpului în ser și animalul cu un titru al anticorpului suficient de mare este selectat ca sursă de celule producătoare de anticorp. Selectarea unui animal cu un titru mare face procedeul care urmează mai eficient. Celulele pentru fuziunea ulterioară sunt în general cultivate de la animal, la 3 până la 5 zile după imunizarea finală.	31 33 35
Metodele de determinare a titrului anticorpului includ diferite tehnici bine cunoscute, cum ar fi radioimunoanaliza (la care se va face referire de acum înainte ca „RIA”), imunoanaliza enzimatică în fază solidă (la care se va face referire de acum înainte ca „ELISA”), analiza anticorpului fluorescent și analiza hemaglutinării pasive, fiind preferate RIA și ELISA, din motive de sensibilitate de detecție, rapiditate, acuratețe și posibilitate de automatizare.	37 39 41
Determinarea titrului anticorpului poate fi realizată, de exemplu, prin ELISA, după cum urmează. Întâi, DR5 sau DR4 purificați sau DR5 sau DR4 parțial purificați se adsorb pe suprafața unei faze solide, cum ar fi o placă ELISA cu 96 godeuri, urmată de blocarea oricărei	43 45

# RO 123525 B1

1 suprafețe rămase, la care DR5 sau DR4 nu s-au legat, cu o proteină neînrudită cu antigenul,  
cum ar fi albumina serică bovină (BSA). După spălare, suprafețele godeurilor sunt puse în  
3 contact cu probe diluate serial de ser de șoarece, pentru a permite legarea anticorpului DR5  
sau DR4 din probe la antigen. Se adaugă un anticorp marcat antișoarece, ca anticorp  
5 secundar, pentru a fi legat de anticorpul de șoarece. Agentul de marcare poate include un  
agent de marcare enzimatic, un agent de marcare fluorescent sau alți agenți de marcare  
7 cunoscuți în domeniu. După spălare, se adaugă substratul enzimei și titrul anticorpului se  
estimează, prin determinarea modificării absorbanței, datorită dezvoltării culorii produse de  
9 alterarea substratului sau de altele asemănătoare.

## c. Prepararea celulelor de mielom

11 Celule de la linii de celule de șoarece stabilite servesc ca sursă de celule de mielom,  
incluzând, de exemplu, șoarece rezistent la 8-azaguanină, derivate de la tulpinile de mielom  
13 Balb/c: P3X63Ag8U.1 (P3-U1) (D. E. Yelton et al., 1978, *Current Topics in Microbiology and  
Immunology*, 81, 1-7), P3NSI/1-Ag4-1(NS-1) (G. Kohler et al., 1976, *European J.  
15 Immunology*, 6, 511-519). Sp2/0-Ag14 (SP-2) (Shulman, M., et al., 1978, *Nature*, 276, 269-  
270), P3X63Ag8.653 (653) (J. F. Kearney et al., 1979, *J. Immunology*, 123, 1545-1550) și  
17 P3X63Ag8 (X63) (K. Horibata și A. W. Harris, 1975, *Nature*, 256, 495-497). Linia de celule  
selectată este transferată serial într-un mediu adecvat, cum ar fi mediul de 8-azaguanină.  
19 Mediul de 8-azaguanină include Mediul Dulbecco modificat, al lui Iscove (la care se va face  
referire de acum înainte ca „IMDM”) sau Mediul Eagle modificat, al lui Dulbecco (la care se  
21 va face referire de acum înainte ca „DMEM”). Mediul RPMI-1640 suplimentat cu glutamină,  
2-mercaptoetanol, gentamicină, ser fetal de vițel (la care se va face referire de acum înainte  
23 ca „FCS”), și 8-azaguanină. Celulele sunt apoi transferate pe un mediu normal, cum ar fi  
mediul ASF104 (Ajinomoto, K. K.) care conține FCS 10%, la 3 până la 4 zile înainte de  
25 fuziune, pentru a asigura faptul că cel puțin  $2 \times 10^7$  celule sunt disponibile în ziua fuziunii.

## d. Fuziunea celulelor

27 Limfocitele și celulele plasmatiche obținute din orice parte adecvată a animalului sunt  
celule precursor care produc anticorp. Surse ilustrative de limfocite sau de celule  
29 plasmatiche includ în mod ilustrativ splina, nodulii limfatici, sângele periferic sau orice  
combinație adecvată a acestora, celulele de splină fiind cea mai comună sursă.

31 După ultima injecție, țesutul în care celulele producătoare de anticorp sunt prezente  
se îndepărtează de la un șoarece care are titrul predeterminat al anticorpului. Tehnica cea  
33 mai bună de fuziune a celulelor de splină cu celulele de mielom preparate în etapa c.  
utilizează polietilenglicol.

35 Tehnica de fuziune include spălarea celulelor de splină și de mielom cu mediu fără  
ser (cum ar fi RPMI 1640) sau tampon fosfat salin (la care se va face referire de acum înainte  
37 ca „PBS”), astfel încât raportul numeric al celulelor de splină și al celulelor de mielom să fie  
aproximativ 5:1 și 10:1, și apoi se centrifughează. După evacuarea supernatantului și  
39 eliberarea celulelor din peletă, se adaugă 1 ml mediu fără ser, care conține 50% (gr/v)  
polietilenglicol (g.m. de la 1000 la 4000) în picături cu amestecare. Ulterior, 10 ml de mediu  
41 fără ser se adaugă încet și apoi se centrifughează. Supernatantul se aruncă din nou, iar celu-  
lele strânse în peletă se suspendă într-o cantitate adecvată de mediu HAT care conține o solu-  
43 ție de hipoxantină, aminopterină și timidină (la care se va face referire de acum înainte ca  
„HAT”) și interleukină-2 de șoarece (la care se va face referire de acum înainte ca „1L-2). Sus-  
45 pensia este apoi dispersată în godeurile de pe plăcile de cultură (la care se mai face referire

# RO 123525 B1

aici simplu ca „plăci”) și se incubă în prezența a 5% v/v CO <sub>2</sub> , la 37°C, timp de aproximativ 2 săptămâni, adăugând suplimentar mediu HAT, cât este necesar.	1
<i>e. Selectarea hibridoamelor</i>	3
Când tulpina de mielom utilizată este rezistentă la 8-azaguanină, adică, are o deficiență a enzimei hipoxantin guanin fosforibozil transferază (HGPRT), orice celule de mielom nefuzionate și orice fuziuni mielom-mielom sunt incapabile de supraviețuire în mediul HAT. Pe de altă parte, fuziuni ale celulelor producătoare de anticorp una cu alta, la fel ca și a hibridoamelor de celule producătoare de anticorp cu celule de mielom pot supraviețui, primele având doar o viață limitată. În consecință, incubarea continuă în mediul HAT are ca rezultat selecția numai a hibridoamelor dorite.	5 7 9
Hibridoamele rezultate cresc în colonii care sunt transferate în mediul HAT fără aminopterină (mediu HT). După aceea, se îndepărtează alicote de supematant de cultură. pentru a determina titrul anticorpului anti-Fas, de exemplu, prin ELISA. Când proteina de fuziune mai sus-menționată se utilizează ca antigen ELISA, este de asemenea necesară eliminarea clonelor care produc un anticorp care este legat specific la regiunea Fc a IgG1 uman. Prezența sau absența unei astfel de clone poate fi verificată, de exemplu, prin ELISA, utilizând ca antigen Fas-IgG1 sau IgG1.	11 13 15 17
<i>f. Clonarea</i>	
Hibridoamele care s-a demonstrat că produc anticorpi specifici, utilizând o metodă similară cu cea descrisă în etapa b., pentru a determina titrul anticorpului, sunt apoi transferate pe o altă placă, pentru clonare. Metodele de clonare adecvate includ: metoda diluțiilor limitate, în care hibridoamele sunt diluate, pentru a conține o celulă per godeul unei plăci și apoi se cultivă; metoda agarului moale, în care coloniile sunt recuperate după cultivarea într-un mediu de agar moale; o metodă de utilizare a unui micromanipulator, pentru a separa o singură celulă pentru cultură; și „sortează - o -clonă”, în care celule unice sunt separate de către un sortator de celule.	19 21 23 25
Procedura de clonare conformă cu, de exemplu, metoda diluțiilor limitate, se repetă de 2 până la 4 ori, pentru fiecare godeu, demonstrând un titru de anticorpi, și clonele care au titre de anticorpi stabile sunt selectate ca hibridoame producătoare de anticorpi monoclonali anti-DR5. Hibridoamele care produc anticorpul DR5 antișoarece sunt selectate printr-o metodă similară, pentru a obține o linie de celule producătoare de anticorpi monoclonali anti-DR5.	27 29 31
Hibridomul șoarece-șoarece TRA-8, care este baza pentru anticorpii din invenția de față, a fost depozitat în Colecția Americană de Tipuri de Culturi (American Type Culture Collection), la 1 martie 2000, și are numărul de acces PTA-1428. Hibridomul 2E12 a fost depozitat în Colecția Americană de Tipuri de Culturi, la 24 octombrie 2001, după cum a fost descris mai sus și are numărul de acces ATCC Nr. PTA-3798. În conformitate, când se prepară un anticorp utilizând hibridomul șoarece-șoarece TRA-8 sau orice alt hibridom stabilit, prepararea se poate realiza prin urmarea unei proceduri, începând de la etapa g. în jos, etapele de la a. la f. fiind omise.	33 35 37 39
<i>g. Cultura de hibridom pentru prepararea anticorpului monoclonal</i>	41
Hibridomul obținut prin clonare este apoi cultivat într-un mediu normal, nu în mediul HT. Cultura pe scară largă este realizată prin cultura flacoanelor cilindrice, utilizând flacoane de cultură mari, sau prin cultură rotitoare. Supernatantul de la cultura pe scară largă este apoi recoltat și purificat printr-o metodă adecvată, cum ar fi gel-filtrarea, care este bine	43 45

# RO 123525 B1

1 cunoscută persoanelor cu calificare în domeniu, pentru a obține anticorpii monoclonali DR5  
sau DR4, care este o bază pentru anticorpii din invenția de față. Hibridomul mai poate fi, de  
3 asemenea, crescut intraperitoneal, la un șoarece singenic, cum ar fi șoarecele Balb/c, sau  
șoarecele nu/nu, pentru a obține ascite care conțin un anticorp monoclonal DR5 sau DR4  
5 în cantități mari. Trusele de purificare a anticorpilor monoclonali, disponibile în comerț (de  
exemplu, trusa MAbTrap GII; Pharmacia) sunt utilizate în mod convenabil, pentru a purifica  
7 anticorpii recoltați).

Anticorpii monoclonali preparați ca mai sus au o înaltă specificitate pentru DR5 uman  
9 sau respectiv DR4 uman.

## h. Analiza anticorpului monoclonal

11 Metodele adecvate de identificare a izotopului și a subclasei anticorpului monoclonal  
includ metoda Ouchterlony, ELISA și RIA. De preferință, pentru identificare, se utilizează o  
13 trusă comercială, cum ar fi o trusă Mouse Typer (denumire comercială BioRad).

Cuantificarea proteinei poate fi realizată prin metoda Folin-Lowry sau prin calcul  
15 bazat pe absorbanta la 280 nm ( $1,4 (DO_{280}) = \text{imunoglobulină } 1 \text{ mg/ml}$ ).

Identificarea determinantului antigenic pe care anticorpii monoclonali îl recunoaște  
17 se realizează după cum urmează. Mai întâi, se prepară diferite structuri parțiale ale moleculei  
pe care anticorpii monoclonali le recunoaște. Structurile parțiale se prepară prin metoda în  
19 care diferite peptide parțiale ale moleculei se prepară prin sinteză, prin cunoscuta tehnică  
de sinteză a oligopeptidelor, sau prin metoda în care ADN-ul care codifică polipeptida  
21 parțială dorită, este încorporat într-un plasmid de exprimare adecvat, și se exprimă într-o  
gazdă adecvată, cum ar fi *E. coli*, pentru a produce peptidele. În general, ambele metode  
23 sunt frecvent utilizate în combinație, pentru obiectul de mai sus. De exemplu, o serie de  
polipeptide având lungimi reduse în mod adecvat, care lucrează de la capătul C sau N  
25 terminal al proteinei antigen, se pot prepara prin tehnici de inginerie genetică consacrate.  
Stabilind care fragment reacționează cu anticorpii, se obține o idee aproximativă a locului  
27 determinantului antigenic.

Determinantul antigenic este identificat mai îndeaproape prin sinteza unei multitudini  
29 de oligopeptide mai mici care îi corespund sau care corespund unor mutații ai peptidei,  
utilizând tehnici consacrate de sinteză a oligopeptidelor, pentru a determina proprietatea de  
legare a peptidelor la anticorpii monoclonali anti-DR5, de exemplu, ceea ce constituie baza  
31 pentru prepararea anticorpului din invenția de față și o inhibiție competitivă a legării peptidei  
la un antigen cu anticorpii monoclonali. Trusele disponibile în comerț, cum ar fi SPOTs Kit  
(Genosys Biotechnologies, Inc.) și o serie de truse (multipin) de sinteză multiplă a peptidelor  
33 bazate pe metoda de sinteză multiplă (multipin) (Chiron Corp.) pot fi utilizate în mod  
convenabil, pentru a obține o largă varietate de oligopeptide.

37 Un anticorp din invenția de față posedă diferitele proprietăți funcționale de la a. la f.,  
descrise mai jos, fiecare dintre acestea fiind verificată, de exemplu, printr-o metodă descrisă  
39 aici mai jos.

## a. Legarea specifică a TRA-8 la celule care exprimă DR5 umani

41 O caracteristică unică a acestei invenții este capacitatea de a lega DR5 de la  
suprafața celulei. Acest lucru se demonstrează prin analiza de citometrie în flux a celulelor  
43 care exprimă DR5. Mai întâi, legarea specifică la suprafața celulei a DR5 este confirmată prin  
celulele COS-7 transfectate cu cADN cu lungime integrală care codifică DR5 uman. În mod  
45 specific, TRA-8 recunoaște doar celulele COS-7 transfectate cu DR5 dar nu vectorul de

# RO 123525 B1

control gol sau vectorul care codifică DR4. În a doua etapă, sunt testate trei tipuri de celule de tumori maligne de origini diferite: celulele hematopoietice, de gliom și de cancer de prostată. Majoritatea acestor celule tumorale transformate exprimă niveluri semnificative de DR5 de la suprafața celulei, deși nivelurile de exprimare variază în limite largi. În a treia etapă, se examinează două grupuri de celule fibroblastice sinoviale, primare, de la pacienți cu RA și OA. Toate celulele sinoviale RA exprimă niveluri semnificativ mai înalte de DR5 comparativ cu celulele OA.

## *b. Inducția apoptozei celulelor tumorale maligne in vitro în absența reticulării*

Capacitatea unui anticorp crescut, conform invenției de față, de a recunoaște receptorul TRAIL și de a induce direct apoptoza celulelor tumorale maligne umane este determinată prin analiza viabilității celulare (ATPLite) în timpul culturii *in vitro* a celulelor cu concentrații diferite de anticorp, în mod specific TRA-8. Majoritatea celulelor tumorale sunt susceptibile la apoptoza indusă de TRA-8. Pentru unele celule, TRA-8 a prezentat o puternică activitate de inducție a apoptozei, de exemplu, TRA-8 este capabil de a induce apoptoza celulelor umane Jurkat la niveluri de pg/ml. Ca un lucru important, apoptoza indusă de TRA-8 nu necesită reticulare, și în cele mai multe celule, TRA-8 a prezentat o activitate de inducție a apoptozei mai puternică decât TRAIL solubil, recombinat, în prezența agentului de îmbunătățire.

## *c. Activitatea tumoricidă a TRA-8 in vivo*

Activitatea tumoricidă a TRA-8 este evaluată prin două modele de tumori SCID/umane. Mai întâi, șoarecii SCID sunt inoculați intravenos cu celule Jurkat de leucemie umane și sunt tratați cu o doză unică (100 μg) de TRA-8. Rezultatele au arătat faptul că majoritatea celulelor Jurkat implantate sunt eliminate din sângele periferic și din splină prin tratament cu TRA-8, după cum s-a determinat prin analiză citometrică în flux și prin filtrarea imunohistochimică a celulelor Jurkat. În al doilea rând, celule de astrocitom uman 1321N1 sunt inoculate subcutanat la șoareci SCID, iar șoarecii purtători de tumori sunt tratați cu o doză unică de TRA-8. Creșterea celulelor 1321N1 implantate este inhibată semnificativ la șoarecii tratați cu TRA-8, după cum s-a determinat prin mărimea tumorii și prin analiză histologică.

## *d. Identificarea celulelor sinoviale RA de către TRA-8*

Celulele sinoviale primare, izolate de la 8 pacienți cu RA și 4 pacienți cu OA, sunt testate pentru exprimarea la suprafața celulei a DR5. TRA-8 este capabil să coloreze pozitiv toate celulele RA și să coloreze negativ toate celulele OA. Astfel, RA se distinge de OA prin expresia la suprafață a DR5, după cum se detectează prin TRA-8.

## *e. Inducția apoptozei în celulele fibroblastice sinoviale RA de către TRA-8*

Abilitatea lui TRA-8 de a induce apoptoza celulelor sinoviale RA se determină prin analiza viabilității celulare în timpul cultivării *in vitro*, în prezența diferitelor concentrații de TRA-8. Toate celulele RA au prezentat niveluri de la înalte la intermediare ale susceptibilității la 100 ng/ml de TRA-8. În contrast, toate celulele OA sunt în mod esențial rezistente la apoptoza indusă de TRA-8. Ca un fapt important, TRA-8 a prezentat o mai bună activitate de inducție a apoptozei în celulele sinoviale RA decât TRAIL solubil, împreună cu agentul de îmbunătățire. Mai mult, comparativ cu anticorpul anti-Fas (CH-11), TRA-8 a prezentat o mai bună selectivitate la celulele sinoviale RA.

## *f. TRA-8 nu induce producția de MMP-uri în celulele sinoviale RA*

Deoarece TRA-8 este capabil de a induce activarea NF-kb în celulele sinoviale RA ca și TNF-α, se determină efectul TRA-8 asupra producției de MMP1 și MMP3 ale celulelor

# RO 123525 B1

1 sinoviale. Deoarece TNF-a a indus o creștere doză-dependentă a MMP-urilor, TRA-8 este  
incapabil de a induce orice producere de MMP-uri, și în unele concentrații, TRA-8 a scăzut  
3 ușor producția de MMP-uri în celulele sinoviale RA.

## g. TRA induce o multiplă activare a caspazei

5 Deoarece caspazele joacă un rol crucial în inducția apoptozei, abilitatea TRA-8 de  
a induce activarea caspazei se determină în celulele umane Jurkat. Când celulele Jurkat  
7 sunt incubate cu o doză scăzută (50 ng/ml) de TRA-8, activarea caspazei 8, caspazei 9 și  
caspazei 3 se observă la 15 min după incubare, după cum se demonstrează prin analiza  
9 Western și prin analiza de clivaj a caspazei. În termeni de timp, număr și forță de activare  
a caspazei, anticorpii din invenția de față, incluzând anticorpul demonstrativ TRA-8, au  
11 prezentat o activitate mult mai bună decât orice alți anticorpi inductori ai apoptozei, cum ar  
fi anticorpul Fas antiuman (CH-11).

13 Anticorpul 2E12 leagă în mod specific DR4 în forma sa solubilă și are o activitate de  
inducție a apoptozei *in vivo* și *in vitro*, în celulele țintă care exprimă DR4 (incluzând, de  
15 exemplu, celulele canceroase, celulele sinoviale de artrită reumatoidă, celule imunitare  
activate, cum ar fi limfocitele activate și celulele infectate viral), are o activitate tumoricidă *in*  
17 *vivo* (de preferință, în absența toxicității la celulele netumorale). De preferință, anticorpul DR4  
din invenție are o activitate de inducție a apoptozei caracterizată prin mai puțin de  
19 aproximativ 60%, 50%, 40%, 30%, 20% sau 10% viabilitate a celulelor țintă, la concentrații  
de anticorp de mai puțin de 30 μg/ml, 3 μg/ml, 0,3 μg/ml, sau 0,03 μg/ml, și o activitate  
21 tumoricidă caracterizată prin 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% sau 100%  
reducere a mărimii tumorii. Astfel, un anticorp aAn din invenția de față este o substanță  
23 având proprietatea de a induce selectiv apoptoza celulelor patogene, după cum se arată în  
efectul (a) și (g). În conformitate, acesta este util ca agent profilactic și terapeutic pentru  
25 bolile asociate cu supraviețuirea neadecvată a celulelor sau cu proliferarea inadecvată a  
celulelor, cum ar fi a celor care pot fi atribuite dereglării sistemelor de apoptoză, incluzând  
27 sistemul Fas/ligand Fas.

Abilitatea unui anticorp din invenția de față de a induce apoptoza este confirmată prin  
29 cultivarea celulelor, cum ar fi linia Jurkat de celule leucemice umane (Colecția Americană de  
Tipuri de Culturi Nr. TIB-152) și a liniei de celule de astrocitom 1321N1, în mediul în care a  
31 fost adăugată proba de test, și determinarea ratei de supraviețuire, de exemplu, printr-o  
analiză ATPLite.

33 Anticorpii din invenția de față, în special, anticorpii DR5 și DR4, având aproape  
aceeași imunogenicitate la om ca și cea a anticorpilor umani, este utilizat ca agent pentru  
35 profilaxia și tratamentul bolilor asociate cu supraviețuirea sau cu proliferarea neadecvată ale  
celulelor, incluzându-le pe cele care pot fi atribuite dereglărilor sistemelor de apoptoză în  
37 bolile inflamatorii și autoimune, incluzând în mod ilustrativ lupusul eritematos sistemic, boala  
Hashimoto, artrita reumatoidă, boala greafă contra gazdă, sindromul Sjögren, anemia  
39 pernicioasă, boala Addison, sclerodermia, sindromul Goodpasture, boala Crohn, anemia  
hemolitică autoimună, sterilitatea, miastenia gravis, scleroza multiplă, boala Basedow,  
41 trombopenia purpura, diabetul zaharat insulinodependent, alergია, astmul, boala atopică,  
arterioscleroza, miocardita, cardiomiopia, nefrita glomerulară, anemia hipoplasică,  
43 respingerea după transplantul de organ și numeroasele malignități ale țesuturilor plămânilor,  
prostatai, ficatului, ovarelor, colonului, cervixului și sânilor. Anticorpii din invenția de față pot  
45 fi utilizați pentru a ținti și a induce selectiv apoptoza în celulele imunitare activate, incluzând

# RO 123525 B1

limfocitele, celulele limfoide, celulele mieloide și celulele sinoviale reumatoide activate (incluzând sinoviocitele inflamatoare activate, sinoviocitele asemănătoare macrofagelor, sinoviocitele asemănătoare fibroblaștilor) și în celulele infectate viral (incluzându-le pe cele infectate cu HIV, de exemplu), atât timp cât aceste celule țintite exprimă sau pot fi făcute să exprime receptorii TRAIL specifici (adică DR4 sau DR5).

Un astfel de agent terapeutic sau profilactic se poate administra în diferite forme. Modurile adecvate de administrare includ administrarea orală, cum ar fi prin comprimate, capsule, granule, pulberi și siropuri, sau administrare parenterală, cum ar fi administrarea prin injecții sau supozitoare.

Anticorpul sau agentul terapeutic se poate administra oral, rectal, intracisternal, intraventricular, intracranian, intratecal, intraarticular, intravaginal, parenteral (intravenos, intramuscular sau subcutanat), local (pudre, unguente sau picături), intraperitoneal, transdermic, prin inhalatie sau ca spray nazal sau bucal. Cantitatea exactă de anticorp sau de agent terapeutic necesară va varia de la un subiect la alt subiect, dependent de vârstă, greutate și de starea generală a subiectului, de severitatea bolii care este tratată, de localizarea și mărimea tumorii, de compoziții particulare utilizați, de modul de administrare și de altele asemenea. O cantitate adecvată poate fi determinată de cineva cu calificare obișnuită în domeniu, utilizând doar experimentarea de rutină, date fiind cunoștințele de aici. Dozele unice de anticorp se situează în domeniul de la 0,1...10000 micrograme, de preferință, între 1 și 100 micrograme. Concentrațiile tipice de anticorp într-un transportor variază în domeniul de la 0,2 la 2000 nanograme pe mililitru cedat. Pentru injecție într-o articulație, volumele de anticorp și transportor vor varia dependent de articulație, dar vor fi de aproximativ 0,5...10 ml, și, de preferință, de la 1 la 5 ml, care sunt injectați într-un genunchi uman, și, de preferință, 1...2 ml într-o gleznă umană.

În funcție de modul de administrare intenționat, anticorpul sau agentul terapeutic poate exista în compozițiile farmaceutice în forme de dozare solide, semisolide sau lichide, cum ar fi, de exemplu, comprimate, supozitoare, pilule, capsule, pulberi, lichide sau suspensii, de preferință, într-o formă dozată, unitară, adecvată pentru administrarea unică a unei doze exacte. Compozițiile vor include o cantitate eficientă de substrat selectat în combinație cu un transportor farmaceutic acceptabil și, în plus, poate include alți agenți medicinali, agenți farmaceutici, transportori sau diluanți. Prin „farmaceutic acceptabil”, se înțelege un material care nu este indezirabil din punct de vedere biologic sau în alt mod, care poate fi administrat unui individ, împreună cu substratul selectat, fără a produce efecte biologice indezirabile, semnificative, sau fără a interacționa într-o manieră dăunătoare cu oricare alți componenți ai compoziției farmaceutice în care acesta este conținut.

Compozițiile adecvate pentru injecție parenterală pot cuprinde dispersii, soluții, suspensii sau emulsii apoase sau neapoase, fiziologic acceptabile, și pulberi sterile pentru a fi reconstituite în soluții sau dispersii injectabile sterile. Exemple de transportori, diluanți, solvenți sau vehicule, apoși sau neapoși, adecvați includ apa, etanolul, polioli (propilenglicolul, polietilenglicolii, glicerolul și altele asemenea), amestecuri adecvate ale acestora, uleiuri vegetale (cum ar fi uleiul de măsline) și esteri organici injectabili, cum ar fi oleatul de etil. Poate fi menținută o fluiditate adecvată, de exemplu, prin utilizarea unui înveliș cum ar fi lecitina, prin menținerea dimensiunii cerute a particulelor în cazul dispersiilor și prin utilizarea de surfactanți.

# RO 123525 B1

1 Aceste compoziții mai pot de asemenea să conțină adjuvanți, cum ar fi agenți de  
conservare, umectare, emulsifiere și dispersare. Prevenirea acțiunii microorganismelor poate  
3 fi asigurată cu ajutorul diferiților agenți antibacterieni și antifungici, de exemplu, parabenii,  
clorbutanol, fenol, acid sorbic și alții asemenea. Poate fi de asemenea de dorit includerea  
5 agenților izotonici, de exemplu, zaharurile, clorura de sodiu și altele asemenea. Absorbția  
prelungită a formei farmaceutice injectabile poate fi obținută prin utilizarea de agenți care  
7 întârzie absorbția, de exemplu, monostearatul de aluminiu și gelatina.

Formele dozate solide pentru administrare orală includ capsulele, comprimatele,  
9 pilulele, pulberile și granulele. În astfel de forme dozate, solide, compusul activ este  
amestecat cu cel puțin un excipient obișnuit (sau transportor), cum ar fi citratul de sodiu sau  
11 fosfatul dicalcic, sau a. agenți de umplere sau extindere, cum ar fi, de exemplu, amidonurile,  
lactoza, sucroza, glucoza, manitolul și acidul silicic, b. lianți, cum ar fi, de exemplu,  
13 carboximetilceluloza, alginatii, gelatina, polivinilpirolidona, sucroza și acacia, c. umectanți,  
cum ar fi, de exemplu, glicerolul, d. dezintegranti, cum ar fi, de exemplu, agar agarul,  
15 carbonatul de calciu, amidonul de cartof sau tapioca, acidul alginic, anumiți silicați complexi,  
și carbonat de sodiu, e. retardanți de soluție, cum ar fi, de exemplu, parafina, f. acceleratori  
17 de absorbție, cum ar fi, de exemplu, compușii de amoniu cuaternar, g. agenți de umectare,  
cum ar fi, de exemplu, alcoolul cetilic și monostearatul de glicerol, h. adsorbanti, cum ar fi,  
19 de exemplu, caolinul și bentonita, și i. lubrifianți, cum ar fi, de exemplu, talcul, stearatul de  
calciu, stearatul de magneziu, polietilenglicolii solizi, laurilsulfatul de sodiu sau amestecuri  
21 ale acestora. În cazul capsulelor, comprimatelor și pilulelor, formele dozate mai pot cuprinde,  
de asemenea, agenți de tamponare.

23 Compozițiile solide de tip similar pot fi de asemenea utilizate ca agenți de umplere  
în capsule de gelatină dure sau moi, utilizând excipienți cum ar fi lactoza sau zahărul din  
25 lapte, la fel ca și polietilenglicolii cu greutate moleculară mare, și alții asemenea.

Formele dozate solide, cum ar fi comprimatele, drajeurile, capsulele, pilulele și  
27 granulele, se pot prepara cu învelișuri și straturi de acoperire, cum ar fi învelișurile  
enterosolubile și altele binecunoscute în domeniu. Acestea pot conține agenți de opacifiere  
29 și pot avea astfel de compoziții, încât să cedeze compusul sau compușii activi într-o anumită  
parte a tractului intestinal, într-o manieră întârziată. Exemple de compoziții de aglutinare,  
31 care se pot utiliza, sunt substanțele polimerice și cerurile. Compușii activi pot fi de asemenea  
într-o formă microîncapsulată, dacă este adecvat, împreună cu unul sau mai mulți dintre  
33 excipienții mai sus menționați.

Formele dozate lichide, pentru administrare orală, includ emulsiile, soluțiile, suspen-  
35 siile, siropurile, și elixirurile farmaceutic acceptabile. În plus față de compușii activi, formele  
dozate lichide mai pot conține diluanți inerți, utilizați în mod obișnuit în domeniu, cum ar fi  
37 apa sau alți solvenți, agenți de solubilizare și emulgatori, cum ar fi, de exemplu, alcoolul  
etilic, alcoolul izopropilic, carbonatul de etil, acetatul de etil, alcoolul benzilic, benzoatul de  
39 benzil, propilenglicolul, 1,3-butilenglicolul, dimetilformamida, uleiurile, în special, uleiul din  
semințe de bumbac, uleiul de arahide, uleiul de germeni de porumb, uleiul de măsline, uleiul  
41 de ricin și uleiul de susan, glicerolul, alcoolul tetrahidrofurfurilic, polietilenglicolii și esterii de  
acid gras ai sorbitanului sau amestecuri ale acestor substanțe, și altele asemenea.

43 Pe lângă acești diluanți inerți, compozițiile mai pot include adjuvanți, cum ar fi agenții  
de umectare, agenții emulgatori și de suspendare, agenți de îndulcire, aromatizare și  
45 parfumare.

# RO 123525 B1

Suspensiile, în plus față de compușii activi mai pot conține agenți de suspendare, cum ar fi, de exemplu, alcoolii izostearilici etoxilați, polioxiutilen sorbitolul și esterii de sorbitan, celuloza microcristalină, metahidroxidul de aluminiu, bentonita, agar agarul și tragacanta, sau amestecuri ale acestor substanțe, și altele asemenea. 1  
3

Compozițiile pentru administrare rectală sunt, de preferință, supozitoare care se pot prepara prin amestecarea compușilor din invenția de față cu excipienți sau transportori neiritativi, adecvați, cum ar fi untul de cacao, polietilenglicolul sau o ceară de supozitor, care sunt solizi la temperaturile obișnuite, dar lichide la temperatura corpului, și de aceea, se topesc în cavitatea vaginală sau în rect și cedează substanța activă. 5  
7  
9

Formele de dozare pentru administrarea topică a unui compus din această invenție includ unguentele, pudrele, spray-urile și inhalantele. Componenta activă este amestecată în condiții sterile cu un transportor fiziologic acceptabil și cu conservanți, tampoane sau propulsori care pot fi necesari. Preparatele oftalmice, unguentele, pudrele și soluțiile sunt de asemenea considerate ca fiind în scopul acestei invenții. 11  
13

Termenul „săruri, esteri, amide și prodroguri farmaceutic acceptabile”, după cum se utilizează aici, se referă la acele săruri carboxilat, săruri de adiție acidă ale aminoacizilor, esteri, amide și prodroguri ale compușilor din invenția de față care sunt adecvate, din punct de vedere medical, pentru utilizare în contact cu țesuturile pacienților, fără a prezenta un grad ridicat de toxicitate, răspuns alergic, iritație și altele asemenea, corelate cu un raport beneficiu/risc adecvat, și eficiente pentru utilizarea intenționată, la fel ca și formele amfionice, unde sunt posibile, ale compușilor din invenție. Termenul „săruri” se referă la sărurile de adiție acidă, anorganice și organice, relativ netoxice, ale compușilor din invenția de față. Aceste săruri pot fi preparate *in situ* în timpul izolării și purificării finale a compușilor sau prin reacția separată a compusului purificat în forma sa de bază liberă cu un acid organic sau anorganic și izolarea sării astfel formate. Sărurile reprezentative includ bromhidratul, clorhidratul, sulfatul, disulfatul, nitratul, acetatul, oxalatul, valeratul, oleatul, palmitatul, stearatul, lauratul, boratul, benzoatul, lactatul, fosfatul, tosilatul, citratul, maleatul, fumaratul, succinatul, tartratul, naftilat mesilatul, glucoheptonatul, lactobionatul, metansulfonatul și sărurile laurilsulfonat, și altele asemănătoare. Acestea pot include cationi pe bază de metale alcaline și alcalinopământoase, cum ar fi sodiul, litiul, potasiul, calciul, magneziul și altele semănătoare, la fel ca și cationi de amoniu, de amoniu cuaternar și aminici netoxici incluzând, dar nelimitându-se la, amoniu, tetrametilamoniu, tetraetilamoniu, metilamină, dimetilamină, trimetilamină, trietilamină, etilamină și altele asemănătoare, (vezi, de exemplu, S.M. Barge et al., „Pharmaceutical Salts”, *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66:1-19, care este încorporat aici prin referință.) 15  
17  
19  
21  
23  
25  
27  
29  
31  
33  
35

Termenul "prodrug" se referă la compuși care sunt rapid transformați *in vivo*, pentru a produce compusul părinte cu formula de mai sus, de exemplu, prin hidroliză în sânge. O discuție pe larg este furnizată în T. Higuchi și V. Stella, „Pro-drugs as Novel Delivery Systems”, vol. 14 din Seriile Simpozionului A.C.S. (A.C.S. Symposium Series), și în *Bioreversible Carriers in Drug Design*, ed. Edward B. Roche, Societatea Farmaceutică Americană (American Pharmaceutical Association) și Pergamon Press, 1987. 37  
39  
41

O celulă țintă este o celulă de la un animal, incluzând în mod ilustrativ omul, primatele neumane, pisicile, câinii, șobolanul, șoarecele, cobaiul, iepurele, capra, oaia, vaca, calul, piul, porcul, maimuțele și dihorii. 43

# RO 123525 B1

1 În plus, anticorpul sau agentul terapeutic din invenția de față poate exista atât sub  
formă nesolvată, cât și solvată, cu solvenți farmaceutic acceptabili, cum a fi apa, etanolul  
3 și alții asemenea. În general, formele solvate sunt considerate echivalente cu formele  
nesolvate, pentru scopurile invenției de față.

5 Moleculele de anticorp sunt purificate prin tehnici cunoscute, incluzând în mod  
ilustrativ cromatografia de aminoabsorbție sau de aminoafinitate, tehnicile cromatografice,  
7 cum ar fi cromatografia lichidă la presiune înaltă sau o combinație a acestora.

9 Un alt aspect al invenției de față include un produs farmaceutic pentru a fi utilizat la  
cedarea anticorpului receptorului anti-TRAIL biologic activ sau a anticorpului receptorului anti-  
TRAIL umanizat la un vertebrat. Produsul farmaceutic include o cantitate farmaceutic eficace,  
11 de fragment de anticorp al receptorului anti-TRAIL sau un fragment al acestuia, un transportor  
farmaceutic acceptabil și un recipient care include transportorul și anticorpul într-o manieră  
13 sterilă.

15 Într-o concretizare preferată a invenției, o cantitate farmaceutic eficace de anticorp  
din invenție inhibă proliferarea celulară sau induce apoptoza în contact cu o celulă țintă sau  
cu celule țintă. O proporție sau o cantitate farmaceutic eficace, de anticorp care recunoaște  
17 fie DR5 fie DR4 sau un anticorp umanizat care recunoaște fie DR5, fie DR4, este o proporție  
administrată la un individ, suficientă pentru a produce efectul dorit. După cum se utilizează  
19 aici, termenii „proporție farmaceutic eficace” și „cantitate terapeutică” sunt sinonime. Efectele  
dorite ale administrării unei cantități farmaceutic acceptabile, de anticorpi care recunosc DR5  
21 sau DR4, includ moartea uneia sau a mai multor celule țintă, inhibiția creșterii uneia sau a  
mai multor celule țintă, stimularea DR5 sau, respectiv, a DR4, legarea la DR5 sau, respectiv,  
23 la DR4, și niveluri sau activități crescute de NFkB la o celulă țintă. O celulă țintă este o celulă  
care exprimă DR5 sau DR4 și pot fi incluse în mod ilustrativ celule care cresc anormal și  
25 celule tumorale, cum ar fi papiloamele și negii; cancerul de sân, cancerul de colon,  
heptoamele, leucemiile, cancerul de plămân, melanomul, mieloamele, osteosarcoamele,  
27 cancerul ovarian, cancerul pancreatic, cancerul prostatic, cancerul gâtului și capului,  
cancerul tiroidian, cancerul uterin, tumorile creierului, cum ar fi astrocitoamele, celulele imune  
29 activate (de exemplu, limfocitele activate, celulele limfoide și mieloide), celulele inflamatorii,  
celulele sinoviale de artrită reumatoidă, și celulele infectate viral. *In vivo*, celula țintă este o  
31 celulă a unui individ cu o stare patologică, incluzându-i pe cei unde proliferarea celulară este  
anormală sau neregulată, cum ar fi cancerul malign sau benign și artrita reumatoidă.

33 Într-o altă concretizare preferată, celula țintă este de asemenea contactată de un  
agent terapeutic. Astfel, anticorpii și compozițiile din invenția de față se pot administra  
35 singure sau în combinație cu unul sau mai mulți agenți terapeutici. Agenții terapeutici includ,  
dar nu se limitează la alți membri ai familiei TNF, agenți chimioterapeutici, anticorpi, agenți  
37 antivirali, agenți antiinflamatori steroidieni și nesteroidieni, agenți imunoterapeutici  
convenționali, citokine, chemokine, și/sau factori de creștere. Combinațiile se pot administra  
39 fie concomitent (de exemplu, ca amestec), separat, dar simultan (de exemplu, prin linii  
intravenoase separate la același subiect), sau secvențial (de exemplu, unul dintre compuși  
41 sau agenți este dat primul, urmat de al doilea). Astfel, termenul „combinație” sau „combinat”  
este utilizat pentru a desemna administrarea fie concomitentă, fie simultană, fie secvențială  
43 a doi sau a mai mulți agenți.

45 Într-una dintre concretizări, terapia de combinație include administrarea membrilor  
familiei TNF. Moleculele de TNF, cele înrudite cu TNF și cele asemănătoare cu TNF, care  
se pot administra cu anticorpul includ, dar nu se limitează la formele solubile ale TNF- $\alpha$ ,

# RO 123525 B1

limfotoxină- $\alpha$  (LT- $\alpha$ , care mai este cunoscută ca TNF- $\beta$ ), LT- $\beta$  (care se găsește în heterotrimerul complex LT- $\alpha$ 2- $\beta$ ) OPGL, FasL, CD27L, CD30L, CD40L, 4-1BBL, DcR3, OX40L, TNF- $\gamma$  (**WO 96/14328**), TRAIL, AIM-II (**WO 97/34911**), APRIL (J. Exp. Med. 188:1185-90, endokina- $\alpha$  (**WO 98/07880**), TR6 (**WO 98/30694**), OPG și factorul de creștere a nervului (NGF), și formele solubile ale Fas, CD30, CD27, CD40 și 4-1BB, TR2 (**WO 96/34095**), DR3 (**WO 97/33904**), DR4 (**WO 98/32856**), TR5 (**WO 98/30693**), TRANK, TR9 (**WO 98/56892**), TRIO (**WO 98/54202**), 312C2 (**WO 98/06842**), și TR12, și formele solubile ale CD154, CD70 și CD153. 1

Într-o altă concretizare, anticorpul din invenție se administrează în combinație cu liganzi CD40, care apar în mod natural, sintetici sau manipulați genetic (CD40L), incluzând, de exemplu, o formă solubilă a CD40L (de exemplu, AVREND), cu fragmente biologic active, variante sau derivați ai CD40L, anticorpi CD40L (de exemplu, anticorpii agoniști sau antagoniști), și/sau anticorpi CD40 (de exemplu, agoniști sau antagoniști). 3 5 7

Într-o altă concretizare, anticorpul din invenție este administrat în combinație cu unul, doi, trei, patru, cinci sau mai mulți dintre următorii: tacrolimus (Fujisawa), talidomidă (de exemplu, Celgene), anti Tac (Fv)-PE40 (de exemplu, Protein Design Labs), inolimomab (Biotest), MAK-195F (Knoll), ASM-981 (Novartis), receptorul interleukinei-1 (de exemplu, Immunex), receptorul interleukinei-4 (de exemplu, Immunex), ICM3 (ICOS), BMS-188667 (Bristol Myers Squibb), Ab anti-TNF (de exemplu Therapeutic Antibodies), CG-1088 (Celgene), anticorpul monoclonal anti-B7 (de exemplu, Innoetics), MEDI-507 (BioTransplant), și ABX-CBL (Abgenix). 9 11 13 15 17 19 21

În conformitate cu invenția, anticorpul din invenție se poate administra cu ligandul Fas (Fas-L) sau cu un anticorp Fas care leagă Fas și traduce semnalul biologic care are ca rezultat apoptoza. De preferință, anticorpii Fas utilizați în conformitate cu această metodă sunt anticorpi monoclonali. 23 25

În anumite concretizări, anticorpii din invenție se administrează în combinație cu agenți antiretrovirali, cu inhibitori nucleozidici ai revers transcriptazei, cu inhibitori nonnucleozidici ai revers transcriptazei, și/sau cu inhibitori proteazici. Inhibitorii nucleozidici ai revers transcriptazei, care se pot administra în combinație cu anticorpii din invenție, includ, dar nu se limitează la RETROVIR® (zidovudină/AZT) (Glaxo-Wellcome, Research Triangle Park, NC), VIDEX® (didanozină/ddI) (Bristol-Myers Squibb, New York), HIVID® (zalcitabină/ddC) (Roche, Nutley, New Jersey), ZERIT® (stavudină) (Bristol-Myers Squibb). Inhibitorii nonnucleozidici ai revers transcriptazei, care se pot administra în combinație cu anticorpii din invenție, includ, dar nu se limitează la VIRAMUNE® (nevirapină) (Boehringer Ingelheim/Roxanne, Columbus, Ohio), RESCRIPTOR® (delavirdină) (Pharmacia & Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan), și SUSTIVA® (evafirenz) (Bristol-Myers Squibb). 27 29 31 33 35

Inhibitorii proteazici care se pot administra în combinație cu anticorpii din invenție includ, dar nu se limitează la CRIVAN® (indinavir sulfat) (Merck & Company, Whitehouse Station, NJ), NORVIR® (ritonavir) (Abbott Laboratories, Chicago, IL), INVIRASE® (saquinavir) (Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ), și VIRACEPT® (nelfinavir) (Agouron Pharmaceuticals, San Diego, CA). Într-una din concretizările specifice, agenții antiretrovirali, inhibitorii nucleozidici ai revers transcriptazei, inhibitorii nonnucleozidici ai revers transcriptazei, și/sau inhibitorii proteazici se pot utiliza în orice combinație cu compoziții ale invenției, pentru a trata SIDA și/sau pentru a preveni sau trata infecția cu HIV. 37 39 41 43

# RO 123525 B1

1 În alte concretizări, anticorpul din invenție se poate administra în combinație cu agenți  
de infecție antioportuniști. Agenții antioportuniști, care se pot administra în combinație cu  
3 compozițiile din invenție, includ, dar nu se limitează la trimetoprim-pentamidină,  
sulfametoxazol, DAPSONE® (Jacobus Pharmaceuticals, Princeton, NJ), ATOVAQUONE®  
5 (Glaxo Smith Kline, Research Triangle Park, NC), ISONIAZID® (CIBA Pharmaceuticals,  
Summit, NJ), RIFADIN® (rifampină) (Hoechst-Marrion-Roussel, Kansas City, MO),  
7 PYRAZINAMIDE® (Ledelrle, Pearl River, NY), BIAVIN® (claritromicină) (Abbott Laboratories,  
Chicago, IL), ETHAMBUTOL® (Ledeirle, Peari River, NY), RIFABUTIN® (Pharmacia &  
9 Upjohn Company, Kalamazoo, MI), AZITHROMYCIN® (Pfizer Inc., New York, NY),  
GANCICLOVIR® (Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ), FOSCARNET® (Astra,  
11 Westborough, MA), CIDOFOVIR® (Gilead Sciences, Foster City, CA), KETOCONAZOLE®  
(Janssen, Titusville, NJ), FLUCONAZOLE® (Pfizer Inc., New York, NY), ITRACONAZOLE®  
13 (Janssen, Titusviile, NJ), ACYCLOVIR® (Glaxo-Welfcome, Research Triangle Park, NC),  
FAMCICOLCIR® (SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Pittsburgh, PA), pirimetamina,  
15 leucovorina, NEUPOGEN® (filgrastim/GM-CSF) (Amgen, Thousand Oaks, CA), și  
LEUKINE® (sargramostim/GM-CSF) (Immunex, Seattle, WA).

17 Într-o concretizare specifică, anticorpul din invenție se utilizează în orice combinație  
cu trimetoprim-sulfametoxazol și/sau cu atovaquonă, dapsonă, pentamidină, pentru a trata  
19 profilactic și/sau pentru a preveni o infecție oportunistă a plămânilor cu *Pneumocystis carinii*.

Într-o altă concretizare specifică, anticorpul din invenție se utilizează în orice  
21 combinație cu izoniazidă, RIFADIN® (Merrel Dow Pharmaceuticals, Cincinnati, Ohio),  
pirazinamidă, și/sau etambutol pentru a trata profilactic și/sau a preveni o infecție oportunistă  
23 complexă cu *Mycobacterium avium*. Într-o altă concretizare specifică, anticorpul din invenție  
se utilizează în orice combinație cu rifabutină, claritromicină, și/sau azitromicină pentru a  
25 trata profilactic și/sau a preveni o infecție oportunistă cu *Mycobacterium tuberculosis*. Într-o  
altă concretizare specifică, anticorpul din invenție se utilizează în orice combinație cu  
27 ganciclovir, foscarnet și/sau cidofovir, pentru a trata profilactic și/sau a preveni o infecție  
oportunistă cu citomegalovirus. Într-o altă concretizare specifică, anticorpul din invenție se  
29 utilizează în orice combinație cu fluconazol, traconazol, și/sau ketoconazol, pentru a trata  
profilactic și/sau pentru a preveni o infecție oportunistă cu fungi. Într-o altă concretizare  
31 specifică, anticorpul din invenție se utilizează în combinație cu aciclovir și/sau famciclovir,  
pentru a trata profilactic și/sau pentru a preveni o infecție oportunistă cu virus herpes simplex  
33 de tip I și/sau de tip II. Într-o altă concretizare specifică, anticorpul din invenție se utilizează  
în orice combinație cu pirimetamină și/sau cu leucovorină, pentru a trata profilactic și/sau  
35 pentru a preveni o infecție oportunistă cu *Toxoplasma gondii*. Într-o altă concretizare  
specifică, anticorpul din invenție se utilizează în orice combinație cu leucovorină și/sau cu  
37 NEUPOGEN® (Amgen, Thousand Oaks, CA), pentru a trata profilactic și/sau pentru a  
preveni o infecție oportunistă bacteriană.

39 Într-o concretizare suplimentară, anticorpul din invenție se administrează în  
combinație cu un agent antiviral. Agenții antivirali care se pot administra includ, dar nu se  
41 limitează la aciclovir, ribavirină, amantadină și remantidină.

Într-o concretizare suplimentară, anticorpul din invenție se administrează în com-  
43 combinație cu un agent antibacterian. Agenții antibacterieni care se pot administra cu compoziția  
din invenție includ, dar nu se limitează la amoxicilină, aminoglicozide, betalactame  
45 (glicopeptide), betalactamaze, clindamicină, cloramfenicol, cefalosporine, ciprofloxacină,

# RO 123525 B1

eritromicină, flurochinolone, macrolide, metronidazol, peniciline, chinolone, ritempină, streptomycină, sulfonamidă, tetraciclone, trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazol și vancomicină. 1  
3

Agenții imunosupresivi, nespecifici, convenționali, care se pot administra în combinație cu anticorpul din invenție includ, dar nu se limitează la steroizi, ciclosporină, analogi de ciclosporină, ciclofosfamidă, metilprednisonă, prednisonă, azatioprină, FK-506 (Fujisawa Pharmaceuticals, Deerfield, IL), 15-deoxispergualină, și alți agenți imunosupresivi care acționează prin deprimarea funcției de răspuns a celulelor imunitare (incluzând, de exemplu, celulele T), direct (de exemplu, prin acțiunea asupra celulei imunitare) sau indirect (prin acțiunea asupra altor celule mediatore). 5  
7  
9

În concretizări specifice, anticorpul din invenție se administrează în combinație cu agenți imunodepresivi. Preparatele imunodepresive care se pot administra în combinație cu anticorpul din invenție includ, dar nu se limitează la ORTHOCLONE® (OKT3) (Ortho Biotech, Raritan, NJ), SANDIMMUNE® ORAL (ciclosporină) (Sandoz Pharmaceuticals, Hanover, NJ), PROGRAF® (tacrolimus) (Fujisawa Pharmaceuticals, Deerfield, IL), CELLCEPT® (micofenolat) (Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ), azatioprină, glucosteroizi, și RAPAMUNE® (sirolimus) (Wyeth, Collegeville, PA). Într-o concretizare specifică, imunodeprimanții se pot utiliza în combinație cu anticorpul pentru a preveni respingerea transplantului de organ sau de măduvă osoasă. 11  
13  
15  
17  
19

Într-o concretizare suplimentară, anticorpul din invenție se administrează singur sau în combinație cu unul sau mai multe preparate intravenoase de imunoglobulină. Preparatele intravenoase de imunoglobulină, care se pot administra cu anticorpul din invenție, includ, dar nu se limitează la GAMMARE® (Centeon, Kankakee, IL), IVEEGAM® (Immuno-US Inc., Rochester, MI), SANDOGLOBULFN® (Sandoz Pharmaceuticals, Hanover, NJ), GAMMAGARD® (Baxter Healthcare, Glendale, CA), și GAMIMUNE® (Bayer Biological, West Haven, CT). Într-o concretizare specifică, anticorpul din invenție se administrează în combinație cu preparate de imunoglobulină intravenoase în terapia de transplant (de exemplu, transplant de măduvă osoasă). 21  
23  
25  
27

Într-o concretizare suplimentară, anticorpul din invenție se administrează singur sau în combinație cu un agent antiinflamator. Agenții antiinflamatori care se pot administra cu compozițiile din invenție includ, dar nu se limitează la glucocorticoizi și agenți antiinflamatori nesteroidieni, derivați de acizi aminoarilcarboxilici, derivați de acid arilacetic, derivați de acid arilbutiric, acizi arilcarboxilici, derivați de acizi arilpropionic, pirazoli, pirazolone, derivați de acid salicilic, tiazincarboxamide, acid e-acetamidocaproic, S-adenozilmetionină, acid 3-amino-4-hidroxi-butiric, amixetrina, bendazac, benzidiamină, bucolomă, difenpiramidă, ditazol, emorfazonă, guaiazulenă, nabumetonă, nimesulidă, orgoteină, oxaceprool, paranilină, perisoxal, pifoximă, proquazonă, proxazol și tenidap. 29  
31  
33  
35  
37

Într-una dintre concretizări, anticorpul din invenție se administrează în combinație cu o terapie steroidică. Steroizii care se pot administra în combinație includ metilprednisolona (de exemplu, IV metilprednisolona). Într-o concretizare specifică, anticorpul din invenție se administrează în combinație cu prednisona. Într-o concretizare suplimentară specifică, anticorpul din invenție se administrează în combinație cu prednisona și cu un agent imunodepresiv. Agenții imunodepresivi care se pot administra cu prednisona sunt cei descriși aici, și includ, dar nu se limitează la azatioprină, ciclofosfamidă, și ciclofosfamidă IV. Într-o concretizare specifică, anticorpul din invenție se administrează în combinație cu metilprednisolona. 39  
41  
43  
45

# RO 123525 B1

1 Într-o concretizare suplimentară specifică, anticorpusul din invenție se administrează în  
combi-nație cu metilprednisolona și un agent imunodepresiv. Agenții imunodepresivi care se  
3 pot administra cu metilprednisolona sunt cei descriși aici, și includ, dar nu se limitează la  
azatioprină, ciclofosfamidă, și ciclofosfamidă IV.

5 Într-o altă concretizare, anticorpusul din invenție se administrează în combinație cu un  
antimalaric. Antimalaricii care se pot administra cu compozițiile din invenție includ, dar nu se  
7 limitează la hidroxiclorochină, clorochină și/sau chinacrină.

9 Într-o altă concretizare suplimentară, anticorpusul din invenție se administrează în  
combi-nație cu un AINS. Opțional, anticorpusul din invenție se administrează în combinație cu  
unul, două, trei, patru, cinci, zece sau mai multe dintre următoarele medicamente: NRD-101  
11 (Hoechst Marion Roussel, Kansas City, MO), Diclofenac, (Dimethaid, Ontario, CN),  
Oxaprozina potasică (Monsanto), Mecasermină (Chiron, Emeryville, CA), T-614 (Toyama),  
13 Premefrexed disodic (Eli Lilly, Indianapolis, IN), Atreleuton (Abbott, Cicago, IL), Valdecoxib  
(Monsanto), Eltenac (Byk Gulden, Melville, NY), Campat, AGM-1470 (Takeda, Lincolnshire,  
15 IL), CDP-571 (Celltech, Rochester, NY), CM-101 (CarboMed, Nashville, TN), ML-3000  
(Merck), CB-2431 (KS Biomedix, Surrey, UK), CBF, BS2 (KS Biomedix, Surrey, UK), terapia  
17 cu gena IL-1ra (Valentis, Burligame, CA), JTE-522 (Japan Tobacco, Tokyo, Japonia),  
Paclitaxel (Angiotech, Vancouver, BC), DW-166HC (Dong Wha, Seul, Coreea), Darbufelonă  
19 mesilat (Pfizer Inc., New York, NY), Receptorul TNF solubil 1 (sinergen; Amgen, Thousand  
Oaks, CA), IPR 6001 (Institutul de Cercetări Farmaceutice, Institute for Pharmaceutical  
21 Research), Trocade (Hoffman-La Roche, Nutley, NU), EF5 (Scoția Pharmaceuticals), BIII-  
284 (Boehringer Ingelheim, Ridgefield, CT), BIIF-1149 (Boehringer Ingelheim, Ridgefield, CT),  
23 LEUKOVAX® (Inflammatics, Malvern, PA), MK-663 (Merck, Whitehouse Station, NJ), ST-  
1482 (Sigma-Tau, Gaithersburg, MD), și Propionat de butixocort (Pfizer Inc., New York, NY).

25 Într-o altă concretizare, anticorpusul din invenție se administrează în combinație cu unul  
sau mai multe DMARD-uri. Astfel, se pot utiliza unul, două, trei, patru, cinci sau mai multe  
27 dintre următoarele medicamente: metotrexat, leflunomidă, edatrexat, epiroprim, iometrexol,  
pirtrexim, trimetrexat, brodimoprim, MX-68, acid N-[4-[3-(2,4-diamino-6,7-dihidro-5H-  
29 ciclopenta[d]-pirimidin-5-il)propil]benzoil]-L-glutamic, acid 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-glutamic, acid (R)N-[[5-[2-(2-  
31 amino-1,4,5,6,7,8-hexahidro-4-oxopirido[2,3-d]-pirimidin-6-il)etil]-2-tienil]-carbonil]L-glutamic,  
acid N-((2,4-diamino-3,4,5,6,7,8-hexahidropirido[2,3-d]-pirimidin-6-il)etil)-2-tienilcarbonil-L-  
33 glutamic, acid (S)-2-[[[4-carboxi-4-[[4-[[2,4-diamino-6-pteridini]metil]amino]benzoil]-  
amino]butil]amino]carbonil]benzoic, acid N-[4-[3-(2,4-diamino-1H-pirolo[2,3-d]pirimidin-5-  
35 il)propil]benzoil]-L-glutamic, 2,4-diamino-6-(N-(4-(fenilsulfonil)benzil)metilamino)chinazolină,  
2,4-diamino-5-[4-[3-(4-aminofenil-4-sulfonilfenilamino)propoxi]-3,5-dimetoxibenzilpirimidina,  
37 acid N-[4-[4-(2,4-diamino-5-pirimidinil)butil]benzoil]-L-glutamic, acid N-[4-[3-(2,4-diamino-5-  
pirimidinil)propil]benzoil]-L-glutamic, acid N-[4-[2-(2,4-diamino-6-pteridinil)etil]benzoil]-4-metilen-  
39 DL-glutamic, și clorhidratul diamidei N-(1-metiletil-N'[3-(2,4,5-triclorfenoxi)propoxi]-  
imidocarbonimidice (PS15), sulfasalazina, aurotiomalatul de sodiu, auranofina, ciclosporina,  
41 penicilamina, azatioprina, un medicament antimalaric (de exemplu, cum este descris aici),  
ciclofosfamidă, clorambucilul, aurul, Enbrel (etanercept) (Wyeth-Ayerst Laboratories,  
43 Philadelphia, PA), anticorpusul anti TNF, și prednisolona. Într-o concretizare mai preferată,  
anticorpusul din invenție se administrează în combinație cu un antimalaric, metotrexat, anti-TNF,  
45 Enbrel și/sau sulfasalazina.

# RO 123525 B1

Într-o concretizare, anticorpul din invenție se administrează în combinație cu metotrexatul. Într-o altă concretizare, anticorpul din invenție se administrează în combinație cu anticorpul anti-TNF. Într-o altă concretizare, anticorpul din invenție se administrează în combinație cu metotrexatul și cu anticorpul anti-TNF sau cu anticorpul anti-Fas. Într-o altă concretizare, anticorpul din invenție se administrează în combinație cu sulfasalazina. Într-o altă concretizare specifică, anticorpul din invenție se administrează în combinație cu metotrexatul, cu anticorpul anti-TNF, cu anticorpul anti-Fas și cu sulfasalazina. Într-o altă concretizare, anticorpul din invenție se administrează în combinație cu Enbrel. Într-o altă concretizare, anticorpul din invenție se administrează în combinație cu Enbrel și metotrexat. Într-o altă concretizare, anticorpul din invenție se administrează în combinație cu Enbrel, metotrexat, sulfasalazina, leflunomidă, etoricoxib, misoprostol/diclofenac sodic, valdecoxib, tiracoxib, rofecoxib, celecoxib, galantamină, darbufelonă mesilat, aceclofenac, ML-3000, anakinra, hialuronat sodic, nimesulid, micofenolat mofetil, diacerein, sivelest sodic, deflazacort, nalmefen clorhidrat, lexidronam de samariu-153 pentasodic, pentostatină, T-614, amipriloză clorhidrat, rocefafant, ampiroxicam, prednisolonă famesilat, meloxicam, diclofenac sodic, lomoxicam, salazosulfapiridină, etodolac, flupirtină maleat, ebselen, tacrolimus hidrat, nabumetonă, cloprednol, piroxicam cinamat, proquazonă, rimexolonă, fenretinidă, imidazol hidroxibenzoat, droxicam, fentiazac, alfacalcidol, diacetat de halopredonă, clorhidrat de gusperimus, inozină pranobex, actarit, indometacin farnesil, mizoribină, acid tolfenamic, diflunisal, piroxicam, oxaprozin, hialuronat sodic, bucilamină, ciclosporină, floctafenină, tenoxicam, palmitat de dexametazonă, amfenac sodic, acemetacină, auranofină, lobenzarit disodic, sau orice combinație a acestora.	1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21
Într-o altă concretizare, anticorpul din invenție este administrat în combinație cu Enbrel, metotrexat și sulfasalazină. În alte concretizări, unul sau mai mulți agenți antimalarici sunt combinați cu una dintre combinațiile citate mai sus. Într-o concretizare particulară, anticorpul din invenție se administrează în combinație cu un antimalaric (de exemplu, hidroxiclorochină), Enbrel, metotrexat și sulfasalazină. Într-o altă concretizare specifică, anticorpul din invenție se administrează în combinație cu un antimalaric (de exemplu, hidroxiclorochină), sulfasalazină, anticorp anti-TNF și metotrexat.	23 25 27 29
Într-o altă concretizare, anticorpul din invenție este administrat în combinație cu un agent chemoterapeutic. Agenții chemoterapeutici care se pot administra cu compozițiile din invenție includ, dar nu se limitează la derivați antibiotici (de exemplu, doxorubicina, bleomicina, daunorubicina și dactinomicina); antiestrogeni (de exemplu, tamoxifenu); antimetaboliți (de exemplu, fluorouracilul, 5-FU, metotrexatul, floxuridina, interferonul alfa-2B, acidul glutamic, plicamicina, mercaptopurina și 6-tioguanina); agenți citotoxici (de exemplu, carmustina, BCNU, lomustina, CCNU, citozina arabinozidă, ciclofosfamida, estramustina, hidroxiureea, procarbazona, mitomicina, busulfanul, cisplatinul și sulfat de vincristină); hormoni (de exemplu, medroxiprogesterona, fosfat sodic de estramustină, etinil estradiolul, estradiolul, acetat de megestrol, metiltestosteronul, difosfatul de dietilstilbestrol, clortrianisenu și testolactona); derivații azotați din muștar (de exemplu, mefalen, clorambucil, mecloretamină (azotat din muștar) și tiotepa); steroizi și combinații (de exemplu, fosfat sodic de betametazonă); și alții (de exemplu, dicarbazină, asparaginază, mitotant, sulfat de vincristină, sulfat de vinblastină, și etoposidă). Alți agenți chemoterapeutici includ, de exemplu, CPT-11, deflunomida, cicloheximida, și mitomicina.	31 33 35 37 39 41 43

# RO 123525 B1

1 Într-o concretizare specifică, anticorpul din invenție este administrat în combinație cu  
CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina și prednisonă) sau cu orice combinație de  
3 componente ale CHOP. Într-o altă concretizare, anticorpul din invenție este administrat în  
combinație cu rituximab. Într-o concretizare suplimentară, anticorpul din invenție este  
5 administrat în combinație cu rituximab și CHOP sau cu rituximab și orice combinație a  
componentelor CHOP.

7 Într-o concretizare suplimentară, anticorpul din invenție este administrat în combinație  
cu citokine. Citokinele care se pot administra cu compozițiile din invenție includ, dar nu se  
9 limitează la GM-CSF, G-CSF, 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,  
11 CD40L, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gama, TNF-alfa, și TNF-beta.

13 Într-o concretizare suplimentară, anticorpul din invenție este administrat în combinație  
cu factori de creștere hematopoietică. Factorii de creștere hematopoietică care se pot  
administra cu compozițiile din invenție includ, dar nu se limitează la LEUKINE®  
15 (sargramostim) și NEUPOGEN® (filgrast).

17 În concretizări suplimentare, anticorpul din invenție este administrat în combinație cu  
unul sau mai multe regimuri terapeutice sau profilactice, cum ar fi, de exemplu, terapia cu  
19 radiații.

21 După cum se utilizează peste tot, un „agent terapeutic” este un compus sau o  
compoziție eficace în ameliorarea unei stări patologice. Exemple ilustrative de agent  
23 terapeutic includ un compus anticanceros, membri ai familiei TNF, agenți antiinflamatori,  
agenți antivirali, agenți antiretrovirali, agenți antioportuniști, antibiotice, agenți imuno-  
25 depresivi, imunoglobuline, agenți antimalarici, medicamente antireumatice care modifică  
boala (DMARD-uri), citokine, chemokine, factori de creștere, și anticorpi secundari care  
promovează apoptoza celulelor țintă.

27 Un compus anticancerigen sau un agent chemoterapeutic este un compus sau o  
compoziție care este eficace în inhibarea sau stoparea creșterii celulelor cu creștere  
anormală. De aceea, un astfel de agent poate fi utilizat din punct de vedere terapeutic,  
29 pentru a trata cancerul, la fel ca și alte boli caracterizate de creșterea anormală a celulelor.  
O cantitate farmaceutic eficace de compus anticancerigen este o cantitate administrată la  
31 un individ, suficientă pentru a produce inhibiția sau stoparea creșterii anormale a celulelor.  
Exemple ilustrative de compuși anticancerigeni includ: bleomicina, carboplatinul,  
33 clorambucilul, cisplatinul, colchicina, ciclofosfamida, daunorubicina, dactinomicina,  
dietilstilbestrolul, doxorubicina, etoposida, 5-fluoruracilul, floxuridina, melfalanul,  
35 metotrexatul, mitomicina, 6-mercaptapurina, teniposida, 6-tioguanina, vincristina și  
vinblastina. Exemple suplimentare de compuși anticancerigeni și agenți terapeutici se găsesc  
37 în *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy (Manualul Merck de diagnostic și terapie)*,  
ediția a 15-a, editori Berkow et al., 1987, Rahway, N. J. și Sladek et al., *Metabolism and*  
39 *Action of Anti-Cancer Drugs (Metabolismul și acțiunea medicamentelor anticanceroase)*,  
1987, editori Powis et al., Taylor și Francis, New York, N. Y.

41 Anticorpii din invenția de față se mai pot combina cu alte terapii, cum ar fi  
chemoterapia și/sau radioterapia, în tratamentul malignității, și eficacitatea terapeutică poate  
43 fi îmbunătățită cu ajutorul compușilor inductori ai apoptozei, cum ar fi bisindolilmaleimida VIII  
(BisVIII) sau alți agenți sensibilizatori, cum ar fi SN-50 sau LY294002. Astfel, într-una dintre  
45 concretizări, anticorpul sau anticorpii din invenția de față se pot combina cu BisVIII sau cu

# RO 123525 B1

alt agent sensibilizator și cu un agent chemoterapeutic (de exemplu, Adriamicina, Etoposida, Topotecanul, Taxoterul sau Paclitaxelul). Într-o altă concretizare, anticorpul sau anticorpul din invenția de față se pot combina cu un medicament antiinflamator nesteroidian (de exemplu, sulindac sulfura au alți inhibitori COX-1 sau COCS-2), cu un agent chemoterapeutic (de exemplu, Adriamicina, Etoposida, Topotecanul, Taxoterul sau Paclitaxelul). În tratamentul altor boli, de exemplu, bolile autoimune și antiinflamatorii, se mai pot utiliza și combinații de tratamente. De exemplu, un anticorp se poate administra în combinație cu alți agenți terapeutici, cum ar fi afenții antiinflamatori, DMARD-uri, agenți chemoterapeutici, metotrexat, bisindolilmaleimida VIII sau alți agenți sensibilizatori și alții asemenea. Radioterapia poate fi de asemenea combinată cu alți agenți terapeutici în tratamentul bolilor inflamatorii și autoimune. Cineva cu calificare în domeniu va adapta forma de radioterapie la boala inflamatorie sau autoimună specifică (de exemplu, sinovectomia prin iradiere, în tratamentul artritei).

Terapia care utilizează un anticorp din invenția de față poate fi de asemenea combinată cu terapia care utilizează alt anticorp. De exemplu, anticorpul față de DR5 poate fi administrat unui subiect care are nevoie de acesta, împreună cu, înainte de sau consecutiv administrării unui anticorp față de DR4, TNF, B7, ligand CD40, CD40, CD20 (de exemplu, rituximab), Fas sau o combinație a acestora. O asemenea terapie cu anticorpi combinată poate fi suplimentar combinată cu administrarea unuia sau cu a mai multor agenți terapeutici (de exemplu, chemoterapeutici, doxorubicină, și/sau metotrexat), radioterapie sau ambele.

Astfel, invenția furnizează o metodă de inducție selectivă a apoptozei sau de inhibiție a proliferării în celulele țintă care exprimă DR5, cuprinzând etapele de: a. punere în contact a celulelor țintă cu o cantitate terapeutică de anticorp care leagă specific un receptor DR5 TRAIL, în care anticorpul menționat, în forma sa solubilă, are activitate de inducție a apoptozei *in vivo* și *in vitro*, a celulelor țintă care exprimă DR5, și b. punerea în contact a celulelor țintă cu o cantitate terapeutică dintr-unul sau mai mulți agenți terapeutici. Într-una dintre concretizări, una sau ambele etape de punere în contact se realizează opțional *in vivo*. Într-o altă concretizare, una sau ambele etape de punere în contact se realizează opțional *in vitro*. Celulele țintă pot fi selectate din celule care prezintă dereglări ale sistemului de apoptoză, neutrofile, limfocite activate sau alte celule imunitare activate (de exemplu, celule limfoide și mieloide), celule infectate viral și celule sinoviale care proliferază anormal (de exemplu, celule sinoviale de poliartrită reumatoidă, incluzând celule inflamatorii sinoviale, celule mieloide și limfoide activate în sinoviu, sinoviocite asemănătoare macrofagelor, și sinoviocite asemănătoare cu fibroblaștii) ale bolilor autoimune. Comparativ cu anticorpul anti-DR5 publicat anterior (T. S. Griffith, C. T. Rauch, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, D. H. Lynch, C. A. Smith, R. G. Goodwin, M. Z. Kubin, *J. Immunology*, 1999, 162: 2597-2605), activitatea inductoare a apoptozei anticorpului demonstrativ TRA-8 din invenția de față este foarte puternică și este capabilă de a induce apoptoză celulelor Jurkat, la niveluri de pg/ml *in vitro* și demonstrează o activitate tumoricidă *in vivo* superioară, comparativ cu TRAIL solubil raportat anterior. Administrarea intravenoasă a unei doze unice de TRA-8 este suficientă pentru a inhiba creșterea atât a celulelor de tumori solide, cât și a celulelor de tumori hematopoietice, în timp ce inducția regresiei tumorale *in vivo* cu TRAIL solubil necesită o doză mult mai mare (500 μg în fiecare zi, timp de 10 zile). Anticorpul receptorilor anti-TRAIL din invenția de față apar a fi la fel de siguri ca și TRAIL solubil, deoarece anticorpul exemplar TRA-8 nu induce apoptoză celulelor fibroblasfice netransformate. Rezultate similare au fost observate cu anticorpul DR4.

# RO 123525 B1

1 Vectorii invenției de față includ o secvență de acid nucleic care codifică o  
2 imunoglobulină cu lanț greu sau ușor, a unui anticorp DR5 sau DR4 care este legat în mod  
3 operabil la un element reglator, cum ar fi un promotor sau un amplificator. Termenul „legat  
4 în mod operabil” se referă la un aranjament de secvențe de nucleotide, configurat astfel încât  
5 acestea să își realizeze funcția lor obișnuită. Astfel, un element reglator, legat în mod  
6 operabil la o secvență de nucleotide care codifică o polipeptidă, este capabil de a direcționa  
7 transcripția, replicarea și/sau translația polipeptidului. Cei cu calificare în domeniu vor  
8 recunoaște că un vector unic va include opțional secvențe de codificare atât pentru  
9 imunoglobulină cu lanț greu, cât și pentru cea cu lanț ușor ale unui anticorp DR5 sau DR4.  
10 Într-una dintre concretizări, vectorii codifică imunoglobuline umanizate cu lanț greu sau ușor.

11 Exemplele care urmează sunt expuse mai jos, pentru a ilustra metodele și rezultatele  
12 conforme cu invenția de față. Aceste exemple nu se intenționează să includă toate aspectele  
13 invenției de față, ci mai degrabă să illustreze metodele și rezultatele reprezentative.  
14 Exemplele nu se intenționează să excludă echivalentele și variantele invenției de față, care  
15 sunt ușor de recunoscut pentru cineva cu calificare în domeniu.

## 16 **Exemplul 1. Prepararea antigenului DR5**

### 17 **1.1. Clonarea cADN al DR5**

18 ADN-ul care codifică proteina umană DR5, este clonat prin următoarea metodă RT-  
19 PCR, utilizând:

#### 20 **a. Matrița**

21 ARN total din celulele HeLa este extras, utilizând reactivul TRIzol (GIBCO BRL).  
22 Matrița pentru cADN-ul utilizat în reacția PCR, care se obține prin utilizarea trusei de sinteză  
23 a cADN-ului First-Strand (Amersham Pharmacia Biotech), în conformitate cu manualul de  
24 instrucțiuni furnizat cu trusa.

#### 25 **b. Primeri PCR**

26 Se sintetizează pentru PCR următorii primeri oligonucleotidici:

27 5'-gacgatgcccgatctactttaagg-3' (DR5p1: SECV. ID. Nr. 1);

28 5'-ccactgggtgatgttgatggg-3' (DR5p2: SECV. ID. Nr. 2);

29 Dacă nu se specifică altceva, toate oligonucleotidele din aceste exemple sunt  
30 sintetizate de către Lifetechnologies. Toate nucleotidele sunt depozitate la -20°C, după ce  
31 au fost dizolvate în apă distilată.

#### 32 **c. Reacția PCR**

33 Compoziția soluției de reacție:

34 - matrița cADN 5 μl din totalul de 33 μl al reacției;

35 - primerul DR5p1 10 pmoli;

36 - primerul DR5p2 10 pmoli;

37 - tampon PCR concentrat de 10x (furnizat cu trusa) 10 μl;

38 - dNTP-uri (fiecare 2,5 mM) 4 μl, și

39 - polimerază Taq (Promega) 5 unități.

40 Se adaugă, la soluție, apă distilată sterilă, la un volum total de 100 μl. Dacă nu se  
41 specifică altceva, dNTP-urile sunt un amestec echimolar de dATP, dCTP, dGTP și dTTP  
(2,5 mM fiecare).

# RO 123525 B1

Reacția PCR este dirijată după cum urmează. Soluția este întâi încălzită la 94°C, timp de 2 min, după care un ciclu de încălzire la 94°C, timp de 30 s, la 52°C, timp de 1 min, și la 72°C, timp de 3 min, se repetă de 40 de ori. După terminarea acestei proceduri, soluția de reacție se încălzește la 72°C, timp de 10 min. 1 3

Fragmentele de ADN amplificate, astfel obținute, se separă pe un gel de agaroză 1%, care conține 0,25 μg/ml bromură de etidiu. Benzile determinate a conține fragmentele de ADN dorite sunt tăiate, utilizând o lamă de ras, iar ADN-ul este recuperat din acestea, utilizând trusa Gene Clean (BIO101). Fragmentul de ADN este clonat, utilizând trusa de clonare TA Cloning (Invitrogen, CA). Aceasta se realizează după cum urmează. 5 7 9

Fragmentul de ADN recuperat din soluția reacției PCR, împreună cu 50 ng de vector pCR2.1, care este furnizat cu ajutorul trusei de clonare TA Cloning, se amestecă cu 1 μl de tampon de reacție a ligazei 10X (6 mM Tris-HCl (pH 7,5), 6 mM clorură de magneziu, 5 mM clorură de sodiu, 7 mM β-mercaptoetanol, 0,1 mM ATP, 2 mM DTT, 1 mM spermidină, și 0,1 mg/ml albumină serică bovină), la care au fost adăugate 4 unități de ADN ligază T4 (1 μl). Volumul total al amestecului este ajustat, la 10 μl, cu apă deionizată sterilă, iar soluția de ligază rezultată este incubată la 14°C, timp de 15 h. După acest timp, 2 μl de soluție din reacția ligazei se adaugă la 50 μl de tulpină TOP10F' competentă de *E. coli*, care este adusă în reacție cu ajutorul trusei de clonare TA, și este adusă la starea de competență în acord cu manualul de instrucțiuni, la care s-au adăugat 2 μl de 0,5 M β-mercaptoetanol, iar amestecul rezultat se menține pe gheață, timp de 30 min, apoi la 42°C, timp de 30 s și din nou pe gheață, timp de 5 min. În etapa următoare, se adaugă în cultură 500 μl de mediu care conține 2% v/v triptonă, 0,5/gr/v extract de drojdie, 0,05% gr/v clorură de sodiu, 2,5 mM clorură de potasiu, 1 mM clorură de magneziu, și 20 mM glucoză (la care se va face referire în continuare ca mediu „SOC”), iar amestecul se incubează timp de o oră la 37°C, cu agitare. După acest timp, cultura este împrăștiată pe o placă de agar cu bulion L (1% v/v triptonă, 0,5% gr/v extract de drojdie, 0,5% gr/v clorură de sodiu, 0,1% gr/v glucoză, și 0,6% gr/v bacto-agar (Difco)), conținând 100 μg/ml. Coloniile rezistente la ampicilină, care apar pe placă, sunt selecționate și îndepărtate prin răzuire cu o ansă de transfer din platină și sunt cultivate pe un mediu de bulion L care conține 100 μg/ml ampicilină la 37°C, peste noapte, agitând la 200 rpm. După incubare, celulele sunt recoltate prin centrifugare, din care se prepară plasmidul ADN, prin metoda alcalină. Fragmentul EcoRI-EcoRI DR5cADN, din plasmida astfel obținută, este subclonat în plasmida pcADN3 (Invitrogen, CA). Întreaga lungime a genei DR5 din pcADN3 este secvențiată și se potrivește cu secvența publicată. Plasmida astfel obținută este desemnată ca plasmida pcADN3-DR5. 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33

## 1.2. Construirea vectorului de expresie a DR5-IgG 35

Pentru a obține o formă solubilă a DR5 uman fără domeniul transmembranar, se construiește un vector plasmidian de expresie. Acest vector este desemnat să codifice o proteină de fuziune care conține domeniul extracelular al DR5 uman, fuzionat cu ADN Fc IgG1 (J. Cheng et al., 1994, *Science*, 263, 1759-1762). ADN-ul care codifică DR5 uman fără domeniul transmembranar, se obține prin reacția PCR care urmează. 37 39

### a. Matrița 41

Matrița pentru reacția PCR a utilizat pcADN3-DR5.

### b. Primeri PCR 43

Se sintetizează pentru PCR următorii primeri de oligonucleotide:

5'-gacgatgcccgatctactttaaggg-3' (DR5p1: SECV ID nr. 1). 45

# RO 123525 B1

1 5'-ggatccgtggacacattcgaatg-3' (DR5p3: SECV ID nr. 3).

2 Dacă nu se specifică altceva, toate oligonucleotidele din aceste exemple sunt  
3 sintetizate de către Lifetechnologies. Toate nucleotidele sunt depozitate la -20°C, după ce  
4 au fost dizolvate în apă distilată.

5 c. *Reacția PCR*

6 Reacția PCR are loc, iar ADN-ul amplificat se izolează ca în exemplul 1.1 (c).

7 Plasmida astfel obținută este denumită plasmida pCR-ΔDR5. Fragmentul BamHI-  
8 EcoRI, care codifică fragmentul Fc uman care se recuperează din pmFas-hlgGIFc, este  
9 subclonat în situsurile de multiclonare BamHI și EcoRI ale pcADN3. Plasmida astfel obținută  
10 se denumește pcADN<sub>3</sub>Fc. Mai departe, fragmentul BamHI- BamHI, care codifică regiunea  
11 solubilă a DR5 uman care este recuperat din pCR-ΔDR5, este subclonat în situsul BamHI  
12 al plasmidei pcADN<sub>3</sub>Fc. Plasmida astfel obținută se denumește pcDNAΔDR5-Fc. Fragmentul  
13 EcoRI, care codifică regiunea uman solubilă a Fc a IgG DR5 uman care este recuperat din  
14 plasmida pcDNAΔDR5-Fc, este stopat, utilizând fragmentul Klenow al ADN polimerazei  
15 (GIBCO BRL) și apoi subclonându-l în vectorul vehicul pAdCMV5 (Quantum Biotechnologies  
16 Inc., Canada) care este stopat după tăierea cu BamHI. Plasmida astfel obținută este  
17 denumită pAdΔDR5-Fc.

### 18 1.3. *Expresia și purificarea proteinei de fuziune DR5-IgG1 umane*

19 Celulele QBI-293A (furnizate cu trusa ADENO-Quest) sunt cotransfectate cu  
20 pAdΔDR5-Fc și cu ADN viral QBI (furnizat cu trusa ADENO-Quest), utilizând trusa ADENO-  
21 Quest (Quantum Biotechnologies Inc., Canada), în conformitate cu manualul de utilizare.  
22 Plăcile cu virus recombinat sunt cultivate și analizate pentru exprimarea proteinei de fuziune  
23 DR5-IgG prin analiza ELISA a supernatantului. Plăcile pozitive sunt amplificate în celulele  
24 QBI-293A și sunt depozitate la -80°C ca stoc de virus. Cincizeci de vase (150 mm) cu celule  
25 QBI-293A sunt transfectate cu virusul recombinat pAdΔDR5-Fc la 10 m.o.i. (multiplicitate a  
26 infecției). Mediile de cultură sunt recoltate după o transfecție de 48 h.

27 Celulele transfectate având gena DR5-IgG sunt crescute la o densitate de celule de  
28  $1 \times 10^6$  celule/ml, prin incubare în 500 ml de mediu DMEM (GIBCO), care conține 10% v/v  
29 FCS, la 37°C, într-o atmosferă de 5% v/v CO<sub>2</sub>, timp de 2 zile. Cultura este apoi centrifugată  
30 (1000 r.p.m., 5 min) și supernatantul se colectează. Purificarea DR5-IgG din supernatant se  
31 realizează, utilizând cromatografia de afinitate ProteinA-Sepharose CL-4B (Pharmacia), în  
32 următoarele condiții:

33 - coloană: coloană ProteinA-Sepharose CL-4B (dimensiunea coloanei 2 ml;  
34 Pharmacia);

35 - tampon de eluare: 0,1 M glicină (pH 2,4), 0,15 M NaCl;

36 - tampon de neutralizare: 1M Tris-HCl (pH 8,5).

37 După ce tot supernatantul este aplicat pe coloană, aceasta se spală de trei ori cu  
38 20 ml PBS și apoi se adaugă 1 ml tampon de eluție de 10 ori. Se măsoară densitatea optică  
39 a fiecărei fracții eluate (1 ml). A doua fracție până la a cincea fracție (cu DO<sub>280</sub> ≥ 0,1) se  
40 colectează și după adăugarea a 100 μl de tampon de neutralizare, eluatele se plasează  
41 separat în tuburi de dializă, iar eluatele se dializează față de un litru de PBS (pH 7,5) la 4°C,  
42 tamponul de analiză fiind schimbat de două ori.

43 Eluatelor li se analizează apoi exprimarea produsului genă DR5-IgG prin ELISA. Mai  
44 întâi, 100 μl din fiecare fracție se plasează separat în godeurile unei plăci cu 96 godeuri  
45 (Costar) și se incubează la 37°C, timp de o oră. După acest timp, soluția din godeu se

# RO 123525 B1

îndepărtează, iar placa se spală de 3 ori cu 100 µl/godeu de PBS care conține 0,1% v/v Tween 20 (la care se va face referire de acum înainte ca „PBS-Tween”). După spălare, PBS care conține albumină serică bovină 2% gr/v (la care se va face referire de acum înainte ca „BSA”) se adaugă în cantități de 100 µl/godeu, iar placa este apoi incubată la 37°C, timp de o oră. După acest timp, godeurile se spală de încă 3 ori cu PBS-Tween 100 µl/godeu, după care, se adaugă, în fiecare godeu, 100 µl/godeu de soluție de anticorp monoclonal IgG1 antiuman, diluat de 1000 de ori cu PBS-Tween, și placa este din nou incubată la 37°C, timp de o oră. Godeurile sunt apoi spălate de trei ori cu PBS-Tween 100 µl/godeu. Se adaugă apoi un sistem de substrat lichid, format din 3,3',5,5'-tetrametil-benzidină (la care se va face referire de acum înainte ca „TMB”) (Sigma), în cantitate de 100 µl/godeu și placa este lăsată să stea la temperatura camerei, timp de 5 min și apoi reacția se stopează, prin adăugare de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 N, 100 µl/godeu. Absorbanta fiecărui godeu se citește la 450 nm, pentru a estima concentrația de anticorp legat, utilizând absorbanta la 650 nm, ca citire martor. Absorbanta se măsoară, utilizând un cititor microplacă (Molecular Devices). Producția de DR5-IgG1 este confirmată, utilizând metoda ELISA. Masa moleculară a proteinei de fuziune DR5-IgG1 exprimate este determinată, utilizând analiza Western blot, în care mAc IgG1 antiuman este utilizat pentru a detecta anticorpul pe gel. Masa moleculară a proteinei de fuziune DR5-IgG1 exprimată este de aproximativ 50 kDa, puritatea obținută fiind mai mare de 90%, după cum s-a evaluat prin analiza SDS-PAGE și prin detecția proteinei prin colorare cu albastru Coomassie.

## **Exemplul 2. Generarea anticorpilor monoclonali împotriva DR5 uman**

### **2.1. Imunizarea**

Șoareci femele, Balb/c (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), în vârstă de 6-8 săptămâni, se imunizează cu proteină de fuziune DR5/hlgG1 umană, purificată prin afinitate. Pentru imunizarea inițială, proteina de fuziune (50 µg) se emulsionează în adjuvantul Freund complet (Difco, Detroit, MI). Șoarecii sunt apoi revaccinați cu patru injecții de 50 µg de proteină de fuziune, administrată fără adjuvant, din două în două zile. La trei zile după ultima injecție, limfocite din nodulii limfatici locali sunt fuzionate cu celule de mielom NS-1, iar hibridoamele se cultivă în medii F104, suplimentate cu ser fetal de vițel 10%. Hibridoamele pozitive sunt selectate prin ELISA, în care plăcile sunt acoperite fie cu 1 µg/ml DR5/hlgG1, fie cu aceeași cantitate de Fas/hlgG1, ca martor. Izotipul hibridoamelor se determină prin ELISA, utilizând o listă de anticorpi de capră cu izotip IgG specific de șoarece (Southern Biotechnology, Birmingham, AL). Anticorpii monoclonali sunt purificați prin cromatografie de afinitate, utilizând IgG1 de șoarece imobilizată sau proteină G (Sigma).

### **2.2. Fuziunea celulară**

În a treia zi după vaccinare, nodulii limfatici locali se îndepărtează de la șoarece și se plasează în 10 ml mediu RPMI 1640, fără ser (GIBCO BRL), conținând 50 unități/ml penicilină, 50 µg/ml streptomycină, și 300 µg/ml acid L-glutamic, și sunt dezintegrați prin trecerea organului printr-o sită (Cell Strainer, Falcon), utilizând o spatulă. Suspensia de celule rezultată este centrifugată, pentru a transforma în peletă celulele de noduli limfatici, care sunt apoi spălate de două ori cu mediu RPMI fără ser. Celulele spălate sunt apoi resuspendate în mediu RPMI fără ser și sunt numărate.

Între timp, celule de mielom NS1 (American Type Culture Collection TIB-18) au fost crescute la o densitate celulară care nu depășește 1x10<sup>8</sup> celule/ml, în mediu ASF104

# RO 123525 B1

1 (Ajinomoto, K.K.) care conține 10% v/v FCS (Gibco BRL) („mediu ASF cu ser”) la 37°C sub  
5% v/v CO<sub>2</sub>, și acestea sunt dezintegrate în același mod, spălate, resuspendate și numărate.

3 O cantitate de suspensie de celule NS1, calculată pentru a conține 3x10<sup>7</sup> celule, se  
amestecă cu o cantitate de suspensie de celule de splină, calculată pentru a conține 3x10<sup>8</sup>  
5 celule. Amestecul rezultat este centrifugat, iar supernatantul este aruncat. Sunt efectuate  
etapele care urmează, menținând în tot acest timp tubul de plastic care conține peleta la  
7 37°C, într-un recipient cu apă caldă.

1 ml polietilenglicol 1500 50% (gr/v) (Boeringer Mannheim) este apoi adăugat încet în  
9 tub, agitând mereu peleta, utilizând vârful unei pipete. Ulterior, 1 ml de mediu RPMI fără ser,  
preîncălzit la 37°C, este adăugat încet, în 2 porțiuni, urmat de adăugarea a încă 7 ml mediu  
11 RPMI fără ser. Amestecul rezultat este apoi centrifugat, supernatantul este aruncat și se  
adaugă 10 ml mediu HAT, conținând 10% v/v FCS, agitând ușor cu vârful unei pipete. Se  
13 adaugă încă 20 ml mediu HAT, conținând 10% v/v FCS, iar suspensia se dispersează pe  
plăci de cultură cu 96 godeuri, la 100 μl/godeu și se incubează la 37°C, într-o atmosferă de  
15 5% v/v CO<sub>2</sub>. După 7 sau 8 zile, 100 μl/godeu mediu HAT proaspăt sunt utilizați pentru a  
înlocui mediul din godeurile care prezentau o nuanță gălbuie. Celulele de fuziune din aceste  
17 godeuri sunt clonate prin diluție limitată, după cum este descris mai jos.

## 2.3. Clonarea prin diluție limitativă

19 Timusuri de la șoareci femele Balb/c (de la Japan SLC, Inc.) de 4 până la 10 săptă-  
mâni sunt îndepărtate, dezintegrate pe o sită (Cell Strainer, Falcon), conform descrierii de  
21 mai sus, iar celulele dezintegrate se spală de două ori cu mediu HT care conține 10% v/v  
FCS. O cantitate de celule de timus, corespunzând celor de la un șoarece, este suspendată  
23 în 30 ml de mediu HT, care conține 10% v/v FCS, pentru a produce o suspensie de celule  
de hrănire. Preparatul de celule de fuziune obținut mai sus în exemplul 2.2 este diluat cu  
25 această suspensie de celule de hrănire, de la 10 la 100 de ori, și mai este diluată serial cu  
suspensia de celule de hrănire, pentru a obține suspensii având densitățile celulelor de  
27 fuziune de 5, 1 și 0,5 celule/ml. Probele astfel preparate se dispersează în godeurile unor  
microplăci pentru culturi celulare cu 96 godeuri, într-o cantitate de 100 μl/godeu și se incu-  
29 bează timp de 5 zile, la 37°C, într-o atmosferă de CO<sub>2</sub> 5% v/v.

## 2.4. Screening-ul

31 Supernatantele de cultură ale hibridoamelor în creștere sunt analizate prin ELISA,  
utilizând plăci acoperite fie cu 1 μg/ml DR5/hlgG1, fie cu aceeași cantitate de Fas/hlgG1 (J.  
33 Cheng et al., 1994, *Science*, 263, 1759-1762 ) ca martor. Anticorpii legați sunt detectați,  
utilizând imunoglobuline antișoarece conjugate cu peroxidază de hrean (HRP) (Southern  
35 Biotechnology, Birmingham, AL) cu TMB (Sigma, St. Louis, MI) ca substrat. DR5/hlgG1  
purificat la o concentrație de 1 μg/ml sau aceeași cantitate de Fas-hlgG1 se introduce în  
37 godeurile de pe o placă cu benzi ELISA/RIA cu 96 godeuri (Costar, NY). Placa este  
menținută la 4°C, peste noapte, pentru a permite adsorbția proteinei pe suprafața godeurilor.  
39 După acest timp, godeurile se descarcă și fiecare godeu se spală de 3 ori cu PBS-Tween.  
Apoi, se adaugă 100 μl PBS, care conține 1% (gr/v) albumină serică bovină (A3803; Sigma  
41 Chemicals Co.) în fiecare godeu, iar placa este incubată la 37°C, timp de o oră. Godeurile  
sunt apoi spălate de încă 3 ori cu PBS-Tween și apoi se adaugă, în fiecare godeu, 50 μl din  
43 fiecare supernatant de cultură de la hibridoamele în creștere. Placa este apoi incubată la  
37°C, timp de o oră, iar godeurile sunt din nou spălate de 4 ori cu PBS-Tween. După spălare,  
45 se adaugă, în fiecare godeu, 50 μl anticorp imunoglobulină de capră antișoarece, marcat cu

# RO 123525 B1

peroxidază de hrean (Southern Biotechnology, Birmingham, AL), diluat de 1000 de ori cu PBS, iar placa este incubată din nou la 37°C, timp de o oră, după care godeurile sunt din nou spălate de 4 ori cu PBS-Tween. Se adaugă apoi sistemul de substrat lichid (Sigma) 3,3',5,5'-tetrametil-benzidină (TMB) într-o cantitate de 100 µl/godeu, iar placa este lăsată să stea la temperatura camerei timp de 5 min, iar apoi reacția este oprită prin adăugarea a 100 µl/godeu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2N. Absorbanța fiecărui godeu se măsoară la 450 nm (martor 650 nm), utilizând un cititor microplacă (Molecular Devices), iar celulele de fuziune se selectează din proba care are absorbanța (450 nm-650 nm, valorile DO > 0,5) în mod clar mai mari decât ale celor în care nu s-a adăugat supernatant de celule de fuziune (valorile DO ≈ 0,03). Mai departe, supernatantele de la hibridoamele în creștere sunt de asemenea analizate funcțional, prin măsurarea activității de inducție a apoptozei, utilizând celule Jurkat. 50 µl de mediu RPMI, conținând celule Jurkat (1000 celule per godeu), și 5 µM bisindolilmaleimidă VIII (BisVIII, Alexis, San Diego, CA) se adaugă pe plăci cu 96 godeuri, în prezența a 50 µl de supernatant de cultură de la hibridoamele în creștere. Celulele sunt cultivate într-un incubator umidificat la 37°C peste noapte. Apoptoza se determină prin viabilitatea celulară, utilizând trusa ATPLite, conform instrucțiunilor fabricantului (Packard Instruments), iar probele sunt numărate utilizând un TopCounter (Packard Instruments).

## 2.5. Legarea ELISA a TRAIL și TRA-8 la receptori

Plăcile pentru ELISA sunt acoperite cu 2 µg/ml proteină de fuziune DR4-Ig sau DR5-Ig peste noapte. După blocare cu BSA 3%, se adaugă TRAIL-FLAG solubil sau TRA-8 în concentrațiile indicate și se incubează la 37°C, timp de o oră. Legarea TRAIL sau a TRA-8 se detectează cu ajutorul anticorpului anti-Flag conjugat cu HRP (Alexis) sau, respectiv, cu IgG1 antimurin, conjugat cu HRP (Southern Biotechnology). Reacțiile se dezvoltă pe tampon de substrat TMB și se măsoară cu un cititor de referință pentru microplăci (Benchmark Microplate Reader) (BioRad). Valorile K<sub>d</sub> se estimează cu ajutorul modelului de legare la un situs de regresie neliniară, utilizând programul GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Pentru ELISA competitivă, se adaugă 100 ng/ml TRAIL-FLAG și este incubat în prezența a diferite concentrații de TRA-8. Legarea TRAIL se determină ca mai sus.

## 2.6. Clonarea

Etapele descrise în exemplele 2.3 și 2.4 de mai sus se repetă de 5 ori pentru celulele selectate în 2.4, prin aceasta permițând selectarea câtorva clone de hibridom, fiecare dintre acestea producând un singur anticorp care leagă DR5-IgG, dar care nu leagă Fas-IgG. Ca rezultat al acestei proceduri de selecție, se obține un hibridom șoarece-șoarece, denumit TRA-8 și care produce un anticorp care se leagă la DR5-IgG, dar nu se leagă la Fas-IgG. Acest hibridom, TRA-8, a fost depozitat în American Type Culture Collection (colecția americană de tipuri de culturi) la data de 1 Martie 2000 și i s-a fost atribuit numărul de acces Nr. PTA-1428.

Subclasa anticorpului produs de către hibridomul șoarece-șoarece TRA-8 (la care se va face referire de acum înainte ca „TRA-8”) se demonstrează a fi IgG1, k, după testare cu o trusă de izotopi de anticorpi monoclonali (Pierce).

Utilizând ca imunogen proteina noastră de fuziune DR5-IgG1, sunt obținute șapte clone de hibridom prin analiza ELISA inițială, toate acestea fiind puternic pozitive pentru DR5-IgG, dar nu și pentru proteina de fuziune Fas-IgG, indicând faptul că hibridoamele obținute produc anticorpi care recunosc porțiunea extracelulară din DR5, dar nu și porțiunea Fc din IgG1 (date neprezentate).

# RO 123525 B1

## 1           2.7. Analiza Western blot

2           Sunt achiziționate filtre pentru analiza Western blot a omogenatelor de țesuturi  
3 umane normale și canceroase de la Geno Technology (St Louis, MO). Fiecare linie este  
4 încărcată cu o cantitate egală de proteine, așa cum se determină printr-un anticorp anti- $\beta$ -  
5 actină. Preparatele sunt examinate peste noapte cu 1  $\mu\text{g/ml}$  TRA-8 și urmate de IgG1 de  
6 capră antișoarece, conjugată cu HRP (Southern Biotechnology), la temperatura camerei,  
7 timp de o oră și dezvoltate prin chemiluminiscență.

## 8           2.8. *Imunohistochimia in situ*

9           Țesuturile umane sunt obținute din Centrul de Procurare de Țesuturi (Tissue  
10 Procurement Center) al UAB. Secțiunile înghețate sunt fixate în etanol 70%, blocate cu 10%  
11 ser de cal în PBS și apoi sunt incubate cu 10  $\mu\text{g/ml}$  de TRA-8 purificat prin afinitate la  
12 temperatura camerei, timp de 60 min. Se utilizează pentru a vizualiza reactivitatea trusa IgG  
13 ABC antișoarece cu diaminobenzidină (Vector, Burlingame, CA), ca și substrat colorimetric.

## 14           2.9. Analiza activării caspazei

15           Celule Jurkat ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) sunt incubate cu 500 ng/ml TRA-8. Alicotele (30  $\mu\text{g}$  de  
16 proteine) ale lizatului celular sunt separate pe 15% SDS-PAGE, așezate pe o membrană de  
17 nylon și preparatele sunt examinate cu anticorpii anticaspază 8, 9 și 3 (BD Pharmingen, San  
18 Diego, CA), urmate de anticorpii secundar conjugat cu HRP și vizualizare, prin  
19 chemiluminiscență, a produselor clivate. Setul de inhibitori caspazici este achiziționat de la  
20 R&D Systems (Minneapolis, MN). Fiecare inhibitor caspazic este adăugat la cultură la con-  
21 concentrația indicată.

## 22           **Exemplul 3. Purificarea anticorpului monoclonal TRA-8**

23           Hibridomul șoarece-șoarece, TRA-8, este crescut la densitatea celulară de  $1 \times 10^6$   
24 celule/ml prin incubare în 500 ml de mediu ASF, conținând 10% v/v FCS, la 37°C, sub 5%  
25 v/v CO<sub>2</sub>, timp de 5 zile. Cultura este apoi centrifugată (1000 r.p.m., timp de 5 min) și  
26 supernatantul este colectat. Purificarea TRA-8 din supernatant este realizată utilizând  
27 cromatografia de afinitate ProteinG-Sepharose CL-4B (Pharmacia), în următoarele condiții:

- 28 - coloană: coloană ProteinG-Sepharose CL-4B (dimensiunea coloanei 2 ml;  
29 Pharmacia);
- 30 - tampon de eluare: 0,1 M Glicină (pH 2,4), 0,15 M NaCl;
- 31 - tampon de neutralizare: 1 M Tris-HCl (pH 8,5).

32           După ce este aplicat tot supernatantul pe coloană, 20 ml de PBS sunt spălați de trei  
33 ori și apoi tamponul de eluare este adăugat în volume de 1 ml, de 10 ori. Este măsurată den-  
34 sitatea optică a fiecărei fracțiuni eluate (1 ml). Frajeciunile de la nr. 2 la nr. 5 ( $>DO_{280} = 0,1$ )  
35 sunt colectate separat.

36           După adăugarea de 100  $\mu\text{l}$  de tampon de neutralizare, eluații sunt plasați separat în  
37 tuburi de dializă și eluații sunt dializați față de un litru de PBS (pH 7,5), la 4°C, tamponul de  
38 dializă fiind schimbat de două ori. Acestei probe i-a fost determinată activitatea de anticorp  
39 anti-DR5 prin ELISA, utilizând proteina de fuziune DR5-IgG umană, preparată mai sus,  
40 utilizând tehnica descrisă mai sus.

## 41           **Exemplul 4. Prepararea antigenului DR4, a vectorului de exprimare DR4-IgG și a 42 anticorpului monoclonal anti-DR4**

43           Procedurile din exemplele 1...3 sunt repetate cu cADN-ul matriță a DR4 și primerii  
44 în locul celor detaliați în exemplul 1, pentru a obține antigenul DR4, care este utilizat ca în  
45 exemplele 1.2...3, pentru a obține un anticorp monoclonal specific față de DR4.

## Exemplul 5. Anticorpii monoclonali față de DcR1 și DcR2

Anticorpii monoclonali sunt crescuți față de receptorii momelă DcR1 și DcR2 prin substituirea cADN-ului corespunzător și a primerilor, pentru a crea antigenii respectivi, ca în exemplul 1. Vectorii de expresie pentru fuziunile DcR1 sau DcR2 cu imunoglobulina G și anticorpii monoclonali purificați rezultați sunt creați ca în exemplele 2 și 3.

## Exemplul 6. Specificitatea unui anticorp monoclonal

Deoarece toți receptorii pentru TRAIL și alte proteine din familia TNFR au în comun o omologie semnificativă, specificitatea anticorpului exemplificativ TRA-8 pentru DR5 este determinată prin analiza Western blot, utilizând două proteine diferite de fuziune DR5-IgG umane și forme solubile, recombinante, ale altor proteine înrudite. O primă proteină de fuziune DR5-Ig este construită prin fuzionarea cDNA din resturile 1-180 ale porțiunii extracelulare a DR5 și cADN, codificând regiunea constantă a IgG1 uman. cADN-ul fuzionat este clonat într-un vector adenoviral recombinat (Quantum Biotechnologies, Inc., Montreal, Canada). Proteina de fuziune DR5/hlgG1 exprimată, care are o masă moleculară relativă de 50 kDa, este purificată, utilizând o coloană de afinitate cu IgG antiuman (Sigma, St Louis, MO). Pentru analiza Western blot a specificității, o a doua proteină de fuziune DR5/IgG1 umană, recombinată (aa. 52-212), cât și proteinele de fuziune TRAIL-R1, R3 și R4, sunt achiziționate de la Alexis. Formele solubile ale Fas uman și TNFR1 sunt furnizate prin bunăvoința dr. Carl Edwards de la Amgen, Inc., Thousands Oaks, CA, USA. Moleculele umane, recombinante, solubile, de DR4, DcR1, DcR2, TNFR1, R4 și Fas, utilizate, sunt proteine de fuziune IgG1, umane. 0,5 μg din fiecare proteină sunt separate prin 10% SDS-PAGE și așezate pe o membrană de nitroceluloză. Preparatele sunt blocate cu 5% lapte praf în PBS la temperatura camerei, timp de o oră, și examinate cu 1 μg/ml de anticorp anti-DR5 purificat, monoclonal (clona: TRA-8) sau 0,1 μg/ml de IgG antiumană de capră conjugată cu HRP la 4°C peste noapte. Se utilizează ca anticorp secundar IgG antișoarece de capră, conjugat cu peroxidază de hrean (HRP), pentru a detecta TRA-8 legat. Preparatele sunt dezvoltate prin chemiluminiscentă.

Celulele Cos-7 transfectate cu vector pcDNA3 (Clontech, Palo Alto, CA), conținând DR5 sau DR4 cu lungime integrală sau vectorul gol, sunt utilizate pentru analiza citometrică în flux. Trail uman codificat integral cDNA sau ligandul Fas murin este clonat în vectorul pTRE în aval față de promotorul controlabil prin tetraciclină (Clontech). Fragmentele XhoI-HindIII de pTRE-hTRAIL sau pTRE-mFasL sunt clonate mai departe în vectorul suveică adenoviral pAdBN (Quantum Biotechnologies Inc.). Cele 293 celule gazdă sunt cotransfectate cu TRAIL liniar sau cu Pad-TRE-mFasL și fragmentul ADN mare al adenovirusului. Expresia TRAIL uman funcțional sau ligandului Fas murin din plăcile de virus recombinant este analizată, utilizând o analiză cu eliberare de <sup>51</sup>Cr cu Jurkat ca ținte.

TRA-8 a reacționat puternic cu proteina de fuziune DR5-IgG (~50 kDa), care este utilizată pentru imunizare, așa cum este prezentat în fig. 1a, DR5, #1, și slab cu a doua proteină de fuziune DR5-IgG (~60 kDa), așa cum este prezentat în fig. 1a, DR5, #2. Nu există o legare semnificativă a TRA-8 la DR4, DcR1, DcR2, Fas (CD95) sau TNFR1. Aceste rezultate indică faptul că TRA-8 recunoaște determinantii antigenici care sunt specifici pentru DR5, dar care nu sunt în comun cu ceilalți membri ai familiei.

TRA-8 nu reacționează cu alți membri ai superfamiliei de receptori TNF, cum ar fi Fas (CD95) și receptorul TNF I, și nici TRA-8 nu reacționează încrucișat cu omologul murin al lui DR5, așa cum se demonstrează prin rapoartele de absorbantă optică, pentru 450 nm și

# RO 123525 B1

1 650 nm, în grupul inferior de numere 1-7 (fig. 1a, coloana 8 a panoului inferior). TRAIL solubil  
și TRA-8 se leagă în mod comparabil la DR5 imobilizat (fig. 1b, panoul din stânga). În contrast,  
3 TRAIL se leagă la DR4, dar TRA-8 nu a prezentat nicio activitate de legare la DR4 (fig. 1b,  
panoul din mijloc). Valorile K<sub>d</sub> pentru legarea lui TRAIL și TRA-8 la DR5 sunt estimate la 59 nM  
5 și, respectiv, 3 nM. Ca un fapt important, TRA-8 a concurat în mod eficient cu TRAIL pentru  
legare la DR5, dar nu pentru legare la DR4, așa cum este prezentat în ELISA competitivă  
7 (fig. 1b, panoul din dreapta). Aceste rezultate stabilesc specificitatea TRA-8 pentru DR5 uman.

TRA-8 este capabil să detecteze exprimarea la suprafața celulei a lui DR5, analiza  
9 citometrică în flux indicând o legare specifică la suprafața celulei a celulelor Cos-7 transfectate  
cu DR5 uman cu lungime integrală, dar nu a celulelor Cos-7 transfectate cu DR4 sau vector  
11 gol (fig. 1c). În mod similar, imunohistochimia *in situ* cu TRA-8 a demonstrat o reactivitate  
a celulelor Cos-7 transfectate cu DR5 ADN cu lungime integrală, dar nu cu acelea transfectate  
13 cu vectorul martor (fig. 1d). TRA-8 nu induce apoptoza celulelor Cos-7 netransfectate, și RT-  
PCR a ARN din celule Cos-7, utilizând primeri perechi care codifică DR5 uman, nu a prezentat  
15 produși specifici PCR. Analiza funcțională efectuată în continuare, utilizând celule umane Jurkat  
ca ținte, a demonstrat faptul că, în absența reticulării, TRA-8 induce puternic moartea celulei,  
17 fapt demonstrat de trei analize de viabilitate celulară, diferite, incluzând ATPLite, MTT și  
excluderea PI (fig. 1e). Sunt ucise mai mult de 50% dintre celulele Jurkat de niveluri de ordinul  
19 nanogramelor de TRA-8, așa cum este demonstrat de analiza ATPLite. Activitatea ucigătoare  
a TRA-8 este specifică pentru DR5, deși aceasta ar putea fi blocată de către DR5-Ig, dar nu  
21 de către proteina de fuziune DR4-Ig (datele nu sunt prezentate). Clivajul caspazelor 8, 9 și  
3 poate fi detectat prin analiza Western blot nu mai devreme de 30 min după tratamentul cu  
23 TRA-8 a celulelor Jurkat (fig. 1f), și moartea celulară a celulelor Jurkat este complet inhibată  
de către inhibitorul general al caspazei (Z-VAD) (fig. 1g).

25 Inhibitori caspazici individuali, pentru caspaza 8, 3, 9 și 10, au inhibat parțial moartea  
celulară, indicând mai departe faptul că moartea celulară mediată de TRA-8 este realizată  
27 în principal printr-un mecanism apoptotic dependent de caspază.

**Exemplul 7.** *Analiza citometrică în flux a exprimării DR5 de la suprafața celulei: un  
29 receptor major al morții pentru multe celule de tumoare, dar nu pentru celule normale*

Capacitatea TRA-8 de a se lega la DR5 exprimat la suprafața celulei și specificitatea  
31 acestei reacții este apoi evaluată, utilizând celule COS-7 (American Type Culture Collection  
Nr. CRL-1651), transfectate cu vectorul de expresie conținând DR5 uman de lungime integrală  
sau cADN-ul DR4 sau vectorul gol ca martor.  
33

Se utilizează IgG1 antișoarece, conjugată cu ficoeritrină (PE) (Pharmingen), ca al doilea  
35 anticorp, pentru a detecta TRA-8 legat. Fluorescența a  $1 \times 10^4$  celule este măsurată, utilizând  
un citometru în flux (FACSVantage), în următoarele condiții:

- 37 - lungimea de undă de excitație: 488 nm;  
- lungimea de undă de detecție: 600 nm.

39 Analiza citometrică în flux a demonstrat faptul că TRA-8 a colorat aproximativ 30%  
din celulele COS-7 transfectate cu vectorul DR5, așa cum este prezentat în histograma solidă  
41 din fig. 1c. Acest procentaj este analog cu eficiența de transfecție, așa cum este determinată  
prin analiza transfecției, utilizând proteină verde fluorescentă (GFP) (datele nu sunt prezentate).  
43 TRA-8 nu a colorat în mod semnificativ celulele transfectate fie cu DR4 (histograma deschisă),  
fie cu vectorul de control (histograma punctată), indicând faptul că TRA-8 este specific pentru  
45 DR5 de la suprafața celulei.

# RO 123525 B1

Deși exprimarea DR5 în celule tumorale a fost studiată în mod extensiv la nivelul mRNA (vă rog inserați REFERINȚA), exprimarea la suprafață a DR5 nu a fost documentată.	1
Astfel, disponibilitatea anticorpului monoclonal anti-DR5 ne permite să examinăm nivelurile de suprafață ale DR5 și să corelăm exprimarea cu susceptibilitatea celulelor la apoptoza mediată de TRAIL. Următorul grup de celule ( $1 \times 10^6$ ) este incubat cu 10 $\mu\text{g/ml}$ de TRA-8 purificat prin afinitate la temperatura camerei, timp de 30 de min, și apoi colorat cu IgG1 antișoarece conjugată cu PE (PharMingen), pentru încă 30 min. 10000 de celule viabile sunt analizate, utilizând citometrul în flux FACS Vantage, în următoarele condiții:	3
- lungimea de undă de excitație: 488 nm;	5
- lungimea de undă de detecție: 600 nm.	7
Cele cinci linii celulare hematopoietice care au fost testate sunt celulele Jurkat, CEM-6, Molt-4, H-9 și U937. Exprimarea DR5 este detectabilă pe suprafața celulelor Jurkat, CEM-6, H-9 și U937, dar este aproape de nedetectat pe celulele Molt-4, așa cum se demonstrează în fig. 2a și 2a'. Deși niveluri ridicate de exprimare a ARN-ului DR5 au fost descrise anterior (J. P. Sheridan, A. S. Marsters, R. M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C. J. Gray, K. Baker, W. I. Wood, A. D. Goddard, P. Godowski și A. Ashkenazi, 1997, <i>Science</i> , 277, 818-821), analiza FACs a indicat faptul că aceste celule nu exprimă niveluri înalte de DR5 de suprafață. Aceste rezultate indică faptul că exprimarea DR5 de suprafață nu se corelează cu exprimarea transcripțională a DR5, ceea ce nu este un lucru neașteptat pentru un astfel de receptor. Nivelul de expresie de la suprafața celulei al DR5 poate fi specific descendenței celulare, deoarece majoritatea celulelor de origine hematopoietică au exprimat niveluri scăzute, în timp ce majoritatea celulelor de gliomi și prostatice au exprimat niveluri ridicate de DR5.	9
Anticorpul monoclonal TRA-8 este utilizat pentru a determina rolul DR5 în inducția apoptozei mediate de TRAIL prin examinarea exprimării acestuia la suprafața celulei într-un grup de tipuri diferite de celule tumorale umane, precum și susceptibilitatea acestor celule la apoptoza mediată atât de TRAIL, cât și de TRA-8. Celulele T primare din sângele periferic nu au exprimat niveluri semnificative ale DR5 la suprafața celulei și sunt rezistente la apoptoza mediată atât de TRAIL, cât și de TRA-8 (figurile 2a, 2a' și 3a'). Deși toate cele cinci linii de celule T umane de leucemie testate au exprimat niveluri detectabile scăzute ale DR5 de la suprafața celulei, două dintre ele (Jurkat și CEM-6) au o susceptibilitate ridicată față de apoptoza mediată atât de TRAIL, cât și de TRA-8, indicând faptul că DR5 singur este suficient pentru a induce apoptoza acestor celule. Celulele Molt-4 și U937 sunt parțial susceptibile la apoptoza mediată de TRAIL, dar sunt relativ rezistente la apoptoza mediată de TRA-8, sugerând faptul că receptorii TRAIL pot fi implicați în traducerea unui semnal apoptotic. Celulele H-9 sunt rezistente atât la apoptoza mediată de TRAIL, cât și la cea mediată de TRA-8, implicând un blocaj mediat de către o cale intracelulară antiapoptoză.	11
Grupul de celule a inclus liniile de celule de gliom maligne umane, Hs683, U251MG, D37MG, D54MG, U373MG, CH235MG, U87 și astrocite umane normale, care au fost furnizate de către dr. Yancey Gillespie de la Departamentul de Neurochirurgie al Universității din Alabama de la Birmingham. Liniile de celule canceroase de prostată umană, Du154, PC3 și LnCap, au fost furnizate de către dr. William Grizzle de la Departamentul de Patologie al Universității din Alabama de la Birmingham, care a obținut liniile de celule de la Colecția Americană de Tipuri de Culturi. Liniile de celule T umane de leucemie, de limfom cu celule B, HepG2 Jurkat (Colecția Americană de Tipuri de Culturi TIB-152) și CCRF-CEM CEM-6	13
	15
	17
	19
	21
	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45

# RO 123525 B1

1 (Colecția Americană de Tipuri de Culturi CCL-119), liniile de celule monocite, U937 (Colecția  
2 Americană de Tipuri de Culturi CRL-2367) au fost procurate de la Colecția Americană de  
3 Tipuri de Culturi. Toate liniile de celule de mai sus sunt cultivate în RPMI 1640 suplimentat  
4 cu FCS 10%. Linia de celule de astrocitom uman 1321N1 a fost furnizată prin bunăvoința dr.  
5 Richard Jope de la Departamentul de Psihiatrie al Universității din Alabama de la  
6 Birmingham, și au fost cultivate în DMEM suplimentat cu FCS 5%.

7 TRAIL uman recombinat solubil, procurat de la Alexis Corporation (San Diego, CA),  
8 este o proteină de fuziune compusă din domeniul extracelular al TRAIL uman (resturile de  
9 aa de la 95 la 281), fuzionat la capătul N-terminal cu un marcaj FLAF și cu o peptidă de  
10 legătură cu 8 aminoacizi. În mod diferit față de TRAIL marcat la His, care s-a raportat  
11 anterior, doar acest preparat al TRAIL nu induce un răspuns apoptotic puternic în celulele  
12 Jurkat și necesită un anticorp anti-FLAG, ca agent de legare încrucișată, pentru a îmbunătăți  
13 apoptoza. Anticorpul anti-FLAG a fost procurat de la Alexis.

14 Toate cele 10 celule maligne de gliom uman testate au exprimat niveluri detectabile  
15 de DR5 la suprafața celulei, majoritatea au exprimat niveluri de DR5 de la intermediare la  
16 ridicate, după cum se arată în fig. 2b. Trei linii, D-54MG, U373MG și CH-235MG, au exprimat  
17 niveluri înalte ale DR5, în timp ce șase linii, Hs-683, U251-MG, D37-MG, U87, SMK-1 și  
18 1321N,1 au exprimat niveluri intermediare de DR5. Doar o linie de celule, H-465, a exprimat  
19 niveluri scăzute de DR5. Toate cele trei linii de celule de cancer de prostată au exprimat  
20 niveluri ridicate de DR5, după cum se arată în fig. 2c.

21 La fel ca și celulele T primare, celulele B primare nu au exprimat niveluri semnificative  
22 de DR5 și nu au suferit apoptoza după tratamentul fie cu TRAIL, fie cu TRA-8 (fig. 2d). Trei  
23 (SKW6.4, EB-3 și Raji), în afară de a patra dintre liniile de celule B de limfom, au exprimat  
24 niveluri relativ ridicate de DR5 și sunt foarte susceptibile atât la apoptoza mediată de TRAIL,  
25 cât și la cea mediată de TRA-8. A patra linie de celule, Daudi, a exprimat niveluri foarte  
26 scăzute de DR5 și este mult mai puțin susceptibilă atât la apoptoza mediată de TRAIL, cât  
27 și la cea mediată de TRA-8. Deși astrocitele primare nu au exprimat niveluri detectabile de  
28 DR5 de la suprafața celulei (fig. 2b'), toate cele patru linii de celule de gliom testate au  
29 exprimat niveluri crescute de DR5. Nivelul mai ridicat al DR5 pe celulele de gliom decât cel  
30 de pe celulele T și B nu este însoțit de o susceptibilitate semnificativ mai mare la apoptoza  
31 mediată de TRAIL și de DR5, sugerând faptul că nivelul de exprimare la suprafața celulei a  
32 DR5 nu este corelat în mod necesar cu nivelul de apoptoză a celulelor tumorale. RT-PCR,  
33 efectuată pentru a determina nivelurile mesajului DR4, DR5 și DCR2, a detectat mesaje în  
34 toate celulele testate (tabelul 1). Cu toate acestea, în general, celulele normale primare au  
35 exprimat niveluri relativ scăzute de DR5 comparativ cu celulele tumorale transformate.

37 *Tabelul 1*

38 *Analiza RT-PCR a exprimării receptorului TRAIL\**

Celule	DR5	DR4	DcR2
Celule T primare	<0,001	<0,001	0,015
Celule Jurkat	0,10	<0,001	0,21
CEM-6	0,50	0,59	0,25
Molt-4	0,10	<0,001	0,05

Tabelul 1 (continuare)

Celule	DR5	DR4	DcR2
H-9	0,73	0,61	0,07
Celule B primare	<0,001	<0,001	0,024
SKW6.4	0,95	0,66	0,45
EB3	0,40	<0,001	0,35
Raji	0,55	0,11	0,45
Daudi	0,73	0,36	0,63
Astrocite normale	0,05	<0,001	0,12
SH683	0,56	0,96	0,14
U87	0,44	0,56	0,21
D54	1,15	0,46	0,12
1321N1	0,25	0,35	0,05

\*ARN total a fost izolat din celule și RT-PCR a fost efectuată conform descrierii din Metode. Producții PCR au fost separați în gel de agaroză 3% și au fost analizați cu un sistem Multimager Fluor-S MAX (BioRad). Valorile sunt prezentate ca raport față de β-actină.

### Exemplul 8. Inducția apoptozei *in vitro* în celulele maligne

Pentru a determina dacă TRA-8 induce apoptoza în celulele transformate *in vitro*, toate celulele tumorale DR5- pozitive sunt examinate pentru susceptibilitatea lor la apoptoza indusă fie de TRA-8, fie de TRAIL.

Celulele țintă ( $1 \times 10^3$  per godeu) sunt cultivate pe plăci cu 96 de godeuri, în prezența concentrațiilor indicate de TRAIL solubil, plus agent de legare încrucișată (Alexis) sau TRA8, la 37°C, peste noapte. Viabilitatea celulară se determină, utilizând (1) trusa ATPLite în conformitate cu instrucțiunile fabricantului (Packard Instruments, Meriden, CT); (2) trusa de proliferare a celulelor MTT/viabilitate (Sigma); sau (3) colorarea PI a celulelor moarte și se analizează prin citometrie în flux. La sfârșitul cultivării, celulele sunt colorate cu PI 10 μg/ml PI și celulele PI negative sunt raportate ca celule viabile. Pentru analiza nucleelor condensate de hepatocite, celulele se colorează cu Hoechst 33352 10 ng/ml (Molecular Probes) și se analizează prin citometrie în flux.

Anticorpul TRA-8 este capabil de a induce apoptoza în majoritatea liniilor de celule de gliom uman maligne (9/10), în 2 din 3 linii de celule de cancer de prostată și în 2 din 5 linii de celule hematopietice DR5- pozitive. Acesta nu a indus apoptoza în linia de celule Molt-4, care a exprimat niveluri de DR5 aproape nedetectabile la suprafața celulară. Cu toate acestea, nivelurile de susceptibilitate a celulelor la apoptoza mediată de TRA-8 au variat considerabil printre liniile de celule.

Variabilitatea susceptibilității celulelor față de apoptoza indusă de anticorpul TRA-8 sugerează că, deși este necesar un nivel minim de exprimare a DR5 la suprafața celulei, nivelul exprimării la suprafața celulei a DR5 nu este în mod necesar determinantul primar al susceptibilității, ci și alți factori influențează acest proces. Deși toate celulele de gliom au

# RO 123525 B1

1 exprimat în general niveluri semnificativ mai mari de DR5 de la suprafața celulei decât au  
făcut-o celulele hematopoietice, susceptibilitatea celulelor de gliom la apoptoza indusă de  
3 TRA-8 nu este proporțional crescută comparativ cu celulele hematopoietice. Susceptibilitatea  
a cinci linii de celule de gliom, D-37MG, D54-MG, U373-MG, CH-235-MG și 1321N1, la  
5 apoptoza indusă de TRA-8, este mare și este echivalentă cu susceptibilitatea acestora la  
apoptoza mediată de TRAIL, după cum se arată în fig. 3b. Două dintre liniile de celule de  
7 gliom, H-456 și SMK1, sunt mult mai puțin susceptibile la apoptoza indusă de TRA-8. În  
cazul celulelor H-456, exprimarea de suprafață a DR5 este scăzută, cu toate acestea,  
9 exprimarea la suprafață a DR5 pe SMK1 este similară cu cea a liniilor de celule mai  
susceptibile, sugerând că alte mecanisme pot juca un rol în determinarea susceptibilității la  
11 apoptoza mediată de TRAIL. Deși toate cele trei linii de cancer de prostată au exprimat  
niveluri înalte de DR5, celulele Du145 sunt cele mai sensibile la apoptoza indusă de TRA-8,  
13 celulele PC3 sunt parțial sensibile, în timp ce LnCAP sunt complet rezistente, după cum se  
arată în fig. 3c. Printre celulele hematopoietice, s-a descoperit că celulele CEM-6 sunt foarte  
15 susceptibile la apoptoza indusă de TRA-8, după cum se arată în fig. 2a, deși ambele linii de  
celule au fost găsite a exprima niveluri scăzute de DR5. Deși DR5 este detectabil pe celulele  
17 U937, aceste celule sunt rezistente la apoptoza indusă de TRA-8. În mod similar, deși  
celulele H-9 au exprimat niveluri detectabile de DR5, celulele H-9 sunt rezistente la apoptoza  
19 indusă de TRA-8. Aceste rezultate au implicat existența mecanismelor reglatoare care  
influențează apoptoza mediată de DR5.

21 Anticorpii anti-DR5 de legare de suprafață adiționali sunt produși ca în procedurile  
din exemplele 1...3. Doi anticorpi anti-DR5, suplimentari, desemnați TRA-1 și TRA-10, sunt  
23 studiați, împreună cu TRA-8, pentru a determina comparativ capacitatea de a induce  
apoptoza și, prin aceasta, de a acționa ca agonist sau, din contră, de a bloca apoptoza  
25 mediată de TRAIL, prin aceasta acționând ca antagonist. Celule umane Jurkat se utilizează  
ca țintă, pentru a determina activitatea agonistă și/sau antagonistă a trei anticorpi anti-DR5,  
27 denumiți TRA-1, TRA-8 și TRA-10. După cum se arată în fig. 4, viabilitatea celulară este  
aproximativ 90%, 70% și 20%, pentru TRA-10, TRA-1 și TRA-8, respectiv, după o incubare  
29 peste noapte cu 2,5 μg per ml. TRA-8 a indus un răspuns apoptotic puternic într-o manieră  
doză-dependentă, în timp ce TRA-1 a indus doar un răspuns apoptotic moderat, iar TRA-10  
31 a indus doar un răspuns slab. De aceea, TRA-8 este clasificat ca anticorp anti-DR5 agonist.  
În fig. 4, viabilitatea celulelor Jurkat umane este prezentată ca funcție doză-dependentă a  
33 apoptozei induse de TRAIL. TRA-10 a blocat apoptoza celulelor Jurkat umane într-o  
proporție semnificativă, într-un studiu al apoptozei induse de TRAIL în doză mică. Astfel,  
35 TRA-10 este clasificat ca anticorp anti-DR5 antagonist.

37 Susceptibilitatea a cinci linii de celule de gliom, D-37MG, D54-MG, U-373-MG,  
CH235-MG și 1321N1, la apoptoza indusă de TRA-8, este echivalentă cu susceptibilitatea  
39 acestora la apoptoza mediată de TRAIL, după cum se arată în fig. 3b, indicând faptul că  
apoptoza indusă de TRAIL, în aceste celule, este mediată, în primul rând, prin DR5. Mai  
mult, două dintre liniile de celule de gliom, Hs683 și U251-MG, sunt rezistente la apoptoza  
41 indusă de TRAIL, dar sunt parțial sensibile la apoptoza indusă de TRA-8, indicând faptul că  
receptorii momeală funcționează în aceste celule și că utilizarea anticorpului TRA-8  
43 scurtcircuitează acest mecanism reglator. În liniile celulare de cancer de prostată, în ciuda  
sensibilității variabile la apoptoza indusă de TRA-8, aceasta a fost analoagă cu sensibilitatea  
45 celulelor la apoptoza indusă de TRAIL, sugerând din nou că DR5 joacă un rol major în

apoptoza mediată de TRAIL în celulele de cancer de prostată. Printre celulele hematopoietice, s-a descoperit că Jurkat și CEM-6 sunt foarte susceptibile atât la apoptoza mediată de TRA-8, cât și la cea mediată de TRAIL. Nivelul apoptozei induse de TRA-8 este compatibil cu cel indus de TRAIL, după cum se arată în fig. 2a și 3a'. Doar una dintre liniile de celule de gliom, U87, și două linii de celule hematopoietice, U937 și Molt 4, au prezentat sensibilitate la apoptoza indusă de TRAIL, dar sunt mai puțin sensibile sau sunt rezistente la apoptoza indusă de TRA-8. Una dintre liniile de celule, linia de celule H-9, a exprimat niveluri detectabile de DR5, dar este rezistentă la apoptoza indusă fie de TRA-8, fie de TRAIL. Deoarece sunt necesare niveluri minime de expresie, a DR5 pentru apoptoza indusă de TRA-8, nivelul de expresie a DR5 nu prevede în mod necesar susceptibilitatea celulelor la apoptoza mediată de TRA-8; receptorii momeală joacă un rol în modularea apoptozei mediate de TRAIL în unele celule, dar nu pare să joace un rol major în majoritatea celulelor testate; după cum se anticipează, anticorpii TRA-8 scurtcircuitează efectele receptorilor momeală; pot apărea mutații funcționale ale receptorului DR5 în celulele transformate; și, în final, mecanismele reglatoare intracelulare pot fi la fel de importante sau mai importante decât receptorii momeală, în definirea susceptibilității celulelor la apoptoza mediată de TRAIL și de DR5.

Studii anterioare au arătat că mRNA pentru DR5 este larg distribuit în țesuturile normale (P. Schneider, M. Thome, K. Burns, J. L. Bodmer, K. Hofmann, T. Kataoka, N. Holler, J. Tschopp, *Immunity*, 1997, Dec.; 7(6):831-6). Pentru a evalua exprimarea DR5 la nivel de proteină, este examinat un grup de omogenate de țesut uman normal (Geno Technology, St. Louis, MO) cu anticorp TRA-8 prin analiza Western blot. Dintre nouă linii de țesuturi umane normale, țesutul de creier este slab pozitiv (fig. 5a, linia 2). Proteina DR5 nu este detectabilă de către reactivitatea TRA-8 în ficat (linia 1), plămân (linia 3), rinichi (linia 4), splină (linia 5), testicule (linia 6), ovar (linia 7), inimă (linia 8), sau pancreas (linia 9). În contrast, toate cele treisprezece țesuturi canceroase umane s-au colorat pozitiv cu TRA-8 (fig. 5b), incluzând cancerul de ovar (linia 1), plămân (linia 2), ficat (linia 3), rect (linia 4), cervix (linia 5), piele (linia 6), testicule (linia 7), tiroidă (linia 8), uter (linia 10), stomac (linia 11), laringofaringe (linia 12) și pancreas (linia 13). Mai mult, imunochimia *in situ* a țesuturilor normale și canceroase cu TRA-8 a confirmat că, în afară de câteva celule pozitive răspândite în splină, exprimarea DR5 în celulele normale de sân, plămân și splină nu este detectabilă (fig. 5c). Țesuturile canceroase corespunzătoare, incluzând carcinomul ductal infiltrant de sân, cancerul de plămân cu celule mici și limfomul, au reacționat pozitiv cu TRA-8 (fig. 5d). Dintr-un total de 22 de țesuturi examinate, 5 din 6 cancere de sân, 2 din 2 cancere de cervix, 4 din 5 cancere de ficat 5 din 8 limfoame, 2 din 2 cancere de plămâni, 2 din două cancere de prostată au reacționat pozitiv cu TRA-8. Rezultatele concordă cu cele ale analizei citometrice în flux și indică faptul că țesuturile canceroase exprimă niveluri mai înalte de proteină DR5 decât o fac țesuturile normale.

## **Exemplul 9. Activitatea tumoricidă a TRA-8 *in vivo***

Din diferite motive, mulți agenți care au fost promițători în studiile *in vitro* nu au arătat eficacitate *in vivo*. De aceea, este important să se testeze eficacitatea TRA-8 pe un model animal *in vivo*. Pentru a realiza aceasta, anticorpii DR5 antiuman TRA-8 se administrează la șoareci care poartă xenogrefe umane care exprimă molecula umană DR5. Șoarecii utilizați au avut de la 6 la 8 săptămâni, au fost șoareci NOD/SCID (Jackson Laboratory), care au fost

1 inoculați subcutanat cu celule 1321N1 de astrocitom uman ( $1 \times 10^7$ ) sau li s-au inoculat celule  
Jurkat de leucemie umană ( $1 \times 10^6$ ). În ziua 2 de la inocularea tumorii, șoarecii sunt inoculați  
3 intravenos cu TRA-8 (100  $\mu$ g). La cinci zile după tratamentul cu TRA-8, creșterea tumorii  
1321N1 se determină prin mărimea și greutatea masei tumorale. Creșterea celulelor Jurkat  
5 se determină prin greutatea splinei și procentajul de celule CD3 pozitive umane în splina  
animalelor inoculate. Biopsiile țesuturilor tumorale sunt prelevate și examinate histologic.

7           Tratamentul timpuriu, cu o singură doză intravenoasă de 100  $\mu$ g de TRA-8, la o zi  
după inocularea tumorii, a inhibat complet celulele 1321N1, formând o tumoare solidă  
9 (fig. 6a). Tratamentul târziu, cu trei doze de 100  $\mu$ g de TRA-8, la o săptămână după  
inocularea tumorii, a redus greutatea tumorii de 4 ori sau mai mult (fig. 6b). Formarea tumorii  
11 nu este vizibilă la animalele tratate cu TRA-8 devreme (fig. 6c, panoul superior). Analiza  
histologică a relevat un țesut tumoral degenerat în mod dramatic, la animalele tratate cu  
13 TRA-8 (fig. 6c, panoul inferior). În mod similar, tratamentul cu TRA-8 a inhibat populația de  
splină de către celulele Jurkat, după cum s-a demonstrat prin insuficiența celulelor Jurkat din  
15 splină (fig. 6d, 6e). Analiza histologică a tumorii implantate a arătat câteva celule tumorale  
împrăștiate în țesutul moale, la animalele tratate cu TRA-8, în timp ce martorii au arătat  
17 formarea unei tumori solide, după cum s-a arătat în fig. 6c. Modelul cu celule Jurkat, numărul  
de celule Jurkat din splinele animalelor tratate cu TRA-8 este mai mic de 2% comparativ cu  
19 aproximativ 10% în splina animalelor de control, după cum s-a demonstrat prin analiza  
citometrică în flux, după cum se arată în fig. 6a și prin colorarea CD3 *in situ* din fig. 6c.

21           Aceste rezultate au confirmat demonstrația recentă că administrarea sistemică a  
inhibitorilor TRAIL recombinanți, legați încrucișat, inhibă creșterea tumorii *in vivo* (H. Walczak,  
23 R. E. Miller, K. Ariail, B. Gliniak, T. S. Griffith, M. Kubin, W. Chin, J. Jones, A. Woodward, T.  
Le, C. Smith, P. Smolak, R. G. Goodwin, C. T. Rauch, J. C. Schuh, D. H. Lynch, *Nat. Med.*,  
25 1999, Feb.; 5(2):157-63). Aceste rezultate au indicat faptul că o singură doză de TRA-8 are  
o eficacitate înaltă în eliminarea celulelor tumorale *in vivo*.

27           Deoarece se utilizează un anticorp antiuman într-un model murin, toxicitatea  
tratamentului cu TRA-8 nu a putut fi determinată. Cu toate acestea, studiul administrării  
29 TRAIL *in vivo* a indicat că nu se asociază o toxicitate semnificativă cu acest tratament (H.  
Walczak, R. E. Miller, K. Ariail, B. Gliniak, T. S. Griffith, M. Kubin, W. Chin, J. Jones, A.  
31 Woodward, T. Le, C. Smith, P. Smolak, R. G. Goodwin, C. T. Rauch, J. C. Schuh, D. H.  
Lynch, *Nat. Med.*, 1999, Feb.; 5(2):157-63).

33           **Exemplul 10. Celulele sinoviale RA sunt susceptibile la apoptoza indusă de TRAIL  
și TRA-8**

35           Majoritatea studiilor din stadiul tehnicii ale apoptozei mediate de TRAIL s-au concen-  
trat asupra celulelor maligne. Apoptoza mediată de TRAIL, în conformitate cu prezenta  
37 invenție, este, de asemenea, terapeutică, în condiții autoimune și inflamatoare, cum ar fi RA.

39           **10.1. Analiza citometrică în flux a exprimării lui DR5 de la suprafața celulei în celulele  
RA sinoviale**

41           Exprimarea lui DR5 pe un grup de opt celule sinoviale primare, cultivate de la pacienți  
cu RA, este comparată cu aceea de pe opt celule sinoviale, cultivate de la pacienți cu  
osteoartrită (la care se va face referire de acum înainte ca „OA”). Cele opt celule umane  
43 sinoviale RA primare, cultivate, RA-1014, RA-1016, RA-1021, RA-512, RA-707, RA-811, RA-  
716 și RA-929, sunt furnizate prin amabilitatea dr. M. Ohtsuki (Sankyo Co. Ltd., Tokyo,

Japonia) și cultivate în DMEM suplimentat cu 10% FCS, penicilină, streptomycină și glutamină. Cele șapte culturi celulare primare de celule sinoviale OA sunt izolate din țesuturile sinoviale ale pacienților cu OA printr-o metodă cu colagenază standard și cultivate în aceleași condiții. Numărul de trecere al tuturor celulelor primare este sub 10. Expresia lui DR5 este determinată prin analiză FACs așa cum se descrie în exemplul 5.

Toate culturile primare de celule RA au exprimat niveluri înalte de DR5 de suprafață și există o variație mică a nivelurilor de exprimare printre aceste celule sinoviale, izolate de la pacienți diferiți, așa cum este prezentat în fig. 7a. În contrast, exprimarea lui DR5 de suprafață pe suprafața celulelor sinoviale izolate de la pacienții cu OA este foarte scăzută sau nedetectabilă, așa cum se prezintă în fig. 7b. S-a descoperit că celulele sinoviale transformate SV40 exprimă niveluri înalte de DR5, comparabile cu cele expuse de către celulele RA. În contrast, celulele fibroblastice netransformate au exprimat niveluri scăzute de DR5, comparabile cu cele expuse de celulele OA din fig. 7b.

## 10.2. Susceptibilitatea celulelor sinoviale RA la apoptoza mediată de TRA-8 și TRAIL

În general, toate celulele sinoviale izolate de la pacienții cu RA sunt susceptibile atât la apoptoza indusă de TRAIL, cât și la cea indusă de anticorpul anti-DR5, și toate celulele OA sunt rezistente la apoptoza indusă de TRAIL și de anticorpul anti-DR5, așa cum se prezintă în fig. 8a, b. Aceste studii indică faptul că anticorpul TRA-8 țintește celule modificate, preferențial față de celulele normale. Mai mult, modelul susceptibilității sau al rezistenței la apoptoza indusă de TRAIL este corelat cu cel indus de anticorpul anti-DR5, indicând faptul că celulele sinoviale utilizează, în principal, DR5, pentru a declanșa apoptoza TRAIL.

Așa cum a fost descris în cazul celulelor maligne, susceptibilitatea la apoptoza indusă de TRAIL sau de anticorpul anti-DR5 a variat printre celulele sinoviale RA, deși a exprimat niveluri similare de DR5. RA-512 și RA-707 sunt cele mai susceptibile, deoarece peste 80% dintre celule sunt omorâte de concentrații de TRAIL sau TRA-8 sub 20 ng/ml. RA-1014, RA-811, RA-716 și RA-929 sunt printre cele cu susceptibilitate intermediară la TRAIL sau la TRA-8, cu aproape 100% moarte celulară, care apare în prezența concentrațiilor mari (>50 ng/ml) de TRAIL sau TRA-8. În celulele RA-1016 și RA-1021, deși majoritatea celulelor (peste 60%) sunt omorâte de o doză mică de TRAIL sau TRA-8, o porțiune de celule a supraviețuit în prezența concentrațiilor ridicate de TRAIL sau TRA-8, indicând faptul că o subpopulație de celule este rezistentă la apoptoza mediată de TRAIL. În contrast, toate celulele de OA sunt mult mai puțin susceptibile la apoptoza indusă de TRAIL și TRA-8. Nu mai mult de 60% dintre celule sunt omorâte în OA52F și OA69F, chiar și în prezență de concentrații ridicate de TRAIL sau de TRA-8. Celulele OA72M sunt complet rezistente la apoptoza indusă de TRAIL sau TRA-8. Celulele sinoviale transformate SV40 sunt de asemenea susceptibile la apoptoza indusă de TRAIL și TRA-8 (datele nu sunt prezentate), în contrast, celulele fibroblastice, netransformate, au prezentat rezistență la TRAIL și TRA-8.

S-a demonstrat anterior faptul că DR5 utilizează, pentru a declanșa apoptoza, o cale dependentă de FADD/caspază 8 (P. Schneider, M. Thome, K. Burns, J. L. Bodmer, K. Hofmann, T. Kataoka, N. Holler, J. Tschopp, 1997, *Immunity*, Dec.;7(6): 831-836). Pentru a determina dependența de caspază, a apoptozei mediate de celulele sinoviale de RA, celulele de RA sunt cultivate cu TRAIL sau cu anticorp anti-DR5, în prezența inhibitorilor specifici ai caspazei. Dintre opt inhibitori ai caspazei testați, inhibitorii caspazelor 6, 8 și 10 sunt capabili

1 să inhibe apoptoza celulelor sinoviale de RA induse atât de TRAIL, cât și de DR5, așa cum  
este prezentat în fig. 9, indicând faptul că aceste trei caspaze sunt implicate în apoptoza  
3 mediată de DR5.

5 **10.3. TRA-8 sau TRAIL induc activarea NF- $\kappa$ b în celule sinoviale de RA fără  
eliberare crescută de MMP-uri**

7 Există o probă considerabilă pentru a sprijini ideea că există legături strânse între  
semnalizarea apoptozei și semnalizarea proliferării (N. J. Kennedy, T. Kataoka, J. Tschopp  
și R. C. Budd, 1999, *J. Exp. Med.*, 1891-1896). S-a stabilit faptul că DR5 este capabil să  
9 activeze o cale NF- $\kappa$ b în plus față de traducerea semnalizării apoptozei, și că activarea NF-  
 $\kappa$ b poate fi capabilă să traducă un semnal antiapoptoză. De aceea, este efectuată o analiză  
11 de deplasare în gel. Celulele sunt stimulate cu 50 ng/ml de TRAIL solubil recombinat, ligand  
FAS, în prezența a 1 mg/ml agent de intensificare, sau 50 ng/ml de TRA-8, pe perioada de  
13 timp indicată. Extractele nucleare sunt preparate și incubate cu o probă de oligo-ADN marcat  
cu [ $^{32}$ P], colorată de două ori. Rezultatele sunt analizate, utilizând fosfaimagerul cu ciclon  
15 (TopCount NXT, Packard Instrument Company, CT). După ce celulele sinoviale RA sunt  
incubate cu TNF- $\alpha$  sau TRAIL, NF- $\kappa$ b este activat într-o modalitate dependentă de timp.  
17 Anticorpul TRA-8 este capabil să activeze puternic NF- $\kappa$ b. În contrast, ligandul Fas nu este  
capabil să inducă activarea NF- $\kappa$ b, așa cum se prezintă în fig. 10a.

19 Astfel, deși TRAIL și anticorpul TRA-8 induc un răspuns apoptotic puternic în celulele  
sinoviale RA, aceștia activează de asemenea NF- $\kappa$ b, și activarea NF- $\kappa$ b s-a crezut că  
21 contribuie la rolul proinflamator al TNF- $\alpha$  în RA. Astfel, este posibil ca TRAIL, ca și TNF- $\alpha$ ,  
să poată servi ca citokină proinflamatoare. Pentru a determina dacă există o consecință  
23 biologică similară a activării NF- $\kappa$ b induse de TRAIL și TNF- $\alpha$ , producția de MMP-uri este  
determinată prin ELISA. Celulele sinoviale sunt cultivate în mediu, peste noapte, singure sau  
25 cu 50 ng/ml interleukină 1b, 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 50 ng/ml TRAIL, sau 50 ng/ml TRA-8. Nivelurile  
de MMP-1 și MMP-3 în supernatantele de cultură sunt determinate cu truse ELISA.

27 Atunci când celulele sinoviale RA sunt incubate cu citokină proinflamatorie, TNF- $\alpha$   
sau IL-1b, producția de MMP-1,3 și 13 a crescut în comparație cu martorul mediu, așa cum  
29 este prezentat în fig. 10 b, c. În contrast, tratamentul cu TRAIL sau anticorp anti-DR5 nu este  
asociat cu o eliberare crescută a acestor MMP-uri.

31 **Exemplul 11 A. Eșecul în inducția toxicității hepatocelulare**

33 Pentru analize de viabilitate celulară de 24 h, au fost achiziționate *in vitro*, de  
laTechnology (Baltimore, MD), hepatocite umane, normale, proaspete, în plăci cu 96 de  
godeuri. Hepatocitele sunt cultivate în mediul de cultură pentru hepatocite, care conține  
35 1  $\mu$ g/ml de TRAIL solubil sau TRA-8. Pentru analize de viabilitate de 6 h, sunt izolate, din  
specimene chirurgicale proaspete, colectate de la UAB Tissue Procurement Center,  
37 hepatocite normale sau celule de cancer hepatocelulare. Toți reactivii pentru izolarea  
hepatocitelor umane, inclusiv tamponul de perfuzie pentru hepatocite, mediul de digestie,  
39 mediul de spălare și mediul de atașare, au fost achiziționate de la Gibco. Feliile de țesut sunt  
digerate în mediul de digestie pentru hepatocite, la 37°C, cu agitare (50 rpm), timp de o oră.  
41 Hepatocitele izolate sunt recoltate prin centrifugare de viteză mică (50 g, 3 min) și spălate,  
cu mediul de spălare pentru hepatocite, de șase ori. Suspensii cu celule singulare de  
43 hepatocite sunt cultivate în mediul de atașare, care conține 10% FCS, în plăci cu 96 de  
godeuri Matrigel (BD), timp de șase ore. Hepatocitele neatașate sunt îndepărtate, spălând

# RO 123525 B1

de două ori cu mediul de atașare preîncălzit. Hepatocitele atașate sunt după aceea incubate cu diferite concentrații de TRAIL solubil sau FasL, în prezența unui agent de legare încrucișată sau TRA-8 sau CH11, timp de 6 h.

TRAIL are cel puțin doi receptori (DR4 și DR5), care sunt capabili să inducă apoptoza. TRA-8 este utilizat pentru a determina dacă legarea încrucișată (reticularea) numai a DR5 este suficientă pentru a induce apoptoza hepatocitelor normale. Expresia DR5 la nivelul proteinei este examinată inițial în cinci țesuturi de ficat uman normale și cinci țesuturi canceroase de ficat prin imunohistochimie *in situ*, utilizând TRA-8. Secțiunile din țesuturile de ficat normale au demonstrat arhitecturi și morfologii celulare normale prin colorare H&E (fig. 11a, panourile din partea stângă superioară) în absența unei reactivități pozitive cu TRA-8 pentru DR5 (fig. 11a, grupurile din partea stângă inferioară). În contrast, țesutul de carcinom hepatocelular uman a reacționat pozitiv cu TRA-8, într-un model potrivit atât cu membrana celulară, cât și cu prezența citoplasmică a DR5 în celulele canceroase. Linia celulară de carcinom hepatocelular uman HepG2 este de asemenea pozitivă pentru DR5. Aceste rezultate sunt consistente între cele cinci țesuturi de ficat normale și numai unul (adenomul de ficat) dintre cele cinci țesuturi canceroase de ficat este DR5 negativ. Aceste rezultate concordă cu datele de analiză Western blot, prezentate în fig. 5a, care demonstrează, la fel ca și alte țesuturi normale, faptul că țesutul normal de ficat uman nu exprimă niveluri semnificative de proteină DR5. Mai mult, analiza Western blot a hepatocitelor umane normale, examinate cu TRA-8 izolate, nu demonstrează niveluri detectabile de DR5.

Expresia DR5 de la suprafața celulei pe hepatocite umane prin analiză citometrică în flux a demonstrat faptul că hepatocitele normale preparate proaspăt nu au exprimat niveluri detectabile ale DR5 de la suprafața celulei (fig. 11b, panourile din partea stângă superioară). Aceasta nu este detectată nici pe hepatocite umane normale care au fost crioconservate sau plasate în cultură pe termen scurt. În contrast, celulele de carcinom hepatocelular, proaspăt izolate, la fel ca și celulele HepG2, exprimă DR5 de la suprafața celulei. Utilizând Fas ca și comparație, hepatocitele normale, celulele de carcinom hepatocelular și celulele HepG2, toate au exprimat niveluri echivalente de Fas (fig. 11b, panourile inferioare). Aceste rezultate sunt în acord cu cele obținute utilizând imunohistochimia *in situ* și Western blot, și indică faptul că DR5 de la suprafața celulei este bine exprimat în celulele de ficat canceroase, dar nu și în hepatocitele normale. Prezența nivelurilor mRNA, pentru DR4, DR5, DcR1 și DcR2, în hepatocitele umane, demonstrată prin RT-PCR (T. S. Griffith, S. R. Wiley, M. Z. Kubin, L. M. Sedger, C. R. Maliszewski, N. A. Fanger, *J. Exp. Med.*, 19 Apr, 1999; 189(8): 1343-54), sugerează faptul că hepatocitele umane pot exprima niveluri foarte mici de proteină DR5, care sunt sub pragul pentru detecție prin TRA-8.

Pentru a determina dacă TRA-8 induce toxicitate hepatocelulară, se examinează susceptibilitatea hepatocitelor umane normale la apoptoza indusă de TRA-8 și de TRAIL solubil plus agent de reticulare. Când hepatocitele normale sunt cultivate în prezența unei concentrații mari de TRAIL, se observă o scădere dependentă de timp a viabilității celulare, prin analizele ATPLite (fig. 12a) și MTT. Moartea celulară, mediată de TRAIL, a hepatocitelor normale, poate fi văzută la patru ore după adăugarea TRAIL. La sfârșitul unei culturi de 24 h, mai mult de 80% dintre hepatocite sunt ucise de TRAIL. Prin contrast, în timpul aceleiași perioade, TRA-8 nu a indus o moarte celulară semnificativă a hepatocitelor normale. Nucleele condensate colorate cu Hoechst, o caracteristică a apoptozei, sunt crescute în hepatocitele tratate cu TRAIL, dar nu și în hepatocitele tratate cu TRA-8 (fig. 12). Numărul

1 de hepatocite apoptotice este bine corelat cu viabilitatea celulară scăzută, după cum se  
determină prin analiza ATPLite, sugerând faptul că moartea celulară indusă de TRAIL este  
3 mediată de apoptoză. Aceasta este confirmată prin capacitatea Z-VAD de a inhiba toxicitatea  
mediată de TRAIL a hepatocitelor. Deoarece cicloheximida este un agent de creștere eficace  
5 al apoptozei, este investigat efectul acestui compus asupra hepatocitelor tratate cu TRAIL  
și TRA-8. În timpul unei culturi de patru ore, cicloheximida a crescut în mod semnificativ  
7 moartea celulară a hepatocitelor indusă de TRAIL, mai mult de 70% dintre hepatocite fiind  
ucise de TRAIL în prezența cicloheximidei (fig. 12c). Cu toate acestea, tratamentul cu  
9 cicloheximidă nu este capabil de a crește moartea celulară mediată de TRA-8 a  
hepatocitelor. Pentru a compara caracteristicile apoptozei mediate de TRA-8 cu cea indusă  
11 de TRAIL în hepatocite, hepatocite normale, precum și celule canceroase, sunt incubate cu  
cantități variabile de TRAIL solubil cu agent de reticulare sau cu TRA-8. În timpul unei  
13 perioade de cultură de 6 h, TRAIL a indus un răspuns apoptotic moderat în hepatocitele  
normale. Mai mult de 20% dintre hepatocite sunt ucise în prezența a 500 ng/ml TRAIL  
15 (fig. 12d, în partea superioară stângă). Tratamentul cu TRA-8 al hepatocitelor normale nu  
a provocat nicio moarte celulară semnificativă de-a lungul aceleiași perioade de timp. În  
17 contrast cu hepatocitele normale, celulele de carcinom hepatocelular primar (fig. 12d, partea  
superioară mijloc) și celulele HepG2 (fig. 12d, partea superioară dreapta) sunt foarte  
19 susceptibile la apoptoza mediată fie de TRAIL, fie de TRA-8. Peste 80% dintre celulele de  
carcinom hepatocelular și aproape 100% dintre celulele HepG2 sunt ucise în timpul unei  
21 perioade de cultură de 8 h. Aceste rezultate au indicat faptul că hepatocitele normale sunt  
complet rezistente la apoptoza mediată de TRA-8 și sunt mult mai puțin susceptibile la  
23 apoptoza mediată de TRAIL decât sunt celulele de cancer de ficat. Utilizând ligandul Fas și  
anticorpul anti-Fas (CH-11), nu există nicio diferență semnificativă în ceea ce privește  
25 susceptibilitatea la apoptoza mediată de Fas între hepatocitele normale, celulele de carcinom  
hepatocelular, și celulele HepG2 (fig. 12d, panourile inferioare).

27 **Exemplul comparativ 11B. Inducția hepatitei de către TRAIL legat de membrană *in vivo***

29 Șoareci femele B6 de 8...10 săptămâni sunt injectate intravenos cu  $10^9$  pfu de  
Ad/hTRAIL cu numărul egal de Ad/Tet-on. Șoarecii sunt hrăniți cu concentrații diferite de  
31 tetraciclină în apa de băut a acestora, imediat după inocularea vectorilor adenovirali.  
Leziunea hepatică este determinată prin nivelurile serice de AST, utilizând o trusă de  
33 diagnostic AST (Sigma). Exprimarea TRAIL este determinată prin analiza Northern.

Pentru a determina dacă forma legată de membrană a TRAIL induce o leziune  
35 hepatică *in vivo*, este construit un vector adenoviral recombinat, care codifică lungimea  
integrală a TRAIL uman (Ad/hTRAIL), a cărui exprimare se află sub controlul promotorului  
37 inductibil de către tetraciclină. La douăzeci și patru de ore după inocularea intravenoasă a  
șoarecilor B6 cu Ad/hTRAIL, exprimarea indusă de tetraciclină a TRAIL uman este observată  
39 în ficat într-o manieră doză-dependentă, după cum se demonstrează prin analiza Northern  
blot (fig. 13a). Nivelurile de exprimare a TRAIL sunt corelate bine cu leziunile ficatului, după  
41 cum se arată prin creșterea dependentă de tetraciclină a transaminazelor, din nou într-o  
manieră doză-dependentă (fig. 13b). Deoarece inocularea cu vector adenoviral *per se* poate  
43 crește susceptibilitatea hepatocitelor la apoptoza mediată de TRAIL, sunt izolate hepatocitele  
de la șoareci inoculați cu Ad/TRAIL și li se testează moartea celulară mediată de TRAIL. Nu

există o moarte celulară semnificativ crescută a hepatocitelor infectate cu Ad/TRAIL comparativ cu cea de la șoarecii martor (fig. 13c, panoul stâng). Mai mult, șoarecii inoculați cu Ad/TRAIL nu au prezentat o leziune crescută a ficatului după injecția intravenoasă a TRAIL uman solubil. Astfel, urmează ca hepatita indusă de Ad/TRAIL să fie mediată de către nivelurile înalte de exprimare a TRAIL în forma sa membranară. Analiza histologică a secțiunilor de ficat a relevat faptul că leziunea hepatocitelor este vizibilă la 24 h după inocularea vectorului (fig. 13d) și a persistat cel puțin 7 zile (fig. 13e). Aceste modificări patologice ale ficatului sunt de asemenea dependente de tetraciclină și apar într-o manieră doză-dependentă. Faza inițială, în 24 h de tratament, a leziunii ficatului, indusă de TRAIL, este caracterizată prin focare de necroză. Infiltrarea celulelor inflamatorii nu se observă în acest stadiu, dar hemoragia apare. Din ziua 7 după inoculare, leziuni difuze în ficat apar, împreună cu o dezordine lobulară marcată, o degenerare severă a hepatocitelor, cu o citoplasmă cu aglomerări neregulate și cu spații clare largi și cu o apoptoză și o necroză pregnante. Un infiltrat extensiv de celule mononucleare este o caracteristică a acestui stadiu. Aceste rezultate au indicat faptul că TRAIL uman, sub forma sa legată de membrană, este capabil să inducă leziunea ficatului *in vivo*. În ciuda înclinației TRAIL uman de a produce hepatite severe la șoareci, acesta nu induce un răspuns letal. În contrast, șoarecii inoculați cu vectori similari, controlați de tetraciclină, care codifică ligandul Fas, au dezvoltat o hepatită fulminantă, cu o apoptoză masivă și cu necroza hepatocitelor, însoțită de o hemoragie severă și de mortalitate, care apare într-o doză dependentă de tetraciclină, la 72 h de la inoculare. Rata mortalității a ajuns la 100%, în 48 h, în acele subgrupe care primesc 3 mg/ml tetraciclină. În contrast, toți șoarecii care au primit Ad/hTRAIL, în ciuda dozei de tetraciclină, sunt încă în viață, la patru săptămâni după inoculare. Astfel, rezultă că, *in vivo*, forma legată de membrană a TRAIL este un inductor mai puțin eficient al leziunilor hepatocelulare decât ligandul Fas. Aceasta sugerează, în continuare, că TRAIL poate induce leziuni hepatice printr-un mecanism care diferă de mecanismele care prezintă toxicitatea ligandului Fas.

## **Exemplul 12. Celulele T și B umane activate exprimă niveluri crescute de DR5**

Pentru a determina dacă DR5 joacă un rol în apoptoza mediată de TRAIL a celulelor T și B activate, se examinează exprimarea la suprafață a DR5, pe celulele T și B în repaus sau activate, utilizând TRA-8. Celulele T umane, nestimulate în PBMC, nu au exprimat niveluri semnificative de DR5 (fig. 14). La 48 h după stimularea, fie anti-CD3, fie Con-A, exprimarea DR5 de la suprafața celulei este crescută semnificativ. În mod similar, celulele B nestimulate au exprimat niveluri foarte joase de DR5. Stimularea cu anti- $\mu$ , dar nu cu LPS, a avut ca rezultat o exprimare crescută la suprafața celulei a DR5. Aceste rezultate au indicat că ambele celule T și B activate exprimă niveluri mai mari de DR5 la suprafața celulei. Celulele sunt colorate cu 20  $\mu$ g/ml TRA-8 și IgG1 antișoarece PE.

## **Exemplul 13. Celulele T și B activate devin susceptibile la apoptoza mediată de TRA-8**

Pentru a determina dacă celulele activate T și B sunt susceptibile la apoptoza mediată de TRAIL, celulele T și B de PBMC uman sunt stimulate cu anti-CD3 sau, respectiv, cu anti- $\mu$  *in vitro*, timp de 48 h. Celulele gliale și celulele bolnave, care proliferază, sunt colectate prin centrifugare în gradient și sunt incubate cu concentrații diferite de TRA-8. Celulele T și B nestimulate nu sunt susceptibile la apoptoza mediată de TRA-8 (fig. 15).

1 Celulele T și B stimulate total au prezentat o susceptibilitate moderat crescută la apoptoza  
mediată de TRA-8, 20% dintre celule fiind ucise de TRA-8, după cultivare peste noapte.  
3 Celulele T bolnave, cu proliferare înaltă, sunt chiar mai susceptibile la apoptoza mediată de  
TRA-8. Celulele B bolnave sunt, de asemenea, mai susceptibile la apoptoza mediată de  
5 TRA-8, comparativ cu altele. Aceste rezultate au indicat faptul că celulele activate T și B sunt  
susceptibile la apoptoza mediată de DR5.

7 **Exemplul 14.** *TRA-8 produce depleția celulelor T activate la șoarecii uman/SCID*

Pentru a determina eficacitatea anticelulă T, *in vivo*, a TRA-8, șoareci NOD/SCID  
9 sunt injectați intravenos cu  $1 \times 10^8$  PMBC uman. În mod normal, celulele T umane din șoarecii  
SCID sunt rapid activate, ca răspuns la stimularea xenogenică. Șoarecii PBMC/SCID umani  
11 sunt injectați intraperitoneal cu 100  $\mu$ g TRA-8 sau cu IgG1 martor din ziua transferului, și se  
repetă zilnic, timp de 3 zile. La cinci zile după transfer, celulele mononucleare se izolează  
13 din splină și se colorează cu anticorp CD3 antiuman, iar populația de limfocite este analizată  
prin analiză citometrică în flux și se determină celulele umane T CD3 pozitive. Aproximativ  
15 30% dintre limfocitele splenice sunt celule T umane, după cum se determină prin colorarea  
CD3 antiuman, la șoarecii martor tratați. Cu toate acestea, doar câteva celule T umane (mai  
17 puțin de 3%) sunt observate printre limfocitele splenice la șoarecii tratați cu TRA-8 (fig. 16).  
Studiul histologic *in situ* a revelat faptul că, în splina șoarecilor martor, celulele T umane sunt  
19 repopulate în splină, și doar câteva celule apoptotice se observă, după cum s-a demonstrat  
prin colorarea TUNEL. În contrast, repopularea cu celule umane viabile T nu se observă în  
21 splina șoarecilor tratați cu TRA-8, ci mai degrabă se observă mai multe celule (fig. 17).  
Aceste rezultate demonstrează faptul că TRA-8 are o activitate celulară anti-T *in vivo*, și  
23 indică utilizarea anticorpilor din invenție pentru tratamentul bolii GVH.

**Exemplul 15.** *Activitatea terapeutică anticancer a TRA-8*

25 **15.1.** *Exprimarea și DR5, funcționarea DR5 în țesuturile și liniile de celule canceroase  
umane*

27 **i.** *Exprimarea DR5 în țesuturile canceroase umane prin colorarea in situ cu TRA-8*

Pentru a determina dacă celulele și țesuturile canceroase exprimă în mod diferențial  
29 niveluri mai înalte de DR5, un grup de țesuturi canceroase umane, incluzând peste 20 de  
cancere de sân, 6 cancere ovariene, 5 cancere de colon și 5 cancere de prostată, se  
31 colorează cu TRA-8, pentru imunochimie. Majoritatea acestor țesuturi canceroase au  
exprimat DR5 detectabil. Nivelurile de exprimare ale DR5, în aceste țesuturi canceroase, au  
33 fost diferite. În general, țesuturile canceroase au exprimat niveluri mai înalte de DR5 decât  
țesuturile neimplicate. În plus, exprimarea DR5 aparent nu este corelată cu mutația p53.

35 **ii.** *Exprimarea și funcționarea DR5 în liniile de celule canceroase umane (tabelul 2)*

La nouă linii de celule de cancer de sân, la trei linii de cancer ovarian, la trei linii de  
37 cancer de colon și la trei linii de cancer de prostată, li s-au examinat exprimarea de suprafață  
a DR5 și susceptibilitatea la apoptoza indusă de TRA-8 *in vitro*. 7 din 9 linii de cancere de  
39 sân, 3 din 3 linii de cancer de colon și 3 din 3 linii de cancer de prostată au exprimat niveluri  
variabile de DR5 de suprafață. Dintre 9 linii de cancer de sân, 3 sunt foarte susceptibile, 3  
41 sunt intermediare și 3 sunt rezistente la apoptoza mediată de TRAIL. Toate liniile de cancer  
ovarian sunt foarte susceptibile. Una din trei linii de cancer de colon este foarte sensibilă,  
43 în timp ce două au o sensibilitate intermediară. Două din trei linii de cancer de prostată au  
sensibilitate intermediară și una este rezistentă.

Exprimarea și funcționarea DR5 în celulele de cancer umane

Linia de celule	Originea	Exprimarea <sup>1</sup>	Susceptibilitatea <sup>2</sup>	
2LMP	Sân	+	++++	3
LCC6	Sân	+++	++++	5
MB468	Sân	+++	+++	
MB231	Sân	++	+++	7
ZR-75-1	Sân	+++	++	
SKBR3	Sân	+	++	9
MB453	Sân	++	+	
BT474	Sân	+	-	11
DY36T2	Sân	-	-	
Caov-3	Ovar	+	++++	13
OVCAR-3	Ovar	++	++++	
Skov-3	Ovar	+	+++	15
WiDR	Colon	+++	++++	
HST29	Colon	++	+++	17
T84	Colon	+	++	
PC3	Prostată	+++	++	19
LnCap	Prostată	+++	+	
Du-145	Prostată	+++	+	21

Notă: <sup>1</sup> determinată prin citometrie în flux, celulele sunt colorate cu 20 µg/ml TRA-8 și comparativ cu anticorpul martor. <sup>2</sup> determinat prin analiza ATPLite. ++++: peste 80% omorâre, +++ între 60 și 80%, ++: omorâre între 40 și 60%, +: omorâre între 20 și 40%, - fără omorâre.

### iii. Citotoxicitatea combinată a TRA-8 cu Adriamicină

În câteva linii de cancer de sân, se examinează efectul Adriamicinei asupra apoptozei induse de TRA-8. Doze mari de Adriamicină au prezentat un efect aditiv. Cu toate acestea, la unele dintre liniile de celule rezistente la TRA-8, doze mici de Adriamicină cresc sinergic apoptoza indusă de TRA-8.

### iv. Activitatea de legare *in vitro* și *in vivo* a TRA-8 la celulele canceroase umane

Utilizând TRA-8 marcat cu radioizotopi, activitatea TRA-8 asupra unei linii de cancer de celule este examinată *in vitro* și *in vivo*, la șoarecii SCID la care s-a implantat tumoarea. Activitatea de legare *in vitro* a celulelor canceroase se estimează ca valoare Kd de 3 nM, care este concordantă cu previziunile noastre, utilizând ELISA, și de cel puțin 50 de ori mai mare decât a TRAIL solubil. *In vivo*, TRA-8 s-a localizat în țesuturile tumorale implantate.

## 15.2. *Terapia leucemiei cronice limfolitice la șoarecii NOD/SCID cu TRA-8*

Leucemia limfolitică cronică este o formă comună de malignitate a celulelor B. Cele mai multe celule B maligne în CLL sunt cu fenotip matur și sunt rezistente la mulți stimuli apoptotici. Sunt examinate exprimarea și funcționarea DR5 în celulele B la cinci pacienți cu CLL. Toți pacienții au avut un număr mare de celule B, care s-au dovedit a fi mai mult de 95% celule CD19+B în PBMC. Comparativ cu celulele B primare, celulele B de CLL ale tuturor pacienților au avut niveluri mai înalte de DR5 de la suprafața celulei și sunt mai susceptibile la apoptoza indusă de TRA-8 *in vivo*. Interesant, celulele CLL B sunt de asemenea sensibile la toxicitatea indusă bisindolmaleimidă VIII (BisVIII). Consecutiv tratamentului cu TRA-8 și BisVIII, aproape 50% dintre celulele B de CLL sunt ucise, în timp ce celulele B normale au rămas fără răspuns (fig. 18). Transferul celulelor B de CLL în șoareci NOD/SCID a avut ca rezultat o repopulare cu celule CD19+B 25...30% a splinei șoarecilor receptori, la cinci zile după transfer. Cu toate acestea, trei doze de tratament cu 100 μg TRA-8 au eliminat complet celulele B de CLL, la patru din cinci pacienți, în splina șoarecilor SCID receptori. Astfel, TRA-8 singur sau împreună cu alte substanțe este activ ca agent terapeutic, pentru leucemia limfolitică cronică.

### **Exemplul 16. Clonarea cADN**

#### 1. *Determinarea secvențelor de aminoacid ale capătului N-terminal al lanțurilor greu și ușor ale TRA-8*

Pentru a obține cADN-urile lanțurilor ușor și greu ale TRA-8, secvențele de aminoacid ale capătului N-terminal al lanțurilor greu și ușor ale TRA-8 și genele clonate ale TRA-8 se determină prin tehnicile cunoscute.

10 μg de soluție care conține anticorpus antiuman TRA-8 DR5 sunt supuse electroforezei în gel de SDS-poliacrilamidă („SDS-PAGE”), utilizând o concentrație a gelului de 12% gr/v, 100 V tensiune constantă, timp de 120 min. După electroforeză, gelul este imersat în tampon de transfer Tris-HCl 25 mM (pH 9,5), 20% metanol, 0,02% vol/vol SDS, timp de 5 min. După acest timp, conținutul proteic al gelului este transferat pe o membrană de difluorură de poliviniliden („membrană de PVDF”); mărimea porilor 0,45 μm; Milipore, Japonia), îmbibată anterior în tamponul de transfer, utilizând un aparat pentru blotting (KS-8451; Marysol), în condiții de tensiune constantă de 10 V, 4°C, timp de 14 h.

După acest timp, membrana PVDF este spălată cu tampon de spălare cu NaCl 25 mM, 10 mM tampon borat sodic (pH 8,0), apoi a fost colorată într-o soluție de colorare (50% vol/vol metanol, 20% vol/vol acid acetic și 0,05% gr/vol Coomassie Brilliant Blue), timp de 5 min, pentru a localiza benzile proteice. Membrana PVDF este apoi decolorată cu metanol apos 90% vol/vol, iar benzile care corespund lanțului greu, banda cu mobilitate scăzută și lanțul greu, banda cu mobilitate mare localizată anterior pe membrana PDVF, sunt excizate și spălate cu apă deionizată.

Secvența aminoacizilor de la capătul N-terminal al lanțurilor ușor și greu este determinată prin metoda automată Edman (Edman, P. et al., (1967), *Eur. J. Biochem.*, 1, 80), utilizând un secvențiator de proteină în fază gazoasă (PPSQ-10; Shimadzu Seisakusyo, K. K.).

Secvența aminoacizilor de la capătul N-terminal al benzii corespunzătoare la lanțul greu este determinată ca fiind:

Glu-Val-Met-Leu-Val-Glu-Ser-Gly-Gly-Gly-Leu-Val-Lys-Pro-Gly-Gly-Ser-Leu-Lys-Leu (SECV ID Nr. 4 din lista de secvențe);

# RO 123525 B1

și cea a benzii corespunzătoare la lanțul ușor este determinată ca fiind:	1
Asp-Ile-Val-Met-Thr-Gln-Ser-His-Lys-Phe-Met-Ser-Thr-Ser-Val-Gly-Asp-Arg-Val-Ser (SECV ID Nr. 5 din lista de secvențe);	3
Compararea acestor secvențe de aminoacizi cu baza de date a secvențelor de aminoacizi ai anticorpilor produși de Kabat et al. (Kabat E. A. et al., 1991, în <i>Sequences of proteins of immunological interest (Secvențe de proteine de interes imunologic)</i> , Vol. II, U. S., Department of Health and Human Services) a revelat faptul că lanțul greu (lanțul γ1) și lanțul ușor (lanțul κ) ale lui TRA-8 aparțin subtipurilor al 3-lea și, respectiv, primului.	7
2. Clonarea cADN	9
Pe baza descoperirilor de mai sus, sunt sintetizați primerii oligonucleotidici, care este de așteptat să hibridizeze cu porțiunile din regiunile 5'-netranslate și cu cele chiar de la capătul regiunilor 3'-translate ale genelor care aparțin subtipurilor șoarece. Apoi, cADN-urile care codifică lanțurile greu și ușor ale lui TRA-8 sunt clonate prin următoarea combinație a revers transcripției și PCR (RT-PCR):	13
a. Matrița	15
ARN-ul total al hibridomului TRA-8 (ATCC Nr. PTA-1428) este extras, utilizând reactivul TRIzol (GIBCO BRL). Matrița pentru reacția PCR a utilizat cADN-ul care este obținut utilizând trusa de sinteză cADN First-Strand (Amersham Pharmacia Biotech) în conformitate cu manualul de instruire furnizat cu trusa.	19
b. Primerii PCR	
Următorii primeri oligonucleotidici se sintetizează pentru PCR:	21
5'-cagcactgaa cacggacccc-3' (H5NCS1: SECV ID Nr. 6 din lista de secvențe);	
5'-aaaggaatt tattgagaag-3' (H5NCS2: SECV ID Nr. 7 din lista de secvențe);	23
5'-cctcaccatg aacttcgggc-3' (H5SS1: SECV ID Nr. 8 din lista de secvențe);	
5'-ctgtgtatg cacatgagac-3' (H5SS2: SECV ID Nr. 9 din lista de secvențe);	25
5'-gaagtgatgc tggaggagtc-3' (H5CS1: SECV ID Nr. 10 din lista de secvențe);	
5'-agtgtgaagt gatgctggtg-3' (H5CS2: SECV ID Nr. 11 din lista de secvențe);	27
5'-ttaccagga gagtgggaga g-3' (H3CR: SECV ID Nr. 12 din lista de secvențe);	
5'-tgagagaca gtgaccagag-3' (H3VR: SECV ID Nr. 13 din lista de secvențe);	29
5'-tgctcaggac cagcatgggc-3' (L5NCS1: SECV ID Nr. 14 din lista de secvențe);	
5'-aagacattt ggattctaac-3' (L5NCS2: SECV ID Nr. 15 din lista de secvențe);	31
5'-tatcatgaag tctttgatg-3' (L5SS1: SECV ID Nr. 16 din lista de secvențe);	
5'-gatggagaca cattctcagg-3' (L5SS2: SECV ID Nr. 17 din lista de secvențe);	33
5'-gacattgtga tgaccagtc-3' (L5CS: SECV ID Nr. 18 din lista de secvențe);	
5'-ttaactca ttctgtga-3' (L3CR: SECV ID Nr. 19 din lista de secvențe);	35
și	
5'-gactgggtca tcacaatgc-3' (LCSR: SECV ID Nr. 20 din lista de secvențe).	37
Dacă nu este altfel specificat, toate oligonucleotidele din aceste exemple sunt sintetizate de către Pharmacia Biotech. Toate oligonucleotidele sunt depozitate la -20°C, după ce sunt dizolvate în apă distilată.	39
c. Reacția PCR	41
Compoziția soluției reacției PCR:	
- matrița cADN 5 μl din totalul de 33 μl de reacție;	43
- primerul DR5p1 . . . . . 10 pmol;	
- primerul DR5p2 . . . . . 10 pmol;	45

# RO 123525 B1

- 1 - tamponul concentrat PCR 10 x (furnizat cu trusa) ..... 10 µl;  
- dNTP-uri (fiecare 2,5 mM) ..... 4 µl; și  
3 - polimeraza Taq (Promega) ..... 5 unități.

5 Se adaugă apă distilată sterilă, la soluție, la un volum total de 100 µl. Dacă nu este altfel specificat, dNTP-urile sunt un amestec echimolar de dATP, dCTP, dGTP și dTTP (2,5 mM fiecare).

7 Reacția PCR este condusă după cum urmează. Soluția este mai întâi încălzită la 94°C, timp de 2 min, după care se repetă de 40 de ori un ciclu de încălzite la 94°C, timp de 30 s, la 52°C, timp de 1 min și la 72°C, timp de 3 min. După efectuarea acestei proceduri, soluția de reacție este încălzită la 72°C, timp de 10 min.

11 Fragmentele de ADN amplificate, astfel obținute, sunt separate pe gel de agaroză care conține 0,25 µg/ml bromură de etidiu. Benzile determinate ca conținând fragmentele de ADN dorite sunt îndepărtate prin tăiere, utilizând o lamă de ras, iar ADN-ul este recuperat de acolo, utilizând o trusă Gene Clean (BIO101). Fragmentul ADN este clonat, utilizând vectorul pGEM-T Easy (Promega). Acest lucru este realizat după cum urmează:

17 Fragmentul de ADN recuperat din soluția de reacție PCR, împreună cu 50 ng de vector pGEM-T Easy (furnizat împreună cu trusa), este amestecat cu 1 µl de 10 x tampon de reacție cu ligază (6 mM Tris-HCl (pH 7,5), 6 mM clorură de magneziu, 5 mM clorură de sodiu, 7 mM β-mercaptoetanol, 0,1 mM ATP, 2 mM DTT, 1 mM spermidină și 0,1 mg/ml albumină serică bovină), la care s-au adăugat 4 unități de T4 ADN ligază (1 µl). Volumul total al amestecului este ajustat la 10 µl cu apă deionizată sterilă și soluția de ligaze este incubată la 14°C, timp de 15 h. După acest timp, 2 µl de soluție de reacție cu ligază se adaugă la 50 µl de tulpină de *E. coli* JM109, competentă (furnizată împreună cu trusa și adusă la competență în conformitate cu manualul de utilizare), la care s-au adăugat 2 µl β-mercaptoetanol 0,5 M, iar amestecul rezultat este menținut pe gheață, timp de 30 min, apoi la 42°C, timp de 30 s și din nou pe gheață, timp de 5 min. Apoi, se adaugă, la cultură, 500 µl de mediu care conține 2% v/v triptonă, 0,5% gr/v extract de drojdie, 0,05% gr/v clorură de sodiu, clorură de potasiu 2,5 mM, clorură de magneziu 1 mM, și glucoză 20mM (la care se va face referire de acum înainte ca mediu "SOC"), iar amestecul se incubează timp de o oră, la 37°C, cu agitare. După acest timp, cultura este răspândită pe o placă de agar cu bulion L (conține 1% v/v triptonă, 0,5% gr/v extract de drojdie, 0,5% gr/v clorură de sodiu, 0,1% gr/v glucoză, și 0,6% gr/v bacto-agar (Difco)), care conține 100 µg/ml. Coloniile rezistente la ampicilină, care apar pe placă, sunt selectate și răzuite cu o ansă de transfer din platină și se cultivă în mediu cu bulion L, care conține 100 µg/ml ampicilină, la 37°C, peste noapte, agitând la 200 rpm. După incubare, celulele sunt recoltate prin centrifugare, celule din care se prepară ADN plasmidian prin metoda alcalină. Plasmida obținută este desemnată ca plasmidă pH62 pentru lanțul greu al TRA-8 sau pL28 pentru lanțul ușor al TRA-8. Tulpinile de *E. coli* transformante, purtătoare ale acestui plasmid, desemnate ca *E. coli* JM109/pH62 și *E. coli* JM109/pL28, au fost depozitate în Organismul Depozitar al Brevetului Internațional, Institutul Național de Știință și Tehnologie Industrială Avansată, 1-1, Higashi 1 chome Tsuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japonia, în 20 aprilie 2001, în conformitate cu Tratatul de la Budapesta pentru Depozitele de Microorganisme, și au primit numerele de acces FERM BP-7560 și, respectiv, FERM BP-7561. Secvențele de nucleotide, ale acestor ADN-uri care codifică lanțul greu și lanțul ușor al TRA-8, sunt confirmate prin metoda dideoxi (F. S. Sanger et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 74:5463-5467), utilizând analizorul 3700 DNA (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems, Japonia).

# RO 123525 B1

Secvențele de nucleotide ale lanțurilor greu și ușor ale TRA-8 sunt date ca SECV ID nr. 21 și, respectiv, nr. 22, din Lista de Secvențe. Secvența de aminoacizi a lanțurilor greu și ușor ale TRA-8 este dată ca SECV ID nr. 23 și, respectiv, nr. 24, din Lista de Secvențe. Secvențele de aminoacid de la capătul N-terminal al lanțurilor greu și ușor ale TRA-8, stabilite mai sus, se potrivesc perfect. Mai mult, când secvențele de aminoacizi ale lanțului greu și ușor se compară cu baza de date a secvențelor de aminoacizi ale anticorpilor, se stabilește că, pentru lanțul greu, nucleotidele de la nr. 58 la 414, din SECV ID nr. 21, au constituit regiunea variabilă, în timp ce nucleotidele de la nr. 415 la 1392, din SECV ID nr. 21, au constituit regiunea constantă. Pentru lanțul ușor, nucleotidele de la nr. 64 la 387, din SECV ID nr. 22, au constituit regiunea variabilă, în timp ce nucleotidele de la nr. 388 la 702, din SECV ID nr. 22, au constituit regiunea constantă. Locațiile și secvențele CDR-urilor sunt de asemenea elucidate, comparând omologiile cu baza de date. Secvențele de aminoacizi ale CDR1, CDR2 și CDR3 ale lanțului greu al TRA-8 sunt prezentate în SECV ID nr 25, nr. 26 și, respectiv, nr. 27. Secvențele de aminoacizi ale CDR1, CDR2 și CDR 3 ale lanțului greu al TRA-8 sunt prezentate în SECV ID nr. 28, nr. 29 și, respectiv, nr. 30.

## **Exemplul 17. Proiectarea unei versiuni umanizate a anticorpului TRA-8**

### **1. Modelarea moleculară a regiunii variabile a TRA-8**

Modelarea moleculară a regiunii variabile a TRA-8 este realizată prin metoda cunoscută în general ca modelare de omologie (*Methods in Enzymology*, 203, 121-153, 1991). Secvențele primare ale regiunilor variabile ale imunoglobulinei umane, înregistrate în Banca de Date pentru Proteine (*Nuc. Acid. Res.*, 28, 235-242, 2000), pentru care structurile tridimensionale, derivate din analiza cristalografică cu raze X, sunt disponibile, se compară cu regiunile cadru ale TRA-8, determinate mai sus. Ca rezultat, 1NCD și 1HIL sunt alese ca având cea mai înaltă omologie a secvențelor cu regiunile cadru ale lanțurilor ușor și, respectiv, greu, ale TRA-8. Structurile tridimensionale ale regiunilor cadru sunt generate prin combinarea coordonatelor 1NCD și 1HIL, care corespund lanțurilor greu și ușor ale TRA-8, pentru a obține "modelul cadru". Utilizând clasificarea definită de Clothia et al., CDR-urile TRA-8 se clasifică după cum urmează: CDRL<sub>1</sub>, CDRL<sub>2</sub>, CDRH<sub>1</sub> și CDRH<sub>2</sub> care aparțin claselor canonice 2, 1, 1, respectiv, 3, în timp ce CDRL<sub>3</sub> nu aparține vreunei clase canonice specifice. Buclele CDR ale CDR<sub>1</sub>, CDRL<sub>2</sub>, CDRH<sub>1</sub> și CDRH<sub>2</sub> sunt fixate în conformațiile inerente claselor canonice ale lor și sunt integrate în modelul cadru. Lui CDRL<sub>3</sub> îi este desemnată conformația clusterului 8A, în conformitate cu clasificarea lui Thornton et al. (*J. Mol. Biol.*, 263, 800-815, 1996), și CDRH<sub>3</sub> este clasificată în k(8)C, utilizând regula H3 (scrisoarea FEBS 455, 188-197, 1999). Apoi conformațiile reprezentative pentru CDRL<sub>3</sub> și CDRH<sub>3</sub> sunt integrate în modelul cadru.

În final, se efectuează calcule de energie, pentru a elimina legăturile interatomice nefavorabile, pentru a obține un model molecular probabil al regiunii variabile a TRA-8 în termeni de energie. Procedura de mai sus se realizează, utilizând sistemul comun de modelare moleculară ABM (Oxford Molecular Limited, Inc). Pentru modelul molecular obținut, acuratețea structurii este evaluată în continuare, utilizând softul PROCHECK (*J. Appl. Cryst.* (1993), 26, 283-291).

### **2. Proiectarea secvențelor de aminoacizi pentru TRA-8 umanizat**

Construcția anticorpilor TRA-8 umanizați se realizează prin metoda cunoscută în general ca grefare CDR (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 86, 10029-10033, 1989). Anticorpul

# RO 123525 B1

1 acceptor este ales pe baza omologiei dintre aminoacizii din regiunea cadru. Secvențele  
regiunii cadru din Tra-8 se compară cu toate secvențele de cadru din baza de date Kabat de  
3 secvențe de aminoacizi ale anticorpilor (*Nuc. Acid Res.*, 29, 205-206, 2001). Ca rezultat,  
anticorpul mAB58'CL este selectat ca acceptor datorită celei mai înalte omologii a secvenței,  
5 80%, a regiunii cadru. Resturile de aminoacid din regiunea cadru ale mAB58'CL sunt aliniate  
cu cele pentru TRA-8 și sunt identificate pozițiile unde se utilizează aminoacizi diferiți.  
7 Locația acelor resturi este analizată, utilizând modelul tridimensional al TRA-8, construit mai  
sus, și resturile donoare, care ar trebui să fie grefate pe acceptor, sunt alese pe baza  
9 criteriului dat de Queen et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 86, 10029-10033, 1989).  
Secvențele de TRA-8 umanizat sunt construite așa cum se descrie în următorul exemplu,  
11 prin transferarea mai multor resturi donor într-un anticorp acceptor, mAb58'CL.

**Exemplul 18.** *Construcția unui vector de expresie pentru lanțul greu al anticorpului  
13 umanizat*

1. *Construcția plasmidei purtătoare a ADN-ului regiunii variabile a lanțului greu al  
15 TRA-8 umanizat*

Pentru a determina activitatea TRA-8 umanizat, plasmida purtătoare a lanțului greu  
17 al TRA-8 umanizat este construită după cum urmează. Cu toate acestea, se apreciază că  
umanizarea lui TRA-8 nu este limitată la aceste exemple.

19 Așa cum este prezentat în SECV ID Nr. 31 a listei de secvențe, umanizarea secven-  
țelor de aminoacizi ale lanțului greu al anticorpului DR5 antiuman de șoarece TRA-8 a  
21 determinat înlocuirea celui de-al 13-lea aminoacid (lizina), celui de-al 19-lea aminoacid  
(lizina), celui de-al 40-lea aminoacid (treonina), celui de-al 42-lea aminoacid (acidul  
23 glutamic), celui de-al 44-lea aminoacid (arginina), celui de-al 84-lea aminoacid (serina), celui  
de-al 88-lea aminoacid (serina), celui de-al 93-lea aminoacid (metionina), celui de-al 114-lea  
25 aminoacid (treonina), celui de-al 115-lea aminoacid (leucina) cu glutamina, arginina, alanina,  
glicina, glicina, asparagina, alanina, valina, leucina și respectiv valina.

27 Plasmida purtătoare a regiunii variabile a lanțului greu al TRA-8 umanizat  
codificatoare de ADN (SECV ID Nr. 31 a listei de secvențe) este construită după cum  
29 urmează.

PCR este utilizată pentru a construi următoarele secvențe ADN, fiecare dintre  
31 acestea cuprinzând cele descrise mai sus.

Sunt sintetizate următoarele 12 oligonucleotide:

33 5'- ttggataagc ttggcttgac ctccatgg gatggagctg tatcatcctc ttcttgtag caacagctac  
aggtgtccac -3' (A; SECV ID Nr. 32);

35 5'- tctgaagtaa tgctggtgga gtctggggga ggcttagtac agcctggagg gtcctgaga ctctcctgtg  
cagcctctgg -3' (B; SECV ID Nr. 33);

37 5'- attcacttc agtagttatg taatgtcttg gttcggcag gcaccagga aggtctgga gtgggtgca  
accattagta -3' (C; SECV ID Nr. 34);

39 5'- gtggtgtag ttacacctac tatccagaca gtgtgaagg cggattcacc atctccagag acaatgcca  
gaacacctg -3' (D; SECV ID Nr. 35);

41 5'- tatctgcaa tgaacagtct gagagcagag gacacggctg ttattactg tgcaagaagg ggtgactcta  
tgattacgac -3' (E; SECV ID Nr. 36);

43 5'- ggactactgg ggccaaggga cctggtcac agtctctca gcctccacc aagggccat cggtc -3' (F;  
SECV ID Nr. 37);

# RO 123525 B1

5'- ctaccaagaa gaggatgata cagctccatc ccatggtgag gtcaagccaa gcttatccaa -3' (G; SECV ID Nr. 38);	1	
5'- tctcaggac cctccaggct gtactaagcc tccccagac tccaccagca ttacttcaga gtggacacct gtagctgttg -3' (H; SECV ID Nr. 39);	3	
5'- tccagaccct tcctgtgtgc ctgccgaacc caagacatta cataactact gaaagtgaat ccagaggctg cacaggagag -3' (I; SECV ID Nr. 40);	5	
5'- ctctggagat ggtgaatcgg cccttcacac tgtctggata gtaggtgtaa ctaccaccac tactaatggt tgcaaccac -3' (J; SECV ID Nr. 41);	7	
5'- ccttcttgca cagtaataaa cagccgtgtc ctctgtctc agactgttca ttgcagata cagggtgttc ttggcattgt -3' (K; SECV ID Nr. 42);	9	
5'- gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtgacc agggtcctt ggccccagta gtccgtcgta atcatagat cacc -3' (L; SECV ID Nr. 43).	11	
Următorii 2 primeri PCR sunt sintetizați așa cum s-a descris mai sus:	13	
5'- ttggataagc ttggcttgac -3' (P1; SECV ID Nr. 44); și		
5'- gaccgatggg cccttggtgg a -3' (P2; SECV ID Nr. 45).	15	
Sinteza ADN-ului care codifică un lanț polipeptidic care conține o secvență de semnal de secreție, o regiune variabilă a lanțului greu al TRA-8 umanizat și cele 8 resturi de aminoacid de la capătul N-terminal al regiunii IgG-CH1 este realizată, utilizând o combinație a PCR.	17	
Fragmentul ADN este preparat după cum urmează.	19	
Compoziția soluției de reacție PCR:		
- oligonucleotida A . . . . .	10 pmol;	21
- oligonucleotida B . . . . .	10 pmol;	
- oligonucleotida C . . . . .	10 pmol;	23
- oligonucleotida D . . . . .	10 pmol;	
- oligonucleotida E . . . . .	10 pmol;	25
- oligonucleotida F . . . . .	10 pmol;	
- oligonucleotida G . . . . .	10 pmol;	27
- oligonucleotida H . . . . .	10 pmol;	
- oligonucleotida I . . . . .	10 pmol;	29
- oligonucleotida J . . . . .	10 pmol;	
- oligonucleotida K . . . . .	10 pmol;	31
- oligonucleotida L . . . . .	10 pmol;	
- oligonucleotida primer P1 . . . . .	2 μM;	33
- oligonucleotida primer P2 . . . . .	2 μM;	
- tampon 10 X Pyrobest II . . . . .	10 μl;	35
- dNTP mix . . . . .	8 μl;	
- ADN polimerază Pyrobest II . . . . .	0,5 μl și	37
- apă redistilată la un volum final de 50 μl.		
Reacția PCR este condusă după cum urmează. Soluția este mai întâi încălzită la 94°C, timp de 5 min, după care un ciclu de încălzire la 98°C, timp de 10 s, la 55°C, timp de 30 s și la 72°C, timp de un minut, care este repetat de 7 ori. După efectuarea acestei proceduri, soluția de reacție este încălzită la 72°Cn timp de 15 min.	39	
	41	
Se adaugă un volum egal de fenol-cloroform (50% v/v fenol saturat cu apă, 48% v/v cloroform, 2% v/v alcool izoamilic) la 200 μl din fiecare dintre produșii PCR și se amestecă viguros, timp de un minut. După acest interval de timp, amestecul este centrifugat la 10000 x g	43	
	45	

# RO 123525 B1

1 și stratul apos este recuperat și amestecat cu un volum egal de cloroform-alcool izoamilic  
(96% v/v cloroform și 4% v/v alcool izoamilic), care este din nou amestecat viguros la  
3 10000 x g și stratul apos este recuperat. Seria de etape expusă în acest paragraf este  
denumită de acum înainte „extracția fenolului”).

5 Se efectuează apoi precipitarea din etanol a stratului apos recuperat. Așa cum este  
utilizată și denumită aici, „precipitarea din etanol” constă în adăugarea, cu amestecare, a  
7 unei zecimi de volum de acetat de sodiu 3M (pH 5,2) și a 2,5 volume de 100% etanol la  
soluția care trebuie tratată, și înghețarea amestecului, utilizând gheață uscată. Amestecul  
9 rezultat este apoi centrifugat la 10000 X g, pentru a recupera ADN-ul ca precipitat.

După extracția cu fenol și precipitarea din etanol, precipitatul de ADN rezultat este  
11 uscat în vid, dizolvat într-un minimum de apă redistilată, și separat prin electroforeză în gel  
de agaroză 3%. După electroforeză, gelul este colorat cu 1 μg/ml soluție apoasă de bromură  
13 de etidiu, pentru a permite detectarea ADN în lumină UV. Banda ADN corespunzătoare ADN  
TRA-8 umanizat este tăiată, utilizând o lamă de ras și este eluată din gel, utilizând trusa  
15 GeneClean Spin (BIO 101, CA, SUA). După extracția cu fenol, ADN-ul eluat este apoi  
concentrat prin centrifugare la 7500 X g, urmată de precipitare din etanol și, în final, se  
17 dizolvă în 5 μl apă distilată.

Fiecare ADN extras rezultat se donează, utilizând vectorul pGEM-T Easy (Promega),  
19 după cum urmează:

- 21 - fragment de ADN recuperat din reacția PCR ..... 5 μl;
- tampon Taq polimerază ..... 10 X 1 μl;
- amestec dNTP ..... 1 μl;
- 23 - Taq polimerază (5 unități/ml) ..... 1 μl și
- apă redistilată la un volum final de 10 μl.

25 După ce fiecare dintre soluțiile de mai sus reacționează la 70°C, timp de 30 min,  
fiecare soluție de ADN și vector pGEM-T Easy sunt legate, utilizând trusa DNA Ligation  
27 Versiunea 2.0 (Takara Shuzo Co., Ltd), utilizând protocolul fabricantului.

După 4 h de incubare la 15°C, 2 μl de soluție de reacție incubată se amestecă cu  
29 100 μl de tulpină de *E. coli* JM109 competentă la densitatea celulară de 1-2 x 10<sup>9</sup> celule/ml  
(Takara Shuzo Co., Ltd) și amestecul este menținut pe gheață, timp de 30 min, apoi la 42°C,  
31 timp de 30 s și din nou pe gheață, timp de un minut. Apoi se adaugă la amestec 500 μl de  
mediu SOC (2% v/v triptonă, 0,5% gr/v extract de drojdie, 0,05% gr/v clorură de sodiu, 2,5  
33 mM gr/v clorură de potasiu, clorură de magneziu 1 mM și glucoză 20 mM), care este incubat  
timp de încă o oră, agitând. Tulpinile transformante sunt apoi izolate și se prepară ADN  
35 plasmidian din tulpini, după descrierea din *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*.  
Secvențele de nucleotide ale acestor ADN-uri care codifică lanțul greu al TRA-8 umanizat,  
37 sunt confirmate prin metoda dideoxi (F. S. Sanger et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. SUA*,  
74:5463-5467), utilizând analizorul 3700 DNA (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied  
39 Biosystems, Japonia).

Plasmidele rezultate se numesc pHB14 (plasmida care poartă cADN-ul care  
41 codifică lanțul greu al TRA-8 umanizat). Tulpina de *E. coli* transformantă, care poartă  
această plasmidă, desemnată *E. coli* JM109/pHB14, a fost depozitată la Organismul  
43 Internațional Depozitar al Brevetelor, Institutul Național pentru Știință și Tehnologie  
Avansată, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japonia, în 20 aprilie  
45 2001, în acord cu Tratatul de la Budapesta pentru Depozitele de Microorganisme, și i-a fost  
acordat numărul de acces FERM BP-7556.

# RO 123525 B1

2. <i>Construirea plasmidelor de expresie care poartă AND-ul regiunii variabile a lanțului greu al TRA-8 umanizat</i>	1
Vectorii de expresie recombițați pentru celulele animale sunt construiți prin inserarea ADN-ului care codifică lanțul greu al TRA-8 umanizat (clonat în cele de mai sus), după cum urmează.	3
1 µg de plasmidă pSRHHH3 (cererea de brevet european EP 0-909-816-A1), care poartă regiunea variabilă a lanțului greu al regiunii variabile a anticorpului monoclonal anti-Fas umanizat HFE7A și ADN-ul genomic al regiunii constante a IgG1 umane, un vector de expresie pentru celulele de mamifer, este digerat cu enzimele de restricție HindIII și Apal, și se separă prin electroforeză în gel de agaroză 3%. După electroforeză, gelul se colorează cu soluție apoasă 1 µg/ml bromură de etidiu, pentru a permite detectarea ADN în lumină UV. Benzile de ADN ale vectorului, care conțin ADN-ul genomic al regiunii constante ale IgG1 umane fără regiunea variabilă a lanțului greu al HFE7A umanizat, sunt tăiate, utilizând o lamă de ras și se eluează din gel, utilizând trusa GeneClean Spin Kit (BIO 101, CA, SUA)). După extracția cu fenol, ADN-ul eluat este apoi concentrat prin centrifugare la 7500 X g, urmată de precipitare din etanol și, în final, dizolvare în 5 µl de apă distilată, și apoi defosforilare, utilizând CIP. Plasmida defosforilată, digerată (100 ng) este legată cu 1 µg de fragment pHB14 de ADN, care conține ADN-ul care codifică regiunea variabilă a lanțului greu al TRA-8 umanizat, care a fost de asemenea digerată cu HindIII și Apal, utilizând o trusă DNA Ligation, versiunea 2.0 (Takara Shuzo Co., Ltd). Amestecul de legare este apoi utilizat pentru a transforma <i>E. coli</i> JM109, care este apoi pusă pe plăci de agar LB, care conțin 50 µg/ml ampicilină.	5
Transformanții obținuți prin această metodă sunt cultivați în 2 ml mediu LB lichid, care conține 50 µg/ml ampicilină la 37°C, peste noapte, iar ADN-ul plasmidian se extrage ulterior, din cultura rezultată, prin metoda alcalină SDS.	7
ADN-ul plasmidian extras este digerat cu HindIII și Apal, și este supus electroforezei în gel de agaroză 3% gr/v, pentru a confirma prezența sau absența insertului de ADN care codifică regiunea variabilă a lanțului greu al TRA-8 umanizat. Inserția și orientarea fragmentului de ADN dorit în vector sunt confirmate prin secvențierea ADN-ului, utilizând un analizor de secvențe de gene (analizorul de ADN ABI Prism 3700; Applied Biosystems). Plasmida de expresie, rezultată, care poartă cADN care codifică lanțul greu al TRA-8 umanizat, este desemnată pHB14-1.	9
<b>Exemplul 19. Construcția unui vector de expresie pentru lanțul ușor al anticorpului umanizat</b>	11
1. <i>Construirea vectorilor pentru lanțurile ușoare ale versiunilor umanizate ale anticorpului TRA-8</i>	13
După cum se arată în SECV ID nr. 46 din Lista de Secvențe, în umanizarea secvenței de aminoacizi a lanțului ușor al anticorpului de șoarece DR5 antiuman TRA-8, aminoacidul 8 (histidina), aminoacidul 9 (lizina), aminoacidul 10, (fenilalanina), aminoacidul 11 (metionina), aminoacidul 13 (treonina), aminoacidul 20 (serina), aminoacidul 42 (glutamina), aminoacidul 43 (serina), aminoacidul 60 (acidul aspartic), aminoacidul 63 (treonina), aminoacidul 77 (asparagina), aminoacidul 78 (valina), aminoacidul 80 (serina), aminoacidul 83 (leucina), aminoacidul 85 (acidul aspartic), aminoacidul 87 (fenilalanina), și aminoacidul 99 (glicina), aminoacidul 103 (leucina) și aminoacidul 108 (alanina) de la capătul N-terminal	15

# RO 123525 B1

1 al secvenței de aminoacizi a lanțului ușor al TRA-8 sunt înlocuiți cu prolină, serină, serină,  
leucină, alanină, treonină, lizină, alanină, serină, serină, serină, leucină, prolină, fenilalanină,  
3 treonină, tirozină, glutamină, valină și respectiv treonină. Secvența rezultată este desemnată  
LM2.

5 Plasmidele de expresie, care poartă acest tip de secvențe de aminoacizi ale lanțului  
 greu umanizat ale anticorpului antiuman DR5 TRA-8, se construiesc după cum urmează.

7 1. *Sinteza primerilor pentru prepararea regiunilor variabile și constante ale lanțului  
ușor al TRA-8 umanizat*

9 ADN-ul care codifică lanțul polipeptidic LM2 (SECV ID nr. 46 din Lista de Secvențe),  
fiecare dintre acestea fiind o fuziune dintre regiunea variabilă a lanțului ușor al anticorpului  
11 anti-DR5 umanizat TRA-8 și regiunea constantă a lanțului ușor al Ig umane (lanțul  $\kappa$ ) sunt  
sintetizate prin utilizarea de combinații ale PCR.

13 Suplimentar față de 7AL1P (SECV ID Nr. 47) și 7ALCN (SECV ID Nr. 48), se  
sintetizează pentru PCR următorii primeri oligonucleotidici:

15 5' - gtccccaca gatgcagaca aagaactgg agattgggtc atcacaatgt caccagtga -3'  
(HKSPR11; SECV ID Nr. 49);

17 5' - ccaagttctt tgtctgcatc agtaggagac aggtcacca tcacctgc - 3' (HKCDF11; SECV ID  
Nr. 50);

19 5' - agtgtgccgg gtggatgcc agtaaactcag tagttagga gcttccctg gtttctg -3' (HKCDR12;  
SECV ID Nr. 51);

21 5' - tgggcatcca cccggcacac tggggtcca agcaggttta gtggcagt -3' (HKCDF22; SECV ID  
Nr. 52);

23 5' - ataactacta tattgctgac agtaataggt tgcaaatcc tccggctgca gactagagat ggt -3'  
(HKCDR22; SECV ID Nr. 53); și

25 5' - cagcaatata gcagctatcg gacgttcggt caaggcacca agtggaat caaacggact gtg -3'  
(HKCF12; SECV ID Nr. 54).

27 2) Construirea plasmidei pCR3.1/M2-1 (clonarea lanțului ușor al TRA-8 umanizat)

Fragmentul ADN-LM2, conform definiției din SECV ID nr. 55 din Lista de Secvențe,  
29 care codifică secvența de aminoacizi conform definiției din SECV ID nr. 46, a aceluiași, se  
prepară prin realizarea PCR în 2 etape, se inserează într-un vector plasmidian și se clonează  
31 în *E. coli*.

#### a. Prima etapă a PCR

33 Fragmentul LM2-F1-ADN, care codifică o secvență de semnal de secreție și o  
porțiune a regiunii FRL<sub>1</sub>, cu un situs de clivaj al enzimei de restricție Hind III, adăugat la  
35 capătul 5', se prepară în următoarele condiții: plasmidele matrită, pHSGHM17 și pSRPDHH,  
se obțin urmând descrierea din cererea de brevet european **EP 0909816 A1**.

37 Compoziția soluției de reacție:

- ADN-ul plasmidei pHSGHM17 (cererea de brevet european **EP 0909816 A1**)..25ng;

39 - primer oligonucleotidic 7AL1P ..... 50 pmoli;

- primer oligonucleotidic HKSPR11 ..... 50 pmoli;

41 - cocteil de dNTP-uri ..... 5  $\mu$ l;

- tampon 10xPCR ..... 5  $\mu$ l;

43 - ADN polimerază ampliTaQ (PerkinElmer) ..... 2,5 unități.

# RO 123525 B1

Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, este ajustată la un volum final de 50 $\mu$ l, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.	1
Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C timp de 2 min, care se repetă de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.	3
Fragmentul ADN-ului LM2-F2, care codifică o porțiune a FRL <sub>1</sub> , CDRL <sub>1</sub> , FRL <sub>2</sub> și CDRL <sub>2</sub> , se prepară în următoarele condiții:	5
Compoziția soluției de reacție:	7
- ADN plasmidian pL28 . . . . .	25 ng; 9
- primer oligonucleotidic HKCDF11 . . . . .	50 pmoli; 11
- primer oligonucleotidic HKCDF12 . . . . .	50 pmoli; 11
- cocteil de dNTP-uri . . . . .	5 $\mu$ l; 13
- tampon 10xPCR . . . . .	5 $\mu$ l; 13
- ADN polimerază ampliTaq . . . . .	2,5 unități. 15
Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, se ajustează la un volum final de 50 $\mu$ l, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.	15
Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C, timp de 2 min, care se repetă de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.	17
Fragmentul ADN-ului LM2-F3, care codifică o porțiune a CDRL <sub>2</sub> , FRL <sub>3</sub> și o parte a CDRL <sub>3</sub> , se prepară în următoarele condiții:	19
Compoziția soluției de reacție:	21
- ADN-ul plasmidei pSRPDHH (cererea de brevet european EP 0909816 A1)..	25 ng; 23
- primer oligonucleotidic HKCDF22 . . . . .	50 pmoli; 25
- primer oligonucleotidic HKCDR22 . . . . .	50 pmoli; 25
- cocteil de dNTP-uri . . . . .	5 $\mu$ l; 27
- tampon 10xPCR . . . . .	5 $\mu$ l; 27
- ADN polimerază ampliTaq . . . . .	2,5 unități. 29
Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, se ajustează la un volum final de 50 $\mu$ l, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.	29
Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C, timp de 2 min, care se repetă de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.	31
Fragmentul ADN-ului LM2-F4, care codifică CDRL <sub>3</sub> , FRL <sub>4</sub> și regiunea constantă cu un situs de clivaj al enzimei de restricție EcoRI, adăugat la capătul 3', se prepară în următoarele condiții:	33
Compoziția soluției de reacție:	35
- ADN-ul plasmidului pSRPDHH . . . . .	25 ng; 37
- primer oligonucleotidic HKCDF12 . . . . .	50 pmoli; 39
- primer oligonucleotidic 7ALCN . . . . .	50 pmoli; 39
- cocteil de dNTP-uri . . . . .	5 $\mu$ l; 41
- tampon 10xPCR . . . . .	5 $\mu$ l; 41
- ADN polimerază ampliTaq . . . . .	2,5 unități. 43
Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, se ajustează la un volum final de 50 $\mu$ l, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.	45

# RO 123525 B1

1 Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește  
într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C, timp de  
3 2 min, care se repetă de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.

5 Fragmentele de ADN amplificate după PCR se separă prin electroforeză în gel de  
poliacrilamidă 5%. Benzile de ADN respective, astfel detectate, sunt excizate cu o lamă de  
ras.

## 7 *b. A doua etapă a PCR*

9 ADN-ul LM2, în care mai sus descriși ADN LM2-F1, ADN LM2-F2, ADN LM2-F3 și  
ADN LM2-F4 sunt fuzionați, se prepară în următoarele condiții:

Compoziția soluției de reacție:

- 11 - fragmentul gel de ADN-LM2-F1 preparat în prima etapă a PCR;
- fragmentul gel de ADN-LM2-F2 preparat în prima etapă a PCR;
- 13 - fragmentul gel de ADN-LM2-F3 preparat în prima etapă a PCR;
- fragmentul gel de ADN-LM2-F4 preparat în prima etapă a PCR;
- 15 - primerul oligonucleotidic 7AL1P ..... 50 pmoli;
- primerul oligonucleotidic 7ALCN ..... 50 pmoli;
- 17 - cocteil de dNTP-uri ..... 5 μl;
- tampon 10xPCR ..... 5 μl;
- 19 - ADN polimerază ampliTaq ..... 2,5 unități.

21 Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, se ajustează la un volum final de  
50 μl, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.

23 Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește  
într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C, timp de  
2 min, care se repetă de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.

25 Fragmentul de ADN-LM2, astfel preparat, se inserează în plasmida pCR3.1DNA,  
utilizând trusa Eukaryotic TA Cloning (Invitrogen), urmând protocolul fabricantului și se  
27 introduce în *E. coli* TOP10F' competentă, conținută în trusă. Secvențele de nucleotide, ale  
acestor ADN-uri care codifică lanțul ușor al TRA-8 umanizat, sunt confirmate prin metoda  
29 dideoxi (F. S. Sanger et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463-5467) utilizând  
analizorul 3700 DNA (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems, Japonia).

31 Plasmidele rezultate se numesc pCR3.1/M2-1 (plasmida care poartă cADN-ul care  
codifică regiunea variabilă a lanțului ușor al TRA-8 umanizat și o regiune constantă a lanțului  
33 ușor al Ig umane).

35 Plasmida pCR3.1/M2-1, care conține fragmentul de ADN LM2, este digerată cu  
enzimele de restricție Hind III și EcoR I.

37 1 μg de ADN al plasmidei de clonare pHSG399 este digerat cu enzimele de restricție  
Hind III și EcoR I și apoi se defosforilează cu CIP. Fragmentele defosforilate de ADN  
pHSG399 și de ADN al LM2, care au fost digerate cu enzimele de restricție Hind III și EcoR  
39 I, se leagă, utilizând trusa DNA Ligation, versiunea 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd). Apoi, *E. coli*  
DH5α este retransformată cu ADN legat și este împrăștiată pe un mediu de agar care  
41 conține IPTG 0,1 mM, 0,1% X-Gal și 50 μg/ml cloramfenicol (concentrații finale).  
Transformanții albi, obținuți, se cultivă în mediu lichid LB, care conține 50 μg/ml  
43 cloramfenicol, și ADN-ul plasmidian este extras din cultura rezultată, în conformitate cu  
metoda alcalin-SDS. ADN-ul plasmidian extras este digerat cu Hind III și EcoR I, și apoi este  
45 selectată o clonă purtătoare de fragment LM2-ADN, prin electroforeză în gel de agaroză 1%.

# RO 123525 B1

Ca rezultat al procedurii de mai sus, se obține plasmida pHSG/M2-1-4, purtătoare a unui fragment de fuziune al regiunii variabile a lanțului ușor LM2 TRA-8 umanizat al regiunii constante al lanțului uman Igκ. Tulpina transformantă *E. coli*, care prezintă această plasmidă, denumită *E. coli* DH5α/pHSG/M2-1-4, a fost depozitată în International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japonia, la data de 20 Aprilie, 2001, în conformitate cu Tratatul de la Budapesta pentru Depozitarea Microorganismelor, și i-a fost acordat numărul de acces FERM BP-7563.

### 3. Construirea plasmidei pSR/M2-1 (plasmida de expresie pentru lanțul ușor LM2 TRA-8 umanizat)

Plasmida obținută pHSG/M2-1-4, purtătoare a unui fragment de fuziune al regiunii variabile a lanțului ușor LM2 TRA-8 umanizat și al regiunii constante a lanțului uman Igκ, este digerată cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I, și apoi este defosforilată cu CIP. ADN-ul defosforilat, rezultat, pSRPDHH și fragmentul HindIII-EcoR I, obținut din pHSG/M2-1-4, sunt legate, utilizând trusa de legare a ADN, versiunea 2.0 (DNA Ligation Kit Version 2.0) (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Apoi *E. coli* DH5α este transformat cu ADN-ul ligat și întins pe agar LB. Transformanții obținuți sunt cultivați în mediu lichid LB, care conține 100 μg/ml ampicilină, și plasmida ADN este extrasă din cultura rezultată, în conformitate cu metoda SDS alcalină. Inserția și orientarea fragmentului de ADN dorit, în vectorul pSRPDHH, sunt confirmate prin secvențierea ADN, utilizând un analizor de secvențe de gene (ABI Prism 3700 DNA Analyzer; Applied Biosystems).

Plasmida de exprimare, care poartă cADN-ul care codifică lanțul ușor al TRA-8 umanizat, este desemnată pSR/M2-1.

#### Exemplul 20. Producerea anticorpului umanizat

Transfectarea celulelor COS-7, adică a liniei celulare derivate din rinichi de maimuță, cu plasmidele de expresie pentru lanțul greu al TRA-8 umanizat și lanțul ușor al TRA-8 umanizat obținute mai sus, este realizată prin metodele cu reactiv de transfecție FUGENE6 (Boehringer Mannheim Biochemica), în conformitate cu manualul de utilizare furnizat cu trusa.

Celule COS-7 (Colecția Americană de Tipuri de Culturi nr. CRL-1651) sunt crescute la semiconfluență ( $3 \times 10^6$  celule/vas) într-un vas de cultură (suprafața culturii: 57 cm<sup>2</sup>; Sumitomo Bakelite) care conține mediu modificat Eagle al lui Dulbecco (la care se va face referire de acum încolo ca "D-MED"; Gibco BRL), suplimentat cu ser fetal de vițel 10% (abreviat aici ca "FCS"; Moredgate).

Între timp, 10 μg/vas (în total 5 vase) cu ADN al plasmidei de exprimare a lanțului greu DR5 umanizat (pHA15-1) și 10 μg/vas de ADN al plasmidei de exprimare a lanțului ușor DR5 umanizat preparat prin metoda SDS-alcalină și centrifugare în gradient de densitate de clorură de cesiu se amestecă și apoi se precipită cu etanol, urmat de suspendare în 5 μl/vas dH<sub>2</sub>O.

După ce 15 μl/vas de reactiv de transfecție FUGENE6 este amestecat cu 180 μl/vas D-MEM fără FCS, această soluție FUGENE (185 μl/vas) se amestecă cu 5 μl/vas soluție de ADN care conține 10 μg/vas ADN al plasmidei de exprimare a lanțului greu DR5 umanizat și cu 10 μg/vas ADN al plasmidei de exprimare a lanțului ușor DR5 umanizat. După 15 min de incubare la temperatura camerei, suspensia de plasmidă obținută (200 μl) se adaugă la plăcile cu COS-7 preparate anterior. După incubare în 5% CO<sub>2</sub> la 37°C, timp de 24 h, mediul

# RO 123525 B1

1 de cultură este schimbat cu D-MEM fără FCS. După incubare în 5% CO<sub>2</sub>, la 37°C, timp de  
2 72 h, supernatantul de cultură este recuperat, pentru a purifica produsele de exprimare în  
3 fluidele supernatante. Prin metoda descrisă mai sus, celulele COS-7 sunt transfectate cu  
4 fiecare dintre combinațiile de plasmide:

- 5 A. ADN neplasmidian;
- 6 B. cotransfecția pHB14-1 și pSR/M-2-1.

7 Cultura este apoi centrifugată (1000 rpm, 5 min) și se colectează supernatantul.  
8 Supernatantul se centrifughează din nou (9800 rpm, 15 min) și se filtrează cu un filtru de  
9 0,45 μm (ADVANTEC TOYO DISMIC-25cs, Cat # 25CS045 AS). Purificarea IgG din filtrate  
10 se realizează, utilizând cromatografia de afinitate POROS-Proteină G (Applied Biosystems)  
11 în următoarele condiții:

- 12 - HPLC: BioCAD 700E (Applied Biosystems);
- 13 - coloană: cartuș senzor ProteinăG-ID (mărimea coloanei: 2,1 mm ID x 30 mm LD,  
14 volumul patului: 0,1 ml; Cat # 2-1002-00, Applied Biosystems);
- 15 - tampon de eluție: 0,1 M glicină-HCl (pH 2,5);
- 16 - tampon de neutralizare: 1M Tris-HCl (pH 8,5);
- 17 - detecție: 280 nm;
- 18 - viteza de curgere: 1 ml/min;
- 19 - mărimea fracțiilor: 0,5 ml/0,5 min;
- 20 - tubul pentru fracție: microtub de polipropilenă 1,5 ml;
- 21 - temperatura: 4°C.

22 După ce toate filtratele se aplică pe coloană, 30 ml PBS (Sigma, Cat # 1000-3),  
23 acestea se utilizează pentru a spăla coloana. Când se aplică tamponul de eluție, pornește  
24 colectorul de fracții. Fiecare microtub de fracții a conținut înainte 55 μl de NaCl 1 M, 110 μl  
25 tampon de neutralizare și 74 μl de albumină serică bovină 2 mg/ml (Sigma, Cat # A-7030)  
26 în PBS. Frațiile de la nr. 8 până la nr. 10 sunt colectate și dializate față de un litru PBS  
27 (pH 7,5), la 4°C, timp de o zi, utilizând aparatul Slide-A lyzer (Pierce, Cat # 66450).  
28 Tamponul de dializă se schimbă de două ori.

29 Verificarea exprimării anticorpilor umanizați și determinarea cantitativă a produșilor  
30 de expresie în fluidele de supernatant de cultură preparate se realizează prin ELISA față de  
31 un anticorp IgG antiuman.

32 În fiecare godeu al unei plăci cu 96 godeuri (MaxiSorp, Nunc), se adaugă 100 μl de  
33 anticorp policlonal specific IgG Fc antiuman de capră (Kappel), dizolvat la concentrația finală  
34 de 0,5 μg/ml în tampon de adsorbție (0,05 M hidrogen碳酸at de sodiu, 0,02% azidă de  
35 sodiu, pH 9,6), iar placa este incubată la 37°C, timp de 2 h, pentru a produce adsorbția  
36 anticorpului. Apoi, placa se spală cu 350 μl PBS(-) conținând 0,05% Tween-20 (BioRad) (la  
37 care se va face referire în continuare ca "PBS-T") de cinci ori. Se adaugă, în godeuri, după  
38 spălare, supernatantul de cultură diluat cu D-MEM, care conține 10% FCS și se incubează  
39 la 37°C, timp de 2 h. După spălare din nou cu PBS-T, se adaugă, în fiecare godeu, 100 μl  
40 de anticorp policlonal specific IgG Fc antiuman de capră, marcat cu fosfatază alcalină  
41 (Jackson Immuno Research Lab.), diluat de 10000 de ori cu PBS-T și se incubează la 37°C,  
42 timp de 2 h. După o nouă spălare cu PBS-T, se adaugă o soluție de substrat de p-nitrofenil  
43 fosfat, obținută din trusa Alkaline Phosphatase Substrate (BioRad), în conformitate cu ma-  
44 nualul de utilizare, furnizat cu trusa. După incubare la 37°C, timp de 0,5 până la o oră, se mă-  
45 soară absorbanta la 405 nm. În experimentele de față, imunoglobulina G subclasa 1 (IgG1)

# RO 123525 B1

din plasmă umană (Biopure AG) diluată cu D-MEM, care conține 10% FCS în anumite concentrații, se utilizează ca probă de concentrație de referință, pentru anticorpii DR5 conținuți în fluidele de supernatant de cultură.

Ca rezultat, produsele de expresie purificate din supernatantul de cultură sunt detectate în mod specific cu anticorp IgG antiuman. Cantitatea de anticorp uman IgG este de 8,96 μg (800 μl).

## **Exemplul 21. Activitatea de inducție a apoptozei anticorpului umanizat**

Se utilizează celule Jurkat (ATCC nr. TIB-152), pentru a examina activitatea de inducție a anticorpului TRA-8 umanizat.

Celule Jurkat, cultivate în mediu RPMI1640, cu 10% FCS (Gibco BRL), la 37°C, timp de 3 zile, în prezența a 5% CO<sub>2</sub>, sunt dispersate în fiecare godeu al unei plăci cu 96 godeuri (Sumitomo Bakelite), la 50 μl per godeu. TRA-8 umanizat, preparat în exemplul 20, este ajustat, pentru a avea concentrația produsului final de interes de 100 ng/ml, cu mediu RPMI1640, care conține 10% FCS, prin estimarea concentrației acestuia în lichide, în conformitate cu metoda descrisă în exemplul 20. Fiecare dintre soluțiile de produși de exprimare, astfel ajustate la 100 ng/ml, se utilizează pentru a produce diluții seriale, prin repetarea unei diluții seriale de 2-ori cu RPMI1640, care conține 10% FCS. Fiecare dintre soluțiile de TRA-8 umanizat se adaugă în fiecare godeu la 50 μl per godeu. După ce reacționează la 37°C, timp de 12 h, se adaugă 50 μl de PMS 25 μM (fenazin metosulfat; Sigma Chemical Co.), care conține 1 mg/ml XTT (2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfopenil]-2H tetrazolium-5-carboxianiridă sare internă; Sigma Chemical Co.) (concentrația finală de 250 μg/ml pentru XTT și 5 μM pentru PMS). După incubare timp de 3 h, se măsoară absorbanta la 450 nm a fiecărui godeu, pentru a calcula viabilitatea celulară prin utilizarea capacității de reducere a mitocondriilor ca indice.

Viabilitatea celulelor din fiecare godeu se calculează în conformitate cu următoarea formulă:

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

unde "a" este măsurătoarea godeului test, "b" este măsurătoarea unui godeu fără celule și "c" este măsurătoarea unui godeu fără anticorp adăugat.

Ca rezultat, produsul de exprimare preparat în exemplul 20 (anticorpul TRA-8 umanizat) se demonstrează că induce apoptoza în celulele liniei de celule de limfom T care exprimă antigenul DR5 uman.

## **Exemplul 22. Reactivitatea TRA-8 față de diferite molecule DR5**

Pentru a determina reactivitatea TRA-8 față de diferite molecule DR5, se examinează reactivitatea TRA-8, utilizând limfocite activate, după cum urmează.

Întâi, se iau probe de sânge periferic de la om (30 ml), saguin (3 ml) și maimuță cynomologus (20 ml). Probele de sânge au avut adăugat 1 ml heparină (Novoheparin; Novo), iar acestea sunt apoi ușor așezate pe un volum egal de soluție Ficoll-Paque PLUS (Amersham Pharmacia Biotech.), gravitația specifică: 1,077 pentru toate, exceptând maimuța Cynomologus, care a avut o gravitație specifică de 1,072 și se centrifughează la 1700 rpm timp de 30 min, pentru a obține o fracție de celule mononucleare din sânge periferic. Această

# RO 123525 B1

1 fracție celulară mononucleară se spală de două ori cu soluție de sare Hanks echilibrată și  
apoi se suspendă în mediu RPMI 1640 cu 10% v/v FCS, la o densitate a celulelor de  $1 \times 10^6$   
3 celule/ml. Se adaugă fitohemaglutinină-P (PHA-P, Sigma Chemicals, Co.) la suspensia  
rezultantă, la o concentrație finală de 5  $\mu\text{g/ml}$ , iar proba este incubată la  $37^\circ\text{C}$ , în 5% v/v  $\text{CO}_2$ ,  
5 timp de 24 h. După acest timp, celulele se recuperează prin centrifugare, se spală și se  
resuspendă în mediu RPMI 1640, care conține 10% v/v FCS. Apoi, pentru a activa celulele  
7 recuperate, se adaugă în suspensie interleukină-2 (Amersham Pharmacia Biotech.), la o  
concentrație finală de 10 unități/ml și aceasta este incubată la  $37^\circ\text{C}$ , în 5% v/v  $\text{CO}_2$ , timp de  
9 72 de h.

O cantitate de preparat activat, calculat să conțină  $1 \times 10^6$  celule limfocite activate, este  
11 plasată într-un tub de test și se suspendă fie în 50  $\mu\text{l}$  de 0,5, 1, 5, 10  $\mu\text{g/ml}$  TRA-8 în PBS,  
fie în 50  $\mu\text{l}$  de PBS. Suspensia rezultată se lasă să stea pe gheață, timp de o oră, după care  
13 celulele se spală de trei ori cu alicote de 500  $\mu\text{l}$  de PBS și apoi se suspendă în 50  $\mu\text{l}$  de  
anticorp IgG antișoarece marcat cu FITC 20  $\mu\text{g/ml}$  (Bioresource) în PBS. Utilizând celulele  
15 suspendate în 500  $\mu\text{l}$  PBS ca martori, se măsoară intensitățile fluorescenței, utilizând un  
citometru în flux (FACSCalibur; Becton Dickinson).

17 Se obține distribuția numerelor de celule prin intensitatea fluorescenței și se  
calculează raportul numărului de celule colorate din numărul de celule totale. Mai departe,  
19 se calculează fiecare valoare Kd, utilizând concentrația TRA-8 și raportul dintre numărul de  
celule colorate și numărul total de celule. Fiecare frecvență a reactivității limfocitelor activate  
21 de om, saguin și maimuță *Cynomolgus* este aproape aceeași. În conformitate, TRA-8 este  
capabil să lege o gamă largă de DR5 de primate, incluzându-l pe cel de om, împotriva cărora  
23 TRA-8 a fost preparat la origine.

## **Exemplul 23. Studiul dozei escaladate a TRA-8 la saguini**

25 Se realizează un studiu de toxicitate preliminară cu doză escaladată de TRA-8,  
utilizând un saguin mascul și unul femelă. Au loc trei seturi de dozări intravenoase unice,  
27 care sunt separate printr-o perioadă de retragere de 7 zile. Doza de TRA-8 este fixată la 50,  
250 și 1250  $\mu\text{g/corp}$ . La patruzeci și opt de ore după fiecare tratament, se colectează sânge  
29 din vena femurală și se prepară plasmă. Se măsoară activitățile aspartat aminotransferazei  
și alanin aminotransferazei din plasmă, utilizând un analizor (FUJI DRI-CHEM: Fuji Film  
31 Medical Co., Ltd.). Tot sângele se ia fără niciun fel de anestezie. Ca rezultat, nu se observă  
nicio probă a vreunei leziuni hepatice în timpul examinării biochimice a plasmei după fiecare  
33 tratament.

## **Exemplul 24. Studiile farmacologice *in vitro* și *in vivo* ale TRA-8 împotriva celulelor 35 canceroase**

Pentru a determina dacă TRA-8 are eficacitate terapeutică în terapia anticancer, se  
37 examinează activitatea terapeutică deucidere *in vitro* a TRA-8, utilizând diferite linii de celule  
canceroase, după cum urmează.

39 Diferite celule canceroase ( $2 \times 10^3$  celule/50  $\mu\text{l}$ ), cultivate în mediu RPMI1640 (pentru  
Jurkat), în mediu DMEM (pentru HCT-116), MEM-R (pentru WiDr) sau DMEM-F12 (pentru  
41 COL2-Jck), obținute de la Gibco BRL, cu 10% FCS (Gibco BRL), la  $37^\circ\text{C}$ , în prezența a 5%  
 $\text{CO}_2$ , se dispersează în fiecare godeu de pe o microplacă cu 96 godeuri (Sumitomo Bakelite).  
43 TRA-8 este ajustat cu mediu conținând 10% FCS, pentru a avea concentrația produsului final

# RO 123525 B1

de interes de 100 ng/ml. Soluția de TRA-8 (100 ng/ml) se utilizează pentru a produce diluții  
 seriale, prin repetarea unei diluții seriale de două ori, cu mediu care conține 10% FCS.  
 Fiecare dintre soluțiile diluate de TRA-8 se adaugă, în fiecare godeu, la 50 μl per godeu, și  
 sunt incubate la 37°C. După ce reacționează la 37°C, timp de 72 h, se adaugă 50 μl de PMS  
 25 μM (fenazin metosulfat; Sigma Chemical Co.), care conține 1 mg/ml XTT (concentrație  
 finală de 250 μg/ml pentru XTT și 5 μM pentru PMS). După incubare timp de 3 h, se măsoară  
 absorbanta la 450 nm a fiecărui godeu, pentru a calcula viabilitatea celulelor, prin utilizarea  
 capacității de reducere a mitocondriilor ca index.

Viabilitatea celulelor din fiecare godeu se calculează în conformitate cu următoarea  
 formulă:

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

unde "a" este măsurătoarea godeului test, "b" este măsurătoarea unui godeu fără celule și  
 "c" este măsurătoarea unui godeu fără anticorp adăugat.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3 de mai jos.

Tabelul 3

Celule	DE50 (ng/ml)
Jurkat	0,001...0,01
HCT-116	0,004...0,02
WiDr	0,007...0,03
COL2-Jck	2,28

TRA-8 induce apoptoza foarte puternic la diferite linii de celule în condiții *in vitro*.

Mai departe, se determină efectul antitumoral *in vitro* al TRA-8 la șoareci nuzi cărora  
 li s-au transplatat celule WiDr, deoarece TRA-8 nu reacționează încrucișat cu DR5 murin.

Anticorpul DR5 antiuman TRA-8 se administrează la șoareci nuzi care poartă  
 xenogrefe umane care exprimă molecula de DR5 uman. Șoarecii utilizați au fost șoareci  
 Balb/c nud/nud de șase săptămâni (femele, de la Clea Japan Inc.), cărora li s-au transplatat  
 linii de celule canceroase de colon WiDr (5 mm<sup>3</sup>). La o zi după transplantul tumorii, acești  
 șoareci, cărora li s-a făcut transplant, sunt tratați zilnic cu injecții intraarticulare cu TRA-8  
 (5 μg/corp) de 14 ori. Creșterea tumorii WiDr este determinată zilnic, prin mărimea masei  
 tumorale. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 4 de mai jos.

Tabelul 4

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

# RO 123525 B1

1 În acest model, în timp ce toate animalele netratate au prezentat o creștere vizibilă  
a tumorii, creșterea tumorii este vizibil inhibată la animalele tratate cu TRA-8, după cum se  
3 demonstrează prin dimensiunea tumorii. Acest rezultat a indicat faptul că TRA-8 este eficace  
pentru eliminarea celulelor tumorale *in vivo*.

## 5 **Exemplul 25. Studiul de combinare a TRA-8**

7 Se obține linia de celule de cancer de prostată PC-3 de la American Tissue Culture  
Collection (ATCC) și se menține în amestec nutritiv F-12K (21127-022, Gibco BRL) care  
9 conține ser fetal bovin 10% (FBV, Hyclone, 200 mM L-glutamină 1% (25030-149, Gibco BRL)  
și soluție de streptomycină penicilină 0,5% (P-7539, Sigma). Se utilizează în experimentul  
11 care urmează mediul RPMI1640 (MED-008, IWAKI) suplimentat cu FBS 10% și cu soluție  
de penicilină streptomycină 0,5%. Celulele PC-3 cu creștere exponențială se colectează prin  
13 tripsinizare și se spală de două ori cu mediu proaspăt. Celulele sunt apoi numărate,  
resuspendate în mediu proaspăt, la o densitate de  $5 \times 10^4$  celule/ml și se distribuie în triplicat  
15 pe plăci cu 96 godeuri (3598, Corning-Coster), într-un volum total de 100  $\mu$ l/godeu, la o zi  
după începerea experimentului. Un medicament anticanceros reprezentativ, Paclitaxel (169-  
18611, Wako), dizolvat în dimetilsulfoxid (10 mg/ml), este diluat în mediu proaspăt și apoi  
17 se adaugă pe plăci cu 96 godeuri, care conține celule în cantitate de 50  $\mu$ l/godeu.  
Concentrațiile finale de dimetilsulfoxid sunt mai mici de 0,1%. După incubare timp de 24 h,  
19 la 37°C, într-o atmosferă de 5% CO<sub>2</sub>, se adaugă, în godeuri, TRA-8 diluat în mediu proaspăt.  
După incubare timp de încă 24 h, se adaugă, în godeuri, 50  $\mu$ l de mediu Minimum Essential  
21 (11095-098, Gibco BRL), care conține 1 mg/ml XTT și 25 mM PMS și plăcile sunt incubate  
timp de 6 h. Se măsoară apoi DO<sub>450</sub> cu SPECTRA MAX 250 (Molecular Devices), iar  
23 viabilitatea celulară se calculează după cum urmează:

25 Viabilitatea (%) =  $(DO_{450}$  pentru godeul care conține celule tratate cu Taxol și/sau cu  
TRA-8 (agent/agenți -  $DO_{450}$  pentru godeul care nu conținea nici celule nici agent) x  
27  $100 / (DO_{450}$  pentru godeul care conține celule fără agent -  $DO_{450}$  pentru godeul care nu  
conține nici celule nici agent)

29  
31 Rezultatul analizei de mai sus al TRA-8 combinat cu un medicament anticanceros  
reprezentativ, Paclitaxel, este următorul. Paclitaxel a redus viabilitatea celulară a celulelor  
PC-3, dar mai mult de 40% dintre semnalele care indică celule canceroase viabile a rămas  
33 încă la concentrații de până la 200 nM. Adăugarea a 0,1 ng/ml TRA-8 a scăzut foarte mult  
viabilitatea celulelor de cancer de sân, cu până la 10%, chiar dacă nu se vede o reducere  
35 a viabilității celulare, după o singură aplicare a TRA-8, la această concentrație. Acest rezultat  
a indicat în mod clar faptul că TRA-8 a prezentat o activitate anticanceroasă sinergică când  
37 a fost combinat cu alte medicamente anticancer.

## 39 **Exemplul 26. Analiza altor tipuri de anticorpi umanizați TRA-8**

### 41 1. Proiectarea anticorpilor umanizați

43 Construirea unei versiuni umanizate a TRA-8 se realizează prin metode cunoscute  
în general ca grefare CDR. Anticorpul mAB58'CL se utilizează ca acceptor, după cum este  
descriș în exemplul de referință nr 2 și regiunile CDR ale anticorpului TRA-8 sunt grefate pe  
acceptor. În regiunea cadrului, unii aminoacizi sunt grefați pe acceptor fie de pe TRA-8, fie

# RO 123525 B1

de pe secvențele umane similare, prin criteriile date de Queen et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029-10033, 1989), și secvențele TRA-8 umanizate sunt construite conform descrierii de mai jos. 1  
3

2. *Construirea plasmidei care poartă ADN-ul regiunii variabile a lanțului greu al altor tipuri de TRA-8 de șoarece sau umanizat* 5

După cum se arată în SECV ID nr. 56 din Lista de Secvențe, umanizarea de tip H1 a secvențelor de aminoacizi ale lanțului greu al anticorpului DR5 antiuman de șoarece TRA-8 a determinat înlocuirea aminoacidului 3 (metionina), aminoacidului 13 (lizina), aminoacidului 19 (lizina), aminoacidului 40 (treonina), aminoacidului 42 (acidul glutamic), aminoacidului 44 (arginina), aminoacidului 84 (serina), aminoacidului 88 (serina), aminoacidului 93 (metionina), aminoacidului 114 (treonina), aminoacidului 115 (leucina) cu glutamină, glutamină, arginină, alanină, glicină, asparagină, alanină, valină, leucină și, respectiv, valină. 7  
9  
11

După cum se arată în SECV ID nr. 59 din Lista de Secvențe, umanizarea de tip H3 a secvențelor de aminoacizi ale lanțului greu al anticorpului DR5 antiuman de șoarece TRA-8 a determinat înlocuirea aminoacidului 13 (lizina), aminoacidului 19 (lizina), aminoacidului 40 (treonina), aminoacidului 42 (acidul glutamic), aminoacidului 44 (arginina), aminoacidului 88 (serina), aminoacidului 93 (metionina), aminoacidului 114 (treonina), aminoacidului 115 (leucina) cu glutamină, arginină, alanină, glicină, glicină, alanină, valină, leucină și respectiv valină. 13  
15  
17  
19

După cum se arată în SECV ID nr. 60 din Lista de Secvențe, umanizarea de tip H4 a secvențelor de aminoacizi ale lanțului greu al anticorpului DR5 antiuman de șoarece TRA-8 a determinat înlocuirea aminoacidului 13 (lizina), aminoacidului 19 (lizina), aminoacidului 88 (serina), aminoacidului 93 (metionina), aminoacidului 114 (treonina), aminoacidului 115 (leucina) cu glutamină, arginina, alanină, alanină, valină, leucină și, respectiv, valină. 21  
23

După cum se arată în SECV ID nr. 61 din Lista de Secvențe, plasmida care poartă ADN-ul regiunii variabile a lanțului greu al TRA-8 imaginar este desemnat "tipul M". În plus, TRA-8 umanizat, descris în exemplele 17 și 18, este desemnat "tipul H2". 25  
27

Plasmidele care poartă ADN-ul care codifică secvențele de ADN care codifică regiunea variabilă a lanțului greu al TRA-8 umanizat sau imaginar se construiesc după cum urmează. 29

Se utilizează PCR, pentru a construi secvențele de ADN care urmează, care sunt descrise mai jos: 31

Sunt sintetizate următoarele 24 oligonucleotide: 33

5'- ttggataagc ttggcttgac ctcacatgg gatggagctg tatcatcctc ttcttgtag caacagctac aggtgtccac -3' (A; SECV ID Nr. 32); 35

5'- tctgaagtaa tgctggtgga gtctggggga ggcttagtac agcctggagg gtcctgaga ctctcctgtg cagcctctgg -3' (B; SECV ID Nr. 33); 37

5'- tctgaagtac agctggtgga gtctggggga ggcttagtac agcctggagg gtcctgaga ctctcctgtg cagcctctgg -3' (B2; SECV ID Nr. 57); 39

5'- tctgaagtaa tgctggtgga gtctggggga ggcttagtaa agcctggagg gtcctgaaa ctctcctgtg cagcctctgg -3' (B3; SECV ID Nr. 66); 41

5'- attcacttc agtagttatg taatgtcttg ggctcgag gcaccagga agggctgga gtgggtgca accattagta -3' (C; SECV ID Nr. 34); 43

5'- attcacttc agtagttatg taatgtcttg ggctcgag actccagaga agaggctgga gtgggtgca accattagta -3' (C2; SECV ID Nr. 64); 45

# RO 123525 B1

- 1 5'- gtggtgtag ttacacctac tatccagaca gtggaaggg ccgattcacc atctccagag acaatgccaa  
gaacaccctg -3' (D; SECV ID Nr. 35);
- 3 5'- tatctgcaaa tgaacagtct gagagcagag gacacggctg tttattactg tgcaagaagg ggtgactcta  
tgattacgac -3' (E; SECV ID Nr. 36);
- 5 5'- tatctgcaaa tgagcagtct gagagcagag gacacggctg tttattactg tgcaagaagg ggtgactcta  
tgattacgac -3' (E2; SECV ID Nr. 62);
- 7 5'- tatctgcaaa tgagcagtct gagatctgag gacacggcta tttattactg tgcaagaagg ggtgactcta  
tgattacgac -3' (E3; SECV ID Nr. 67);
- 9 5'- ggactactgg ggccaagggga ccctggtcac agtctcctca gcctccacc aagggcccat cggtc -3' (F;  
SECV ID Nr. 37);
- 11 5'- ggactactgg ggccaagggga ccactctcac agtctcctca gcctccacc aagggcccat cggtc -3' (F2;  
SECV ID Nr. 68);
- 13 5'- ctaccaagaa gaggatgata cagctccatc ccatggtgag gtcaagccaa gcttatccaa -3' (G;  
SECV ID Nr. 38);
- 15 5'- tctcaggac cctccaggct gtactaagcc tccccagac tccaccagca ttactcaga gtggacacct  
gtagctgtg -3' (H; SECV ID Nr. 39);
- 17 5'- tctcaggac cctccaggct gtactaagcc tccccagac tccaccagct gtactcaga gtggacacct  
gtagctgtg -3' (H2; SECV ID Nr. 58);
- 19 5'- ttcaggac cctccaggct ttaactaagcc tccccagac tccaccagca ttactcaga gtggacacct  
gtagctgtg -3' (H3; SECV ID Nr. 69);
- 21 5'- tccagacct tcctggtgc ctgccgaacc caagacatta cataactact gaaagtgaat ccagaggctg  
cacaggagag -3' (I; SECV ID Nr. 40);
- 23 5'- tccagcctct tctctggagt ctgccgaacc caagacatta cataactact gaaagtgaat ccagaggctg  
cacaggagag -3' (I2; SECV ID Nr. 65);
- 25 5'- ctctggagat ggtgaatcgg cccttcacac tgtctggata gtaggtgtaa ctaccaccac tactaatgt  
tgcaaccac -3' (J; SECV ID Nr. 41);
- 27 5'- cctcttgca cagtaataaa cagccgtgc ctctgcttc agactgttca ttgcagata caggggttgc  
ttggcattgt -3' (K; SECV ID Nr. 42);
- 29 5'- cctcttgca cagtaataaa cagccgtgc ctctgcttc agactgttca ttgcagata caggggttgc  
ttggcattgt -3' (K2; SECV ID Nr. 63);
- 31 5'- cctcttgca cagtaataca tagccgtgc ctcatgctc agactgttca ttgcagata caggggttgc  
ttggcattgt -3' (K3; SECV ID Nr. 70);
- 33 5'- gaccgatgg cccttggtg aggctgagga gactgtgacc agggccctt ggcccagta gtccgtcga  
atcatagagt cacc -3' (L; SECV ID Nr. 43) și
- 35 5'- gaccgatgg cccttggtg aggctgagga gactgtgaga gtggccctt ggcccagta gtccgtcga  
atcatagagt cacc -3' (L2; SECV ID Nr. 71).
- 37 Următorii doi primeri PCR sunt sintetizați așa cum s-a descris mai sus:  
5'- ttggataagc ttggcttgac -3' (P1; SECV ID Nr. 44); și
- 39 5'- gaccgatgg cccttggtg a -3' (P2; SECV ID Nr. 45).
- 41 Sinteza ADN-ului de tip H1, care codifică lanțul polipeptidic care conține o secvență  
de semnal de secreție, o regiune variabilă a lanțului greu TRA-8 umanizat și cele 8 resturi  
de aminoacid ale capătului N-terminal al regiunii IgG-CH1 este realizată utilizând o  
43 combinație a PCR.
- Fragmentul de ADN de tip H1 este preparat după cum urmează.

# RO 123525 B1

Compoziția soluției de reacție PCR:	1
- oligonucleotida A . . . . .	10 pmol;
- oligonucleotida B2 . . . . .	10 pmol; 3
- oligonucleotida C . . . . .	10 pmol;
- oligonucleotida D . . . . .	10 pmol; 5
- oligonucleotida E . . . . .	10 pmol;
- oligonucleotida F . . . . .	10 pmol; 7
- oligonucleotida G . . . . .	10 pmol;
- oligonucleotida H2 . . . . .	10 pmol; 9
- oligonucleotida I . . . . .	10 pmol;
- oligonucleotida J . . . . .	10 pmol; 11
- oligonucleotida K . . . . .	10 pmol;
- oligonucleotida L . . . . .	10 pmol; 13
- oligonucleotida primer P1 . . . . .	2 μM;
- oligonucleotida primer P2 . . . . .	2 μM; 15
- tampon Pyrobest II . . . . .	10 X 10 μl;
- amestec dNTP . . . . .	8 μl; 17
- polimerază ADN Pyrobest . . . . .	0,5 μl și
- apă redistilată la un volum final de 50 μl.	19
Reacția PCR este dirijată după cum urmează. Soluția este mai întâi încălzită la 94°C,	
timp de 5 min, după care se repetă de 7 ori un ciclu de încălzire la 98°C, timp de 10 s, la	21
55°C, timp de 30 s și la 72°C, timp de un minut. După efectuarea acestei proceduri, soluția	
de reacție este încălzită la 72°C, timp de 15 min.	23
După extracția cu fenol și precipitarea din etanol, precipitatul de ADN rezultat este	
uscat sub vid, dizolvat într-o cantitate minimă de apă redistilată și separat prin electroforeză	25
pe gel de agaroză 3%. După electroforeză, gelul este colorat cu 1 μg/ml soluție apoasă de	
bromură de etidiu, pentru a permite detecția ADN-ului sub lumină UV. Benzile ADN, care	27
corespund la ADN tip H1, sunt îndepărtate prin tăiere, utilizând o lamă de ras și sunt eluate	
din gel, utilizând trusa GeneClean Spin Kit (BIO 101, CA, USA). După extracția cu fenol,	29
ADN-ul eluat este apoi concentrat prin centrifugare la 7500 X g, urmată de precipitarea din	
etanol și, în final, este dizolvat în 5 μl de apă distilată.	31
Sinteza ADN-ului de tip H3, care codifică un lanț polipeptidic care conține o secvență	
de semnal de secreție, o regiune variabilă a lanțului greu TRA-8 umanizat și cele 8 resturi	33
de aminoacid ale capătului N-terminal al regiunii IgG-CH1 este realizată, utilizând o	
combinație a PCR.	35
Fragmentul de ADN de tip H3 este preparat după cum urmează.	
Compoziția soluției de reacție PCR:	37
- oligonucleotida A . . . . .	10 pmol;
- oligonucleotida B . . . . .	10 pmol; 39
- oligonucleotida C . . . . .	10 pmol;
- oligonucleotida D . . . . .	10 pmol; 41
- oligonucleotida E2 . . . . .	10 pmol;
- oligonucleotida F . . . . .	10 pmol; 43
- oligonucleotida G . . . . .	10 pmol;
- oligonucleotida H . . . . .	10 pmol; 45

# RO 123525 B1

1	- oligonucleotida I	10 pmol;
	- oligonucleotida J	10 pmol;
3	- oligonucleotida K2	10 pmol;
	- oligonucleotida L	10 pmol;
5	- oligonucleotida primer P1	2 $\mu$ M;
	- oligonucleotida primer P2	2 $\mu$ M;
7	- tampon Pyrobest II	10 X 10 $\mu$ l;
	- amestec dNTP	8 $\mu$ l;
9	- polimerază ADN Pyrobest	0,5 $\mu$ l și
	- apă redistilată la un volum final de 50 $\mu$ l.	

11 Reacția PCR este dirijată după cum urmează. Soluția este mai întâi încălzită la 94°C, timp de 5 min, după care se repetă de 7 ori un ciclu de încălzire la 98°C, timp de 10 s, la 13 55°C, timp de 30 s și la 72°C, timp de un minut. După efectuarea acestei proceduri, soluția de reacție este încălzită la 72°C, timp de 15 min.

15 După extracția cu fenol și precipitarea din etanol, precipitatul de ADN rezultat este uscat sub vid, dizolvat într-o cantitate minimă de apă redistilată și separat prin electroforeză pe gel de agaroză 3%. După electroforeză, gelul este colorat cu 1  $\mu$ g/ml soluție apoasă de bromură de etidiu, pentru a permite detecția ADN-ului sub lumină UV. Benzile ADN, care corespund la ADN tip H3, sunt îndepărtate prin tăiere, utilizând o lamă de ras și sunt eluate din gel, utilizând trusa GeneClean Spin Kit. După extracția cu fenol, ADN-ul eluat este apoi concentrat prin centrifugare la 7500 X g, urmată de precipitarea din etanol și, în final, este dizolvat în 5  $\mu$ l de apă distilată.

23 Sinteza ADN-ului de tip H4, care codifică un lanț polipeptidic care conține o secvență de semnal de secreție, o regiune variabilă a lanțului greu TRA-8 umanizat și cele 8 resturi de aminoacid ale capătului N-terminal al regiunii IgG-CH1, este realizată utilizând o combinație a PCR.

27 Fragmentul de ADN de tip H4 este preparat după cum urmează.

Compoziția soluției de reacție PCR:

29	- oligonucleotida A	10 pmol;
	- oligonucleotida B	10 pmol;
31	- oligonucleotida C2	10 pmol;
	- oligonucleotida D	10 pmol;
33	- oligonucleotida E2	10 pmol;
	- oligonucleotida F	10 pmol;
35	- oligonucleotida G	10 pmol;
	- oligonucleotida H	10 pmol;
37	- oligonucleotida I2	10 pmol;
	- oligonucleotida J	10 pmol;
39	- oligonucleotida K2	10 pmol;
	- oligonucleotida L	10 pmol;
41	- oligonucleotida primer P1	2 $\mu$ M;
	- oligonucleotida primer P2	2 $\mu$ M;
43	- tampon Pyrobest II	10 X10 $\mu$ l;
	- amestec dNTP	8 $\mu$ l;
45	- polimerază ADN Pyrobest	0,5 $\mu$ l și
	- apă redistilată la un volum final de 50 $\mu$ l.	

# RO 123525 B1

Reacția PCR este dirijată după cum urmează. Soluția este mai întâi încălzită la 94°C, timp de 5 min, după care se repetă de 7 ori un ciclu de încălzire la 98°C, timp de 10 s, la 55°C, timp de 30 s și la 72°C, timp de un minut. După efectuarea acestei proceduri, soluția de reacție este încălzită la 72°C, timp de 15 min.

După extracția cu fenol și precipitarea din etanol, precipitatul de ADN rezultat este uscat sub vid, dizolvat într-o cantitate minimă de apă redistilată și separat prin electroforeză pe gel de agaroză 3%. După electroforeză, gelul este colorat cu 1 μg/ml soluție apoasă de bromură de etidiu, pentru a permite detecția ADN-ului sub lumină UV. Benzile ADN care corespund la ADN tip H4 sunt îndepărtate prin tăiere, utilizând o lamă de ras și sunt eluate din gel, utilizând trusa GeneClean Spin Kit. După extracția cu fenol, ADN-ul eluat este apoi concentrat prin centrifugare la 7500 X g, urmată de precipitarea din etanol și, în final, este dizolvat în 5 μl de apă distilată.

Sinteza ADN-ului de tip M, care codifică un lanț polipeptidic care conține o secvență de semnal de secreție, o regiune variabilă a lanțului greu TRA-8 himeric și cele 8 resturi de aminoacid ale capătului N-terminal al regiunii IgG-CH1, este realizată, utilizând o combinație a PCR.

Fragmentul de ADN de tip M este preparat după cum urmează: 17

Compoziția soluției de reacție PCR:

- oligonucleotida A	10 pmol;	19
- oligonucleotida B3	10 pmol;	
- oligonucleotida C2	10 pmol;	21
- oligonucleotida D	10 pmol;	
- oligonucleotida E3	10 pmol;	23
- oligonucleotida F2	10 pmol;	
- oligonucleotida G	10 pmol;	25
- oligonucleotida H3	10 pmol;	
- oligonucleotida I2	10 pmol;	27
- oligonucleotida J	10 pmol;	
- oligonucleotida K3	10 pmol;	29
- oligonucleotida L2	10 pmol;	
- oligonucleotida primer P1	2 μM;	31
- oligonucleotida primer P2	2 μM;	
- tampon Pyrobest II	10 X 10 μl;	33
- amestec dNTP	8 μl;	
- polimerază ADN Pyrobest	0,5 μl și	35
- apă redistilată la un volum final de 50 μl.		

Reacția PCR este dirijată după cum urmează. Soluția este mai întâi încălzită la 94°C, timp de 5 min, după care se repetă de 7 ori un ciclu de încălzire la 98°C, timp de 10 s, la 55°C, timp de 30 s și la 72°C, timp de un minut. După efectuarea acestei proceduri, soluția de reacție este încălzită la 72°C, timp de 15 min.

După extracția cu fenol și precipitarea din etanol, precipitatul de ADN rezultat este uscat sub vid, dizolvat într-o cantitate minimă de apă redistilată și separat prin electroforeză pe gel de agaroză 3%. După electroforeză, gelul este colorat cu 1 μg/ml soluție apoasă de bromură de etidiu, pentru a permite detecția ADN-ului sub lumină UV. Benzile ADN, care corespund la ADN tip M, sunt îndepărtate prin tăiere, utilizând o lamă de ras și sunt eluate

# RO 123525 B1

1 din gel, utilizând trusa GeneClean Spin Kit. După extracția cu fenol, ADN-ul eluat este apoi  
concentrat prin centrifugare la 7500 X g, urmată de precipitarea din etanol și, în final, este  
3 dizolvat în 5  $\mu$ l de apă distilată.

Fiecare ADN extras rezultat (tip H1, tip H3, tip H4, și tip M) este clonat, utilizând  
5 vectorul pGem-T Easy (Promega) după cum urmează:

- 7 - Fragmentul ADN recuperat din reacția PCR (H1, H3, H4 sau M) . . . . . 5  $\mu$ l;
- 7 - Tampon polimerază Taq . . . . . 10 X1  $\mu$ l;
- 9 - Amestec dNTP . . . . . 1  $\mu$ l;
- 9 - Polimerază Taq (5 unități/ml) . . . . . 1  $\mu$ l și
- Apă redistilată la volumul final de 10  $\mu$ l.

11 După ce fiecare dintre soluțiile de mai sus reacționează la 70°C, timp de 30 min,  
fiecare soluție ADN și vector pGEM-T Easy sunt legate, utilizând o trusă DNA Ligation  
13 Version 2.0 (Takara Shuzo Co., Ltd.), utilizând protocolul fabricantului.

După 4 h de incubare la 15°C, 2  $\mu$ l din soluția de reacție incubată se amestecă cu  
15 100  $\mu$ l de tulpină de *E. coli* competentă JM109, la o densitate a celulelor de 1-2x10<sup>9</sup>  
celule/ml (Takara Shuzo Co., Ltd), iar amestecul este menținut pe gheață, timp de 30 min,  
17 apoi la 42°C, timp de 30 s, și din nou pe gheață, timp de un minut. Apoi, se adaugă, la  
amestec, 500  $\mu$ l de mediu SOC (2% v/v triptonă, 0,5% extract de drojdie, 0,05% gr/v clorură  
19 de sodiu, 2,5 mM gr/v clorură de potasiu, 1 mM clorură de magneziu, și 20 mM glucoză),  
apoi se incubează timp de încă o oră, agitând. Tulpinile transformante sunt apoi izolate și se  
21 prepară ADN plasmidian din tulpini, după descrierea din *Molecular Cloning, a Laboratory  
Manual*. Secvențele de nucleotide, ale acestor ADN-uri care codifică lanțul greu al TRA-8  
23 umanizat, sunt confirmate prin metoda dideoxi (Sanger, F. S. et al., 1977, *Proc. Natl. Acad.  
Sci. SUA*, 74:5463-5467), utilizând analizorul 3700 DNA (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied  
25 Biosystems, Japonia).

Plasmidele rezultate se denumesc pHA15 (plasmida care poartă cADN-ul care  
27 codifică lanțul greu de tip H1 al TRA-8 umanizat), pHC10 (plasmida care poartă cADN-ul  
care codifică lanțul greu de tip H3 al TRA-8 umanizat), pHD21 (plasmida care poartă cADN-  
29 ul care codifică lanțul greu de tip H4 al TRA-8 umanizat), și pM11 (plasmida care poartă  
cADN-ul care codifică lanțul greu al TRA-8 himeric). Tulpinile de *E. coli* transformante, care  
31 poartă această plasmidă, desemnate *E. coli* JM109/pHA15, *E. coli* JM109/pHC10, *E. coli*  
JM109/pHD21 și *E. coli* JM109/pM11 au fost depozitate la Organismul Internațional  
33 Depozitar al Brevetelor, Institutul Național pentru Știință și Tehnologie Avansată, 1-1, Higashi  
1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japonia în 20 aprilie 2001, în acord cu Tratatul  
35 de la Budapesta pentru Depozitele de Microorganisme, și le-a fost acordat numărul de acces  
FERM BP-7555, FERM BP-7557, FERM BP-7558 și, respectiv, FERM BP-7559.

37 **3. Construirea plasmidelor de expresie care poartă ADN-ul regiunii variabile a lanțului  
greu al câtorva tipuri de TRA-8 umanizate sau de șoarece**

39 Vectorii de expresie recombinanți pentru celulele animale se construiesc prin inserarea  
ADN-ului care codifică lanțul greu al TRA-8 de tip H1, de tip H3, și de tip H4 umanizat sau  
41 himeric de tip M (clonat în cele de mai sus) după cum urmează.

1  $\mu$ g de plasmidă pSRHHH3 (cererea de brevet european **EP 0909816 A1**) care  
43 poartă regiunea variabilă a lanțului greu al regiunii variabile a anticorpului monoclonal anti-  
Fas umanizat HFE7A și ADN-ul genomic al regiunii constante a IgG1 umane, un vector de  
45 exprimare pentru celulele de mamifer, este digerat cu enzimele de restricție HindIII și ApaI,

# RO 123525 B1

și se separă prin electroforeză în gel de agaroză 3%. După electroforeză, gelul se colorează cu soluție apoasă 1 μg/ml bromură de etidiu pentru a permite detectarea ADN în lumină UV. Benzile de ADN ale vectorului care conțin ADN-ul genomic al regiunii constante ale IgG1 umane fără regiunea variabilă a lanțului greu al HFE7A umanizat sunt tăiate, utilizând o lamă de ras și se eluează din gel, utilizând trusa GeneClean Spin. După extracția cu fenol, ADN-ul eluat este apoi concentrat prin centrifugare la 7500 X g, urmată de precipitare din etanol și, în final, dizolvare în 5 μl de apă distilată, și apoi defosforilare, utilizând CIP. Plasmida defosforilată, digerată (100 ng) este legată cu 1 μg de fragment pHA15, pHC10, pHD21, sau pM11 de ADN, care conține ADN-ul care codifică regiunea variabilă a lanțului greu al TRA-8 umanizat sau himeric, care a fost de asemenea digerată cu HindIII și ApaI, utilizând o trusă DNA Ligation Kit versiunea 2.0 (Takara Shuzo Co., Ltd). Amestecul de legare este apoi utilizat pentru a transforma *E. coli* JM109, care este apoi pusă pe plăci de agar LB care conțin 50 μg/ml ampicilină.

Transformanții obținuți prin această metodă sunt cultivați în 2 ml mediu LB lichid care conțin 50 μg/ml ampicilină, la 37°C, peste noapte, iar ADN-ul plasmidian se extrage ulterior din cultura rezultată prin metoda alcalină SDS.

ADN-ul plasmidian extras este digerat cu HindIII și ApaI, și este supus electroforezei în gel de agaroză 3% gr/v, pentru a confirma prezența sau absența insertului de ADN care codifică regiunea variabilă a lanțului greu al TRA-8 umanizat sau himeric. Inserția și orientarea fragmentului de ADN dorit în vector sunt confirmate prin secvențierea ADN-ului, utilizând un analizor de secvențe de gene (analizorul de ADN ABI Prism 3700; Applied Biosystems). Plasmidele de exprimare rezultate care poartă cADN care codifică lanțul greu al TRA-8 umanizat sau himeric sunt desemnate pHA15-1, pHC10-3, pHD21-1, și respectiv pM11-1.

#### 4. Construirea vectorilor pentru lanțurile ușoare umanizate

##### 4.1. Construirea unui vector de exprimare pentru lanțul ușor al anticorpului umanizat (de tip LM1)

După cum se arată în SECV ID nr. 72 din Lista de Secvențe, umanizarea de tip H1 (tip LM1) a secvențelor de aminoacizi ale lanțului greu al anticorpului DR5 antiuman de șoarece TRA-8 a determinat înlocuirea aminoacidului 3 (valina), aminoacidului 8 (histidina), aminoacidului 9 (lizina), aminoacidului 10 (fenilalanina), aminoacidului 11 (metionina), aminoacidului 13 (treonina), aminoacidului 20 (serina), aminoacidului 42 (glutamina), aminoacidului 43 (serina), aminoacidului 60 (acidul aspartic), aminoacidului 63 (treonina), aminoacidului 77 (asparagina), aminoacidului 78 (valina), aminoacidului 80 (serina), aminoacidului 83 (leucina), aminoacidului 85 (acidul aspartic), aminoacidului 87 (fenilalanina), și aminoacidului 99 (glicina), aminoacidului 103 (leucina), și aminoacidului 108 (alanina) de la capătul N-terminal al secvenței de aminoacizi a lanțului ușor TRA-8 se înlocuiesc cu glutamină, prolină, serină, serină, leucină, alanină, treonină, lizină, alanină, serină, serină, serină, leucină, prolină, fenilalanină, treonină, tirozină, glutamină, valină și respectiv treonină. Secvența rezultată se numește LM1.

Plasmidele de expresie care poartă acest tip de secvențe de aminoacizi ale lanțului ușor umanizat ale anticorpului antiuman DR5 TRA-8 (de tip LM1, SECV ID nr 72 din lista de secvențe) se construiesc după cum urmează.

# RO 123525 B1

1           1. *Sinteza primerilor pentru prepararea regiunilor variabile și constante ale lanțului*  
2           *ușor al TRA-8 umanizat (de tip LM1)*

3           AND-ul care codifică lanțul polipeptidic LM1 (SECV ID nr. 72 din Lista de Secvențe),  
4           fiecare dintre acestea fiind o fuziune dintre regiunea variabilă a lanțului ușor (de tip LM1) al  
5           anticorpului anti-DR5 umanizat TRA-8 și regiunea constantă a lanțului ușor al Ig umane  
6           (lanțul κ), sunt sintetizate prin utilizarea de combinații ale PCR.

7           Suplimentar față de 7AL1P (SECV ID Nr. 47) și 7ALCN (SECV ID Nr. 48), HKCDF11  
8           (SECV ID nr. 50), HKCDR12 (SECV ID nr. 51), HKCDF22 (SECV ID nr. 52), HKCDR22  
9           (SECV ID nr 53), și HKCF12 (SECV ID nr. 54), se sintetizează pentru PCR următorii primeri  
10          oligonucleotidici:

11          5'-gtcccccaca gatgcagaca aagaacttgg agattgggtc atctgaatgt caccagtgga-3'  
12          (HKSPR12; SECV ID nr. 77).

13          2. *Construcția plasmidei pCR3.1/LM1-2 (clonarea lanțului ușor al TRA-8 umanizat de*  
14          *tip LM1)*

15          Fragmentul de ADN-LM1 care codifică secvența de aminoacizi care a fost definită în  
16          SECV ID nr 72 a aceluiași se prepară prin realizarea PCR în 2 etape, se inserează într-un  
17          vector plasmidian și se clonează în *E. coli*.

18          a. *Prima etapă a PCR*

19          Fragmentul LM1-F1-ADN care codifică o secvență de semnal de secreție și o  
20          porțiune a regiunii FRL<sub>1</sub>, cu un situs de clivaj al enzimei de restricție Hind III, adăugat la  
21          capătul 5', se prepară în următoarele condiții: plasmidele matrită, pHSGHM17 și pSRPDHH,  
22          se obțin urmând descrierea din cererea de brevet european **EP 0909816 A1**.

23          Compoziția soluției de reacție:

24          - ADN-ul plasmidei pHSGHM17 ..... 25 ng;  
25          - primer oligonucleotidic 7AL1P ..... 50 pmoli;  
26          - cocteil de dNTP-uri ..... 5 μl;  
27          - tampon 10xPCR ..... 5 μl;  
28          - ADN polimerază ampliAq (PerkinElmer) ..... 2,5 unități.

29          Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, este ajustată la un volum final de  
30          50 μl, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.

31          Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește  
32          într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C, timp de  
33          2 min, care se repetă de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.

34          Fragmentul ADN-ului LM1-F2, care codifică o porțiune a FRL<sub>1</sub>, CDRL<sub>1</sub>, FRL<sub>2</sub> și  
35          CDRL<sub>2</sub>, se prepară în următoarele condiții:

36          Compoziția soluției de reacție:

37          - ADN plasmidian pL28 ..... 25 ng;  
38          - primer oligonucleotidic HKCDF11 ..... 50 pmoli;  
39          - rimer oligonucleotidic HKCDF12 ..... 50 pmoli;  
40          - cocteil de dNTP-uri ..... 5 μl;  
41          - tampon 10xPCR ..... 5 μl;  
42          ADN polimerază ampliAq ..... 2,5 unități.

43          Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, se ajustează la un volum final de  
44          50 μl, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.

# RO 123525 B1

Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C, timp de 2 min, care se repetă de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min. 1  
3

Fragmentul ADN-ului LM1-F3, care codifică CDRL<sub>2</sub>, FRL<sub>3</sub> și o porțiune din CDRL<sub>3</sub>, se prepară în următoarele condiții: 5

Compoziția soluției de reacție:

- ADN-ul plasmidului pSRPDHH ..... 25 ng; 7
- primer oligonucleotidic HKCDF22 ..... 50 pmoli;
- primer oligonucleotidic HKCDF22 ..... 50 pmoli; 9
- cocteil de dNTP-uri ..... 5 μl;
- tampon 10xPCR ..... 5 μl; 11
- ADN polimerază ampliTaq ..... 2,5 unități.

Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, se ajustează la un volum final de 50 μl, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR. 13

Condiții termice PCR: încălzire la 94°C, după care un ciclu termic de 94°C, timp de un minut, 55°C, timp de un minut și 72°C, timp de 2 min, repetat de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp 10 min. 15  
17

Fragmentul de ADN al LM1-F4, care codifică CDRL<sub>3</sub>, FRL<sub>4</sub> și regiunea constantă cu un situs de clivaj pentru enzima de restricție EcoR I, adăugată la capătul 3' terminal, se prepară în următoarele condiții: 19

Compoziția soluției de reacție: 21

- ADN-ul plasmidei pSRPDHH ..... 25 ng; 23
- primerul oligonucleotidic HKCF12 ..... 50 pmol;
- primerul oligonucleotidic 7ALCN ..... 50 pmol; 25
- cocteil de dNTP-uri ..... 5 μl;
- tampon PCR ..... 10x5 μl;
- ADN polimerază ampliTaq ..... 2,5 unități. 27

Soluția de reacție, care are compoziția de mai sus, se ajustează la un volum final de 50 μl, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR. 29

Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește într-un ciclu termic la 94°C, timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C, timp de 2 min, repetat de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min. 31

Fragmentele de ADN amplificate după PCR se separă prin electroforeză în gel de poliacrilamidă 5%. După electroforeză, gelul se colorează cu 1 μg/ml de bromură de etidiu, pentru a detecta ADN-ul produs sub lumină UV. Benzile de ADN respective, astfel detectate, sunt excizate cu o lamă de ras. 33  
35

*b. A doua etapă a PCR* 37

ADN-ul LM1, în care fragmentele descrise mai sus ADN LM1-F1, ADN LM1-F2, ADN LM1-F3 și ADN LM1-F4 sunt fuzionate, se prepară în următoarele condiții. 39

Compoziția soluției de reacție:

- fragmentul gel de ADN-LM1-F1 preparat în prima etapă a PCR; 41
- fragmentul gel de ADN-LM1-F2 preparat în prima etapă a PCR;
- fragmentul gel de ADN-LM1-F3 preparat în prima etapă a PCR; 43
- fragmentul gel de ADN-LM1-F4 preparat în prima etapă a PCR;

# RO 123525 B1

- 1 - primerul oligonucleotidic 7AL1P ..... 50 pmoli;  
- primerul oligonucleotidic 7ALCN ..... 50 pmoli;  
3 - cocteil de dNTP-uri ..... 5,0 µl;  
- tampon 10x PCR ..... 5,0 µl;  
5 - ADN polimerază ampliTaq ..... 2,5 unități.

Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, se ajustează la un volum final de 50 µl, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.

Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C, timp de 2 min, repetat de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.

11 Fragmentul de ADN-LM1 astfel preparat se inserează în plasmida pCR3.1ADN utilizând, trusa Eukaryotic TA Cloning Kit (InVitrogen), urmând protocolul fabricantului și se introduce în *E. coli* competentă TOP10F' conținută în trusă. Secvențele de nucleotide ale acestor ADN-uri, care codifică lanțul ușor al TRA-8 umanizat (tip LM1), sunt confirmate prin metoda dideoxi (F. S. Sanger et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463-5467), utilizând analizorul 3700 DNA (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems, Japonia).

17 Plasmidele rezultate se denumesc pCR3.1/LM1-2 (plasmida care poartă cADN-ul care codifică regiunea variabilă a lanțului ușor al TRA-8 umanizat (tip LM1) și o regiune constantă a lanțului ușor al Ig umane).

19 Plasmida pCR3.1/LM1-2, care conține fragmentul de ADN LM1, este digerată cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I.

21 1 µg de ADN al plasmidei de clonare pHSG399 este digerat cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I, și apoi se defosforilează cu CIP. Fragmentele rezultate de ADN pHSG399 și de ADN al LM1 defosforilate, care au fost digerate cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I se leagă, utilizând trusa DNA Ligation, versiunea 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Apoi, *E. coli* DH5α este transformată cu ADN legat și este întinsă pe un mediu de agar LB, care conține IPTG 0,1 mM, 0,1% X-Gal și 50 µg/ml cloramfenicol (concentrații finale). Transformanții albi obținuți se cultivă în mediu lichid LB, care conține 50 µg/ml cloramfenicol, și ADN-ul plasmidian este extras din cultura rezultată în conformitate cu metoda alcalin-SDS. ADN-ul plasmidian extras este digerat cu Hind III și EcoR I, și apoi este selectată o clonă purtătoare de fragment LM1-ADN prin electroforeză în gel de agaroză 1%.

23 Ca rezultat al procedurii de mai sus, se obține plasmida pHSG/M1-2-2 purtătoare a unui fragment de fuziune al regiunii variabile a lanțului ușor LM1 TRA-8 umanizat al regiunii constante a lanțului uman Ig κ. Tulpina transformantă *E. coli*, care prezintă această plasmidă, denumită *E. coli* DH5α/pHSG/M1-2-2, a fost depozitată în International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japonia, la data de 20 Aprilie, 2001, în conformitate cu Tratatul de la Budapesta pentru Depozitarea Microorganismelor, și i-a fost acordat numărul de acces FERM BP-7562.

33 3. *Construirea plasmidei pSR/LM1-2 (plasmida de expresie pentru lanțul ușor LM1 TRA-8 umanizat)*

35 Plasmida obținută pHSG/M1-2 purtătoare a unui fragment de fuziune al regiunii variabile a lanțului ușor LM1 TRA-8 umanizat și regiunea constantă a lanțului uman Ig κ este digerată cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I.

# RO 123525 B1

1 µg al plasmidei de clonare ADN pSRPDHH (cererea de brevet european EP 0909816 A1) este digerat cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I, și apoi este defosforilată cu CIP. ADN-ul defosforilat rezultat pSRPDHH și fragmentul HindIII-EcoRI obținut din pHSG/M1-2-2 sunt legate, utilizând Trusa de Legare ADN, versiunea 2.0 (DNA Ligation Kit Version 2.0) (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Apoi *E. coli* DH5α este transformat cu ADN-ul legat și întinsă pe agar LB. Transformanții obținuți sunt cultivați în mediu lichid LB, care conține 100 µg/ml ampicilină, și ADN-ul plasmidian se extrage din cultura rezultată, în conformitate cu metoda alcalin-SDS. Inserția și orientarea fragmentului de ADN dorit, în vectorul pSRPDHH, sunt confirmate prin secvențierea ADN, utilizând un analizor de secvențe de gene.

Plasmida de exprimare, care poartă cADN-ul care codifică lanțul ușor al LM1 TRA-8 umanizat, este desemnată pSR/LM1-2.

4.2. *Construirea vectorului de exprimare al lanțului ușor al anticorpului umanizat (tip LM3)*

Așa cum este prezentat în SECV ID Nr. 73 din Lista de Secvențe, alte umanizări (de tip LM3) ale secvențelor de aminoacizi ale lanțului ușor al anticorpului șoarece antiuman DR5 TRA-8 au determinat înlocuirea celui de-al 8-lea aminoacid (histidina), al 9-lea aminoacid (lizina), al 10-lea aminoacid (fenilalanina), al 11-lea aminoacid (metionina), al 13-lea aminoacid (treonina), al 20-lea aminoacid (serina), al 42-lea aminoacid (glutamina), al 43-lea aminoacid (serina), al 77-lea aminoacid (asparagina), al 78-lea aminoacid (valina), al 80-lea aminoacid (serina), al 83-lea aminoacid (leucina), al 85-lea aminoacid (acidul aspartic), al 87-lea aminoacid (fenilalanina), al 99-lea aminoacid (glicina), al 103-lea aminoacid (leucina) și al 108-lea aminoacid (alanina) din capătul N- terminal al secvenței aminoacid a lanțului ușor TRA-8 cu prolină, serină, leucină, alanină, treonină, lizină, alanină, serină, leucină, prolină, fenilalanină, treonină, tirozină, glutamină, valină și, respectiv, treonină. Secvența rezultată este denumită LM3.

Plasmidele de exprimare, care poartă acest tip de secvențe de aminoacizi de lanț ușor umanizate ale anticorpului DR5 antiuman TRA-8 (tip LM3, SECV ID Nr. 73 din Lista de Secvențe), sunt construite după cum urmează.

1. *Sinteza primerilor pentru prepararea regiunilor variabile și constante ale lanțului ușor al LM3 TRA-8 umanizat*

ADN-ul care codifică lanțul polipeptidic la LM3 (SECV ID Nr. 73 din Lista de Secvențe), fiecare dintre acestea fiind o fuziune a regiunii variabile a lanțului ușor al anticorpului anti-DR5 TRA-8 umanizat și regiunea constantă a lanțului ușor uman Ig (lanțul κ), sunt sintetizate, utilizând combinații de PCR. În continuare, după 7AL1P (SECV ID Nr. 47) și 7ALCN (SECV ID Nr. 48), au fost sintetizați următorii primeri oligonucleotidici pentru PCR:

5'- atctagttct cagagatgga gacagacaca atcctgctat gggtgctgct gctctgggtt ccagg -3' (MOD1F1; SECV ID Nr. 78);

5'- cagcacccat agcaggattg tgtctgtctc catctctgag aactagatga gaggatgctt ctaagctt - 3' (MOD1R1; SECV ID Nr. 79);

5'- ctccactggt gacattgtga tgaccaatc tccaagtctc ttgtctgcat ctgtggggga cagggtc-3' (MOD1F22; SECV ID Nr. 80);

5'- acttgagat tgggtcatca caatgcacc agtggagcct ggaaccaga gcag-3' (MOD 1R22; SECV ID Nr. 81);

# RO 123525 B1

- 1 5'-accatcacct gcaaggccag tcaggatgtg ggtactgctg tagcctggta ccaacagaaa ccaggaa -3'  
(MOD1F3; SECV ID Nr. 82);
- 3 5'- tacagcagta cccacatcct gactggcctt gcaggatgat gtagccctgt cccccacaga tgcagacaaa  
ga -3' (MOD1R3; SECV ID Nr. 83);
- 5 5'- aagcacccaa actcctcctc tattgggcat ccaccgggca cactggggtc ccagataggt ttacaggcag  
t -3' (MOD1F42; SECV ID Nr. 84);
- 7 5'- cccagtgtgc cgggtggatg cccaatagat gaggagttg ggtgctttc ctggtttctg ttgtaccag gc  
-3' (MOD1R4; SECV ID Nr. 85);
- 9 5'- gggctggga cagacttcac cctcaccatc tctagtctgc agccggagga ttttgaacc tat -3'  
(MOD1F5; SECV ID Nr. 86);
- 11 5'- actagagatg gtgagggtga agtctgtccc agaccactg cctgtaaacc tatctgggac -3'  
MOD1R52;SECV. ID. Nr. 87);
- 13 5'- tactgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttcggtaag gcaccaaggt ggaaatc -3' (MOD1F6;  
SECV ID Nr. 88);
- 15 5'- cgtccgatag ctgctatatt gctgacagta ataggtgca aaatcctccg gctgcac -3'  
(MOD1R6;SECV ID Nr. 89);
- 17 5'- aaacggactg tggtgcacc atctgtctc atctcccgc catctgatga g -3' (MOD1F7; SECV ID  
Nr. 90);
- 19 5'- gaagatgaag acagatggg cagccacagt ccgtttgatt tcaccttg tgccttgacc gaa -3'  
(MOD1R7; SECV ID Nr. 91); și
- 21 5'- agatttcaac tgctcatcag atggcgggaa (LR17; SECV ID Nr. 101).

23 *2. Construcția plasmidei pCR3.1/LM3-3-44 (clonarea lanțului ușor de tip LM3 umanizat al TRA-8)*

25 Fragmentul ADN-LM3, care codifică secvența de aminoacid, așa cum este definită în SECV ID Nr. 73 a aceluiași, se prepară prin efectuarea PCR în două etape, inserția într-un vector plasmidian și clonând în *E. coli*.

27 *a. Prima etapă a PCR*

29 Fragmentul LM3-F31B-ADN, care codifică o secvență de semnal de secreție cu un situs de clivaj al enzimei de restricție Hind III, adăugat la capătul 5' FRL<sub>1</sub> CDRL<sub>1</sub>, FRL<sub>2</sub> și CDRL<sub>2</sub>, FRL<sub>3</sub>, CDRL<sub>3</sub>, FRL<sub>4</sub> și o porțiune a regiunii constante se prepară în următoarele condiții.

31 Compoziția soluției de reacție:

33	- primer oligonucleotidic MOD1F1 .....	5 pmol;
	- primer oligonucleotidic MOD1R1 .....	5 pmol;
35	- primer oligonucleotidic MOD1F22 .....	5 pmol;
	- primer oligonucleotidic MOD1R22 .....	5 pmol;
37	- primer oligonucleotidic MOD1F3 .....	5 pmol;
	- primer oligonucleotidic MOD1R3 .....	5 pmol;
39	- primer oligonucleotidic MOD1F42 .....	5 pmol;
	- primer oligonucleotidic MOD1R4 .....	5 pmol;
41	- primer oligonucleotidic MOD1F5 .....	5 pmol;
	- primer oligonucleotidic MOD1R52 .....	5 pmol;
43	- primer oligonucleotidic MOD1F6 .....	5 pmol;
	- primer oligonucleotidic MOD1R6 .....	5 pmol;
45	- primer oligonucleotidic MOD1F7 .....	50 pmol;

# RO 123525 B1

- primer oligonucleotidic MOD1R7 .....	5 pmol;	1
- primer oligonucleotidic 7AL1P .....	50 pmol;	
- primer oligonucleotidic LR17 .....	50 pmol;	3
- cocteil de dNTP-uri .....	5,0 µl;	
- tampon 10x PCR .....	5 µl;	5
- ADN polimerază ampliTaq .....	2,5 unități.	
Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, se ajustează la un volum final de 50 µl, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.		7
Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C, timp de 2 min, repetat de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.		9
Fragmentul LM3-F31C-ADN, care codifică o porțiune a regiunii constante cu un situs de clivaj al enzimei de restricție Eco R I, adăugat la capătul 3', se prepară în următoarele condiții.		11
Plasmidele matrită, pSRPDHH, se obțin, urmând descrierea din cererea de brevet european EP 0909816 A1.		13
Compoziția soluției de reacție:		15
- plasmidă pSRPDHH ADN .....	25 ng;	
- primer oligonucleotidic MOD1F7 .....	50 pmol;	17
- primer oligonucleotidic 7ALCN .....	50 pmol;	19
- cocteil de dNTP-uri .....	5 µl;	21
- tampon 10x PCR .....	5 µl;	
- ADN polimerază ampliTaq .....	2,5 unități.	23
Soluția de reacție, care are compoziția de mai sus, se ajustează la un volum final de 50 µl, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.		25
Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C, timp de 2 min, repetat de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.		27
Fragmentele de ADN amplificate după PCR se separă prin electroforeză în gel de poliacrilamidă 5%. După electroforeză, gelul se colorează cu 1 µl/ml de bromură de etidiu, pentru a detecta ADN-ul produs sub lumină UV. Benzile de ADN respective astfel detectate sunt excizate cu o lamă de ras.		29
b. A doua etapă a PCR		31
ADN-ul LM3, în care fragmentele descrise mai sus, ADN LM3-F31B, și ADN LM3-F31C, sunt fuzionate, se prepară în următoarele condiții.		33
Compoziția soluției de reacție:		35
- fragmentul gel de ADN-LM3-F31B preparat în prima etapă a PCR;		37
- fragmentul gel de ADN-LM3-F31C preparat în prima etapă a PCR;		
- primerul oligonucleotidic 7AL1P .....	50 pmoli;	39
- primerul oligonucleotidic 7ALCN .....	50 pmol;	
- cocteil de dNTP-uri .....	5,0 µl;	41
- tampon 10x PCR .....	5,0 µl;	
- ADN polimerază ampliTaq .....	2,5 unități.	43
Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, se ajustează la un volum final de 50 µl, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.		45

# RO 123525 B1

1 Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește  
într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C, timp de  
3 2 min, repetat de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.

Fragmentul de ADN-LM3 astfel preparat se inserează în plasmida pCR3.1ADN,  
5 utilizând trusa Eukaryotic TA Cloning Kit (Invitrogen), urmând protocolul fabricantului și se  
introduce în *E. coli* competentă TOP10F' conținută în trusă. Secvențele de nucleotide, ale  
7 acestor ADN-uri care codifică lanțul ușor al LM3 TRA-8 umanizat, sunt confirmate prin  
metoda dideoxi (F. S. Sanger et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463-5467),  
9 utilizând analizorul 3700 DNA Analyzer(ABI PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems,  
Japonia).

11 Plasmidele rezultate se denumesc pCR3.1/LM3-3-44 (plasmida care poartă cADN-ul  
care codifică regiunea variabilă a lanțului ușor al LM3 TRA-8 umanizat și o regiune constantă  
13 a lanțului ușor al Ig umane).

Plasmida pCR3.1/LM3-3-44 obținută, care conține fragmentul de ADN LM3, este  
15 digerată cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I.

17 1 μg de ADN al plasmidei de clonare pHSG399 este digerat cu enzimele de restricție  
Hind III și EcoR I, și apoi se defosforilează cu CIP. Fragmentele rezultate de ADN pHSG399  
și de ADN al LM3 defosforilate, care au fost digerate cu enzimele de restricție Hind III și  
19 EcoR I, se leagă, utilizând trusa DNA Ligation, versiunea 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Apoi,  
*E. coli* DH5α este transformată cu ADN-ul legat și este întinsă pe un mediu de agar LB, care  
21 conține IPTG 0,1 mM, 0,1% X-Gal și 50 μg/ml cloramfenicol (concentrații finale).  
Transformanții albi obținuți se cultivă în mediu lichid LB, care conține 50 μg/ml cloramfenicol,  
23 și ADN-ul plasmidian este extras din cultura rezultată, în conformitate cu metoda alcalin-  
SDS. ADN-ul plasmidian extras este digerat cu Hind III și EcoR I și apoi este selectată o  
25 clonă purtătoare de fragment LM3-ADN prin electroforeză în gel de agaroză 1%.

Ca rezultat al procedurii de mai sus, se obține plasmida pHSG/M3-3-22 purtătoare  
27 a unui fragment de fuziune al regiunii variabile a lanțului ușor LM3 TRA-8 umanizat al regiunii  
constante al lanțului uman Ig κ. Tulpina transformantă *E. coli*, care prezintă această  
29 plasmidă, denumită *E. coli* DH5α/pHSG/M3-3-22, a fost depozitată în International Patent  
Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1,  
31 Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japonia, la data de 20 Aprilie, 2001,  
în conformitate cu Tratatul de la Budapesta pentru Depozitarea Microorganismelor, și i-a fost  
33 acordat numărul de acces FERM BP-7564.

35 *3. Construirea plasmidei pSR/LM3-3-44-10 (plasmida de exprimare pentru lanțul ușor  
LM3 al TRA-8 umanizat)*

Plasmida obținută, pHSG/M3-3-22, purtătoare a unui fragment de fuziune al regiunii  
37 variabile a lanțului ușor, LM3 al TRA-8, umanizat, și regiunea constantă a lanțului uman Igk  
sunt digerate cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I.

39 1 μg de ADN al plasmidei de clonare pSRPDHH (cererea de brevet european  
**EP 0909816 A1**) este digerat cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I, și apoi este  
41 defosforilat cu CIP. ADN-ul defosforilat, rezultat, pSRPDHH, și fragmentul HindIII-EcoRI,  
obținut din pHSG/M3-3-22, sunt legate utilizând Trusa de Legare ADN, versiunea 2,0 (DNA  
43 Ligation Kit Version 2.0) (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Apoi *E. coli* DH5α este transformată cu  
ADN-ul legat și întinsă pe agar LB. Transformanții obținuți sunt cultivați în mediu lichid LB,  
45 care conține 100 μg/ml ampicilină, și ADN-ul plasmidian se extrage din cultura rezultată, în

# RO 123525 B1

conformitate cu metoda alcalin-SDS. Inserția și orientarea fragmentului de ADN dorit, în vectorul pSRPDHH, sunt confirmate prin secvențierea ADN, utilizând un analizor de secvențe de gene (ABI Prism 3700 DNA Analyzer, Applied Biosystems).

Plasmida de exprimare rezultată, care poartă cADN-ul care codifică lanțul ușor al LM3 TRA-8 umanizat, este desemnată pSR/LM3-3-44-10.

#### 4.3. Construirea unui vector de exprimare pentru lanțul ușor al anticorpului umanizat (de tip LM4)

După cum se prezintă în SECV ID nr. 74 din Lista de Secvențe, alt tip de umanizare (de tip H4) a secvențelor de aminoacizi ale lanțului ușor al anticorpului DR5 antiuman de șoarece TRA-8 a determinat înlocuirea aminoacidului 8 (histidina), aminoacidului 9 (lizina), aminoacidului 10 (fenilalanina), aminoacidului 11 (metionina), aminoacidului 13 (treonina), aminoacidului 20 (serina), aminoacidului 42 (glutamina), aminoacidului 43 (serina), aminoacidului 77 (asparagina), aminoacidului 78 (valina), aminoacidului 80 (serina), aminoacidului 83 (leucina), aminoacidului 85 (acidul aspartic), aminoacidului 99 (glicina), aminoacidului 103 (leucina) și aminoacidului 108 (alanina) de la capătul N-terminal al secvenței de aminoacizi a lanțului ușor al TRA-8 cu prolină, serină, serină, leucină, alanină, treonină, lizină alanină, serină, leucină, prolină, fenilalanină, treonină, glutamină, valină și respectiv treonină. Secvența rezultată se denumește LM4.

Plasmidele de expresie care poartă acest tip de secvențe de aminoacizi ale lanțului ușor umanizat ale anticorpului antiuman DR5 TRA-8 (de tip LM4) (SECV ID nr. 74 din Lista de Secvențe) se construiesc după cum urmează.

#### 1. Sinteza primerilor pentru prepararea regiunilor variabile și constante ale lanțului ușor al TRA-8 LM4 umanizat

ADN care codifică lanțul polipeptidic LM4 (SECV ID nr. 74 din Lista de Secvențe), fiecare dintre ele fiind o fuziune dintre regiunea variabilă a lanțului ușor al anticorpului anti-DR5 umanizat TRA-8 și regiunea constantă a lanțului ușor al Ig umane (lanțul  $\kappa$ ), sunt sintetizate prin utilizarea de combinații ale PCR.

Suplimentar față de 7AL1P (SECV ID Nr. 47) și 7ALCN (SECV ID Nr. 48), MOD1F1 (SECV ID nr. 78), MOD1R1 (SECV ID nr. 79), MOD1F22 (SECV ID nr. 80), MOD1R22 (SECV ID nr. 81), MOD1F3 (SECV ID nr. 82), MOD1R3 (SECV ID nr. 83), MOD1F42 (SECV ID nr. 84), MOD1R4 (SECV ID nr. 85), MOD1F5 (SECV ID nr. 86), MOD1R52 (SECV ID nr. 87), MOD1F7 (SECV ID nr. 90) și MOD1R7 (SECV ID nr. 91), LR17 (SECV ID nr. 101), se sintetizează pentru PCR următorii primeri oligonucleotidici:

5'-ttctgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttcggtcaag gcaccaaggt ggaaatc-3' (MOD1F62; SECV ID nr. 92)

5'-cgtccgatag ctgctatatt gctgacagaa ataggttgca aaatcctccg gtcgcag-3' (MOD1R62; SECV ID nr. 93)

#### 2. Construirea plasmidei pCR3.1/LM4-5-3 (clonarea lanțului ușor al TRA-8 LM4 umanizat)

Fragmentul ADN-LM4, care codifică secvența de aminoacizi, conform definiției din SECV ID nr. 74, al aceleiași, se prepară prin realizarea PCR în 2 etape, se inserează într-un vector plasmidian și se clonează în *E. coli*.

##### a. Prima etapă a PCR

Fragmentul de ADN LM4-F41, care codifică o regiune de secvență de semnal de secreție, cu un situs de clivaj al enzimei de restricție Hind III, adăugat la capătul 5', FRL<sub>1</sub>,

# RO 123525 B1

1 CDRL<sub>1</sub>, FRL<sub>2</sub> și CDRL<sub>2</sub>, FRL<sub>3</sub>, CDRL<sub>3</sub>, FRL<sub>4</sub>, și o porțiune a regiunii constante se prepară în următoarele condiții:

3 Compoziția soluției de reacție:

	- primer oligonucleotidic MOD1F1	5 pmoli;
5	- primer oligonucleotidic MOD1R1	5 pmoli;
	- primer oligonucleotidic MOD1F22	5 pmoli;
7	- primer oligonucleotidic MOD1R22	5 pmoli;
	- primer oligonucleotidic MOD1F3	5 pmoli;
9	- primer oligonucleotidic MOD1R3	5 pmoli;
	- primer oligonucleotidic MOD1F42	5 pmoli;
11	- primer oligonucleotidic MOD1R4	5 pmoli;
	- primer oligonucleotidic MOD1F5	5 pmoli;
13	- primer oligonucleotidic MOD1R52	5 pmoli;
	- primer oligonucleotidic MOD1F62	5 pmoli;
15	- primer oligonucleotidic MOD1R62	5 pmoli;
	- primer oligonucleotidic MOD1F7	50 pmoli;
17	- primer oligonucleotidic MOD1R7	5 pmoli;
	- primer oligonucleotidic 7AL1P	50 pmoli;
19	- primer oligonucleotidic LR17	50 pmoli;
	- cocteil de dNTP-uri	5 μl;
21	- tampon 10xPCR	5 μl;
	- ADN polimerază ampliTaq	2,5 unități.

23 Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, este ajustată la un volum final de 50 μl, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.

25 Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C, timp de 2 min, care se repetă de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.

27 Fragmentul de ADN F41C LM4, care codifică regiunea constantă cu un situs de clivaj  
29 al enzimei de restricție EcoRI, adăugat la capătul 3' terminal, se prepară în următoarele condiții.

31 Plasmidele matrită pSRPDHH se obțin urmând descrierea din cererea de brevet european EP 0909816 A1.

33 Compoziția soluției de reacție:

	- ADN-ul plasmidei pSRPDHH	25 ng;
35	- primer oligonucleotidic MOD1F17	50 pmoli;
	- primer oligonucleotidic 7ALCN	50 pmoli;
37	- cocteil de dNTP-uri	5 μl;
	- tampon 10xPCR	5 μl;
39	- ADN polimerază ampliTaq (PerkinElmer)	2,5 unități.

41 Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, este ajustată la un volum final de 50 μl, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.

43 Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C, timp de 2 min, care se repetă de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.

# RO 123525 B1

Fragmentele de ADN amplificate după PCR se separă prin electroforeză în gel de poliacrilamidă 5%. Gelul după electroforeză este colorat cu bromură de etidiu 1 µg/ml, pentru a detecta ADN-ul produs în lumină UV. Benzile de ADN astfel detectate sunt excizate cu o lamă de ras.	1 3
b. A doua etapă a PCR	5
ADN-ul LM4, în care mai sus descrisele fragmente ADN LM4-F41B, și ADN LM4-F41C se fuzionează, se prepară în următoarele condiții.	7
Compoziția soluției de reacție:	
- fragmentul de gel de ADN-LM4-F41B, preparat în prima etapă a PCR;	9
- fragmentul de gel de ADN-LM4-F41C, preparat în prima etapă a PCR;	
- primerul oligonucleotidic 7AL1P .....	50 pmoli; 11
- primerul oligonucleotidic 7ALCN .....	50 pmoli;
- cocteil de dNTP-uri .....	5 µl; 13
- tampon 10xPCR .....	5 µl;
- ADN polimerază ampliTaq .....	2,5 unități. 15
Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, se ajustează la un volum final de 50 µl, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.	17
Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C, timp de 2 min, care se repetă de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.	19
Fragmentul de ADN-LM4 astfel preparat se inserează în plasmida pCR3.1DNA, utilizând trusa Eukaryotic TA Cloning (Invitrogen), urmând protocolul fabricantului și se introduce în <i>E. coli</i> competentă TOP10F' conținută în trusă. Secvențele de nucleotide, ale acestor ADN-uri care codifică lanțul ușor al TRA-8 umanizat, sunt confirmate prin metoda dideoxi (F. S. Sanger et al., 1977, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 74:5463-5467), utilizând analizorul 3700 DNA (ABI PRISM; Perkin Elmer Applied Biosystems, Japonia).	21 23 25
Plasmidele rezultate se denumesc pCR3.1/LM4-5-3 (plasmida care poartă cADN-ul care codifică regiunea variabilă a lanțului ușor al TRA-8 umanizat și o regiune constantă a lanțului ușor al Ig umane).	27 29
Plasmida pCR3.1/LM4-5-1, care conține fragmentul de ADN LM4, este digerată cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I.	31
1 µg de ADN al plasmidei de clonare pHSG399 este digerat cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I, și apoi se defosforilează cu CIP. Fragmentele de ADN pHSG399 și de ADN al LM4 defosforilate, care au fost digerate cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I, se leagă, utilizând trusa DNA Ligation, versiunea 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd). Apoi, <i>E. coli</i> DH5α este retransformată cu ADN legat și este împrăștiată pe un mediu de agar care conține IPTG 0,1 mM, 0,1% X-Gal și 50 µg/ml cloramfenicol (concentrații finale). Transformanții albi obținuți se cultivă în mediu lichid LB, care conține 50 µg/ml cloramfenicol, și ADN-ul plasmidian este extras din cultura rezultată, în conformitate cu metoda alcalin-SDS. ADN-ul plasmidian extras este digerat cu Hind III și EcoR I, și apoi este selectată o clonă purtătoare a fragmentului de ADN LM4 prin electroforeză în gel de agaroză 1%.	33 35 37 39
Ca rezultat al procedurii de mai sus, se obține plasmida pHSG/M4-5-3-1 purtătoare a unui fragment de fuziune al regiunii variabile a lanțului ușor LM4 TRA-8 umanizat al regiunii constante a lanțului uman Ig κ. Tulpina transformantă <i>E. coli</i> , care poartă această plasmidă, denumită <i>E. coli</i> DH5α/pHSG/M4-5-3-1, a fost depozitată în International Patent Organism	41 43 45

# RO 123525 B1

1 Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1, Higashi  
1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japonia, la data de 20 Aprilie, 2001, în con-  
3 formitate cu Tratatul de la Budapesta pentru Depozitarea Microorganismelor, și i-a fost  
acordat numărul de acces FERM BP-7565.

5 3. *Construirea plasmidei pSR/LM4-5-3-3 (plasmida de expresie pentru lanțul ușor*  
*LM4 al TRA-8 umanizat)*

7 Plasmida obținută, pHSG/M4-5-3-1, purtătoare a unui fragment de fuziune al regiunii  
variabile a lanțului ușor LM4 al TRA-8 umanizat și a regiunii constante a lanțului uman Igk  
9 este digerată cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I.

11 1 μg de ADN al plasmidei de clonare pSRPDHH (cererea de brevet european  
**EP 0909816 A1**) este digerată cu enzimele de restricție HindIII și EcoR I și apoi este  
defosforilată cu CIP. ADN-ul pSRPDHH defosforilat rezultat și fragmentul de ADN HindIII-  
13 EcoRI obținut din pHSG/M4-5-3-1 sunt legate, utilizând Trusa de Legare ADN, versiunea 2.0  
(DNA Ligation Kit Version 2.0) (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Apoi *E. coli* DH5α este transformată  
15 cu ADN-ul legat și întinsă pe agar LB. Transformanții obținuți sunt cultivați în mediu lichid LB,  
care conține 100 μg/ml ampicilină, și ADN-ul plasmidian este extras din cultura rezultată, în  
17 conformitate cu metoda SDS alcalină. Inserția și orientarea fragmentului de ADN dorit, în  
vectorul pSRPDHH, sunt confirmate prin secvențierea ADN, utilizând un analizor de  
19 secvențe de gene (ABI Prism 3700 DNA Analyzer; Applied Biosystems).

21 Plasmida de exprimare rezultată, care poartă cADN-ul care codifică lanțul ușor LM4  
al TRA-8 umanizat, este desemnată pSR/LM4-5-3-3.

23 4.4. *Construirea unui vector de expresie pentru lanțul ușor al anticorpului umanizat*  
*(de tip LM5)*

25 După cum se arată în SECV ID nr. 75 din Lista de Secvențe, altă umanizare (de tip  
LM5) a secvențelor de aminoacizi ale lanțului ușor al anticorpului DR5 antiuman de șoarece  
TRA-8 a determinat înlocuirea aminoacidului 8 (histidina), aminoacidului 9 (lizina),  
27 aminoacidului 10 (fenilalanina), aminoacidului 11 (metionina), aminoacidului 13 (treonina),  
aminoacidului 20 (serina), aminoacidului 42 (glutamina), aminoacidului 43 (serina),  
29 aminoacidului 77 (asparagina), aminoacidului 78 (valina), aminoacidului 80 (serina),  
aminoacidului 83 (leucina), aminoacidului 103 (leucina) și aminoacidului 108 (alanina) de la  
31 capătul N-terminal al secvenței de aminoacizi a TRA-8 cu prolină, serină, serină, leucină,  
alanină, treonină, lizină, alanină, serină, leucină, prolină, fenilalanină, valină și, respectiv,  
33 treonină. Secvența rezultată se denumește LM5.

35 Plasmidele de expresie care poartă acest tip de secvențe de aminoacizi ale lanțului  
ușor umanizat ale anticorpului antiuman DR5 TRA-8 (de tip LM5, SECV ID nr 75 din lista de  
secvențe) se construiesc după cum urmează.

37 1. *Sinteza primerilor pentru prepararea regiunilor variabile și constante ale lanțului*  
*ușor al TRA-8 umanizat de tip LM5*

39 ADN care codifică lanțul polipeptidic LM5 (SECV ID nr. 75 din Lista de Secvențe),  
fiecare dintre acestea fiind o fuziune dintre regiunea variabilă a lanțului ușor al anticorpului  
41 anti-DR5 umanizat TRA-8 și regiunea constantă a lanțului ușor al Ig umane (lanțul κ) sunt  
sintetizate prin utilizarea de combinații ale PCR.

43 Suplimentar față de 7AL1P (SECV ID Nr. 47) și 7ALCN (SECV ID Nr. 48), MOD1F1  
(SECV ID Nr. 78), MOD1R1 (SECV ID Nr. 79), MOD1F22 (SECV ID Nr. 80), MOD1R22  
45 (SECV ID Nr. 81), MOD1F3 (SECV ID Nr. 82), MOD1R13 (SECV ID Nr. 83), MOD1F42

# RO 123525 B1

(SECV ID Nr. 84), MOD1R4 (SECV ID Nr. 85), MOD1R52 (SECV ID Nr. 87), MOD1F7 (SECV ID Nr. 90), și LR17 (SECV ID Nr. 101) se sintetizează pentru PCR următorii primeri oligonucleotidici:	1
5'-gggtctggga cagacttcac, cctcaccatc tctagtctgc agccggagga ttttcagat tat -3' (MOD1F52; SECV ID nr. 94)	3
5'-ttctgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttcggtggag gcaccaaggt ggaaatc-3' (MOD1F63; SECV ID nr. 95)	5
5'-cgtccgatag ctgctatatt gctgacagaa ataatctgca aaatcctccg gctgcag-3' (MOD1R63;SECV ID nr. 96)	7
5'-gaagatgaag acagatggg cagccacagt ccgtttgatt tccacctgg tcgctccacc gaa-3' (MOD1R72; SECV ID nr. 102)	9
2. <i>Construcția plasmidei pCR3.1/LM5-3-42 (clonarea lanțului ușor al TRA-8 umanizat de tip LM5)</i>	11
Fragmentul de ADN-LM5, care codifică secvența de aminoacizi care a fost definită în SECV ID nr 75, al aceluiași, se prepară prin realizarea PCR în 2 etape, se inserează într-un vector plasmidian și se clonează în <i>E. coli</i> .	13
a. <i>Prima etapă a PCR</i>	15
Fragmentul LM5-F51B de ADN, care codifică o secvență de semnal de secreție cu un situs de clivaj al enzimei de restricție Hind III, adăugat la capătul 5', FRL <sub>1</sub> , CDRL <sub>1</sub> , FRL <sub>2</sub> și CDRL <sub>2</sub> , FRL <sub>3</sub> , CDRL <sub>3</sub> , FRL <sub>4</sub> , și o porțiune a regiunii constante se prepară în următoarele condiții.	17
Compoziția soluției de reacție:	19
- primer oligonucleotidic MOD1F1 . . . . . 5 pmoli;	23
- primer oligonucleotidic MOD1R1 . . . . . 5 pmoli;	
- primer oligonucleotidic MOD1F22 . . . . . 5 pmoli;	25
- primer oligonucleotidic MOD1R22 . . . . . 5 pmoli;	
- primer oligonucleotidic MOD1F3 . . . . . 5 pmoli;	27
- primer oligonucleotidic MOD1R3 . . . . . 5 pmoli;	
- primer oligonucleotidic MOD1F42 . . . . . 5 pmoli;	29
- primer oligonucleotidic MOD1R4 . . . . . 5 pmoli;	
- primer oligonucleotidic MOD1F52 . . . . . 5 pmoli;	31
- primer oligonucleotidic MOD1R52 . . . . . 5 pmoli;	
- primer oligonucleotidic MOD1F63 . . . . . 5 pmoli;	33
- primer oligonucleotidic MOD1R63 . . . . . 5 pmoli;	
- primer oligonucleotidic MOD1F7 . . . . . 50 pmoli;	35
- primer oligonucleotidic MOD1R72 . . . . . 5 pmoli;	
- primer oligonucleotidic 7AL1P . . . . . 50 pmoli;	37
- primer oligonucleotidic LR17 . . . . . 50 pmoli;	
- cocteil de dNTP-uri . . . . . 5 μl;	39
- tampon 10xPCR . . . . . 5 μl;	
- ADN polimerază ampliTaq . . . . . 2,5 unități.	41
Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, este ajustată la un volum final de 50 μl, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.	43
Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, 55°C, timp de un minut și 72°C, timp de 2 min, care se repetă de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.	45

# RO 123525 B1

1 Fragmentul de ADN F51C LM5, care codifică regiunea constantă cu un situs de clivaj  
al enzimei de restricție EcoRI, adăugat la capătul 3' terminal, se prepară în următoarele  
3 condiții. Plasmida matrită pSRPDHH se obține urmând descrierea din cererea de brevet  
european EP 0909816 A1.

5 Compoziția soluției de reacție:

- 6 - ADN-ul plasmidei pSRPDHH ..... 25 ng;
- 7 - primer oligonucleotidic MOD1F7 ..... 50 pmoli;
- 8 - primer oligonucleotidic 7ALCN ..... 50 pmoli;
- 9 - cocteil de dNTP-uri ..... 5 μl;
- 10 - tampon 10xPCR ..... 5 μl;
- 11 - ADN polimerază ampliTaq ..... 2,5 unități.

12 Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, este ajustată la un volum final de  
13 50 μl, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.

14 Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește  
15 într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, 55°C, timp de un minut și 72°C, timp de 2 min,  
care se repetă de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.

17 Fragmentele de ADN amplificate după PCR se separă prin electroforeză în gel de  
18 poliacrilamidă 5%. După electroforeză, gelul se colorează cu bromură de etidiu 1 μg/ml,  
19 pentru a detecta ADN-ul produs în lumină UV. Benzile de ADN astfel detectate sunt excizate  
cu o lamă de ras.

21 b. A doua etapă a PCR

22 ADN-ul LM5, în care mai sus descriesele fragmente ADN LM5-F51B și ADN LM5-  
23 F51C se fuzionează, se prepară în următoarele condiții.

24 Compoziția soluției de reacție:

- 25 - fragmentul de gel de ADN-LM5-F51B preparat în prima etapă a PCR;
- 26 - fragmentul de gel de ADN-LM5-F51C preparat în prima etapă a PCR;
- 27 - primerul oligonucleotidic 7AL1P ..... 50 pmoli;
- 28 - primerul oligonucleotidic 7ALCN ..... 50 pmoli;
- 29 - cocteil de dNTP-uri ..... 5 μl;
- 30 - tampon 10xPCR ..... 5 μl;
- 31 - ADN polimerază ampliTaq ..... 2,5 unități.

32 Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, se ajustează la un volum final de  
33 50 μl, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.

34 Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește  
35 într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C, timp de  
2 min, care se repetă de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.

37 Fragmentul de ADN-LM5 astfel preparat se inserează în plasmida pCR3.1DNA,  
utilizând trusa Eukaryotic TA Cloning (Invitrogen), urmând protocolul fabricantului și se  
39 introduce în *E. coli* competentă TOP10F' conținută în trusă. Secvențele de nucleotide, ale  
acestor ADN-uri care codifică lanțul ușor al TRA-8 umanizat, sunt confirmate prin metoda  
41 dideoxi (F. S. Sanger et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463-5467), utilizând  
analizorul de ADN.

43 Plasmidele rezultate se denumesc pCR3.1/LM5-3-42 (plasmida care poartă cADN-ul  
care codifică regiunea variabilă a lanțului ușor al LM5 TRA-8 umanizat și o regiune constantă  
45 a lanțului ușor al Ig umane).

# RO 123525 B1

Plasmida pCR3.1/LM5-3-42 care conține fragmentul de ADN LM5 este digerată cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I.	1
1 μg de ADN al plasmidei de clonare pHSG399 este digerat cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I, și apoi se defosforilează cu CIP. Fragmentele de ADN pHSG399 și de ADN al LM5 defosforilate, care au fost digerate cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I, se leagă, utilizând trusa DNA Ligation, versiunea 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd). Apoi, <i>E. coli</i> DH5α este retransformată cu ADN legat și este împrăștiată pe un mediu de agar care conține IPTG 0,1 mM, 0,1% X-Gal și 50 μg/ml clormafenicol (concentrații finale). Transformanții albi obținuți se cultivă în mediu lichid LB, care conține 50 μg/ml cloramfenicol, și ADN-ul plasmidian este extras din cultura rezultată în conformitate cu metoda SDS alcalină. ADN-ul plasmidian extras este digerat cu Hind III și EcoR I, și apoi este selectată o clonă purtătoare de fragment LM5-ADN prin electroforeză în gel de agaroză 1%.	3 5 7 9
Ca rezultat al procedurii de mai sus, se obține plasmida pHSG/M5-3-27, purtătoare a unui fragment de fuziune al regiunii variabile a lanțului ușor LM5 TRA-8 umanizat și al regiunii constante al lanțului uman Ig κ.	13 15
<i>3. Construirea plasmidei pSR/LM5-3-27-1 (plasmida de exprimare a lanțului ușor LM5 al TRA-8 umanizat)</i>	17
Plasmida pHSG/M5-3-27 obținută, purtătoare a unui fragment de fuziune al regiunii variabile a lanțului ușor LM5 al TRA-8 umanizat și al regiunii constante al lanțului uman Ig κ, este digerată cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I.	19
1 μg de ADN al plasmidei de clonare pSRPDHH (cererea de brevet european EP 0909816 A1) se digeră cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I, și apoi este defosforilată cu CIP. ADN-ul defosforilat rezultat pSRPDHH și fragmentul HindIII-EcoRI obținut din pHSG/M5-3-27 sunt legate, utilizând Trusa de legare a ADN, versiunea 2.0 (DNA Ligation Kit Version 2.0) (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Apoi <i>E. coli</i> DH5α este transformat cu ADN-ul legat și este întinsă pe agar LB. Transformanții obținuți sunt cultivați în mediu lichid LB, care conține 100 μg/ml ampicilină, și ADN-ul plasmidian este extras din cultura rezultată în conformitate cu metoda SDS alcalină. Inserția și orientarea fragmentului de ADN dorit, în vectorul pSRPDHH, sunt confirmate prin secvențierea ADN, utilizând un analizor de secvențe de gene (ABI Prism 3700 DNA Analyzer; Applied Biosystems).	21 23 25 27
Plasmida de expresie, care poartă cADN-ul care codifică lanțul ușor al LM5 TRA-8 umanizat, este desemnată pSR/LM5-3-27-1.	29 31
<i>4.5. Construirea unui vector de expresie pentru lanțul ușor al anticorpului umanizat (de tip himeră)</i>	33
Secvența prezentată în SECV ID nr. 76 din Lista de Secvențe, secvența de aminoacizi ai lanțului ușor al TRA-8 de tip himeră este desemnată LM6.	35
Plasmidele de expresie, care poartă acest tip de secvențe de aminoacizi ale lanțului ușor umanizat ale anticorpului antiuman DR5 TRA-8 (de tip LM6, SECV ID nr 75 din lista de secvențe), se construiesc după cum urmează.	37 39
<i>1. Sinteza primerilor pentru prepararea regiunilor variabile și constante ale lanțului ușor al TRA-8 umanizat de tip LM6</i>	41
ADN care codifică lanțul polipeptidic LM6 (SECV ID nr. 75 din Lista de Secvențe), fiecare dintre acestea fiind o fuziune dintre regiunea variabilă a lanțului ușor al anticorpului anti-DR5 umanizat TRA-8 (tip LM6), și regiunea constantă a lanțului ușor al Ig umane (lanțul κ) sunt sintetizate prin utilizarea de combinații ale PCR.	43 45

# RO 123525 B1

1 Suplimentar față de 7AL1P (SECV ID Nr. 47) și 7ALCN (SECV ID Nr. 48), se sintetizează pentru PCR următorii primeri oligonucleotidici:

3 5'-tgatgtggac atgaattgt gagactgggt catcacaatg tcaccagtgg a-3' (HKSPR13; SECV ID nr. 97);

5 5'-tgggtccag gctccactgg tgacattgtg atgaccagt ctacaaaatt c-3' (MVF11; SECV ID nr. 98);

7 5'-aagacagatg gtcagccac agcccgttg attccagct tgggtcctc-3' (MVR11; SECV ID nr. 99), și

9 5'-aagctgaaa tcaaacgggc tgggctgca ccatctgtct tcat-3' (MCF11; SECV ID nr. 100).

11 *2. Construirea plasmidei pCR3.1/M6-1-16 (clonarea lanțului ușor al TRA-8 umanizat de tip LM6)*

13 Fragmentul ADN-LM6, care codifică secvența de aminoacizi definită în SECV ID nr. 75, se prepară prin realizarea PCR în 2 etape, se inserează într-un vector plasmidian și se clonează în *E. coli*.

15 a. *Prima etapă a PCR*

17 Fragmentul LM6-F1 de ADN, care codifică o secvență de semnal de secreție și o porțiune a regiunii FRL<sub>1</sub>, cu un situs de clivaj al enzimei de restricție Hind III, adăugat la capătul 5', se prepară în următoarele condiții: plasmidele matrită, pHSGHM17 și pSRPDHH se obțin urmând descrierea din cererea de brevet european **EP 0909816 A1**.

19 Compoziția soluției de reacție:

21 - ADN-ul plasmidei pHSGHM17 ..... 25 ng;  
- primer oligonucleotidic 7AL1P ..... 50 pmoli;  
23 - primer oligonucleotidic HKSPR13 ..... 50 pmoli;  
- cocteil de dNTP-uri ..... 5 μl;  
25 - tampon 10xPCR ..... 5 μl;  
- ADN polimerază ampliTa<sup>q</sup> (PerkinElmer) ..... 2,5 unități

27 Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, este ajustată la un volum final de 50 μl, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.

29 Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C, timp de 2 min, care se repetă de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.

33 Fragmentul ADN-ului LM6-F2, care codifică o porțiune a FRL<sub>1</sub>, CDRL<sub>1</sub>, FRL<sub>2</sub>, CDRL<sub>2</sub>, FRL<sub>3</sub>, CDRL<sub>3</sub>, FRL<sub>4</sub>, și o porțiune a regiunii constante se prepară în următoarele condiții.

35 Compoziția soluției de reacție:

37 - ADN plasmidian pL28 ..... 25 ng;  
- primer oligonucleotidic MVF11 ..... 50 pmoli;  
- primer oligonucleotidic MVR12 ..... 50 pmoli;  
39 - cocteil de dNTP-uri ..... 5 μl;  
- tampon 10xPCR ..... 5 μl;  
- ADN polimerază ampliTa<sup>q</sup> ..... 2,5 unități.

41 Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, se ajustează la un volum final de 50 μl, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.

43 Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C, timp de 2 min, care se repetă de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.

# RO 123525 B1

Fragmentul de ADN LM6-F3, care codifică o porțiune a FRL <sub>4</sub> și regiunea constantă, cu un situs de clivaj al enzimei de restricție EcoR I, adăugat la căpătul 3', se prepară în următoarele condiții.	1 3
Compoziția soluției de reacție:	
- ADN-ul plasmidei pSRPDHH . . . . .	25 ng; 5
- primer oligonucleotidic MCF11 . . . . .	50 pmoli; 7
- primer oligonucleotidic 7ALCN . . . . .	50 pmoli; 7
- cocteil de dNTP-uri . . . . .	5 μl; 9
- tampon 10xPCR . . . . .	5 μl; 9
- ADN polimerază ampliTaq . . . . .	2,5 unități. 11
Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, se ajustează la un volum final de 50 μl, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.	11
Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește într-un ciclu termic, la 94°C timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C, timp de 2 min, care se repetă de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.	13 15
Fragmentele de ADN amplificate după PCR se separă prin electroforeză în gel de poliacrilamidă 5%. După electroforeză, gelul se colorează cu 1 μg/ml bromură de etidiu, pentru a detecta ADN produs în lumină UV. Benzile de ADN respective astfel detectate sunt excizate cu o lamă de ras.	17 19
<i>b. A doua etapă a PCR</i>	
AND-ul LM6, în care fragmentele de ADN LM6-F1, ADN LM6-F2, ADN LM6-F3 mai sus descrise sunt fuzionate, se prepară în următoarele condiții.	21
Compoziția soluției de reacție:	23
- fragmentul gel de ADN-LM6-F1 preparat în prima etapă a PCR;	
- fragmentul gel de ADN-LM6-F2 preparat în prima etapă a PCR;	25
- fragmentul gel de ADN-LM6-F3 preparat în prima etapă a PCR;	
- primerul oligonucleotidic 7AL1P . . . . .	50 pmoli; 27
- primerul oligonucleotidic 7ALCN . . . . .	50 pmoli; 29
- cocteil de dNTP-uri . . . . .	5 μl; 29
- tampon 10xPCR . . . . .	5 μl; 31
- ADN polimerază ampliTaq . . . . .	2,5 unități. 31
Soluția de reacție, având compoziția de mai sus, se ajustează la un volum final de 50 μl, prin adăugare de apă redistilată și se utilizează în PCR.	33
Condițiile termice ale PCR: încălzire la 94°C, timp de 2 min, după care se încălzește într-un ciclu termic, la 94°C, timp de un minut, la 55°C, timp de un minut și la 72°C, timp de 2 min, care se repetă de 30 de ori, urmat de încălzire la 72°C, timp de 10 min.	35
Fragmentul de ADN-LM6 astfel preparat se inserează în plasmida pCR3.1DNA, utilizând trusa Eukaryotic TA Cloning (Invitrogen), urmând protocolul fabricantului și se introduce în <i>E. coli</i> competentă TOP10F' conținută în trusă. Secvențele de nucleotide, ale acestor ADN-uri care codifică lanțul ușor al TRA-8 umanizat, sunt confirmate prin metoda dideoxi, utilizând un analizor de ADN.	37 39 41
Plasmidele rezultate se denumesc pCR3.1/LM6-1-16 (plasmida care poartă cADN-ul care codifică regiunea variabilă a lanțului ușor al TRA-8 de șoarece și o regiune constantă a lanțului ușor al Ig umane).	43
Plasmida pCR3.1/M6-1-16 obținută, care conține fragmentul de ADN LM6, este digerată cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I.	45

# RO 123525 B1

1           1 µg de ADN al plasmidei de clonare pHSG399 este digerat cu enzimele de restricție  
Hind III și EcoR I, și apoi se defosforilează cu CIP. Fragmentele de ADN pHSG399 și de  
3 ADN LM6 defosforilate, care au fost digerate cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I se  
leagă, utilizând trusa DNA Ligation, versiunea 2.0 (Takara Syuzo, Co. Ltd). Apoi, *E. coli*  
5 DH5α este retransformată cu ADN legat și este împrăștiată pe un mediu de agar LB, care  
conține IPTG 0,1 mM, 0,1% X-Gal și 50 µg/ml cloramfenicol (concentrații finale).  
7 Transformanții albi obținuți se cultivă în mediu lichid LB, care conține 50 µg/ml cloramfenicol,  
și ADN-ul plasmidian este extras din cultura rezultată în conformitate cu metoda SDS  
9 alcalină. ADN-ul plasmidian extras este digerat cu Hind III și EcoR I, și apoi este selectată  
o clonă purtătoare de fragment LM6-ADN prin electroforeză în gel de agaroză 1%.

11           Ca rezultat al procedurii de mai sus, se obține plasmida pHSG/M6-1-4-1 purtătoare  
a unui fragment de fuziune a regiunii variabile a lanțului ușor al TRA-8 de șoarece și a  
13 regiunii constante a lanțului uman Igκ. Tulpina transformantă *E. coli*, care prezintă această  
plasmidă, denumită *E. coli* DH5α/pHSG/M6-1-4-1, a fost depozitată în International Patent  
15 Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1,  
Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japonia, la data de 20 Aprilie, 2001,  
17 în conformitate cu Tratatul de la Budapesta pentru Depozitarea Microorganismelor, și i-a fost  
acordat numărul de acces FERM BP-7566.

19           3. *Construirea plasmidei pSR/LM6-1-4-6 (plasmidă de expresie pentru lanțul ușor  
LM6 al TRA-8 de tip himeră)*

21           Plasmida obținută pHSG/LM6-1-4-1, purtătoare a unui fragment de fuziune al regiunii  
variabile a lanțului ușor al TRA-8 de șoarece și al regiunii constante a lanțului uman Igκ, este  
23 digerată cu enzimele de restricție Hind III și EcoR I.

25           1 µg de ADN al plasmidei de clonare este digerat cu enzimele de restricție HindIII  
și EcoR I, și apoi este defosforilat cu CIP. ADN-ul pSRPDHH defosforilat rezultat și  
fragmentul de ADN HindIII-EcoR I obținut din pHSG/LM6-1-4-1 sunt legate, utilizând Trusa  
27 de Legare ADN, versiunea 2.0 (DNA Ligation Kit Version 2.0) (Takara Syuzo, Co. Ltd.). Apoi  
*E. coli* DH5α este transformată cu ADN-ul legat și întinsă pe agar LB. Transformanții obținuți  
29 sunt cultivați în mediu lichid LB, care conține 100 µg/ml ampicilină, și plasmida ADN este  
extrasă din cultura rezultată în conformitate cu metoda SDS alcalină. Inserția și orientarea  
31 fragmentului de ADN dorit în vector sunt confirmate prin secvențierea ADN, utilizând un  
analizor de secvențe de gene.

33           Plasmida de exprimare rezultată, care poartă cADN-ul care codifică lanțul ușor al  
TRA-8 (de tip himeră), este desemnată pSR/LM6-1-4-6.

35           5. *Producerea câtorva tipuri de anticorpi TRA-8 umanizat sau himeric*

37           Transfecția celulelor COS-7 se realizează prin metodele de transfecție cu reactiv  
FUGENE6 (Boehringer Mannheim Biochemica), în conformitate cu manualul de utilizare  
furnizat cu trusa.

39           Celule COS-7 (Colecția Americană de Tipuri de Culturi nr. CRL-1651) sunt crescute  
la semiconfluență (3x10<sup>6</sup> celule/vas) într-un vas de cultură (suprafața culturii: 57 cm<sup>2</sup>,  
41 Sumitomo Bakelite) care conține mediu Eagle modificat al lui Dulbecco (la care se va face  
referire de acum încolo ca "D-MED"; Gibco BRL), suplimentat cu ser fetal de vițel 10%  
43 (abreviat aici ca "FCS"; Moregate).

45           Între timp, 10 µg/vas (în total 5 vase) cu ADN al plasmidei de exprimare a lanțului  
greu DR5 umanizat (pHA15-1) și 10 µg/vas de ADN al plasmidei de expresie a lanțului ușor

# RO 123525 B1

DR5 umanizat preparat prin metoda SDS-alkalină și centrifugare în gradient de densitate de clorură de cesiu se amestecă și apoi se precipită cu etanol, urmat de suspendare în 5 μl/vas dH <sub>2</sub> O.	1 3
După ce 15 μl/vas de reactiv de transfecție FUGENE6 este amestecat cu 180 μl/vas D-MEM fără FCS, această soluție FUGENE (185 μl/vas) se amestecă cu 5 μl/vas soluție de ADN care conține 10 μg/vas ADN al plasmidei de expresie a lanțului greu al DR5 umanizat și 10 μg/vas ADN al plasmidei de expresie a lanțului ușor al DR5 umanizat. După 15 min de incubare la temperatura camerei, suspensia de plasmidă obținută (200 μl) se adaugă la plăcile cu COS-7 preparate anterior. După incubare în 5% CO <sub>2</sub> , la 37°C, timp de 24 h , mediul de cultură este schimbat cu D-MEM fără FCS. După incubare în 5% CO <sub>2</sub> , la 37°C, timp de 72 h, supernatantul de cultură este recuperat, pentru a purifica produsele de expresie din fluidele supernatante. Prin metoda descrisă mai sus, celulele COS -7 sunt transfectate cu fiecare dintre combinațiile de plasmide:	5 7 9 11 13
(A) cotransfecția lui pHA15-1 și pSR/LM1-2 (H1L1);	
(B) cotransfecția lui pHB14-1 și pSR/M2-1 (H2L2);	15
(C) cotransfecția lui pHB14-1 și pSR/LM3-3-44-10 (H2L3);	
(D) cotransfecția lui pHB14-1 și pSR/LM4-5-3-3 (H2L4);	17
(E) cotransfecția lui pHC10-3 și pSR/M2-1 (H3L2);	
(F) cotransfecția lui pHC10-3 și pSR/LM3-3-44-10 (H3L3);	19
(G) cotransfecția lui pHC10-3 și pSR/LM4-5-3-3 (H3L4);	
(H) cotransfecția lui pHD21-1 și pSR/LM5-3-27-1 (H4L5);	21
(I) cotransfecția lui pM11-1 și pSR/LM6-1-4-6 (himeră).	
Cultura este apoi centrifugată (3500 rpm, 15 min) și se colectează supernatantul. Supernatantul se filtrează cu un filtru de 0,45 μm (ADVANTEC TOYO SISMIC-25cs, Cat # 25CS045 AS). Purificarea IgG din filtrate se realizează, utilizând cromatografia de afinitate POROS-Proteină G (Applied Biosystems), în următoarele condiții:	23 25
- sistemul HPLC: BioCAD 700E (Applied Biosystems);	27
- coloană: cartuș senzor ProteinăG-ID (mărimea coloanei: 2,1 mmID x 30 mm LD, volumul patului: 0,1 ml; Cat # 2-1002-00, Applied Biosystems);	29
- tampon de eluție: 0,1 M glicină-HCl (pH 2,5);	
- tampon de neutralizare: 1M Tris-HCl (pH 8,5);	31
- detecție: 280 nm;	
- viteza de curgere: 1 ml/min;	33
- mărimea fracțiilor: 0,5 ml/0,5 min;	
- tubul pentru fracții: Microtub de polipropilenă 1,5 ml;	35
- temperatura: 4°C.	
După ce toate filtratele se aplică pe coloană, 50 ml PBS (Sigma, Cat # 1000-3) se utilizează pentru a spăla coloana. Când se aplică tamponul de eluție, pornește collectorul de fracții. Fiecare microtub de fracții a conținut înainte 55 μl de NaCl 1M, 110 μl tampon de neutralizare și 74 μl de albumină serică bovină 2 mg/ml (Sigma, Cat # A-7030) în PBS). Fracțiile de la nr. 7 până la nr. 8.	37 39 41
Verificarea exprimării anticorpilor umanizați și determinarea cantitativă a produșilor de expresie în fluidele de supernatant de cultură preparate se realizează prin ELISA față de un anticorp IgG antiuman.	43

# RO 123525 B1

1 În fiecare godeu al unei plăci cu 96 godeuri (MaxiSorp, Nunc), se adaugă 100 µl de  
anticorp policlonal specific IgG Fc antiuman de capră (Kappel), dizolvat la concentrația finală  
3 de 0,5 µg/ml în tampon de adsorbție (0,05 M carbonat acid de sodiu, 0,02% azidă de sodiu,  
pH 9,6), iar placa este incubată la 37°C, timp de 2 h, pentru a produce adsorbția anticorpului.  
5 Apoi, placa se spală cu 350 µl PBS(-) conținând 0,05% Tween-20 (BioRad) (la care se va  
face referire în continuare ca "PBS-T") de cinci ori. Se adaugă în godeuri, după spălare,  
7 supernatantul de cultură diluat cu D-MEM, care conține 10% FCS, și se incubează la 37°C,  
timp de 2 h . După spălare din nou cu PBS-T, se adaugă, în fiecare godeu, 100 µl de  
9 anticorp policlonal specific IgG Fc antiuman de capră, marcat cu fosfatază alcalină (Jackson  
Immuno Research Lab.), diluat de 10000 de ori cu PBS-T, și se incubează la 37°C, timp de  
11 2 h . După o nouă spălare cu PBS-T, se adaugă o soluție de substrat de p-nitrofenil fosfat,  
obținută din trusa Alkaline Phosphatase Substrate (BioRad), în conformitate cu manualul de  
13 utilizare, furnizat cu trusa. După incubare la 37°C, timp de 1,5 h, se măsoară absorbanta la  
405 nm. În experimentele de față, imunoglobulină G subclasa 1 (IgG1) din plasmă umană  
15 (Biopure AG), diluată cu D-MEM, care conține 10% FCS în anumite concentrații, se  
utilizează ca probă de concentrație de referință, pentru anticorpul DR5 conținut în fluidele de  
17 supernatant de cultură.

Ca rezultat, produsele de expresie purificate din supernatantul de cultură sunt  
19 detectate în mod specific cu anticorp IgG antiuman. Concentrația de anticorp uman IgG este  
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  
21 (H3L2), 24,7 µg/ml (H3L3), 21,5 µg/ml (H3L4), 16,7 µg/ml (H4L5) și, respectiv, 18,3 µg/ml  
(himeră).

23 *6. Activitatea de inducție a apoptozei a câtorva tipuri de anticorpi umanizați sau  
himerici*

25 Se utilizează celule Jurkat (ATCC nr. TIB-152), pentru a examina activitatea de  
inducere a apoptozei a anticorpului TRA-8 umanizat purificat.

27 Celule Jurkat, cultivate în mediu RPMI1640, cu 10% FCS (Gibco BRL), la 37°C, timp  
de 3 zile, în prezența a 5% CO<sub>2</sub>, sunt dispersate, în fiecare godeu al unei plăci cu 96 godeuri  
29 (Sumitomo Bakelite), la 50 µl per godeu. TRA-8 umanizat, preparat în exemplul 20, este  
ajustat, pentru a avea concentrația produsului final de interes la 100 ng/ml, cu mediu  
31 RPMI1640 care conține 10% FCS, prin estimarea concentrației acestuia în lichide, în  
conformitate cu metoda descrisă în exemplul 26. Fiecare dintre soluțiile de produși de  
33 expresie astfel ajustate la 100 ng/ml se utilizează pentru a produce diluții seriale, prin  
repetarea unei diluții seriale de 2-ori cu RPMI1640 care conține 10% FCS. Fiecare dintre  
35 soluțiile de TRA-8 (H1L1, H2L2, H2L3, H2L4 sau H4L5) se adaugă în fiecare godeu, la 50  
µl per godeu. După ce reacționează la 37°C, timp de 12 h , se adaugă 50 µl de PMS 25 µM,  
37 care conține 1 mg/ml XTT (concentrația finală de 250 µg/ml pentru XTT și 5 µM pentru PMS).  
După incubare timp de 3 h, se măsoară absorbanta la 450 nm a fiecărui godeu, pentru a  
39 calcula viabilitatea celulară, prin utilizarea capacității de reducere a mitocondriilor ca indice.

Viabilitatea celulelor din fiecare godeu se calculează în conformitate cu următoarea  
41 formulă:

$$43 \text{ Viabilitate (\%)} = 100 \times (a-b)/(c-b)$$

# RO 123525 B1

unde "a" este măsurătoarea godeului test, "b" este măsurătoarea unui godeu fără celule și "c" este măsurătoarea unui godeu fără anticorp adăugat.	1
Ca rezultat, anticorpii umanizați testați se demonstrează că induc apoptoza în celulele liniei de celule de limfom T care exprimă antigenul DR5 uman.	3
Mai departe, activitatea de inducție a apoptozei a TRA-8 umanizat în PC-3 se examinează prin adăugarea de taxol, în conformitate cu metoda descrisă în exemplul 25.	5
Se obține linia de celule de cancer de prostată PC-3 (ATCC nr. CRL-1435 de la American Tissue Culture Collection (ATCC) și se menține în amestec nutritiv F-12K (21127-022, Gibco BRL) care conține ser fetal bovin 10% (FBS, Hyclone, 200 mM L-glutamină 1% (25030-149, Gibco BRL) și soluție de streptomycină penicilină 0,5% (P-7539, Sigma). Se utilizează în experimentul care urmează mediu RPMI1640 (MED-008, IWAKI), suplimentat cu FBS 10% și cu soluție de penicilină streptomycină 0,5%. Celulele PC-3 cu creștere exponențială se colectează prin tripsinizare și se spală de două ori cu mediu proaspăt. Celulele sunt apoi numărate, resuspendate în mediu proaspăt, la o densitate de $5 \times 10^4$ celule/ml și se distribuie în triplicat pe plăci cu 96 godeuri (3598, Corning-Costar), într-un volum total de 100 $\mu$ l/godeu, la o zi după începerea experimentului. Un medicament anticanceros reprezentativ, Paclitaxel (169-18611, Wako), dizolvat în dimetilsulfoxid (10 mg/ml), este diluat în mediu proaspăt și apoi se adaugă pe plăci cu 96 godeuri, care conțin celule în cantitate de 50 $\mu$ l/godeu. Concentrațiile finale de dimetilsulfoxid sunt mai mici de 0,1%. După incubare timp de 24 h, la 37°C, într-o atmosferă de 5% CO <sub>2</sub> , se adaugă, în godeuri, anticorp TRA-8 umanizat (H1L1, H2L2, H2L3, H2L4, H3L2, H3L3, H3L4 sau H4L5), diluat în mediu proaspăt. După incubare timp de încă 24 h, se adaugă, în godeuri, 50 $\mu$ l de mediu Minimum Essential (11095-098, Gibco BRL), care conține 1 mg/ml XTT și 25 mM PMS și plăcile sunt incubate timp de 6 h. Se măsoară apoi DO <sub>450</sub> cu numărătorul multimarcaj ARVO HTS 1420 (Wallac Berthold), iar viabilitatea celulară se calculează după cum urmează:	7
	9
	11
	13
	15
	17
	19
	21
	23
	25
	27
Viabilitatea (%) = $(DO_{450}$ pentru godeul care conține celule tratate cu Taxol și cu TRA-8 (agent/agenți) - $DO_{450}$ pentru godeul care nu conținea nici celule nici agent) x 100 / ( $DO_{450}$ pentru godeul care conține celule fără agent - $DO_{450}$ pentru godeul care nu conține nici celule nici agent)	29
	31
Ca rezultat, anticorpii umanizați testați se demonstrează că induc apoptoza în liniile de celule de cancer de prostată uman care exprimă antigenul DR5.	33
<b>Exemplul 27. Producerea anticorpului DR4</b>	35
O proteină de fuziune care conține domeniul extracelular al DR4 uman (aa de la 1 la 236) și porțiunea Fc a IgG umane a fost exprimată în celulele Cos-7 transfectate cu un vector adenoviral recombinat. Proteina de fuziune a fost purificată pe o coloană de afinitate cu proteină A. Au fost imunizați șoareci Balb/c cu proteina de fuziune purificată, conform descrierii de mai sus. A fost subclonată de trei ori o clonă de hibridom, 2E12 (IgG1, $\kappa$ ) cu legare specifică la DR4 și cu capacitatea de a induce apoptoza celulelor de limfom B umane Ramos. A fost determinată specificitatea de legare a 2E12 prin ELISA și analiză Western blot, utilizând DR5, DcR1 și DcR2 umani și proteina de fuziune IgG1 ca antigeni martor. Legarea 2E12 la	37
	39
	41
	43

1 DR4 de la suprafața celulei a fost determinată prin citometrie în flux a celulelor Cos-7  
2 transfectate cu cADN cu lungime integrală care codifică DR4 uman. Activitatea de inducție  
3 a apoptozei a fost determinată prin incubarea celulelor Ramos cu 1 µg/ml 2E12 în prezența  
4 IgG1 de capră antișoarece. Viabilitatea celulelor a fost determinată prin analiza ATPLite  
5 conform descrierii de mai sus.

## **Exemplul 28. Caracterizarea anticorpului DR4**

7 Anticorpul monoclonal DR4 (2E12) este specific pentru DR4 uman și nu se leagă la  
8 alți receptori TRAIL, cum fac DR5, DcR1 și DcR2 în ELISA (fig. 19a). 2E12 a recunoscut  
9 DR4 de la suprafața celulei, după cum s-a demonstrat prin analiză de citometrie în flux a  
10 celulelor Cos-7 transfectate cu DR4 (fig. 19b). 2E12 a fost capabil de a induce apoptoza  
11 celulelor de limfom Ramos în prezența unei reticulări a unui al doilea anticorp într-o manieră  
12 doză-dependentă (fig. 19c). Tratamentul *in vitro* al celulelor Ramos cu 2E12 a avut ca  
13 rezultat o activare dependentă de timp a caspazelor 8, 9 și 3, și clivajul PARP (fig. 19d).  
14 Aceste rezultate au indicat faptul că 2E12 este un anticorp anti-DR4 agonist, care induce  
15 apoptoza într-o manieră caspazo-dependentă.

16 Utilizând anti-DR4 (2E12), urmat de anticorp IgG1 antișoarece de capră, conjugat cu  
17 PE și citometria în flux, anticorpul DR4 s-a dovedit că se leagă la celulele unei linii de celule  
18 de fibrosarcom (Hs 913T) și la câteva linii de celule de cancer de sân (2LMP, MDA-MB231,  
19 și MDA-MB453), dar a prezentat o legare slabă sau deloc la o linie de celule de fibroblast de  
20 piele umană normală (Malme-3).

## **Exemplul 29. Activitatea tumoricidă a anticorpilor DR4**

21 Activitatea tumoricidă a 2E12 a fost testată, utilizând modele de tumori cancerose de  
22 sân. Șoareci nuzi au fost inoculați s. c. cu o linie de celule de cancer de sân uman, 2LMP.  
23 Tratamentul cu doze *i. p.* de 200 µg de 2E12 s-a produs în zilele 7, 10, 14, 17, 21 și 24, după  
24 injecția celulelor tumorale. Animalele au primit Adriamicină (Doxorubicină) (6 mg/kg) în zilele  
25 8, 12 și 16. Tratamentul cu 2E12 și Adriamicină (fig. 20) a produs o mai mare inhibiție a  
26 creșterii tumorii decât 2E12 sau Adriamicină singure.

27 Activitatea tumoricidă a TRA-8 în combinație cu 2E12 a fost testată, utilizând aceleași  
28 modele de tumoare canceroasă de sân. Tratamentul cu doze *i. p.* de 200 µg de TRA-8 și  
29 2E12 s-a produs în zilele 7, 10, 14, 17, 21 și 24, după injecția celulelor tumorale. Animalele  
30 au primit *i. v.* Adriamicină (Doxorubicină) (6 mg/kg) în zilele 8, 12 și 16. Tratamentul cu TRA-  
31 8 plus 2E12, sau cu TRA-8 plus 2E12 și Adriamicină a produs o regresie tumorală de 88%  
32 sau completă, respectiv, de 100% (fig. 21).

## **Exemplul 30. Activitatea tumoricidă a anticorpilor DR4/DR5 în combinație cu alte 35 terapii**

### **1. Reactivi și linii de celule**

36 Subclona 2LMP a liniei de cancer de sân uman MDA-MB-231, subclona LCC6 a  
37 MDA-MB-435, și subclona DY36T2 a MDA-MB-361 au fost obținute de la dr. Marc Lipmann  
38 (Universitatea Georgetown, Washington DC), și au fost menținute în MEM suplimentat cu  
39 FBS10% (Hyclone, Logan, UT). Liniile de celule de cancer uman de sân, MDA-MB-231,  
40 MDA-MB-453, MDA-MB-468, BT-474, SK-BR-3 și ZR-75-1, au fost obținute de la Colecția  
41 Americană de Tipuri de Culturi (Manassas, VA). Celule MDA-MB-231, MDA-MB-453, și

# RO 123525 B1

MDA-MB-468 au fost crescute în DMEM suplimentat cu vitamine MEM, cu aminoacizi neesențiali MEM, cu piruvat de sodiu 1mM și cu 10% FBS. Celulele BT-474 au fost crescute în RPMI 1640, suplimentat cu 10 μg/ml insulină, 4,5 g/l glucoză, HEPES 10 mM, piruvat de sodiu 1 mM și FBS 10%. Celulele SK-BR-3 au fost crescute în mediu McCoy cu FBS 15%. Celulele ZR-75-1 au fost crescute în mediu F12K Ham cu FBS 20%. Toate liniile de celule au fost menținute în mediu fără antibiotic într-o atmosferă de CO<sub>2</sub> 5% și au fost supuse unei analize de rutină, pentru determinarea contaminării cu micoplasme.

A fost produs mAc TRA-8 (IgG1) la UAB și a fost furnizat, de asemenea, de către Sankyo Co., (Tokyo, Japonia). IgG1 antișoarece de capră, conjugat cu ficoeritrină, și anticorpul martor IgG1 izotip-specific au fost obținuți de la Southern Biotechnology Associates (Birmingham, AL). Adriamicina și Paclitaxelul au fost achiziționate de la Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO) și au fost preparate ca soluții stoc 10 mM în H<sub>2</sub>O distilată sau, respectiv, în DMSO. Pentru studiile pe animale, formularea clinică a Paclitaxelului (Bristol-Myers Squibb Co., Princeton, NJ) a fost obținută de la Universitatea din Alabama, la Farmacia Spitalului Birmingham (Birmingham, AL). Acest preparat a fost diluat 1:5 în PBS, imediat înainte de utilizare.

## 2. Analiza de imunofluorescență indirectă și analiza de citometrie în flux a expresiei DR5

Celulele aflate în fază de creștere exponențială au fost spălate o dată cu PBS Dulbecco (cu deficit de Ca<sup>2+</sup> și Mg<sup>2+</sup>) și au fost hrănite cu EDTA 4mM/KCl 0,5%, la 37°C. Celulele au fost colectate prin centrifugare la 4°C, timp de 5 min, la 1000 rpm, au fost spălate o dată și resuspendate în PBS, care conține BSA 1% și azidă de sodiu 0,01% (tampon FACS) la 4°C. Celulele au fost incubate cu 10 μg/ml TRA-8 purificat sau cu un anticorp martor specific IgG1, timp de 60 min, la 4°C, spălate o dată cu tampon, apoi incubate cu 10 μg/ml IgG1 antișoarece de capră, conjugat cu PE, timp de 20 min, la 4°C. După colorarea anticorpului, celulele au fost spălate o dată cu tampon FACS și au fost fixate în paraformaldehidă, timp de 15 min, pe gheață. Au fost analizate probe cu un aparat Becton Dickinson FACScan (San Jose, CA) și datele au fost analizate, utilizând un soft CellQuest.

## 3. Viabilitatea celulară utilizând ATPLite

Celulele au fost tripsinizate și resuspendate în mediu de cultură complet. O mie de celule per godeu au fost plasate pe plăci negre optic clare cu 96 godeuri (Costar # 3904, Corning, NY) și au fost incubate peste noapte la 37°C, înainte de a iniția tratamentele. Medicamentele și anticorpul au fost diluate în mediul de cultură imediat înainte de utilizare, iar concentrația finală a DMSO a fost întotdeauna ≤ 0,001%. Viabilitatea celulelor a fost determinată după o expunere de 24 h, doar la TRA-8. Pentru tratamentele combinate cu medicamente citotoxice, celulele au fost pretratate cu medicament cu 24 h înainte de adăugarea anticorpului, și au fost incubate timp de încă 24 h, înainte de determinarea viabilității celulelor prin măsurarea nivelurilor de ATP celular, utilizând o analiză bazată pe luminescență ATPLite (Packard Instruments, Meriden, CT). A fost urmat protocolul recomandat de fabricant, cu excepția faptului că toate volumele de reacție (mediul de cultură și reactivii) au fost reduse la jumătate. Toate probele au fost determinate în triplicat și au fost raportate ca medie ± ES, pentru minimum 3 experimente independente.

## 4. Studiile de terapie cu TRA-8 singur sau în combinație cu chimioterapia sau cu radiația la șoareci nuzi atimici care poartă xenogrefe de cancer de sân

Șoareci nuzi atimici au fost injectați s. c. cu 3 x 10<sup>7</sup> celule 2LMP. La 7 zile după injecția cu celule tumorale, au fost administrate 200 sau 600 μg (10 sau 30 mg/kg) TRA-8

# RO 123525 B1

1 *i. p.*, urmat de cinci injecții suplimentare, în zilele 10, 14, 17, 21 și 24. Creșterea tumorilor a  
fost supravegheată. În studiile ulterioare, animalele care poartă tumori 2LMP s. c. au fost  
3 injectate *i. p.* cu 200 μg de TRA-8, în zilele 7, 10, 14, 17, 21 și 24, singur sau în combinație  
cu Adriamicină (6 mg/kg *i. v.*, în zilele 8, 12 și 16) sau cu Paclitaxel (20 mg/kg *i. p.* în zilele  
5 8, 12, 16, 20 și 24). Au fost determinate mărimea și vitezele de regresie a tumorii. În plus,  
s-a desfășurat un studiu cu TRA-8 și Adriamicină, utilizând același regim descris mai sus,  
7 în combinație cu iradiere cu 3Gy <sup>60</sup>Co a xenogrefelor 2LMP, în zilele 9 și 17.

## 5. Analiza apoptozei în xenogrefe

9 Șoareci nuzi atimici au fost injectați s. c. cu  $3 \times 10^7$  celule 2LMP, în ziua 0, apoi au  
primit 100 μg TRA-8 *i. p.*, în zilele 7 și 10. Grupuri de 2 șoareci au primit fiecare Adriamicină  
11 3 mg/kg), în zilele 8 și 11, Paclitaxel (10 mg/kg) în zilele 8 și 11, sau o combinație de TRA-8  
și Adriamicină sau Paclitaxel, după aceeași doză și schemă. Unul dintre grupurile de șoareci  
13 a fost netratat. Xenogrefele au fost disecate, pentru studiu, în ziua 14, după injectarea  
celulelor tumorale. Motivul reducerii substanțiale a intensității tratamentului comparativ cu  
15 protocolul nostru de tratament standard a fost lăsat să adevăze țesutul tumoral pentru  
analiză în ziua 14. Analiza tunel a apoptozei xenogrefelor tumorale a fost realizată după cum  
17 urmează. Au fost montate secțiuni de țesut în parafină de cinci microni pe lame  
Superfrost/Plus și au fost încălzite la 58°C, timp de 1 oră. Secțiunile de țesut au fost  
19 deparafinizate de trei ori în xilen și au fost rehidratate cu etanol absolut, etanol 95% și cu  
etanol 70%, fiecare în incremente de 5 min. Apoi secțiunile au fost plasate în soluție salină  
21 tamponată cu Tris (0,5M bază Tris, NaCl 0,15M, 0,0002% Triton X-100, pH 7,6). Nucleele  
apoptotice au fost detectate, utilizând trusa Apop TagPeroxidase (Intergen, Purchase, N.Y.).  
23 A fost adăugată, în fiecare specimen de țesut, proteinază K (20 μg/ml în apă distilată  
deionizată), și s-au incubat la temperatura camerei, timp de 15 min. Peroxidazele endogene  
25 au fost inactivate cu o soluție apoasă de peroxid de hidrogen, timp de 5 min. Secțiunile au  
fost tratate cu tampon de echilibrare, timp de 30 min și apoi au fost incubate cu enzimă TdT  
27 (diluată în amestecul de reacție de marcare), timp de o oră, la 37°C, utilizând învelișuri de  
parafilm. În timpul acestei incubări, enzima TdT se leagă la capetele 3'-OH ale fragmentelor  
29 de ADN și catalizează adiția dezoxinucleotidelor marcate cu digoxigenină și nemarcate.  
Martorii negativi au fost incubati cu H<sub>2</sub>O distilată (diluată în amestec de reacție de marcare)  
31 în locul enzimei TdT. Un tampon de stopare a fost adăugat, timp de 10 min, la temperatura  
camerei, pentru a termina reacția de marcare. A fost adăugat, pe fiecare lamelă, un conjugat  
33 antidigoxigenină, timp de 30 min. Cromogenul 3,3'DAB a fost utilizat pentru a vizualiza  
capătul 3'OH al fragmentelor de ADN. Lamelele au fost apoi clătite cu apă deionizată și au  
35 fost ușor contracolorate cu hematoxină, deshidratate, utilizând alcoolii gradați și xilen și se  
acoperă, utilizând Permount. La aproximativ 10 câmpuri randomizate, li s-a evaluat  
37 procentajul de colorație Tunel și procentajul de corpuri apoptotice intens colorate din întregul  
țesut.

## 6. Analiza statistică

### A. Analiza interacțiunii TRA-8 cu citotoxicitatea medicamentului *in vitro*

41 Datele de citotoxicitate au fost evaluate pentru a determina dacă combinația de  
efecte citotoxice a fost aditivă, mai puțin decât aditivă (antagonistă) sau mai mare decât  
43 aditivă (sinergică). Relațiile doză-răspuns pentru agenții singuri și în combinație au fost  
modelate, utilizând un model de răspuns de suprafață de ordinul doi, cu termeni liniari,  
45 pătratici și de interacțiune, pentru fiecare dintre cele 9 linii de celule (Montgomery, D. C.,

*Design and Analysis of Experiments*, New York: Wiley, 2001), după recomandarea lui Gennings (*On Testing for Drug/Chemical Interactions: Definitions and Interference*, pp. 457-468, 2000). Un termen de interacțiune semnificativ a fost clasificat ca fiind sinergic sau antagonist, depinzând de faptul că termenul de interacțiune a fost negativ, având o citotoxicitate mai mult decât aditivă, sau pozitiv, având o toxicitate mai puțin decât aditivă. Dacă termenul de interacțiune nu a fost semnificativ, atunci relația dintre TRA-8 și Adriamicină sau TRA-8 și Paclitaxel ar fi considerată aditivă, cu condiția ca termenii aditivi să fie semnificativi.

## B. Analiza lui TRA-8, chimioterapia, terapia cu radiații și combinată a experimentelor individuale pe animale

Au fost analizate 6 experimente independente prin experiment individual. Combinațiile de tratament au fost comparate din punct de vedere al eficacității antitumorale, adică inhibiția creșterii tumorale, care a fost măsurată din trei puncte de vedere: extinderea timpilor de dublare a tumorii, procentajul regresiiilor tumorale și vitezele de creștere în timp. Numărul real de zile în care tumoarea și-a dublat aria suprafeței (produsul a două diametre) relativ la linia de bază în ziua 7 după injectarea celulelor tumorale a fost utilizat în analiza timpului dublat. Testul neparametric Kruskal-Wallis a fost utilizat pentru comparațiile timpilor medii de dublare a tumorii între tratamente. Testul extractului Fisher a fost utilizat pentru a compara proporția regresiei tumorii și regresiiile fără recidive în grupele de tratament. Pentru a determina dacă orice terapie combinată produce o inhibiție sinergică semnificativă a creșterii tumorii, adică mai mult decât aditivă, curbele de creștere din măsurătorile seriale ale suprafețelor au fost comparate, utilizând o aproximare a modelului amestecat liniar de-a lungul a trei săptămâni după începerea terapiei (Lindsey, J. K., *Models for Repeated Measurements*, pp. 100-142, Oxford, 1993). Pentru a testa efectele sinergice ale terapiilor combinate, a fost inclus un termen de interacțiune în model. Dacă termenul de interacțiune a fost semnificativ și efectul a fost o inhibiție a creșterii cu o viteză mai mare decât aditivă, atunci interacțiunea a fost considerată sinergică.

## C. Analiza cumulată a efectelor terapiei

Un total de 166 animale, 10 grupe de tratament și 6 experimente independente au fost incluse în analiza cumulată. Combinațiile de tratament au fost comparate din punct de vedere al eficacității antitumorale *in vivo*. Timpii medii de dublare a tumorii au fost analizați, utilizând testul Kruskal-Wallis și testul extractului Fisher, pentru a compara proporțiile regresiiilor tumorale și regresiiile fără recidive în grupele de tratament.

Toate analizele statistice au avut loc, utilizând SAS® (Sas/Stat User's Guide, SAS OnlineDoc, Version 8, Cary NC: SAS Institute Inc., 1999).

## 6. Expresia DR5 și citotoxicitatea indusă de TRA-8 în liniile de celule de cancer de sân

După cum se ilustrează în fig. 22A, toate cele nouă linii de celule canceroase au fost DR5- pozitive, cu diferite grade de expresie, de la puternic pozitiv (LCC6 și MDA-MB-453) până la slab pozitiv (MDA-MB-468 și SK-BR-3). Fig. 22B ilustrează citotoxicitatea indusă de TRA-8 în cele nouă linii de celule. Patru linii de celule au fost sensibile la citotoxicitatea indusă de TRA-8, cu concentrațiile  $CI_{50}$  de 17 până la 299 ng/ml (LCC6, 2LMP, MDA-MB231, MDA-MB-468), în timp ce altele au fost destul de rezistente (DY36T2, BT-474, MDA-MB-453). Nu a existat o bună corelație între expresia DR5 și gradul de citotoxicitate indusă de TRA-8, după cum a fost ilustrat în cazul liniilor de celule MDA-MB-453 și MDA-MB-468.

# RO 123525 B1

1 Efectele TRA-8 asupra citotoxicității induse de chimioterapie au fost apoi examinate  
2 cu Adriamicină (fig. 23A) și Paclitaxel (fig. 23B). Un test de analiză pentru interacțiunea dintre  
3 anticorp și efectele medicamentului este rezumat în tabelul 5. Nu au existat interacțiuni  
4 sinergice între TRA-8 și Paclitaxel, cele mai multe interacțiuni fiind aditive. Patru din nouă  
5 linii de celule au îndeplinit criteriile pentru o interacțiune sinergică între TRA-8 și Adriamicină.  
6 Linia de celule 2LMP a demonstrat o bună sensibilitate față de TRA-8, precum și sensibilitate  
7 și la Adriamicină, și la Paclitaxel. Această linie de celule a fost aleasă pentru a explora  
8 eficacitatea *in vivo* a anticorpului și/sau a medicamentelor.

9  
10 *Tabelul 5*

11 *Efectele interacțiunii in vitro pentru tratamentele combinate*

Linia de celule	TRA-8 + Adriamicină		TRA-8 + Paclitaxel	
	Interacțiune	Valoarea p <sup>a</sup>	Interacțiune	Valoarea p <sup>a</sup>
LCC6	Sinergică	<0,001	Aditivă	0,624
MDA-MB-453	Sinergică	<0,001	Fără răspuns <sup>c</sup>	0,615
2LMP	Aditivă	0,153	Aditivă	0,937
MDA-MB-231	Aditivă	0,663	Aditivă	0,064
BT-474	Sinergică	<0,001	ND <sup>b</sup>	0,992
ZR-75-1	Sinergică	0,013	Aditivă	0,172
DY36T2	ND <sup>b</sup>	0,808	ND <sup>b</sup>	0,798
MDA-MB-468	Aditivă	0,184	Aditivă	0,724
SK-BR-3	Aditivă	0,361	Fără răspuns <sup>c</sup>	0,871

12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23 <sup>a</sup> Valoarea p se referă la semnificația termenului de interacțiune sinergică. Dacă atât TRA-8, cât și efectele  
24 medicamentului, au fost semnificative și termenul de interacțiune a fost semnificativ, atunci efectele combinației  
25 au fost considerate sinergice. Dacă valoarea p de interacțiune nu este <0,05, atunci efectele combinației au fost  
26 considerate aditive.

27 <sup>b</sup> Nu au fost determinate, pentru că efectul TRA-8 nu a fost semnificativ, dar efectul Adriamicină/Paclitaxel a fost  
28 semnificativ.

29 <sup>c</sup> Nu a existat un răspuns semnificativ la doză pentru niciun agent.

## 30 7. Efectele antitumorale *in vivo* ale TRA-8 singur sau în combinație cu chimioterapia 31 și/sau iradierea

32 TRA-8 la doze de 200 μg și 600 μg, de două ori pe săptămână, a produs o inhibiție  
33 similară a creșterii tumorii pentru tumorile s. c. 2LMP bine stabilite (fig. 24). În trei experi-  
34 mente adiționale, doza de 200 μg/schemă a produs o inhibiție statistic semnificativă a creș-  
35 terii tumorale (p < 0,004, testul Kruskal-Wallis asupra timpilor de dublare a tumorii) compa-  
36 rativ cu martorii netratați, și această doză și schemă au fost selectate și pentru studiile  
37 ulterioare. Fig. 25 ilustrează efectele TRA-8, Adriamicinei sau ale unei combinații de TRA-8  
38 și Adriamicină asupra eficacității antitumorale. Comparativ cu martorii netratați, terapia cu  
39 TRA-8 singur sau cu TRA-8 plus Adriamicină a produs o inhibiție semnificativă a creșterii

tumorii ( $p=0,002$  testul Kruskal-Wallis), în timp ce Adriamicina nu a diferit de martori. 1  
 Combinația de TRA-8 plus Adriamicină a produs o mai mare inhibiție decât fiecare agent 3  
 singur ( $p=0,002$ ), precum și o regresie semnificativ mai completă a tumorilor (patru) decât 3  
 fiecare agent singur, caz în care nu s-a observat nicio regresie ( $p<0,001$ , testul Fisher exact).  
 Sinergismul *in vivo* dintre TRA-8 și Adriamicină a fost evaluat, utilizând o analiză de creștere 5  
 a curbei. Acest termen al interacțiunii a fost semnificativ ( $p<0,001$ ) și sinergic. Interacțiunea 7  
 sinergică a fost coroborată într-un al doilea experiment independent.

Efectele TRA-8 și ale Paclitaxelului au fost studiate, în acest model făcându-se 9  
 observații similare (fig. 26). Comparativ cu martorii netratați, TRA-8 și TRA-8 plus Paclitaxelul 9  
 au produs o inhibiție semnificativă a creșterii tumorii ( $p<0,001$ , testul Kruskal-Wallis).  
 Creșterea tumorii la animalele tratate cu TRA-8 plus Paclitaxel a fost semnificativ diferită 11  
 decât în cazul doar al Paclitaxelului ( $p=0,008$ ) și a produs o regresie completă 3/8  
 comparativ cu niciuna, pentru fiecare agent singur. Analiza curbelor de creștere timpurie a 13  
 tumorii a demonstrat că efectul sinergic a fost aproape semnificativ ( $p=0,063$ ), în timp ce  
 efectele aditive au fost semnificative ( $p<0,001$ ). 15

În final, efectele TRA-8, Adriamicinei și iradierii cu  $^{60}\text{Co}$  au fost analizate ca agenți 17  
 singulari și în combinații diferite, după cum s-a ilustrat în fig. 27. Au existat diferențe 17  
 semnificative peste tot, cu privire la timpii de dublare a tumorii ( $p<0,001$ ) și comparații 19  
 multiple au indicat faptul că terapia triplă cu TRA-8, Adriamicină și  $^{60}\text{Co}$  a produs o inhibiție 19  
 a creșterii tumorii, care a fost semnificativ diferită decât toate celelalte grupe tratate, în timp 21  
 ce ambele grupe duale de terapie (Adriamicină plus TRA-8 sau  $^{60}\text{Co}$  plus TRA-8 au fost 21  
 diferite decât un grup cu agent singular ( $p<0,001$ ). Animalele  $^{60}\text{Co}$  tratate doar cu radiații nu 23  
 diferă de martorii netratați ( $p=0,926$ ). Toate combinațiile de tratamentele pe două căi au avut 23  
 efecte sinergice semnificative ( $p<0,001$ ). Regresii complete au fost observate la 6/8 animale 25  
 care au primit terapie triplă și 4 animale nu au avut o recurență a tumorii de-a lungul a 180 25  
 de zile de tratament.

## 8. Analiza cumulativă a efectelor terapiei 27

29 Studiile antitumorale au cuprins 166 de animale, și au fost analizați timpii de dublare  
 a tumorii și frecvența regresiei complete a tumorii, pentru toate animalele din fiecare grup de  
 tratament (tabelul 6). Analiza ANOVA a timpilor medii de dublare a tumorii a indicat diferențe  
 31 semnificative între grupele de tratament ( $p<0,001$ ), comparații multiple arătând că TRA-8 +  
 Paclitaxel, TRA-8 + Adriamicină și TRA-8 + Adriamicină +  $^{60}\text{Co}$  au avut timpi de dublare  
 33 medii ai tumorii semnificativ mai lungi decât orice grup de tratament fără TRA-8. Adăugarea  
 lui TRA-8, la orice modalitate de tratament, a produs un timp de dublare a tumorii mai  
 35 îndelungat decât modalitatea singură. În mod similar, testul Kruskal-Wallis asupra timpului  
 median de dublare a tumorii a arătat faptul că medianele au fost semnificativ diferite peste  
 37 tot ( $p<0,001$ ). Comparația perechilor, utilizând testul speciei semnate Wilcoxin, a produs  
 scheme similare pentru timpul mediu de dublare a tumorii, ca și comparațiile multiple  
 39 ANOVA. Această analiză subestimează inhibiția creșterii produsă de cele mai eficiente  
 tratamente în acele grupuri care nu ating o dublare a tumorii la sfârșitul experimentului.  
 41 Tabelul 6 furnizează, de asemenea, frecvența regresiei complete a tumorii și frecvența  
 43 tumorii, văzute la animalele tratate fie cu un regim de chimioterapie, fie cu radiații, atribuite  
 creșterii bine stabilite a tumorii și agresivității tumorii. Din testul extractului Fisher, au existat

# RO 123525 B1

diferențe semnificative, privind frecvența regresiei complete a tumorii între grupele de tratament ( $p < 0,001$ ). 30 din 166 de animale au realizat o regresie completă, și 28 dintre acestea au primit doar TRA-8 sau în combinație cu alte modalități. Regresia completă a avut loc la 1/42 animale martor: 1/54 animale primesc chimioterapie, radiații sau o combinație; și 28/68 doar TRA-8 sau regimuri combinate de TRA-8. Grupele tratate cu TRA-8 au avut o frecvență semnificativ mai mare ( $p < 0,001$ ) de regresie completă. În mod similar, 14/68 animale care primesc TRA-8 sau combinații de TRA-8 nu au avut o recresștere a tumorilor comparativ cu 1/42 martori și 0/52 animale tratate cu chimioterapie și/sau radiații. Regresiile fără recidive au avut perioade de observare de 99 până la 171 zile ( $146 \pm 24$  zile).

Tabelul 6

Rezultatele cumulative ale timpului de dublare și ale regresiei complete ale tumorilor 2LMP

Tratament	# de animale	Timpuri de dublare a tumorii (zile) (mediu/median)	Regresii complete		
			total (%)	Fără recidivă %	Perioada medie de observație
Martori netratați	44 (42) <sup>a</sup>	12/8	1 (2%)	1 (2%)	177
<sup>60</sup> Co	8 (7)	14/10	0	0	186
Adriamicină	31 (28)	17/18	0	0	197
Paclitaxel	7(5)	25/20	0	0	
Adriamicină + <sup>60</sup> Co	8 (8)	39/36	1 (13%)	0	197
TRA-8	30 (26)	47/23	6 (20%)	5 (17%)	159
TRA-8 + <sup>60</sup> Co	8 (8)	65/50	3 (38%)	1 (13%)	186
TRA-8 + Paclitaxel	8 (8)	71/62	3 (38%)	1 (13%)	148
TRA-8 + Adriamicină	14 (12)	81/64	10 (71%)	3 (21%)	185
TRA-8 + Adriamicină+ <sup>60</sup> Co	8 (6)	>140/179	6 (75%)	4 (50%)	192

<sup>a</sup> Numerele din paranteze sunt numerele de animale necenzurate

## 9. Apoptoza în tumorile tratate

Inducția apoptozei la xenogrefele 2LMP, consecutivă tratamentului cu TRA-8, Adriamicină, TRA-8 + Adriamicină, și TRA-8 + Paclitaxel, a fost analizată, utilizând tehnica Tunel. La animalele netratate, tumorile au avut 4% celule colorate (1% intens), în timp ce tratamentul cu Adriamicină sau Paclitaxel a avut 8% (6% intens) și 7% (2% intens) celule colorate. Animalele tratate doar cu TRA-8 au avut o apoptoză foarte puternică, cu 25% celule colorate (15% intens). TRA-8 plus Adriamicină a avut 28% (22% intens) și TRA-8 plus Paclitaxel a avut 26% (12% intens) celule colorate.

# RO 123525 B1

Orice scheme sau publicații menționate în descriere sunt indicative pentru nivelul celor cu calificare în domeniu, cărora invenția li se adresează. Aceste brevete și publicații sunt încorporate aici prin referință, în aceeași proporție ca și cum fiecare publicație ar fi indicată în mod specific și individual ca fiind încorporată prin referință. 1  
3

Invenția de față nu are scopul limitat prin depozitul sau aspectele descrise în exemple, care se intenționează a fi ilustrative pentru câteva aspecte ale invenției, și orice aspecte care sunt funcțional echivalente intră în scopul acestei invenții. Diferite modificări ale invenției, în plus față de cele arătate și descrise aici vor deveni aparente celor cu calificare în domeniu și se intenționează să intre în scopul revendicărilor anexate. 5  
7  
9

# RO 123525 B1

## LISTĂ DE SECVENȚE

- 1
- 3 <110> The UAB Research Foundation  
Zhou, Tong
- 5 Ichikawa, Kimihisa  
Kimberly, Robert P.
- 7 Koopman, William J.  
Oshumi, Jun
- 9 LoBuglio, Albert S.  
Buchsbaum, Donald J.
- 11
- 13 <120> COMBINAȚII DE ANTICORPI SELECTIVI PENTRU UN RECEPTOR AL UNUI  
LIGAND CARE INDUCE APOPTOZA ASOCIAT CU UN FACTOR AL NECROZEI  
TUMORALE ȘI ALȚI AGENȚI TERAPEUTICI
- 15
- 17 <130> 21085.0029P3  
<150> 60/391478  
<151> 2002-06-24
- 19 <150> 60/346402  
<151> 2001-11-01
- 21 <150> PCT/US01/14151  
<151> 2001-05
- 23 <150> 60/201344  
<151> 2000-05-02
- 25 <160> 102
- 27 <170> PatentIn versiunea 3.0
- 29 <210> 1  
<211> 25
- 31 <212> ADN  
<213> construct sintetic
- 33
- 35 <400> 1  
gacgatgccc gatctacttt aaggg 25
- 37 <210> 2  
<211> 22
- 39 <212> ADN  
<213> construct sintetic
- 41
- 43 <400> 2  
ccactgggtg atgttgatg gg 22

# RO 123525 B1

<210> 3		1
<211> 24		
<212> ADN		3
<213> construct sintetic		
<400> 3		5
ggatccgtgg acacattcga tgtc	24	7
<210> 4		
<211> 20		9
<212> PRT		
<213> construct sintetic		11
<400> 4		13
Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly		15
1 5 10 15		
Ser Leu Lys Leu		17
20		
<210> 5		
<211> 20		19
<212> PRT		
<213> construct sintetic		21
<400> 5		23
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly		25
1 5 10 15		
Asp Arg Val Ser		27
20		
<210> 6		
<211> 20		29
<212> ADN		
<213> construct sintetic		31
<400> 6		33
cagcactgaa cacggacccc	20	35
<210> 7		
<211> 20		37
<212> ADN		
<213> construct sintetic		39
<400> 7		41
aaaggtaatt tattgagaag	20	

# RO 123525 B1

1 <210> 8  
<211> 20  
3 <212> ADN  
<213> construct sintetic  
5  
7 <400> 8  
cctcaccatg aacttogggc 20  
9  
<210> 9  
11 <211> 20  
<212> ADN  
13 <213> construct sintetic  
15 <400> 9  
ctggtgatg cacatgagac 20  
17  
19 <210> 10  
<211> 20  
21 <212> ADN  
<213> construct sintetic  
23  
25 <400> 10  
gaagtgatgc tggaggagtc 20  
27  
29 <210> 11  
<211> 20  
<212> ADN  
31 <213> construct sintetic  
33 <400> 11  
agtgtgaagt gatgctggtg 20  
35  
37 <210> 12  
<211> 21  
39 <212> ADN  
<213> construct sintetic  
41  
43 <400> 12  
tttaccagga gagtgggaga g 21

# RO 123525 B1

<210> 13			1
<211> 20			
<212> ADN			3
<213> construct sintetic			
<400> 13			5
tgcagagaca gtgaccagag	20		
			7
<210> 14			
<211> 20			9
<212> ADN			
<213> construct sintetic			11
<400> 14			
tgttcaggac cagcatgggc	20		13
<210> 15			15
<211> 20			
<212> ADN			17
<213> construct sintetic			
<400> 15			19
aagacatttt ggattctaac	20		
			21
<210> 16			
<211> 20			23
<212> ADN			
<213> construct sintetic			25
<400> 16			
tatcatgaag tctttgtatg	20		27
			29
<210> 17			
<211> 20			31
<212> ADN			
<213> construct sintetic			33
<400> 17			
gatggagaca cattctcagg	20		35
			37
<210> 18			
<211> 20			39
<212> ADN			
<213> construct sintetic			41
<400> 18			
gacattgtga tgaccagtc	20		

# RO 123525 B1

1 <210> 19  
 <211> 20  
 3 <212> ADN  
 <213> construct sintetic  
 5  
 7 <400> 19  
 ttaacaactca ttcoctggtga 20  
 9  
 <210> 20  
 11 <211> 20  
 <212> ADN  
 13 <213> construct sintetic  
 15 <400> 20  
 gaotgggtca tcacaatgtc 20  
 17  
 <210> 21  
 19 <211> 1386  
 <212> ADN  
 21 <213> construct sintetic  
 23 <400> 21  
 atgaacttcg ggctcagctt gattttcctt gtccttgttt taaaagggtg ccagtggtgaa 60  
 25 gtgatgctgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gagggtoct gaaactctcc 120  
 tgtgcagcct ctggattcac ttccagtagc tatgtaatgt cttgggttcg ccagactccg 180  
 27 gagaagaggc tggagtgggt cgcaaccatt agtagtggtg gtagtacac ctactatcca 240  
 29 gacagtgtga agggggcatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300  
 caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcaag acggggggac 360  
 31 tctatgatta cgacggacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctgagccaaa 420  
 acgacacccc catctgtcta tccactggcc cctggatctg ctgcccacac taactccatg 480  
 33 gtgaccctgg gatgcctggc caagggctat ttccotgagc cagtgcacgt gacctggaac 540  
 35 tctggatccc tgtccagcgg tgtgcacacc ttcccagctg tctgcagtc tgacctctac 600  
 actctgagca gctcagtgac tgtcccctcc agcacctggc ccagcgagac cgtcacctgc 660  
 37 aacgttgccc acccggccag cagcaccaag gtggacaaga aaattgtgcc cagggattgt 720  
 39 ggttgtaagc cttgcatatg tacagtccca gaagtatcat ctgtcttcat ctcccccca 780  
 aagcccaagg atgtgtcac cattactctg actcctaagg tcacgtgtgt tgtggtagac 840  
 41 atcagcaagg atgatcccga ggtccagttc agctggtttg tagatgatgt ggaggtgcac 900

# RO 123525 B1

			1				
acagctcaga	cgcaaccccg	ggaggagcag	ttcaacagca	cttccgctc	agtcagtcaa	960	
cttcccatca	tgcaccagga	ctggctcaat	ggcaaggagt	tcaaatgcag	ggtcaacagt	1020	3
gcagctttcc	ctgccccat	cgagaaaacc	atctocaaaa	ccaaaggcag	accgaaggct	1080	5
ccacaggtgt	acaccattcc	acctcccaag	gagcagatgg	ccaaggataa	agtcagtctg	1140	
acctgcatga	taacagactt	cttcctgaa	gacattactg	tggagtggca	gtggaatggg	1200	7
cagccagcgg	agaactacaa	gaacactcag	cccatcatgg	acacagatgg	ctcttacttc	1260	
gtctacagca	agctcaatgt	gcagaagagc	aactgggagg	caggaaatac	tttcacctgc	1320	9
tctgtgttac	atgagggcct	gcacaaccac	catactgaga	agagcctctc	ccactctcct	1380	11
ggtaaa						1386	
							13
							15
<210>	22						
<211>	705						17
<212>	ADN						
<213>	construct sintetic						19
							21
<400>	22						
atgaagtctt	tgtatgtggt	agtgataca	cattatctgt	ttctgtttgc	agggtgtgaa	60	
ggagacattg	tgatgaccca	gtctocaaaa	ttcatgtcca	catcagtagg	agacagggtc	120	23
agcatcacct	gcaaggccag	tcaggatgtg	ggtactgctg	tagcctggta	tcaacagaaa	180	25
ccagggcaat	ctoctaaact	actgatttac	tgggcatcca	cccgccacac	tggagtccct	240	
gatcgcttca	caggcagtgg	atctgggaca	gatttcactc	tcaccattag	caatgtgcag	300	27
tctgaagact	tggcagatta	tttctgtcag	caatatagca	gctatcggac	gttcggtgga	360	29
ggcaccaagc	tggaaatcaa	acgggotgat	gctgcaccaa	ctgtatccat	cttcccacca	420	
tccagtgagc	agttaacatc	tggaggtgcc	tcagtcgtgt	gcttcttgaa	caactctctac	480	31
cccaaagaca	tcaatgtcaa	gtggaagatt	gatggcagtg	aacgacaaaa	tggcgtcctg	540	33
aacagttgga	ctgatcagga	cagcaaagac	agcacctaca	gcatgagcag	caccctcagc	600	
ttgaccaagg	acgagtatga	acgacataac	agctatacct	gtgaggccac	tcacaagaca	660	35
tcaacttcac	ccattgtcaa	gagcttcaac	aggaatgagt	gttaa		705	
							37
							39
<210>	23						
<211>	462						41
<212>	PRT						
<213>	construct sintetic						43

# RO 123525 B1

1 <400> 23

3 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly  
1 5 10 15

5 Val Gln Cys Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys  
20 25 30

7 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
35 40 45

9 Ser Ser Tyr Val Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu  
50 55 60

11 Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro  
65 70 75 80

13 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
85 90 95

15 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met  
100 105 110

17 Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Asp Ser Met Ile Thr Thr Asp Tyr Trp  
115 120 125

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

21 Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met  
145 150 155 160

23 Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
165 170 175

25 Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
180 185 190

27 Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val  
195 200 205

29 Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His  
210 215 220

31 Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys  
225 230 235 240

33 Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe  
245 250 255

35 Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro  
260 265 270

37 Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val  
275 280 285

# RO 123525 B1

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr	1
290 295 300	
Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu	3
305 310 315 320	
Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys	5
325 330 335	
Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser	7
340 345 350	
Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro	9
355 360 365	11
Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile	13
370 375 380	
Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly	15
385 390 395 400	
Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp	17
405 410 415	
Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp	19
420 425 430	
Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His	21
435 440 445	
Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys	23
450 455 460	
<210> 24	25
<211> 234	27
<212> PRT	
<213> construct sintetic	29
	31
<400> 24	33
Met Lys Ser Leu Tyr Val Leu Val Tyr Thr His Tyr Leu Phe Leu Phe	35
1 5 10 15	
Ala Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met	37
20 25 30	
Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln	39
35 40 45	
Asp Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser	41
50 55 60	
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro	43
65 70 75 80	



# RO 123525 B1

<210> 27	1
<211> 10	
<212> PRT	3
<213> construct sintetic	
<400> 27	5
Arg Gly Asp Ser Met Ile Thr Thr Asp Tyr	7
1 5 10	
	9
<210> 28	11
<211> 11	
<212> PRT	13
<213> construct sintetic	
<400> 28	15
Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala	17
1 5 10	
	19
<210> 29	
<211> 7	21
<212> PRT	
<213> construct sintetic	23
<400> 29	25
Trp Ala Ser Thr Arg His Thr	
1 5	27
	29
<210> 30	
<211> 8	31
<212> PRT	
<213> construct sintetic	33
	35
<400> 30	37
Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Arg Thr	
1 5	39
	41
<210> 31	
<211> 119	43
<212> PRT	
<213> construct sintetic	45

# RO 123525 B1

1 <400> 31

3 Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

7 Val Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

9 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

11 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

13 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

15 Ala Arg Arg Gly Asp Ser Met Ile Thr Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

17 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

19

21 <210> 32  
<211> 80

23 <212> ADN  
<213> construct sintetic

25

27 <400> 32  
ttggataagc ttggcttgac ctcaccatgg gatggagctg tatcctctc ttcttgtag 60  
caacagctac aggtgtccac 80

29

31 <210> 33  
<211> 80  
<212> ADN  
<213> construct sintetic

33

35 <400> 33  
tctgaagtaa tgctggtgga gtctggggga ggcttagtac agcctggagg gtcctgaga 60  
ctctctgtg cagcctctgg 80

37

39 <210> 34  
<211> 80  
<212> ADN  
<213> construct sintetic

41

43 <400> 34  
attcacttc agtagttatg taatgtcttg ggttcggcag gcaccagga agggctctgga 60  
gtgggttgca accattagta 80

45

# RO 123525 B1

<210> 35			1
<211> 80			
<212> ADN			3
<213> construct sintetic			
			5
<400> 35			
gtggtgtag ttacacctac tatccagaca gtgtgaaggc cggattcacc atctccagag	60		7
acaatgccaa gaacaccctg	80		
			9
<210> 36			
<211> 80			11
<212> ADN			
<213> construct sintetic			13
			15
<400> 36			
tatctgcaaa tgaacagtct gagagcagag gacacggctg tttattactg tgcaagaagg	60		17
ggtgactota tgattacgac	80		
			19
<210> 37			
<211> 64			21
<212> ADN			
<213> construct sintetic			23
			25
<400> 37			
ggactactgg ggccaaggga cctgggtcac agtctctctca gctccacca agggcccacc	60		
ggtc	64		27
			29
<210> 38			
<211> 60			
<212> ADN			31
<213> construct sintetic			
			33
<400> 38			
ctaccaagaa gaggatgata cagctccacc ccatgggtgag gtcaagccaa gottatccaa	60		35
<210> 39			37
<211> 80			
<212> AND			39
<213> construct sintetic			
			41
<400> 39			
tctcagggac cctccaggct gtactaagcc tccccagac tccaccagca ttacttcaga	60		43
gtggacacct gtgctgttg	80		45

# RO 123525 B1

1 <210> 40  
<211> 80  
3 <212> ADN  
<213> construct sintetic  
5  
<400> 40  
7 tccagaccct tccctggtgc ctgccgaacc caagacatta cataactact gaaagtgaat 60  
ccagaggctg cacaggagag 80  
9  
<210> 41  
11 <211> 80  
<212> ADN  
13 <213> construct sintetic  
15  
<400> 41  
ctctggagat ggtgaatcgg cocttcacac tgtctggata gtaggtgtaa ctaccaccac 60  
17 tactaatggt tgcaaccac 80  
19 <210> 42  
<211> 80  
21 <212> ADN  
<213> construct sintetic  
23  
<400> 42  
25 ccttcttgca cagtaataaa cagccgtgtc ctctgctctc agactgttca tttgcagata 60  
caggggtgttc ttggcattgt 80  
27  
<210> 43  
29 <211> 84  
<212> ADN  
31 <213> construct sintetic  
33  
<400> 43  
gaccgatggg cccttggtgg aggetgagga gactgtgacc agggctccctt ggccccagta 60  
35 gtccgtogta atcatagagt cacc 84  
37 <210> 44  
<211> 20  
39 <212> ADN  
<213> construct sintetic  
41  
<400> 44  
43 ttggataagc ttggcttgac 20

# RO 123525 B1

<210> 45	1
<211> 21	
<212> ADN	3
<213> construct sintetic	
<400> 45	5
gaccgatggg cccttggtgg a	21
	7
<210> 46	
<211> 213	9
<212> PRT	
<213> construct sintetic	11
	13
<400> 46	
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	15
1 5 10 15	
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala	17
20 25 30	
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	19
35 40 45	
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	21
50 55 60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	23
65 70 75 80	
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Arg Thr	25
85 90 95	
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro	27
100 105 110	
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr	29
115 120 125	
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys	31
130 135 140	
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu	33
145 150 155 160	
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser	35
165 170 175	
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala	37
180 185 190	
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe	39
195 200 205	
Asn Arg Gly Glu Cys	41
210	

# RO 123525 B1

1 <210> 47  
<211> 34  
3 <212> ADN  
<213> construct sintetic  
5  
<400> 47  
7 cccaagcttta agaagcatcc tctcatctag ttct 34  
<210> 48  
9 <211> 45  
<212> ADN  
11 <213> construct sintetic  
13 <400> 48  
ccccgaattct tactaacact ctcccctggt gaagctcttt gtgac 45  
15 <210> 49  
<211> 60  
17 <212> ADN  
<213> construct sintetic  
19  
<400> 49  
21 gtccccccaca gatgcagaca aagaacttgg agattgggtc atcacaatgt caccagtgga 60  
23 <210> 50  
<211> 48  
25 <212> ADN  
<213> construct sintetic  
27  
<400> 50  
29 ccaagttctt tgtctgcac agtaggagac agggtcacca tcacctgc 48  
<210> 51  
31 <211> 57  
<212> ADN  
33 <213> construct sintetic  
35 <400> 51  
agtgtgccgg gtggatgcc agtaaatcag tagtttagga gttttccctg gtttctg 57  
37  
<210> 52  
39 <211> 48  
<212> ADN  
41 <213> construct sintetic  
43 <400> 52  
tgggcatcca ccgggcacac tgggggccca agcaggttta gtggcagt 48

# RO 123525 B1

<210> 53		1
<211> 63		
<212> ADN		3
<213> construct sintetic		
<400> 53		5
ataactacta tattgctgac agtaataggt tgcaaaatcc tccggctgca gactagagat	60	
ggt	63	7
<210> 54		9
<211> 63		
<212> ADN		11
<213> construct sintetic		
<400> 54		13
cagcaatata gcagctatcg gacgttcggt caaggcacca aggtggaaat caaacggact	60	15
gtg	63	17
<210> 55		19
<211> 711		
<212> ADN		21
<213> construct sintetic		
<400> 55		23
atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttocagg ctccactggt	60	
gacattgtga tgaccocaatc tccaagttct ttgtctgcat ctgtggggga cagggtcacc	120	25
atcaoctgca aggccagtca ggatgtgggt actgctgtag cctggatca acagaaacca	180	
gggaaagctc ctaaactact gattfactgg gcctccacco ggcacaactgg ggtocaaago	240	27
aggtttagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcacctca ccatctctag tctgcagccg	300	29
gaggattttg caacotatta ctgtcagcaa tatagtagtt atcggacggt cggccaaggc	360	
accaaggtgg aatcaaacg gactgtggct gcaccatctg tcttcatct cccgccatct	420	31
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc	480	33
agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgcctcc aatcgggtaa ctcccaggag	540	
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg	600	35
agcaaagcag actaogagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg	660	37
agctogcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt agtaagaatt c	711	39
<210> 56		41
<211> 119		
<212> PRT		43
<213> construct sintetic		

# RO 123525 B1

1 <400> 56

3 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

7 Val Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

9 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

11 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

13 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

15 Ala Arg Arg Gly Asp Ser Met Ile Thr Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

17 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

19 <210> 57  
<211> 80  
<212> ADN  
21 <213> construct sintetic

23 <400> 57  
tctgaagtac agctggtgga gtctggggga ggcttagtac agcctggagg gtccttgaga 60  
25 ctctctgtg cagcctctgg 80

27 <210> 58  
<211> 80  
<212> ADN  
29 <213> construct sintetic

31 <400> 58  
tctcaggac cctccaggct gtactaagcc tccccagac tccaccagct gtacttcaga 60  
33 gtggacacct gtagctgttg 80

35 <210> 59  
<211> 119  
<212> PRT  
37 <213> construct sintetic

39 <400> 59

41 Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

43 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

45 Val Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

# RO 123525 B1

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val 50 55 60	1
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80	3
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	5
Ala Arg Arg Gly Asp Ser Met Ile Thr Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly 100 105 110	7
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115	9
<210> 60	11
<211> 119	13
<212> PRT	
<213> construct sintetic	15
<400> 60	17
Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15	19
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20 25 30	21
Val Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val 35 40 45	23
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val 50 55 60	25
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80	27
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	29
Ala Arg Arg Gly Asp Ser Met Ile Thr Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly 100 105 110	31
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115	33
	35
<210> 61	
<211> 119	37
<212> PRT	
<213> construct sintetic	39

# RO 123525 B1

1 <400> 61

3 Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

5 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

7 Val Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

9 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

11 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

13 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

15 Ala Arg Arg Gly Asp Ser Met Ile Thr Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

17 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

19 <210> 62  
<211> 80  
21 <212> ADN  
<213> construct sintetic

23 <400> 62  
25 tatctgcaaa tgagcagtct gagagcagag gacaaggctg tttattactg tgcaagaagg 60  
ggtgactcta tgattacgac 80

27 <210> 63  
29 <211> 80  
<212> ADN  
31 <213> construct sintetic

33 <400> 63  
ccttcttgca cagtaataaa cagccgtgtc ctctgtctc agactgttca tttgcagata 60  
35 cagggtgttc ttggcattgt 80

37 <210> 64  
<211> 80  
39 <212> ADN  
<213> construct sintetic

41 <400> 64  
43 attcactttc agtagttatg taatgtcttg ggttcggcag actccagaga agaggctgga 60  
gtgggttgca accattagta 80

# RO 123525 B1

<210> 65		1
<211> 80		
<212> ADN		3
<213> construct sintetic		
<400> 65		5
tecagcctct tctctggagt ctgccgaacc caagacatta cataactact gaaagtgaat	60	
ccagaggctg cacaggagag	80	7
<210> 66		9
<211> 80		
<212> ADN		11
<213> construct sintetic		
<400> 66		13
tctgaagtaa tgctgggtgga gtctggggga ggcttagtaa agcctggagg gtccctgaaa	60	
ctctctctgtg cagcctctgg	80	15
<210> 67		17
<211> 80		
<212> ADN		19
<213> construct sintetic		
<400> 67		21
tatctgcaaa tgagcagtct gagatctgag gacacggcta tgtattactg tgcaagaagg	60	
ggtgactcta tgattacgac	80	23
<210> 68		25
<211> 64		
<212> ADN		27
<213> construct sintetic		
<400> 68		29
ggactactgg ggccaaggga ccactctcac agtctcctca gctccacca agggcccatc	60	
ggtc	64	31
<210> 69		33
<211> 80		
<212> ADN		35
<213> construct sintetic		
<400> 69		37
tttcagggac cctccaggct ttactaagcc tccccagac tccaccagca ttacttcaga	60	
gtggacacct gtagctgttg	80	39
<210> 70		41
<211> 80		
<212> ADN		43
<213> construct sintetic		

# RO 123525 B1

1

<400> 70

3 ccttcttgca cagtaataca tagccgtgtc ctcagatctc agactgotca tttgcagata 60

caggggtgttc ttggcattgt 80

5

<210> 71

7 <211> 70

<212> ADN

9 <213> construct sintetic

<400> 71

11 gaccgatggg cccttgggtgg aggotgagga gactgtgaga gtggtcocctt ggccccagta 60

gtccgtcgta 70

13

<210> 72

15 <211> 212

<212> PRT

17 <213> construct sintetic

<400> 72

19 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

21 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala

20 25 30

23 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

25 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

27 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

29 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Arg Thr

85 90 95

31 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

33 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115 120 125

35 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

37 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

39 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

41 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180 185 190

43 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

45 Asn Arg Gly Glu

210

# RO 123525 B1

<210> 73	1
<211> 213	
<212> PRT	3
<213> construct sintetic	5
<400> 73	7
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly 1 5 10 15	9
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala 20 25 30	11
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile 35 40 45	13
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly 50 55 60	15
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65 70 75 80	17
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Arg Thr 85 90 95	19
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro 100 105 110	21
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr 115 120 125	23
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys 130 135 140	25
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu 145 150 155 160	27
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser 165 170 175	29
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala 180 185 190	31
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe 195 200 205	33
Asn Arg Gly Glu Cys 210	35
<210> 74	37
<211> 213	
<212> PRT	39
<213> construct sintetic	41
<400> 74	43
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly 1 5 10 15	

# RO 123525 B1

1  
 3 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala  
                   20                                  25                                  30

5 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                                  40                                  45

7 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
           50                                  55                                  60

9 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
   65                                  70                                  75                                  80

11 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Arg Thr  
                                   85                                  90

13 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
                                   100                                  105                                  110

15 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
           115                                  120                                  125

17 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
   130                                  135                                  140

19 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
   145                                  150                                  155                                  160

21 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
                                   165                                  170

23 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
                                   180                                  185                                  190

25 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
           195                                  200                                  205

27 Asn Arg Gly Glu Cys  
   210

29

31 <210> 75

33 <211> 213

35 <212> PRT

37 <213> construct sintetic

39

41 <400> 75

43 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
   1                  5                                  10                                  15

45 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala  
                   20                                  25                                  30

47 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
           35                                  40                                  45

# RO 123525 B1

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly	1
50 55 60	3
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	5
65 70 75 80	7
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Arg Thr	9
85 90 95	11
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro	13
100 105 110	15
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr	17
115 120 125	19
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys	21
130 135 140	23
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu	25
145 150 155 160	27
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser	29
165 170 175	31
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala	33
180 185 190	35
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe	37
195 200 205	39
Asn Arg Gly Glu Cys	41
210	
<210> 76	
<211> 213	
<212> PRT	
<213> construct sintetic	
<400> 76	
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly	33
1 5 10 15	35
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala	37
20 25 30	39
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile	41
35 40 45	
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly	43
50 55 60	45
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser	47
65 70 75 80	

# RO 123525 B1

1 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Arg Thr  
85 90 95

3 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Val Ala Ala Pro  
100 105 110

5 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
115 120 125

7 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
130 135 140

9 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
145 150 155 160

11 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Gly Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
165 170 175

13 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
180 185 190

15 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
195 200 205

17 Asn Arg Gly Glu Cys  
210

19

21 <210> 77  
<211> 60  
<212> ADN  
<213> construct sintetic

23

25 <400> 77  
gtccccaca gatgcagaca aagaacttgg agattgggto atctgaatgt caccagtgga 60

27

29 <210> 78  
<211> 65  
<212> ADN  
<213> construct sintetic

31

33 <400> 78  
atctagtict cagagatgga gacagacaca atcctgctat gggtgctgct gctctgggtt 60

35 ccagg 65

37 <210> 79  
<211> 69  
<212> ADN  
<213> construct sintetic

41

43 <400> 79  
cagcaccat agcaggattg tgtctgtctc catctctgag aactagatga gaggatgctt 60  
cttaagctt 69

# RO 123525 B1

<210> 80		1
<211> 67		
<212> ADN		3
<213> construct sintetic		
<400> 80		5
ctccaactggg gacattgtga tgacccaatc tccaagttct ttgtctgcat ctgtggggga	60	
cagggtc	67	7
<210> 81		9
<211> 54		
<212> ADN		11
<213> construct sintetic		
<400> 81		13
acttggagat tgggtcatca caatgtcaac agtggagcct ggaaccaga gcag	54	
		15
<210> 82		
<211> 67		17
<212> ADN		
<213> construct sintetic		19
<400> 82		
accatcacct gaaaggccag tcaggatgtg ggtactgctg tagcctggta ccaacagaaa	60	21
ccaggaa	67	23
<210> 83		
<211> 72		25
<212> ADN		
<213> construct sintetic		27
<400> 83		
tacagcagta cccacatcct gactggcctt gcaggtgatg gtgacctgt cccccacaga	60	29
tgcagacaaa ga	72	31
<210> 84		
<211> 71		33
<212> ADN		
<213> construct sintetic		35
<400> 84		37
aagcacccaa actcctcctc tattgggcat ccaccoggca cactgggggc ccagataggt	60	
ttacaggcag t	71	39
<210> 85		41
<211> 72		
<212> ADN		43
<213> construct sintetic		

# RO 123525 B1

1 <400> 85  
cccagtgtgc cgggtggatg cccaatagat gaggagtttg ggtgcttttc ctggtttctg 60

3 ttggtaccag gc 72

5 <210> 86  
<211> 63

7 <212> ADN  
<213> construct sintetic

9 <400> 86  
gggtctggga cagacttcac cctcaccatc tctagtctgc agccggagga ttttgcaacc 60

11 tat 63

13 <210> 87  
<211> 60

15 <212> ADN  
<213> construct sintetic

17

19 <400> 87  
actagagatg gtgaggggtga agtctgtccc agacccaactg cctgtaaacc tatctgggac 60

21 <210> 88  
<211> 57

23 <212> ADN  
<213> construct sintetic

25 <400> 88  
tactgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttcgggtcaag gcaccaaggt ggaaatc 57

27

29 <210> 89  
<211> 57

31 <212> ADN  
<213> construct sintetic

33

35 <400> 89  
cgtccgatag ctgctatatt gctgacagta atagggtgca aaatcctccg gctgcac 57

37 <210> 90  
<211> 51

39 <212> ADN  
<213> construct sintetic

41

43 <400> 90  
aaacggactg tggotgcacc atctgtcttc atcttcccgc catctgatga g 51

# RO 123525 B1

<210> 91		1
<211> 63		
<212> ADN		3
<213> construct sintetic		
		5
<400> 91		
gaagatgaag acagatgggtg cagccacagt cggtttgatt tccaccttgg tgccttgacc	60	7
gaa	63	
		9
<210> 92		
<211> 57		11
<212> ADN		
<213> construct sintetic		13
<400> 92		
ttctgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttoggtcaag gcaccaaggt ggaaatc	57	15
<210> 93		17
<211> 57		
<212> ADN		19
<213> construct sintetic		
		21
<400> 93		
cgtccgatag ctgctatatt gctgacagaa atagggtgca aaatcctccg gctgcag	57	23
<210> 94		25
<211> 63		
<212> ADN		27
<213> construct sintetic		
		29
<400> 94		
gggtctggga cagacttcaac cctcaccatc tctagtctgc agccggagga ttttcagat	60	31
tat	63	
		33
<210> 95		
<211> 57		35
<212> ADN		
<213> construct sintetic		37
<400> 95		
ttctgtcagc aatatagcag ctatcggacg ttoggtggag gcaccaaggt ggaaatc	57	39
		41
<210> 96		
<211> 57		43
<212> ADN		
<213> construct sintetic		45

# RO 123525 B1

1 <400> 96  
cgtccgatag ctgctatatt gctgacagaa ataatctgca aaatcctcog gotgcag 57

3

5 <210> 97  
<211> 51

7 <212> ADN  
<213> construct sintetic

9

11 <400> 97  
tgatgtggac atgaatttgt gagactgggt catcacaatg toaccagtgg a 51

13

15 <210> 98  
<211> 51  
<212> ADN  
<213> construct sintetic

17

19 <400> 98  
tgggttccag gctccaactgg tgacattgtg atgaccagc ctcacaaatt c 51

21

23 <210> 99  
<211> 49

25 <212> AND  
<213> construct sintetic

27

29 <400> 99  
aagacagatg gtgcagccac agcccgtttg atttccagct tggtgccctc 49

31 <210> 100  
<211> 45

33 <212> ADN  
<213> construct sintetic

35

37 <400> 100  
aagctggaaa tcaaacgggc tgtggctgca' ccatctgtct tcate 45

39 <210> 101  
<211> 30

41 <212> ADN  
<213> construct sintetic

43

45 <400> 101  
agatttcaac tgctcatcag atggcgggaa 30

# RO 123525 B1

<210> 102		1
<211> 63		
<212> ADN		3
<213> construct sintetic		5
<400> 102		7
gaagatgaag acagatggg cagccacagt cagtttgatt tccaacttgg tgcctocacc	60	
gaa	63	9

# RO 123525 B1

## Revendicări

1

3

1. Metodă *in vitro* de inducere selectivă a apoptozei în celulele țintă care exprimă DR5, care cuprinde etapele de: a. contactare a celulelor țintă cu o cantitate terapeutică dintr-un anticorp care se leagă în mod specific la un receptor DR5 TRAIL, în care anticorpul este un anticorp care are aceeași specificitate pentru epitop ca TRA-8 al hibridomului șoarece-șoarece, care are numărul de acces ATCC PTA-1428, în care anticorpul respectiv, în forma sa solubilă, are activitate de inducere a apoptozei *in vivo* și *in vitro*, în celulele țintă care exprimă DR5, și b. contactarea celulelor țintă cu o cantitate terapeutică dintr-un anticorp care se leagă în mod specific la un receptor DR4 TRAIL, în care anticorpul este un anticorp care are aceeași specificitate pentru epitop ca 2E12 al hibridomului șoarece-șoarece, care are numărul de acces ATCC PTA-3798, în care anticorpul respectiv, în forma sa solubilă, are o activitate de inducere a apoptozei *in vivo* și *in vitro*, în celulele țintă care exprimă DR4.

11

13

15

17

19

21

23

2. Metodă *in vitro* de inhibare a proliferării celulelor țintă care exprimă DR5, care cuprinde etapele: a. contactarea celulelor țintă cu o cantitate terapeutică dintr-un anticorp care se leagă în mod specific la un receptor DR5 TRAIL, în care anticorpul este un anticorp care are aceeași specificitate pentru epitop ca TRA-8 al hibridomului șoarece-șoarece, care are numărul de acces ATCC PTA-1428, în care anticorpul respectiv, în forma sa solubilă, are activitate de inducere a apoptozei *in vivo* și *in vitro*, în celulele țintă care exprimă DR5, și b. contactarea celulelor țintă cu o cantitate terapeutică dintr-un anticorp care se leagă în mod specific la un receptor DR4 TRAIL, în care anticorpul este un anticorp care are aceeași specificitate pentru epitop ca 2E12 al hibridomului șoarece-șoarece, care are numărul de acces ATCC PTA-3798, în care anticorpul respectiv, în forma sa solubilă, are o activitate de inducere a apoptozei *in vivo* și *in vitro*, în celulele țintă care exprimă DR4.

25

27

29

31

3. Compoziție care cuprinde o combinație alcătuită din:

a. o cantitate terapeutică dintr-un anticorp care se leagă, în mod specific, la un receptor DR5 TRAIL, în care anticorpul este un anticorp cu aceeași specificitate pentru epitop ca TRA-8 al hibridomului șoarece-șoarece, care are numărul de acces ATCC PTA-1428, în care anticorpul respectiv, în forma sa solubilă, are activitate de inducere a apoptozei *in vivo* și *in vitro*, în celulele țintă care exprimă DR5,

și

b. o cantitate terapeutică dintr-un anticorp care se leagă, în mod specific, la un receptor DR4 TRAIL, în care anticorpul este un anticorp care are aceeași specificitate pentru epitop ca 2E12 al hibridomului șoarece-șoarece, care are numărul de acces ATCC PTA-3798, în care anticorpul respectiv, în forma sa solubilă, are o activitate de inducere a apoptozei *in vivo* și *in vitro*, în celulele țintă care exprimă DR4.

37

4. Compoziție conform revendicării 3, care cuprinde, în plus, unul sau mai mulți agenți terapeutici.

39

5. Compoziție conform revendicării 4, în care agentul sau agenții terapeutici sunt agenți chimioterapeutici.

41

6. Compoziție conform revendicării 4, în care agentul sau agenții terapeutici sunt membrii ai familiei TNF.

43

7. Compoziție conform revendicării 4, în care agentul sau agenții terapeutici sunt agenți antiinflamatori.

## RO 123525 B1

8. Compoziție conform revendicării 4, în care agentul sau agenții terapeutici sunt produși antivirali.	1
9. Compoziție conform revendicării 4, în care agentul sau agenții terapeutici sunt produși antiretrovirali.	3
10. Compoziție conform revendicării 4, în care agentul sau agenții terapeutici sunt agenți antioportuniști.	5
11. Compoziție conform revendicării 4, în care agentul sau agenții terapeutici sunt antibiotice.	7
12. Compoziție conform revendicării 4, în care agentul sau agenții terapeutici sunt agenți imunosupresori.	9
13. Compoziție conform revendicării 4, în care agentul sau agenții terapeutici sunt imunoglobuline.	11
14. Compoziție conform revendicării 4, în care agentul sau agenții terapeutici sunt agenți antimalarici.	13
15. Compoziție conform revendicării 4, în care agentul sau agenții terapeutici sunt medicamente antireumatice care modifică boala.	15
16. Compoziție conform revendicării 4, în care agentul sau agenții terapeutici sunt citokine.	17
17. Compoziție conform revendicării 4, în care agentul sau agenții terapeutici sunt chemokine.	19
18. Compoziție conform revendicării 4, în care agentul sau agenții terapeutici sunt factori de creștere.	21
19. Compoziție conform revendicării 4, care cuprinde, în plus, un purtător acceptabil farmaceutic.	23

(51) Int.Cl.  
*A61K 39/395* (2006.01),  
*A61K 31/00* (2006.01),  
*A61K 38/00* (2006.01),  
*A61K 39/00* (2006.01),  
*A61P 35/00* (2006.01),  
*C07K 16/00* (2006.01),  
*C12N 1/00* (2006.01)

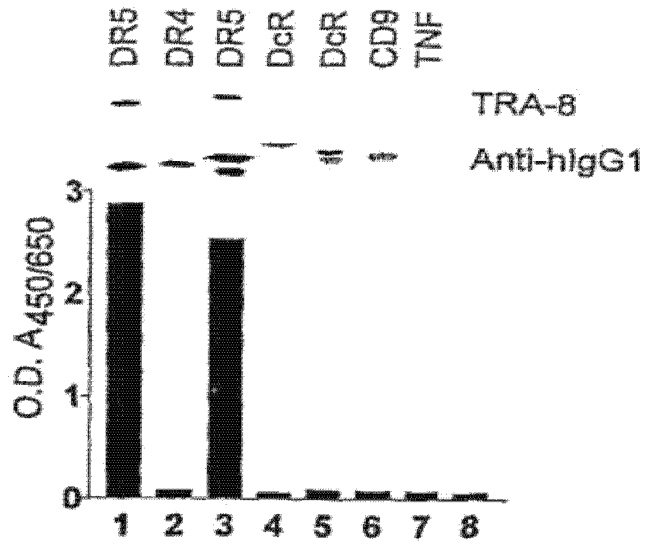


Fig. 1A

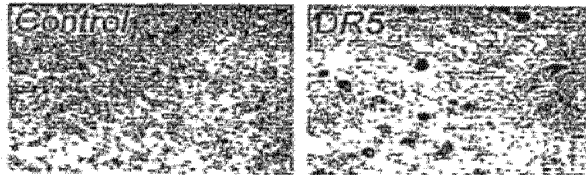


Fig. 1D

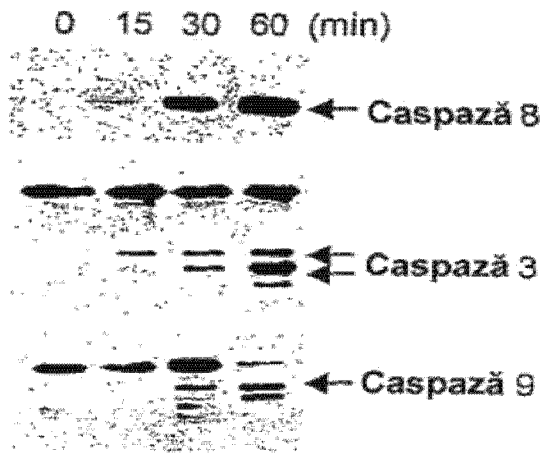


Fig. 1F

(51) Int.Cl.

- A61K 39/395 (2006.01),
- A61K 31/00 (2006.01),
- A61K 38/00 (2006.01),
- A61K 39/00 (2006.01),
- A61P 35/00 (2006.01),
- C07K 16/00 (2006.01),
- C12N 1/00 (2006.01)

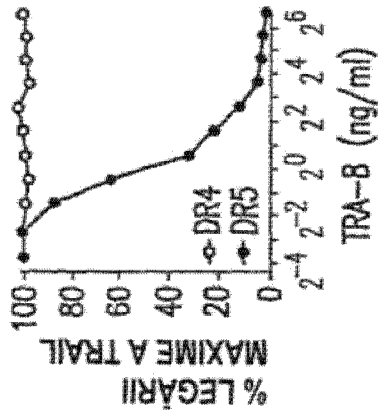


Fig. 1B3

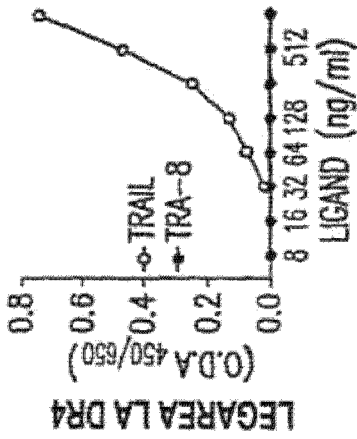


Fig. 1B2

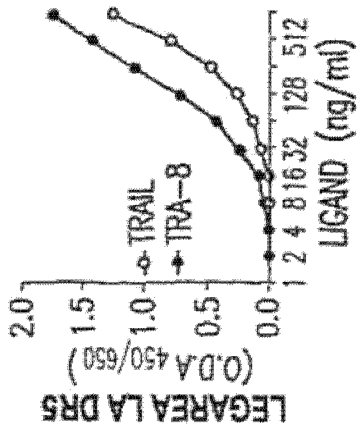


Fig. 1B1

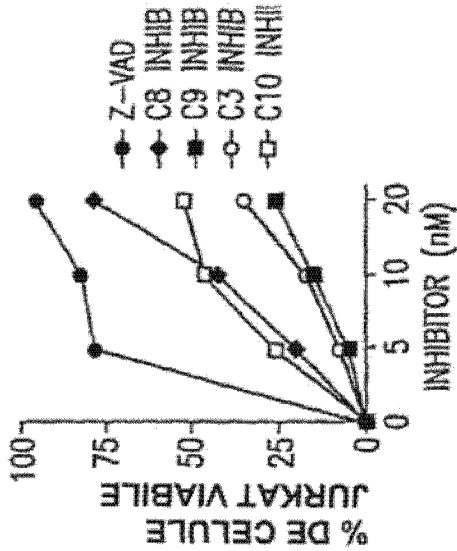


Fig. 1G

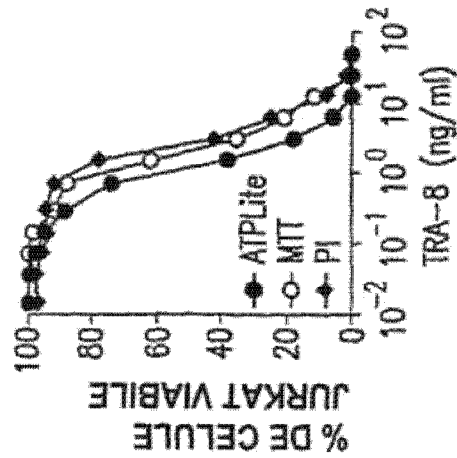


Fig. 1E

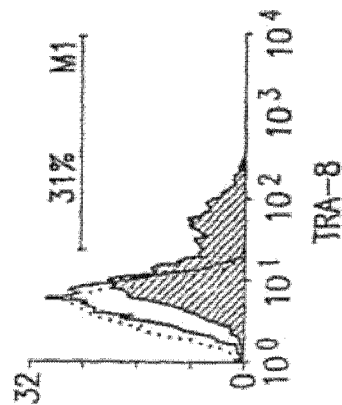


Fig. 1C

(51) Int.Cl.

- A61K 39/395 (2006.01);
- A61K 31/00 (2006.01);
- A61K 38/00 (2006.01);
- A61K 39/00 (2006.01);
- A61P 35/00 (2006.01);
- C07K 16/00 (2006.01);
- C12N 1/00 (2006.01)

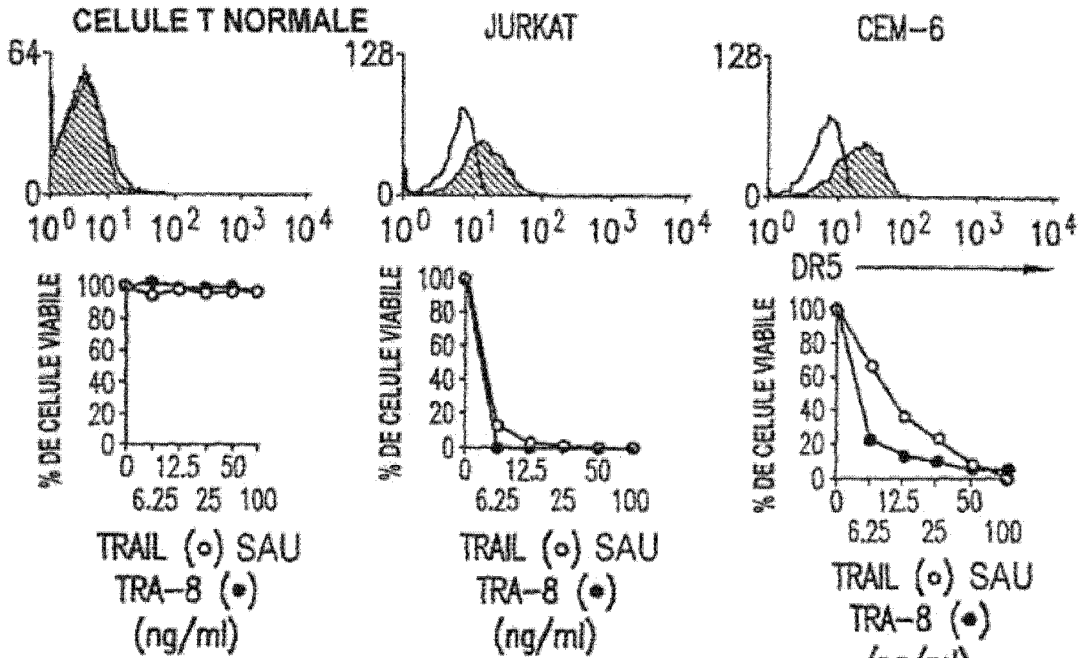


Fig. 2A1

Fig. 2A2

Fig. 2A3

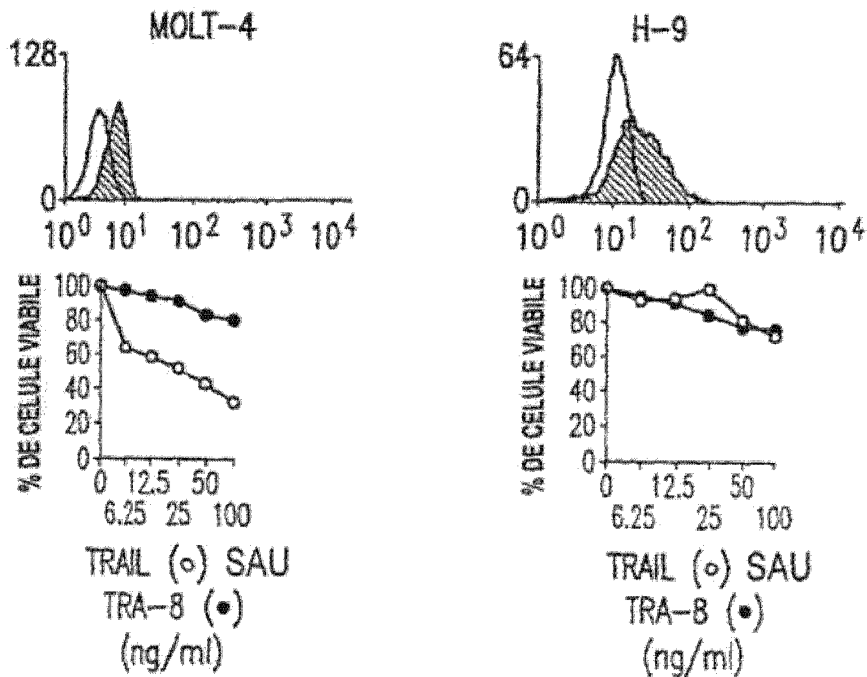


Fig. 2A4

Fig. 2A5

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01),  
 A61K 31/00 (2006.01),  
 A61K 38/00 (2006.01),  
 A61K 39/00 (2006.01),  
 A61P 35/00 (2006.01),  
 C07K 16/00 (2006.01),  
 C12N 1/00 (2006.01)

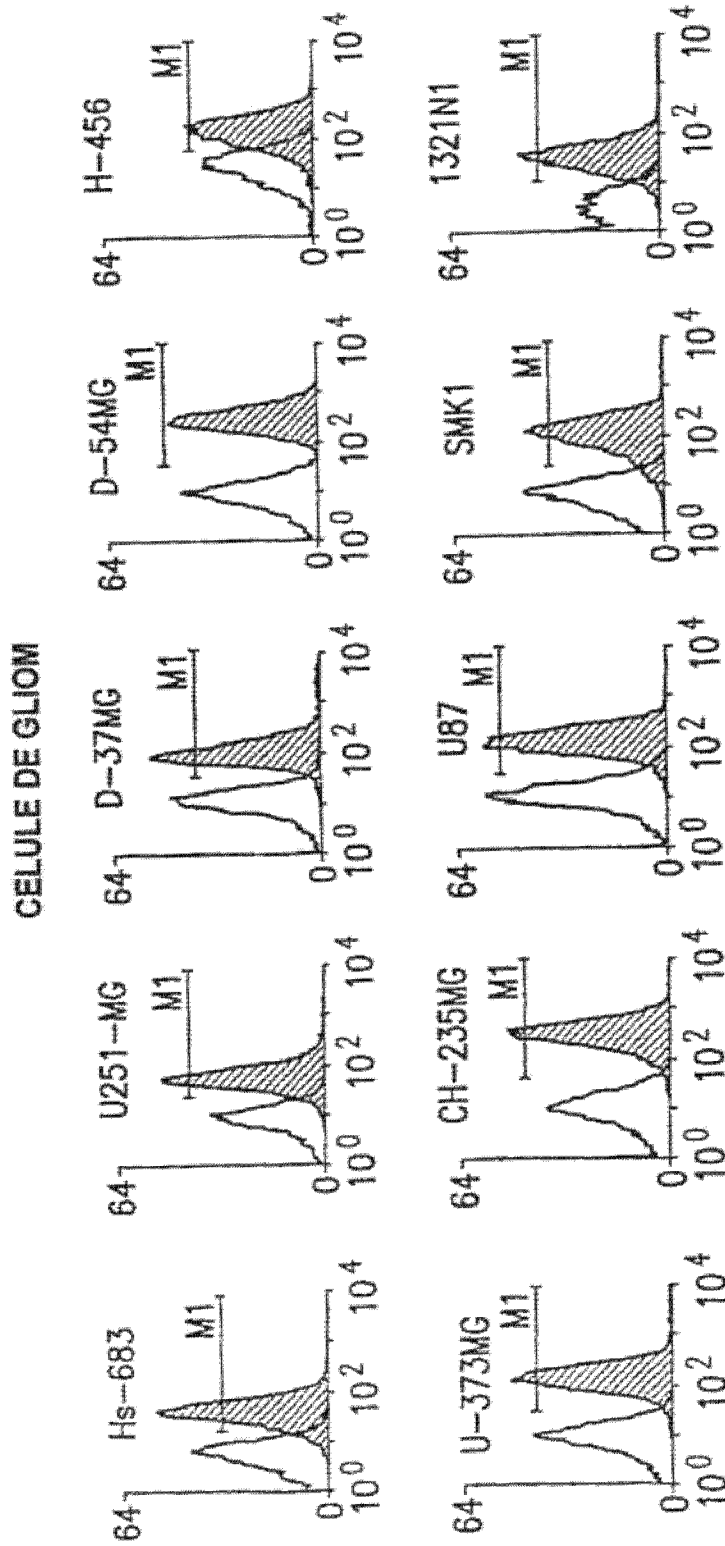


Fig. 2B

(51) Int.Cl.

- A61K 39/395 (2006.01),
- A61K 31/00 (2006.01),
- A61K 38/00 (2006.01),
- A61K 39/00 (2006.01),
- A61P 35/00 (2006.01),
- C07K 16/00 (2006.01),
- C12N 1/00 (2006.01)

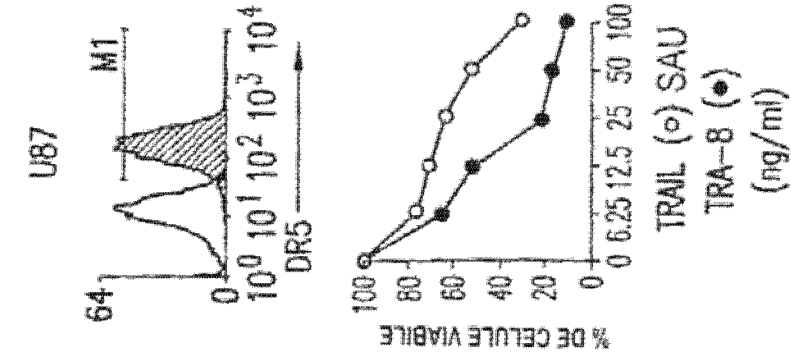


Fig. 2B'3

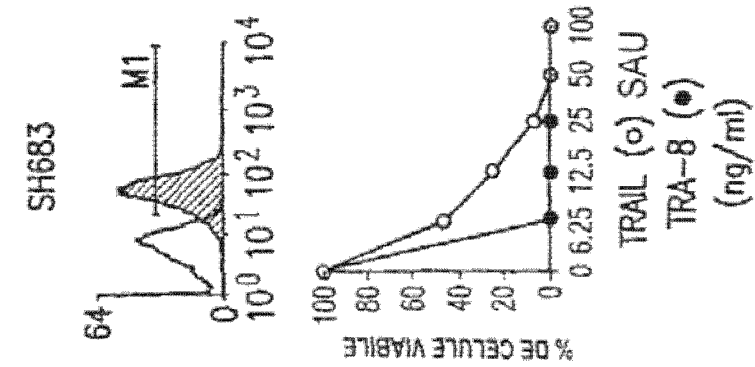


Fig. 2B'2

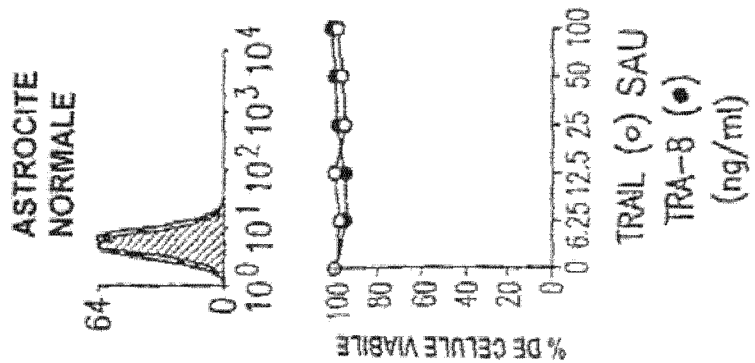


Fig. 2B'1

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01);  
 A61K 31/00 (2006.01);  
 A61K 38/00 (2006.01);  
 A61K 39/00 (2006.01);  
 A61P 35/00 (2006.01);  
 C07K 16/00 (2006.01);  
 C12N 1/00 (2006.01)

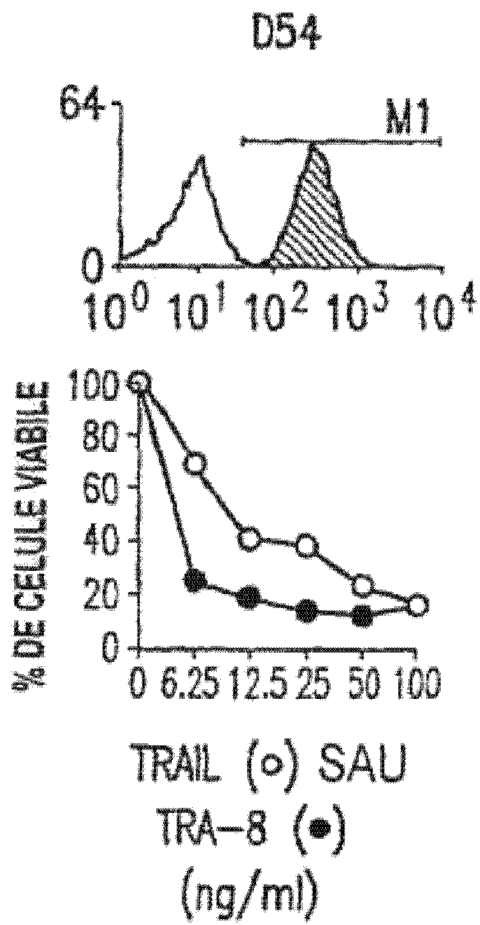


Fig. 2B'4

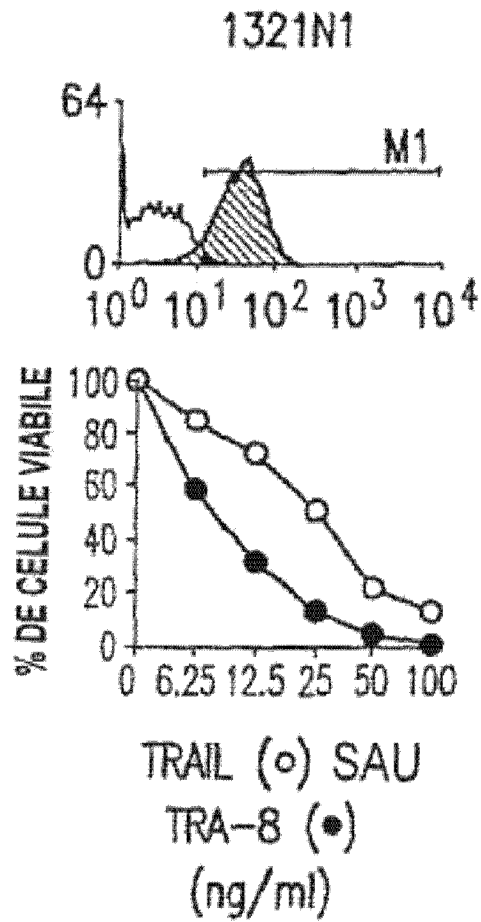


Fig. 2B'5

(51) Int.Cl.  
A61K 39/395 (2006.01),  
A61K 31/00 (2006.01),  
A61K 38/00 (2006.01),  
A61K 39/00 (2006.01),  
A61P 35/00 (2006.01),  
C07K 16/00 (2006.01),  
C12N 1/00 (2006.01)

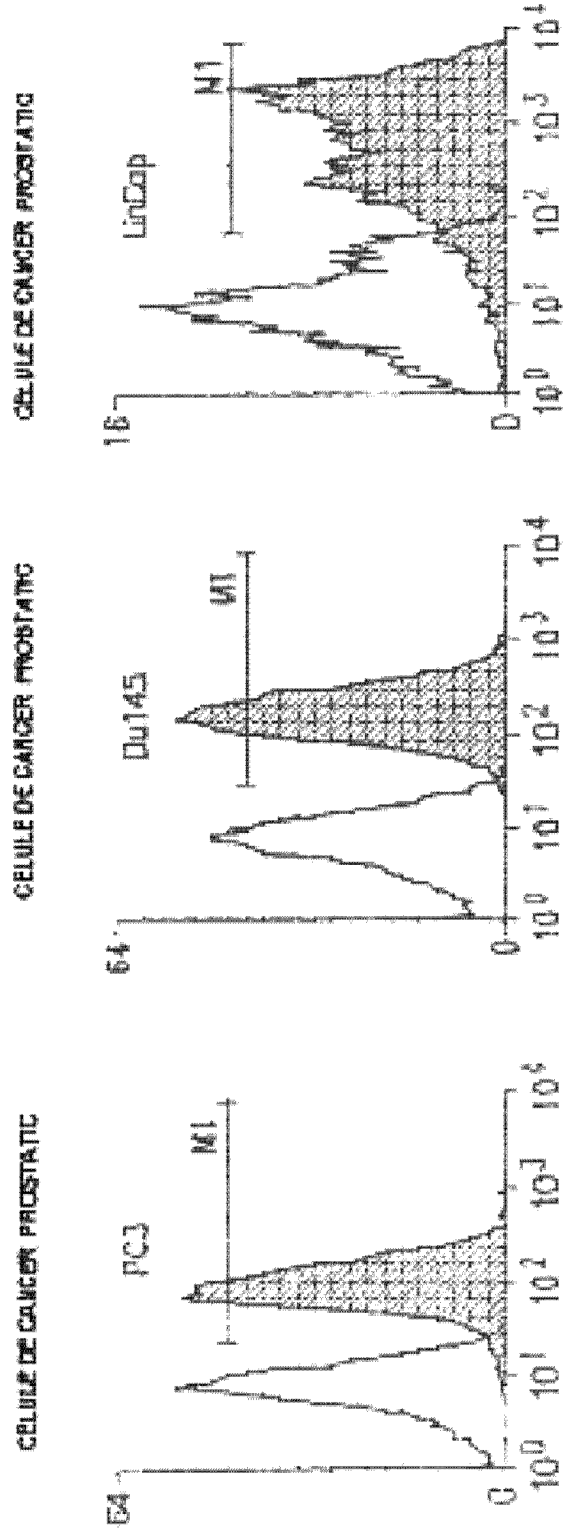


Fig. 2C1

Fig. 2C2

Fig. 2C3

(51) Int.Cl.

- A61K 39/395 (2006.01),
- A61K 31/00 (2006.01),
- A61K 38/00 (2006.01),
- A61K 39/00 (2006.01),
- A61P 35/00 (2006.01),
- C07K 16/00 (2006.01),
- C12N 1/00 (2006.01)

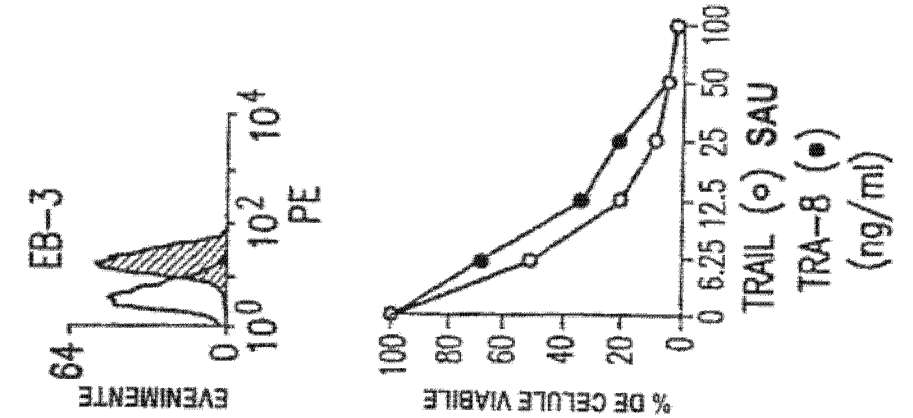


Fig. 2D3

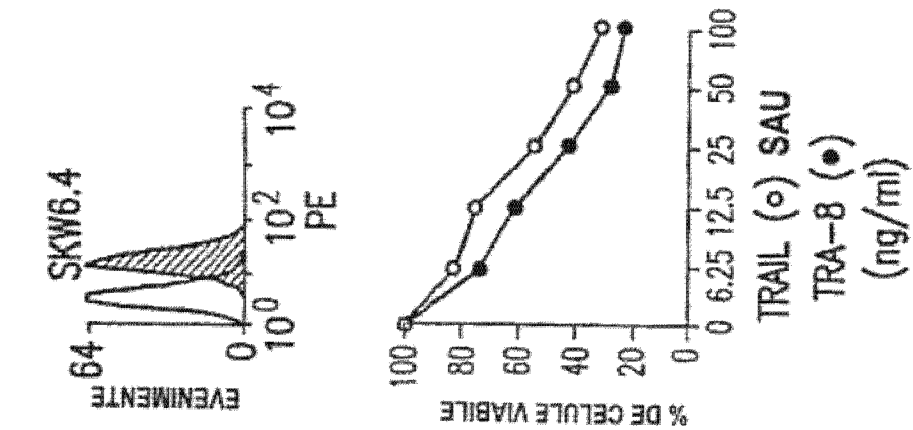


Fig. 2D2

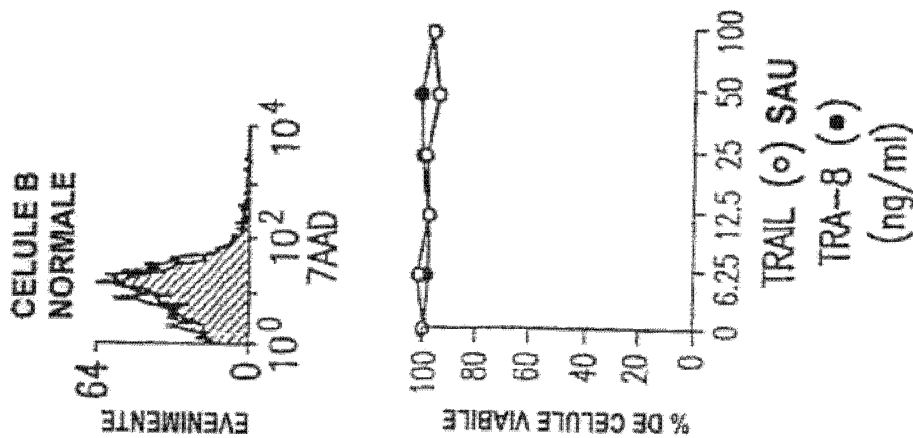
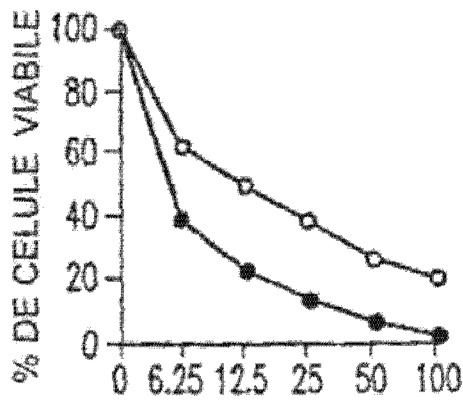
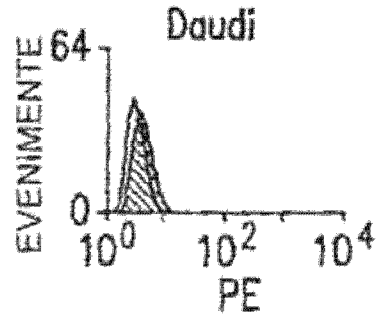
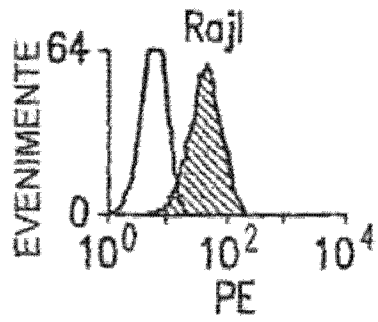


Fig. 2D1

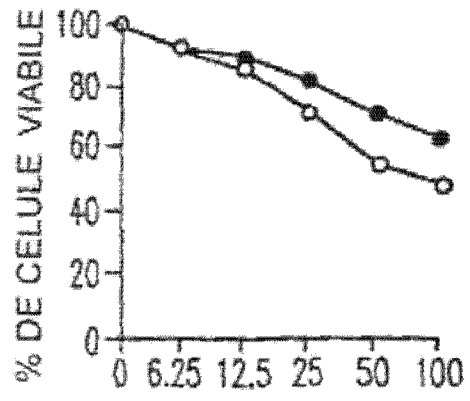
(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01),  
 A61K 31/00 (2006.01),  
 A61K 38/00 (2006.01),  
 A61K 39/00 (2006.01),  
 A61P 35/00 (2006.01),  
 C07K 16/00 (2006.01),  
 C12N 1/00 (2006.01)



TRAIL (○) SAU  
 TRA-8 (●)  
 (ng/ml)

Fig. 2D4



TRAIL (○) SAU  
 TRA-8 (●)  
 (ng/ml)

Fig. 2D5

(51) Int.Cl.

**A61K 39/395** (2006.01);  
**A61K 31/00** (2006.01);  
**A61K 38/00** (2006.01);  
**A61K 39/00** (2006.01);  
**A61P 35/00** (2006.01);  
**C07K 16/00** (2006.01);  
**C12N 1/00** (2006.01)

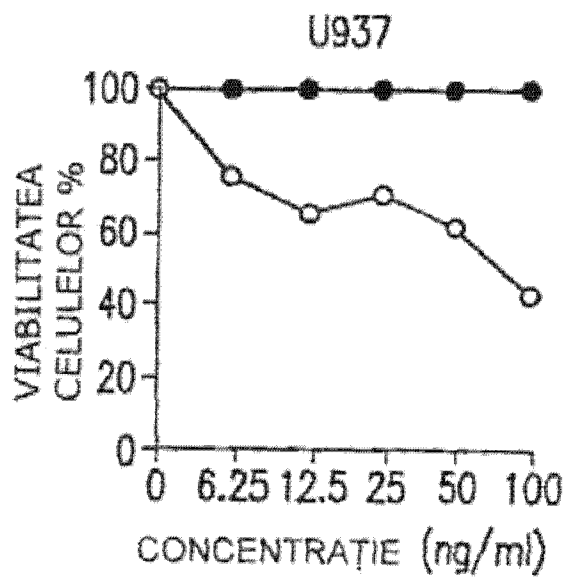


Fig. 3A

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01),  
 A61K 31/00 (2006.01),  
 A61K 38/00 (2006.01),  
 A61K 39/00 (2006.01),  
 A61P 35/00 (2006.01),  
 C07K 16/00 (2006.01),  
 C12N 1/00 (2006.01)

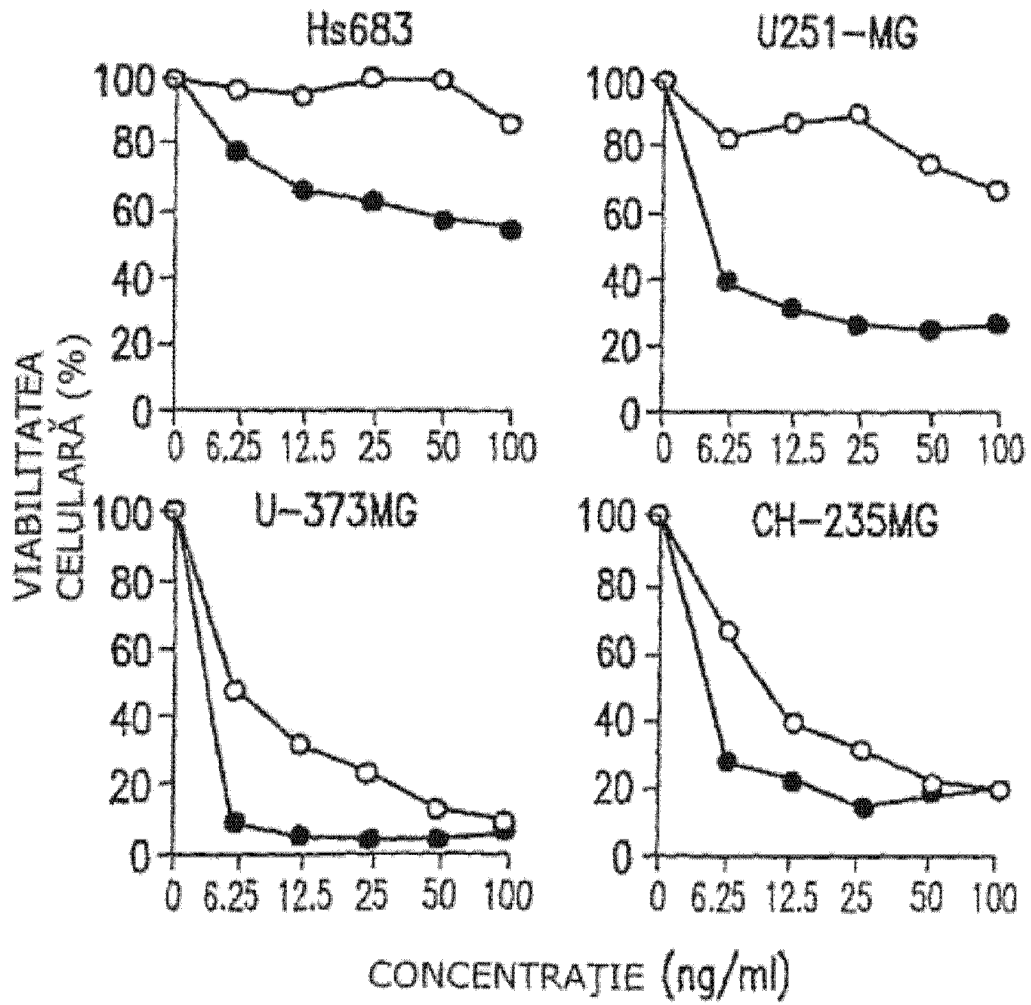


Fig. 3B1

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01);  
 A61K 31/00 (2006.01);  
 A61K 38/00 (2006.01);  
 A61K 39/00 (2006.01);  
 A61P 35/00 (2006.01);  
 C07K 16/00 (2006.01);  
 C12N 1/00 (2006.01)

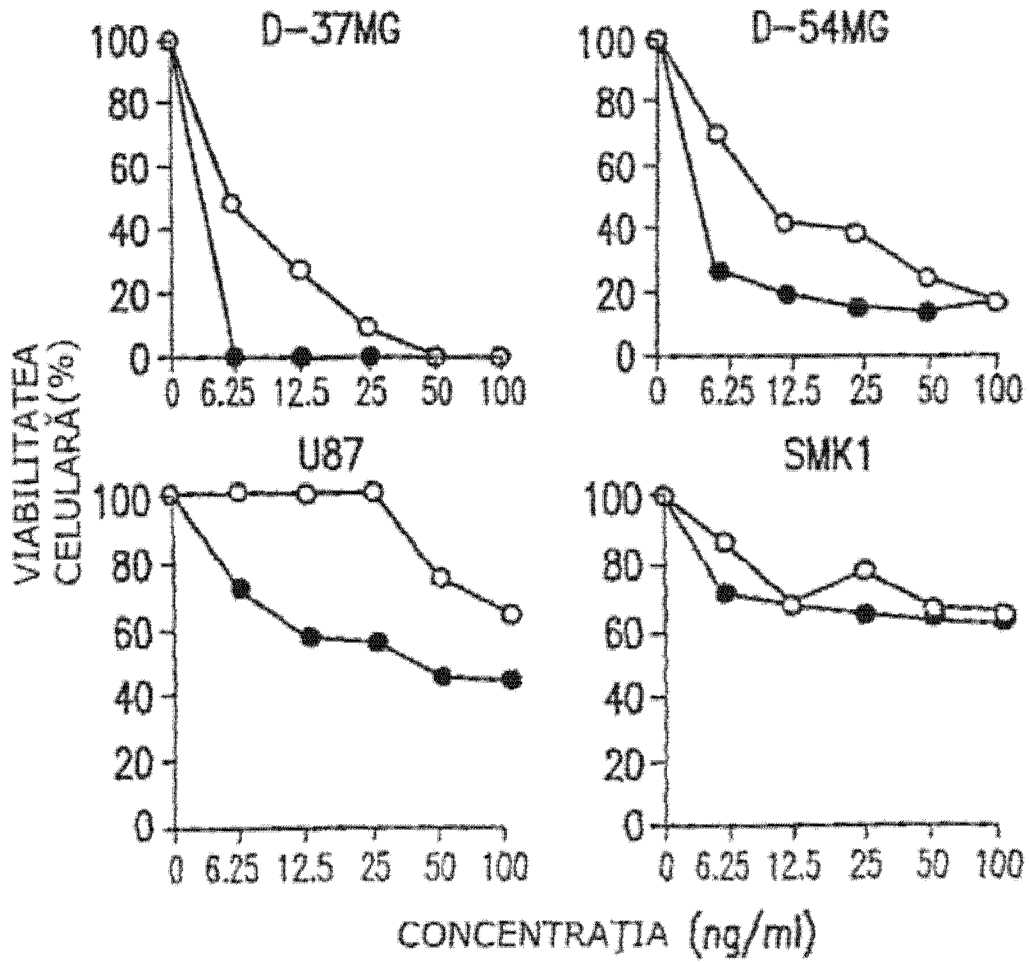


Fig. 3B2

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01);  
 A61K 31/00 (2006.01);  
 A61K 38/00 (2006.01);  
 A61K 39/00 (2006.01);  
 A61P 35/00 (2006.01);  
 C07K 16/00 (2006.01);  
 C12N 1/00 (2006.01)

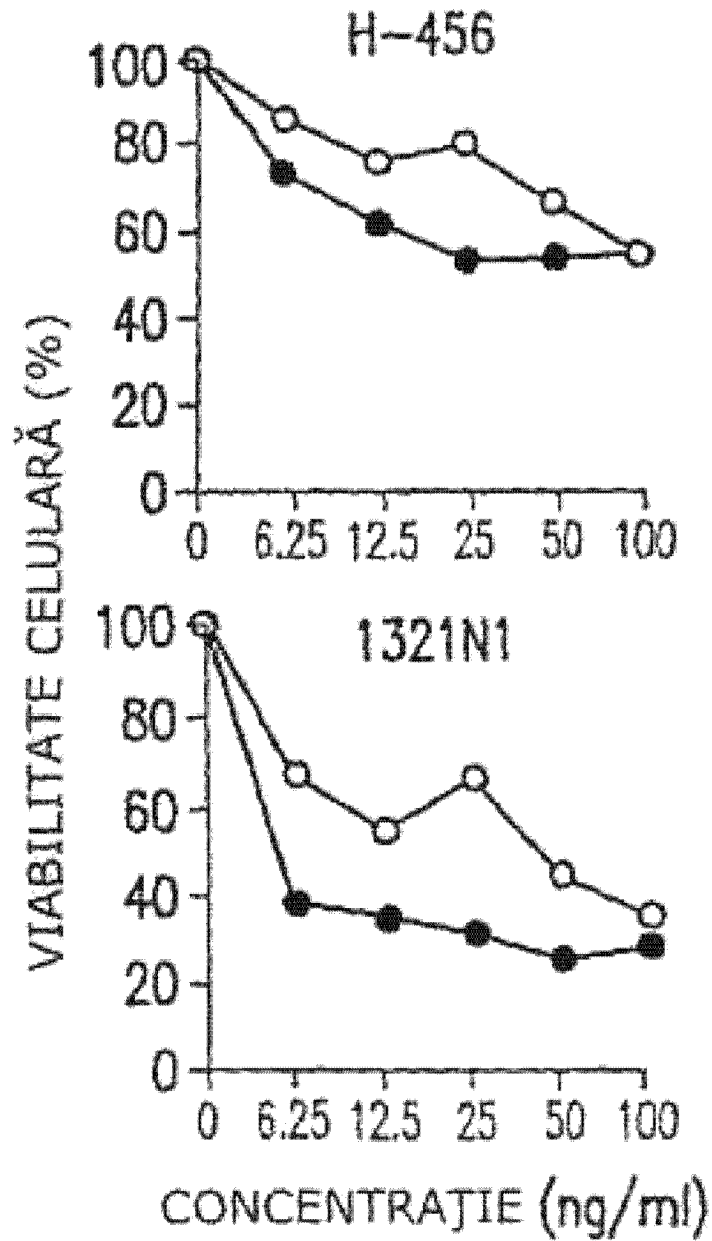


Fig. 3B3

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01),  
 A61K 31/00 (2006.01),  
 A61K 38/00 (2006.01),  
 A61K 39/00 (2006.01),  
 A61P 35/00 (2006.01),  
 C07K 16/00 (2006.01),  
 C12N 1/00 (2006.01)

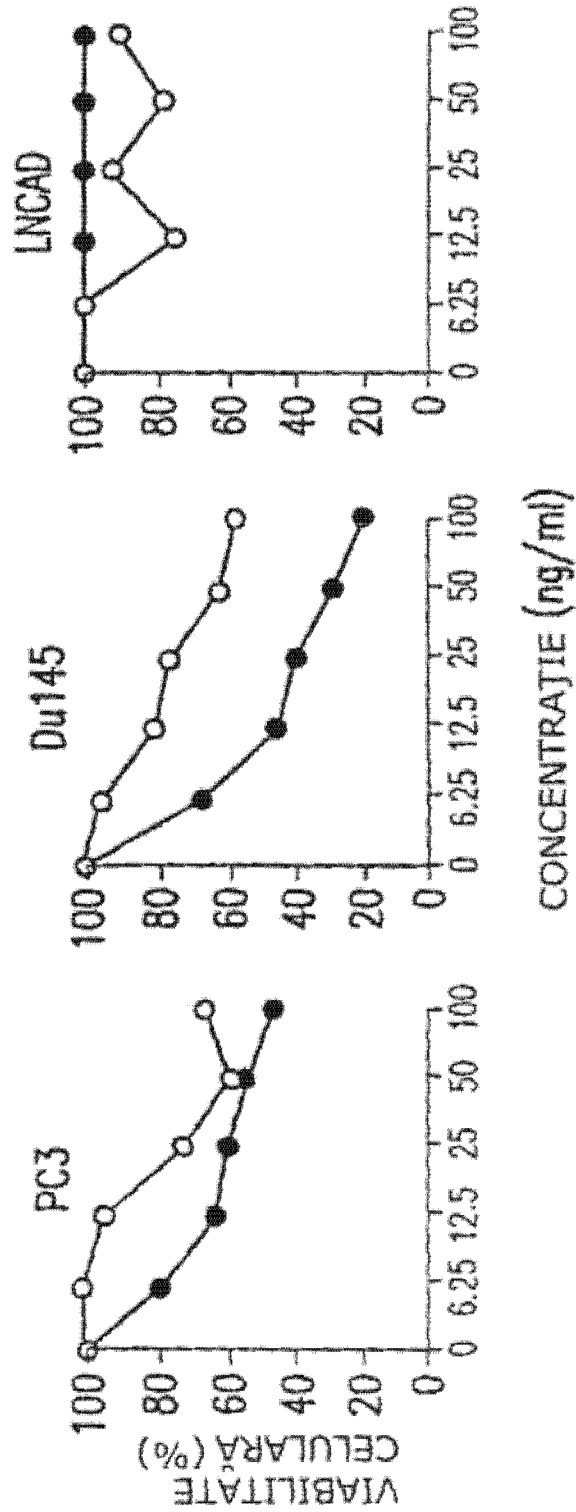


Fig. 3C

(51) Int.Cl.  
 A61K 39/395 (2006.01),  
 A61K 31/00 (2006.01),  
 A61K 38/00 (2006.01),  
 A61K 39/00 (2006.01),  
 A61P 35/00 (2006.01),  
 C07K 16/00 (2006.01),  
 C12N 1/00 (2006.01)

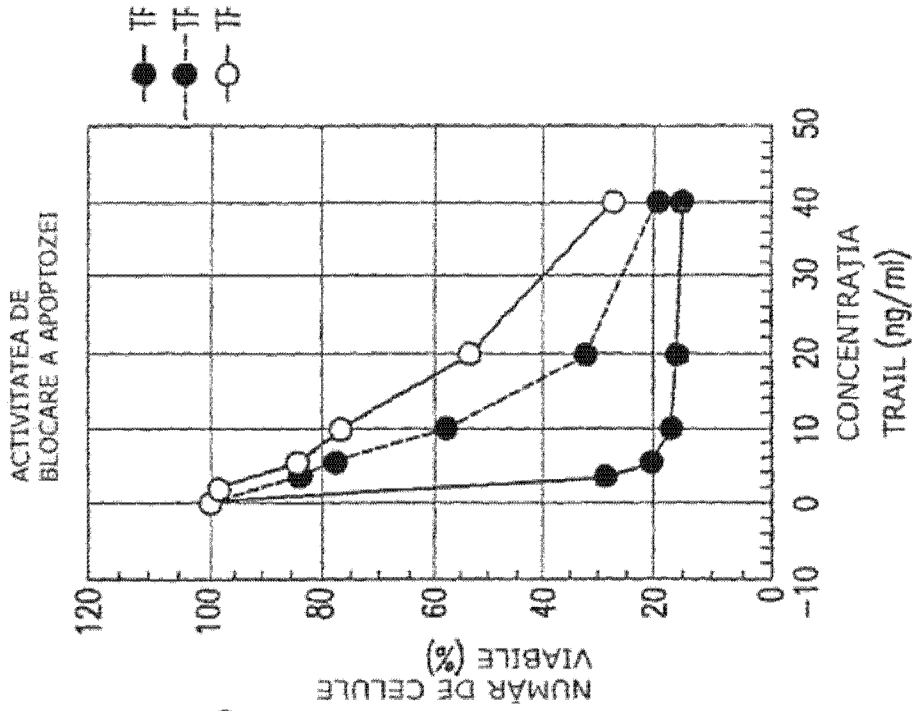


Fig. 4B

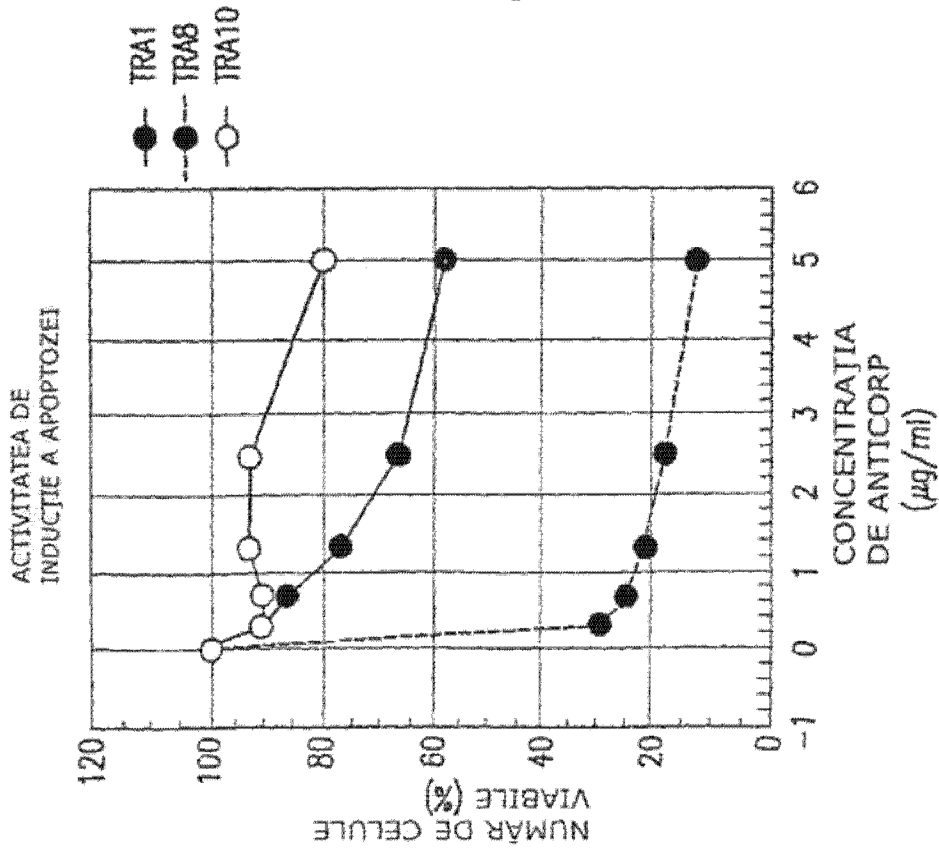


Fig. 4A

(51) Int.Cl.

**A61K 39/395** (2006.01);  
**A61K 31/00** (2006.01);  
**A61K 38/00** (2006.01);  
**A61K 39/00** (2006.01);  
**A61P 35/00** (2006.01);  
**C07K 16/00** (2006.01);  
**C12N 1/00** (2006.01)

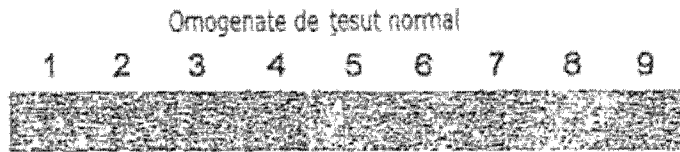


Fig. 5A

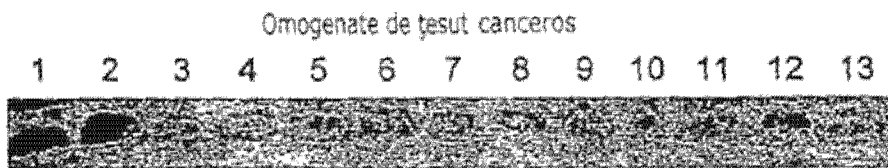


Fig. 5B

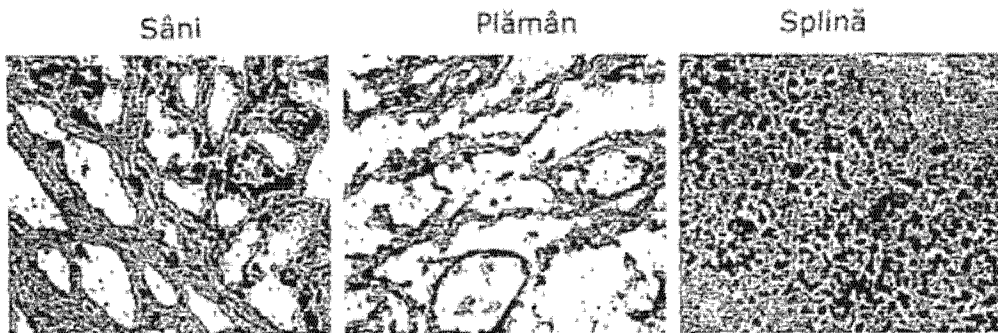


Fig. 5C

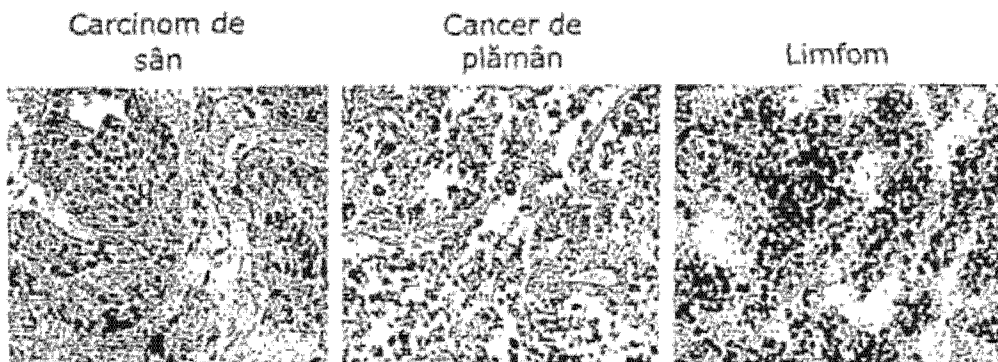


Fig. 5D

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01),  
A61K 31/00 (2006.01),  
A61K 38/00 (2006.01),  
A61K 39/00 (2006.01),  
A61P 35/00 (2006.01),  
C07K 16/00 (2006.01),  
C12N 1/00 (2006.01)

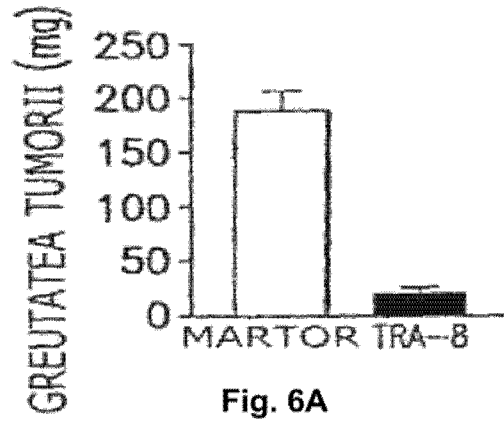


Fig. 6A

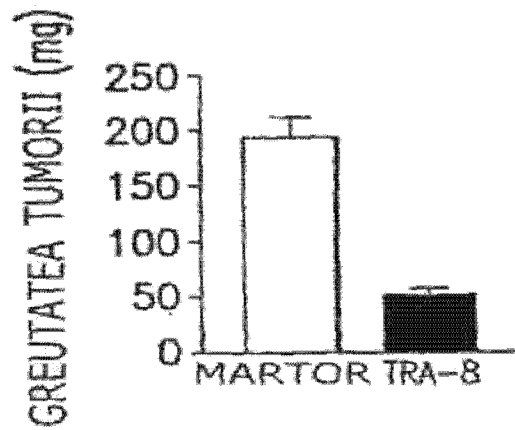


Fig. 6B

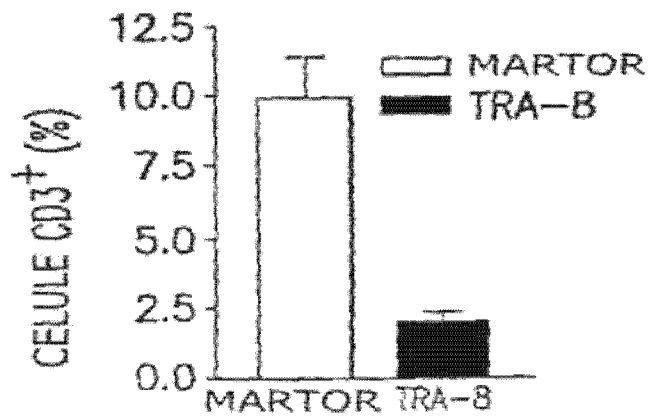


Fig. 6D

(51) Int.Cl.

**A61K 39/395** (2006.01);  
**A61K 31/00** (2006.01);  
**A61K 38/00** (2006.01);  
**A61K 39/00** (2006.01);  
**A61P 35/00** (2006.01);  
**C07K 16/00** (2006.01);  
**C12N 1/00** (2006.01)

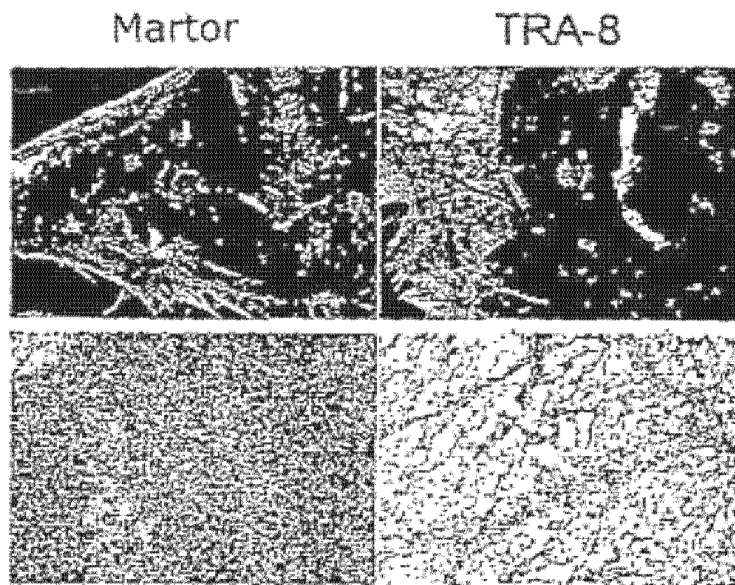


Fig. 6C

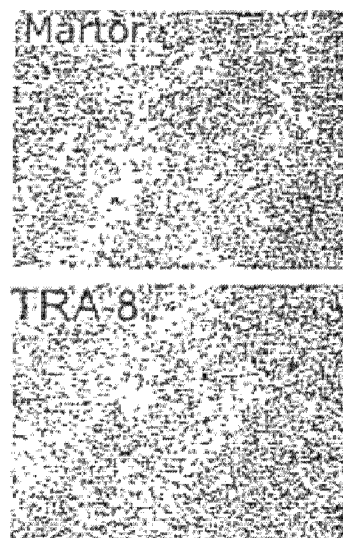


Fig. 6E

(51) Int.Cl.

- A61K 39/395 (2006.01),
- A61K 31/00 (2006.01),
- A61K 38/00 (2006.01),
- A61K 39/00 (2006.01),
- A61P 35/00 (2006.01),
- C07K 16/00 (2006.01),
- C12N 1/00 (2006.01)

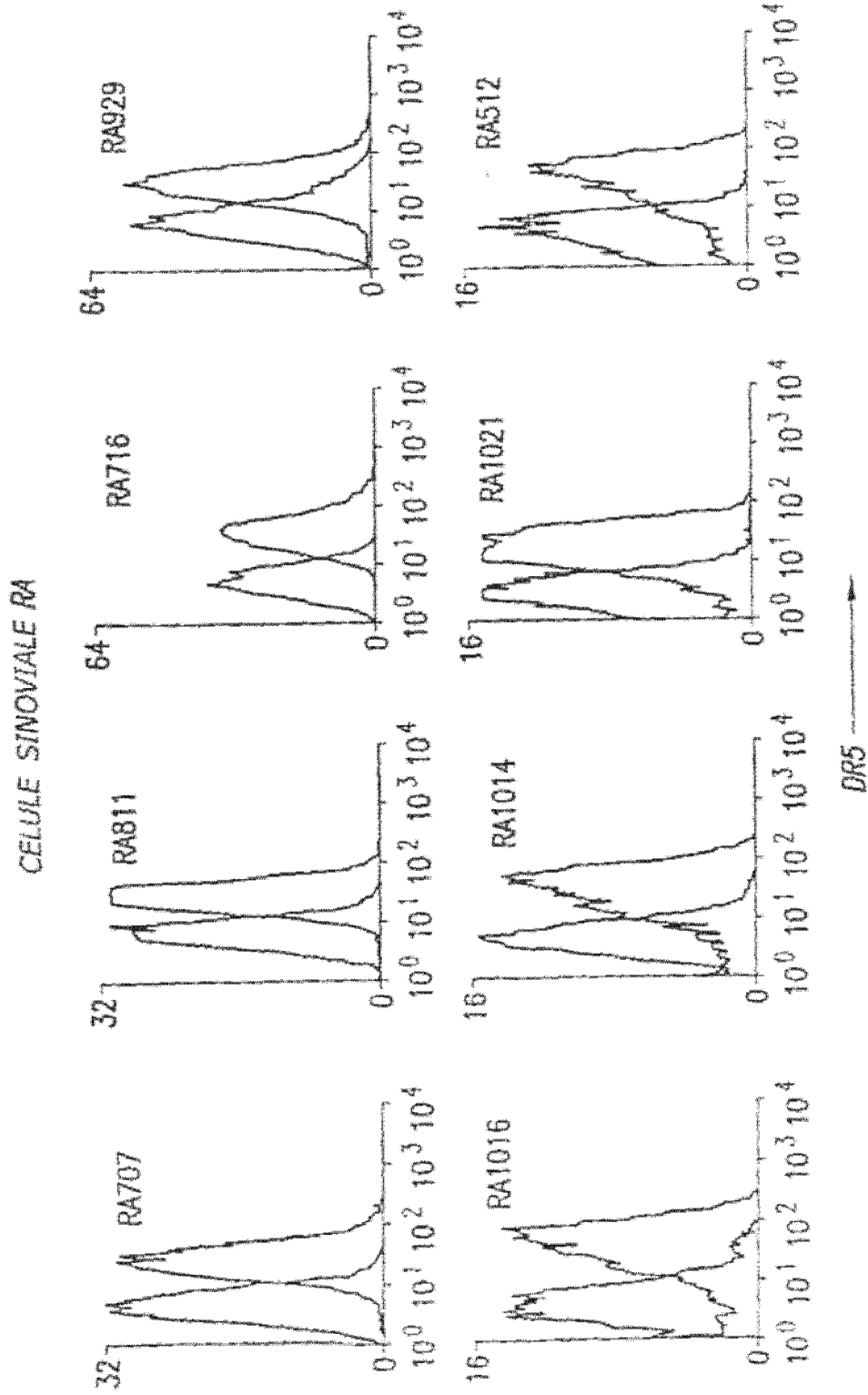


Fig. 7A

(51) Int.Cl.

- A61K 39/395 (2006.01),
- A61K 31/00 (2006.01),
- A61K 38/00 (2006.01),
- A61K 39/00 (2006.01),
- A61P 35/00 (2006.01),
- C07K 16/00 (2006.01),
- C12N 1/00 (2006.01)

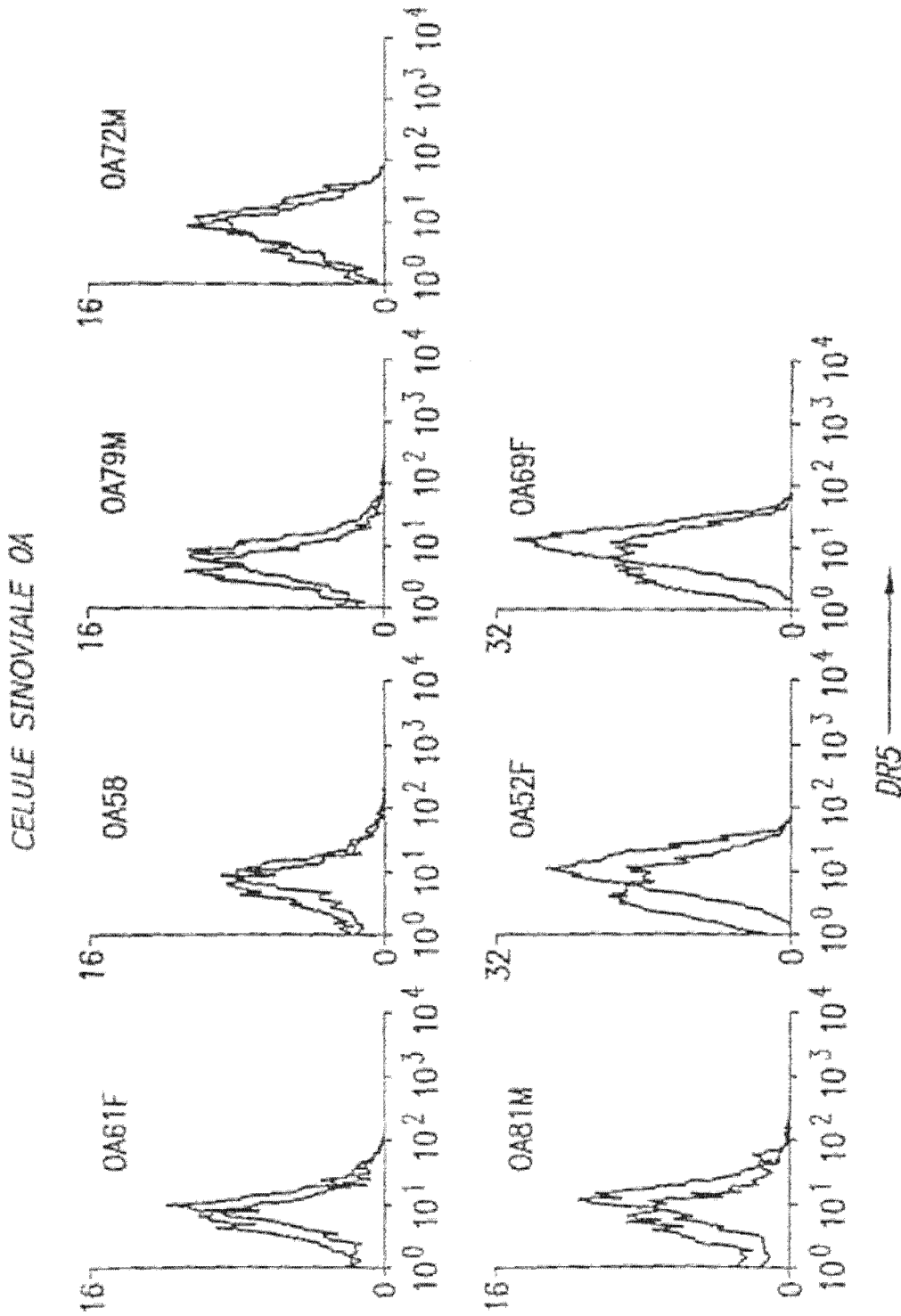


Fig. 7B

(51) Int.Cl.

- A61K 39/395 (2006.01),
- A61K 31/00 (2006.01),
- A61K 38/00 (2006.01),
- A61K 39/00 (2006.01),
- A61P 35/00 (2006.01),
- C07K 16/00 (2006.01),
- C12N 1/00 (2006.01)

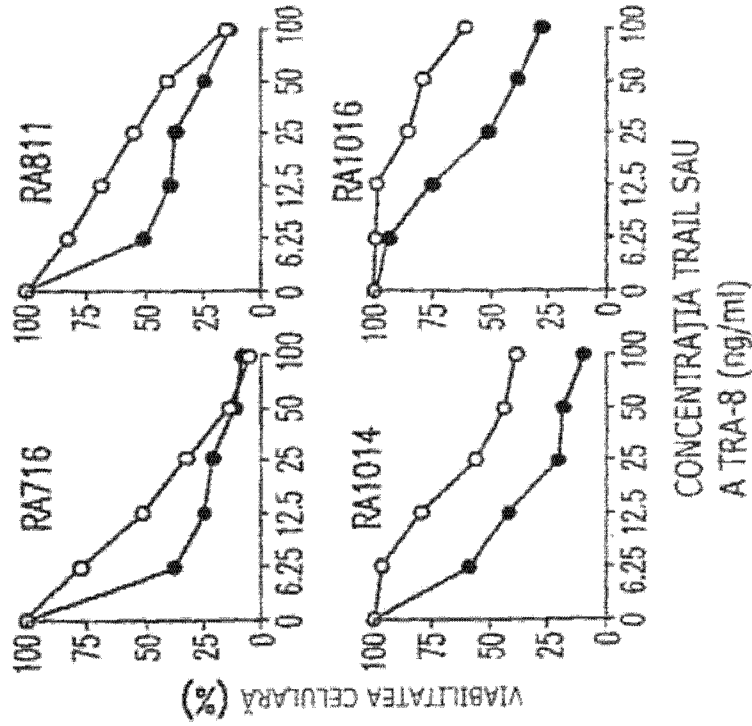


Fig. 8A2

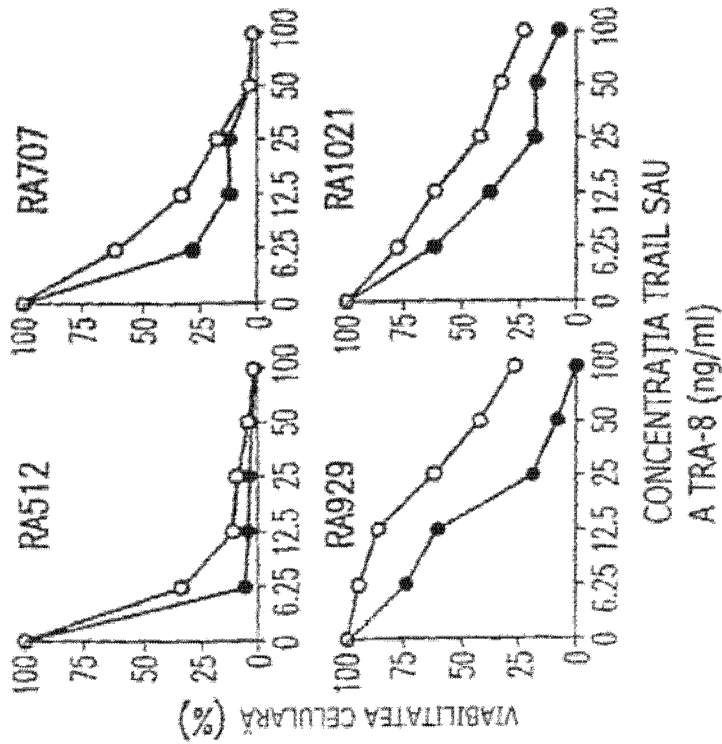


Fig. 8A1

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01);  
 A61K 31/00 (2006.01);  
 A61K 38/00 (2006.01);  
 A61K 39/00 (2006.01);  
 A61P 35/00 (2006.01);  
 C07K 16/00 (2006.01);  
 C12N 1/00 (2006.01)

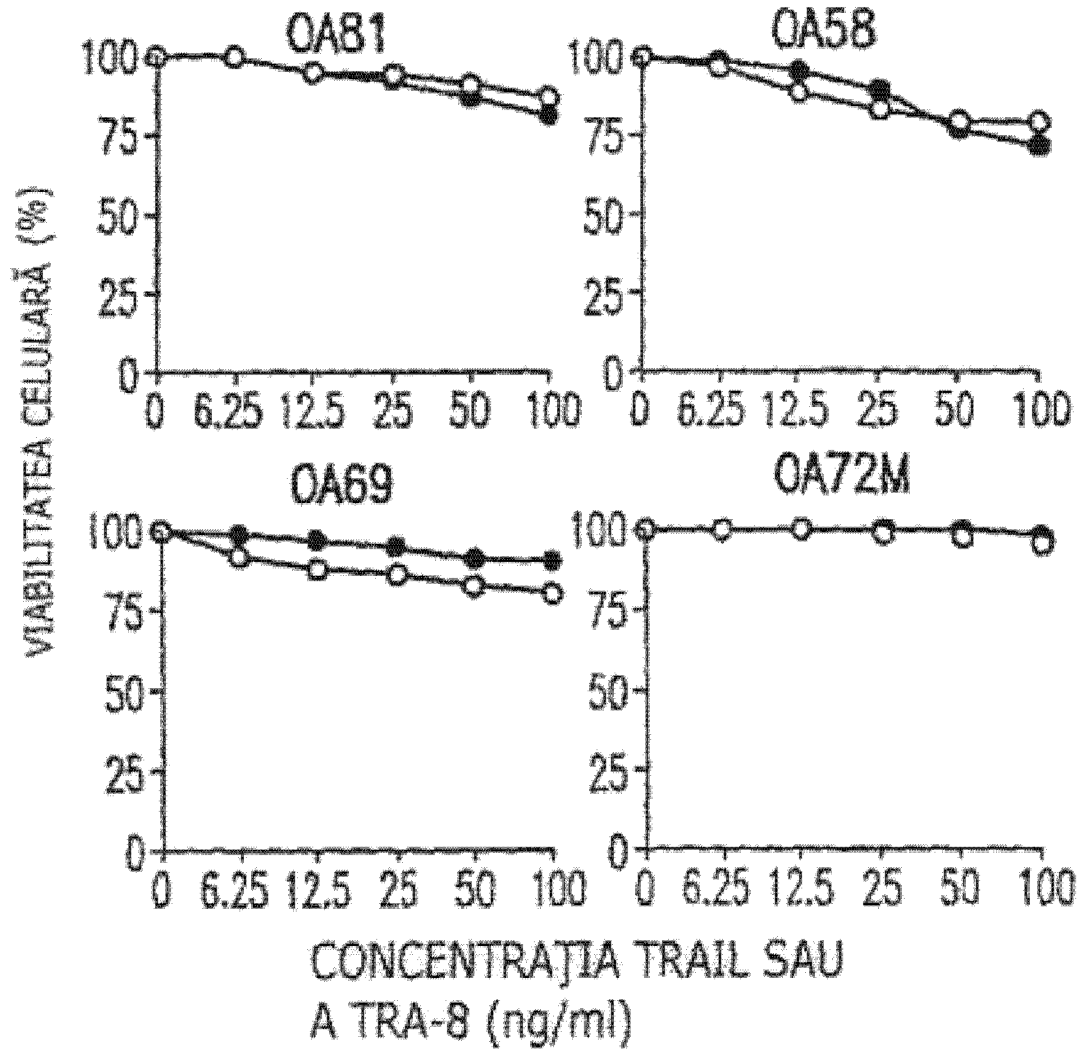


Fig. 8B

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01);  
 A61K 31/00 (2006.01);  
 A61K 38/00 (2006.01);  
 A61K 39/00 (2006.01);  
 A61P 35/00 (2006.01);  
 C07K 16/00 (2006.01);  
 C12N 1/00 (2006.01)

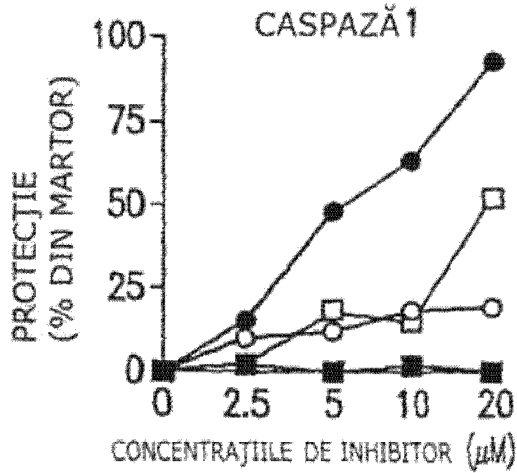


Fig. 9A

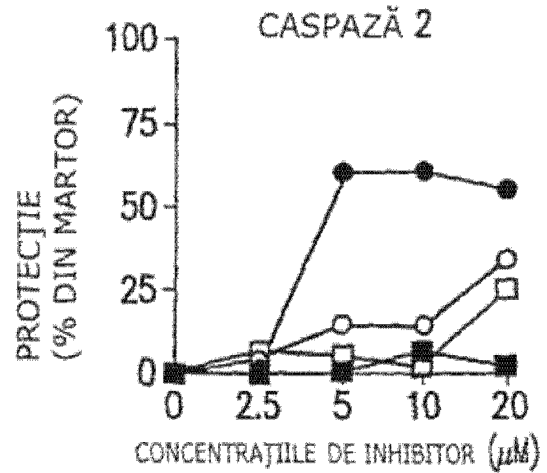


Fig. 9B

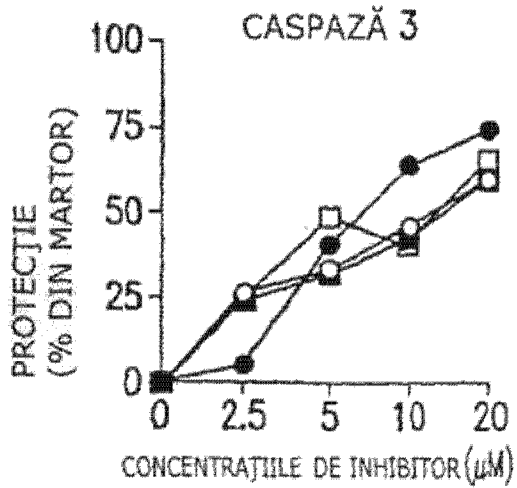


Fig. 9C

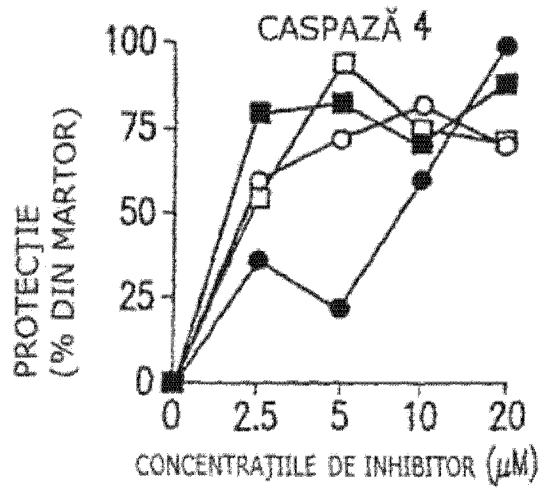


Fig. 9D

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01);  
 A61K 31/00 (2006.01);  
 A61K 38/00 (2006.01);  
 A61K 39/00 (2006.01);  
 A61P 35/00 (2006.01);  
 C07K 16/00 (2006.01);  
 C12N 1/00 (2006.01)

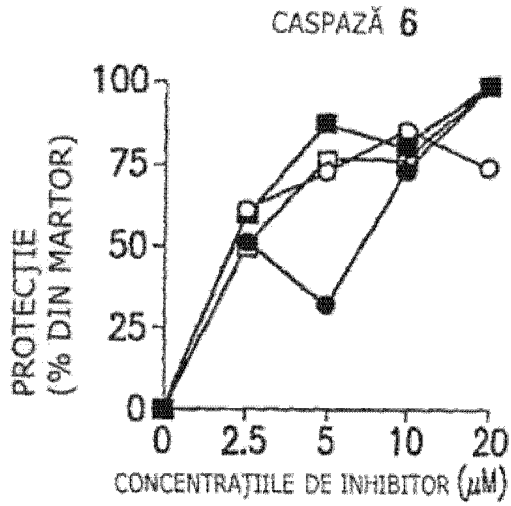


Fig. 9E

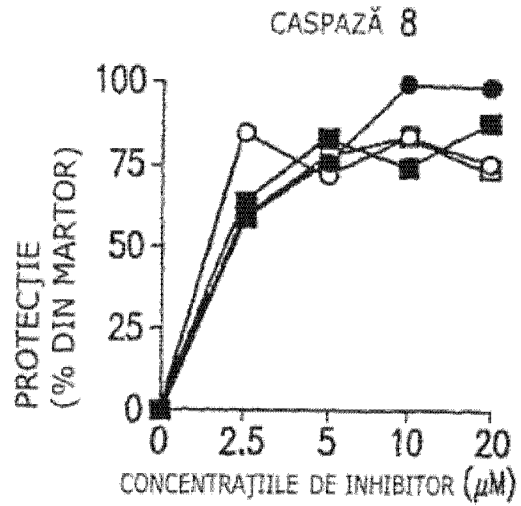


Fig. 9F

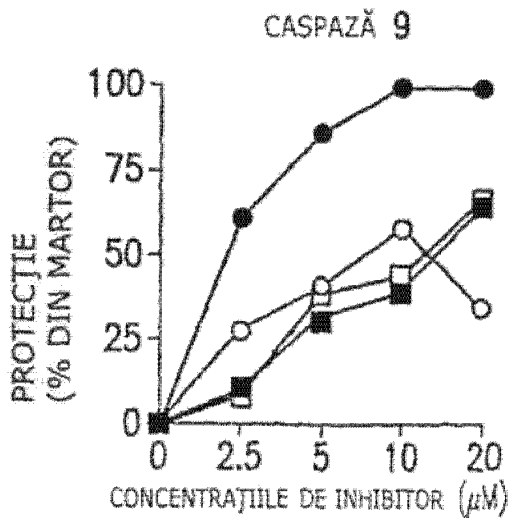


Fig. 9G

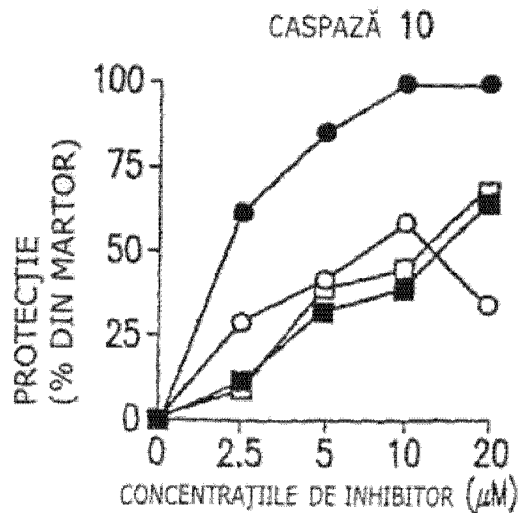


Fig. 9H

(51) Int.Cl.

*A61K 39/395* (2006.01),  
*A61K 31/00* (2006.01),  
*A61K 38/00* (2006.01),  
*A61K 39/00* (2006.01),  
*A61P 35/00* (2006.01),  
*C07K 16/00* (2006.01),  
*C12N 1/00* (2006.01)

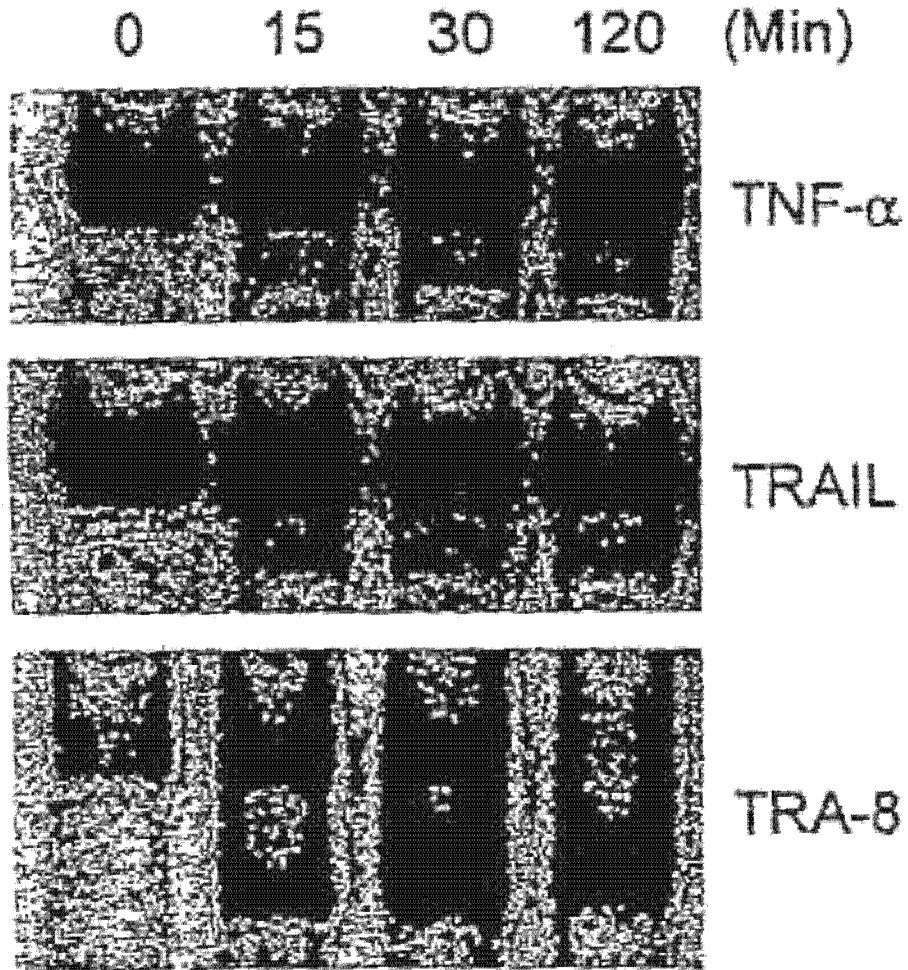


Fig. 10A

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01);  
 A61K 31/00 (2006.01);  
 A61K 38/00 (2006.01);  
 A61K 39/00 (2006.01);  
 A61P 35/00 (2006.01);  
 C07K 16/00 (2006.01);  
 C12N 1/00 (2006.01)

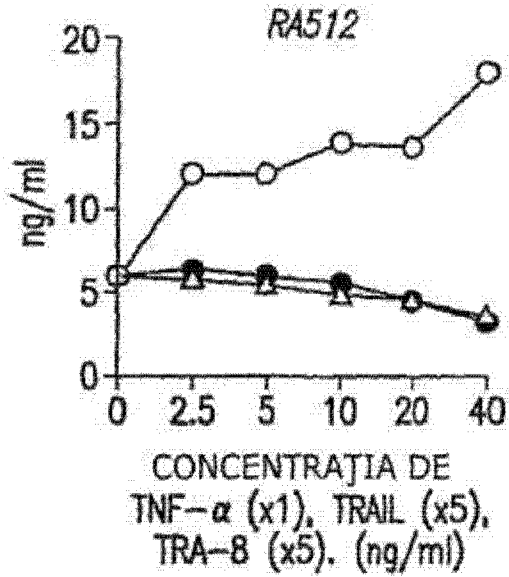


Fig. 10B1

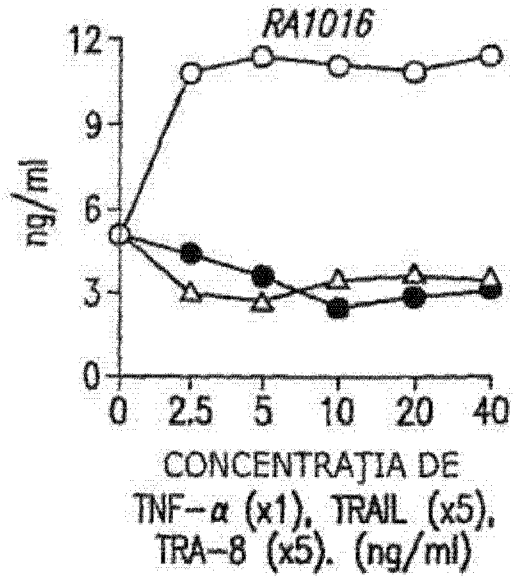


Fig. 10B2

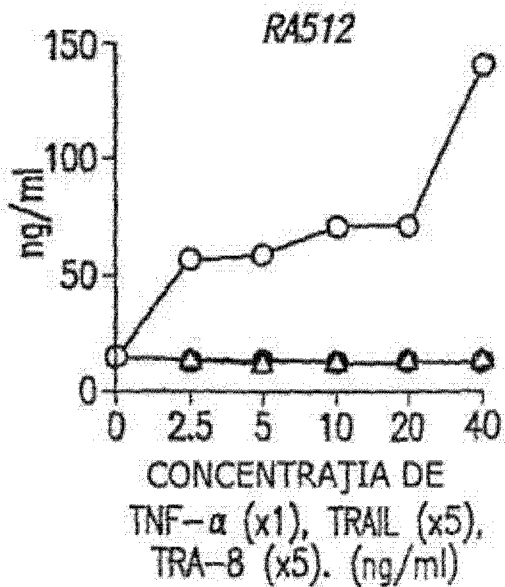


Fig. 10C1

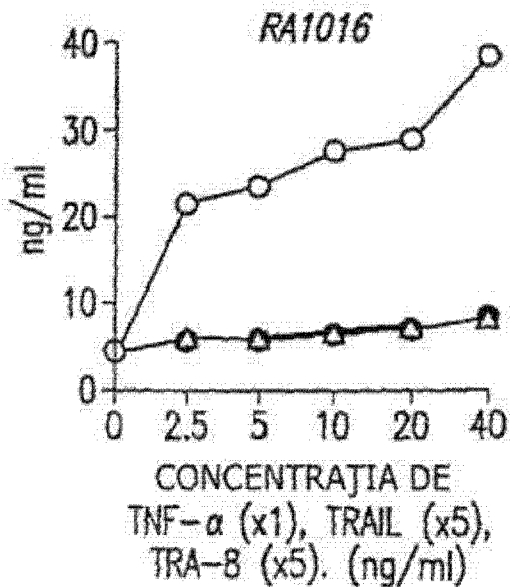


Fig. 10C2

(51) Int.Cl.

*A61K 39/395* (2006.01),  
*A61K 31/00* (2006.01),  
*A61K 38/00* (2006.01),  
*A61K 39/00* (2006.01),  
*A61P 35/00* (2006.01),  
*C07K 16/00* (2006.01),  
*C12N 1/00* (2006.01)

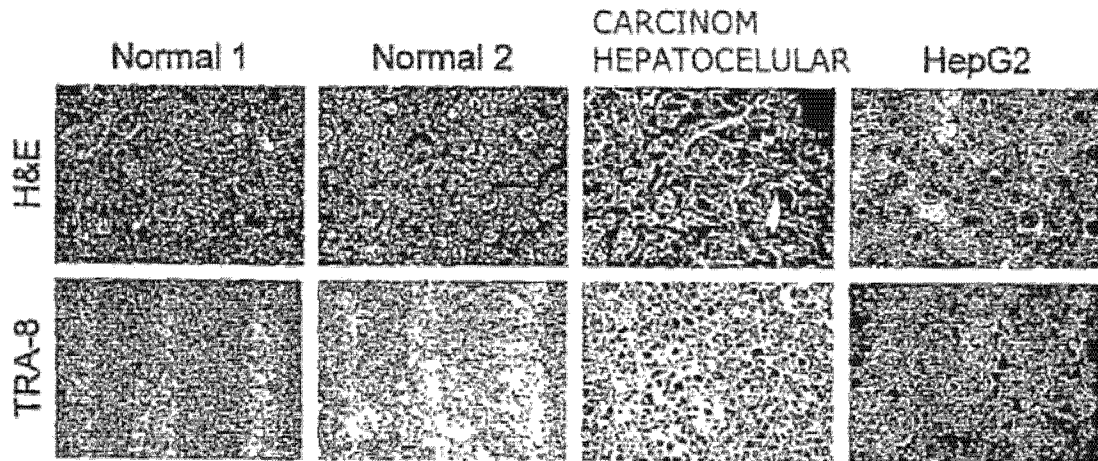


Fig. 11A

(51) Int.Cl.

- A61K 39/395 (2006.01),
- A61K 31/00 (2006.01),
- A61K 38/00 (2006.01),
- A61K 39/00 (2006.01),
- A61P 35/00 (2006.01),
- C07K 16/00 (2006.01),
- C12N 1/00 (2006.01)

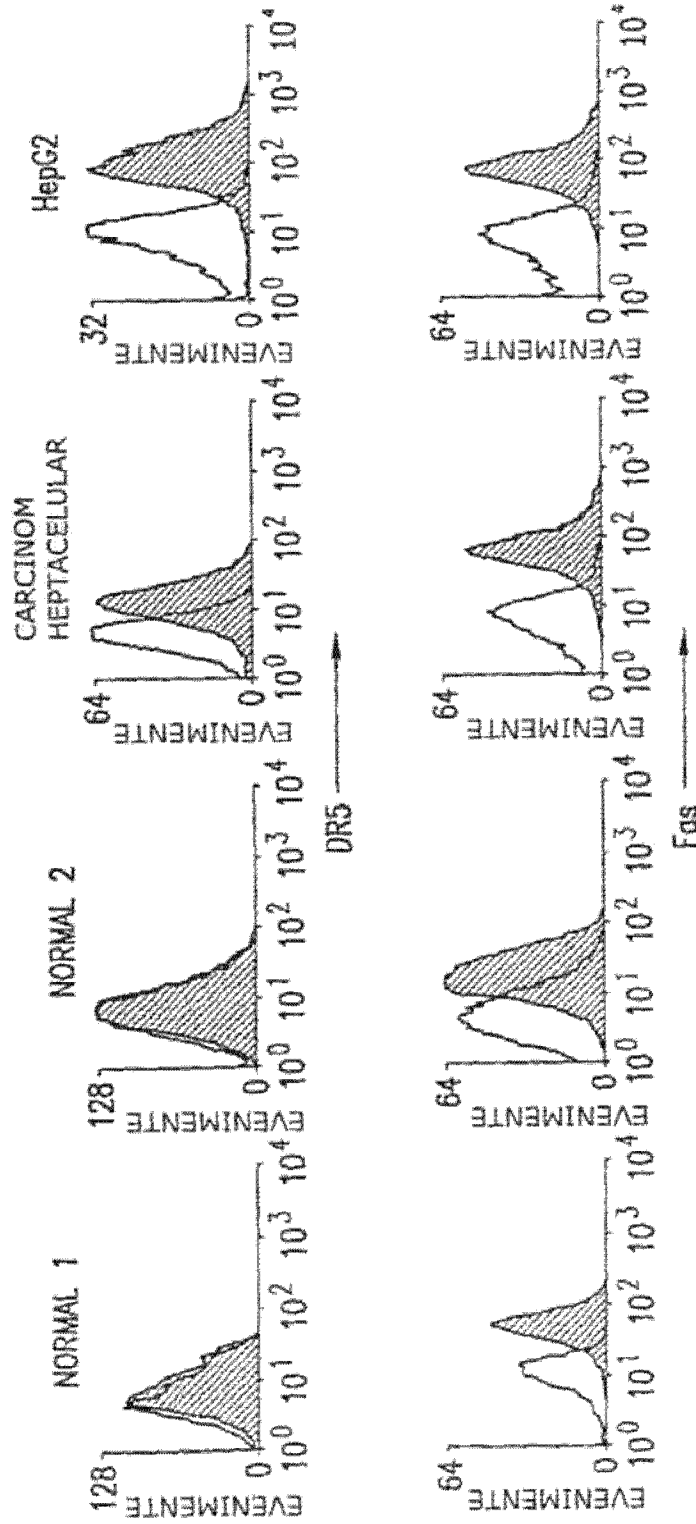


Fig. 11B

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01),  
 A61K 31/00 (2006.01),  
 A61K 38/00 (2006.01),  
 A61K 39/00 (2006.01),  
 A61P 35/00 (2006.01),  
 C07K 16/00 (2006.01),  
 C12N 1/00 (2006.01)

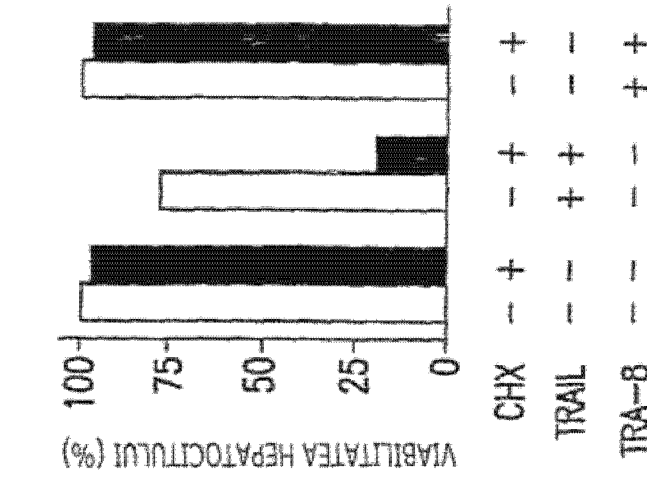


Fig. 12C

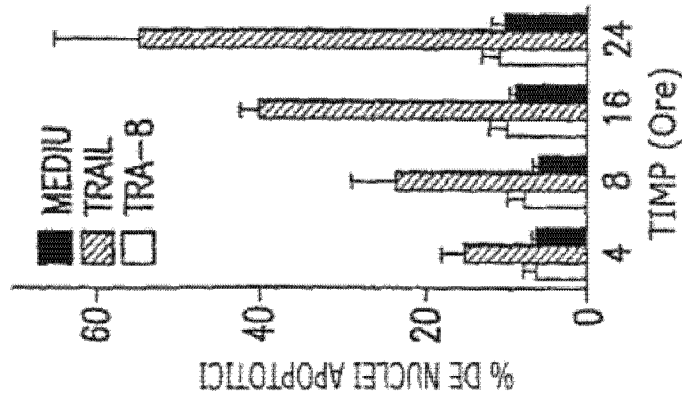


Fig. 12B

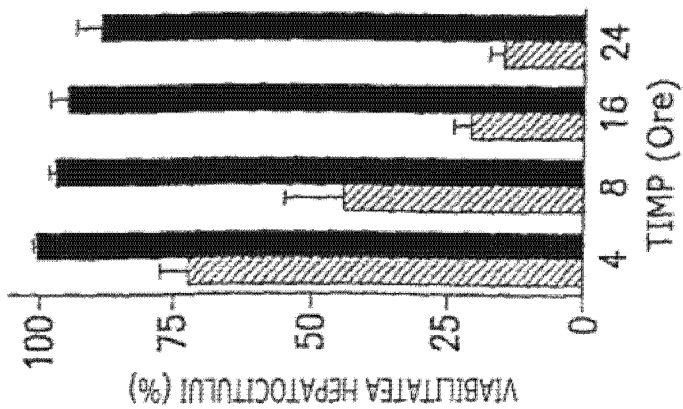


Fig. 12A

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01),  
 A61K 31/00 (2006.01),  
 A61K 38/00 (2006.01),  
 A61K 39/00 (2006.01),  
 A61P 35/00 (2006.01),  
 C07K 16/00 (2006.01),  
 C12N 1/00 (2006.01)

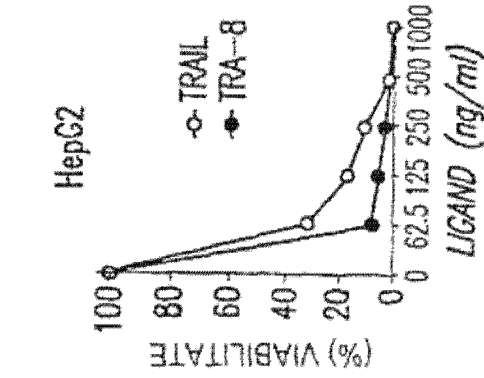


Fig. 12D3

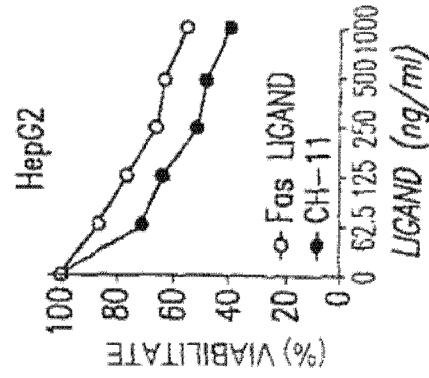


Fig. 12D6

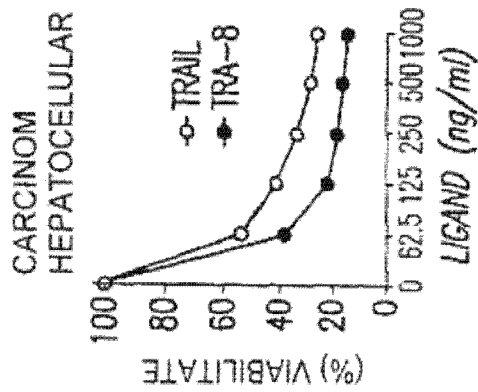


Fig. 12D2

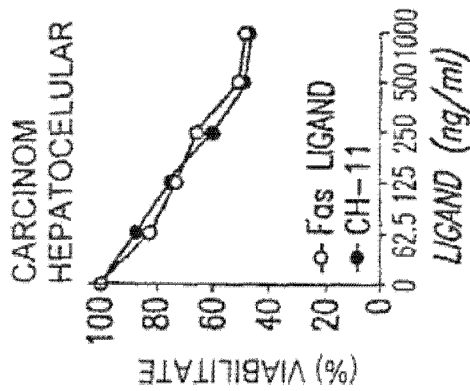


Fig. 12D5

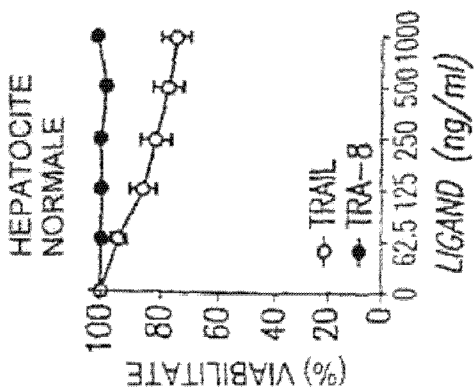


Fig. 12D1

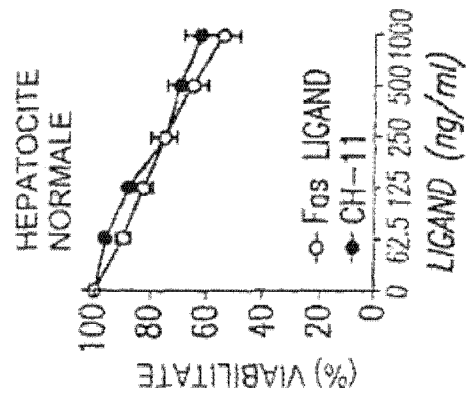
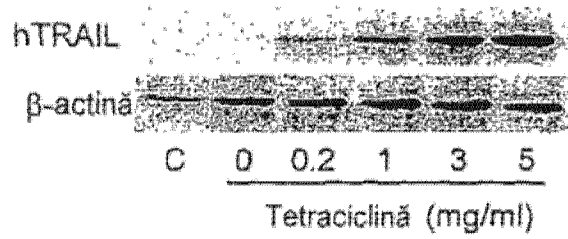


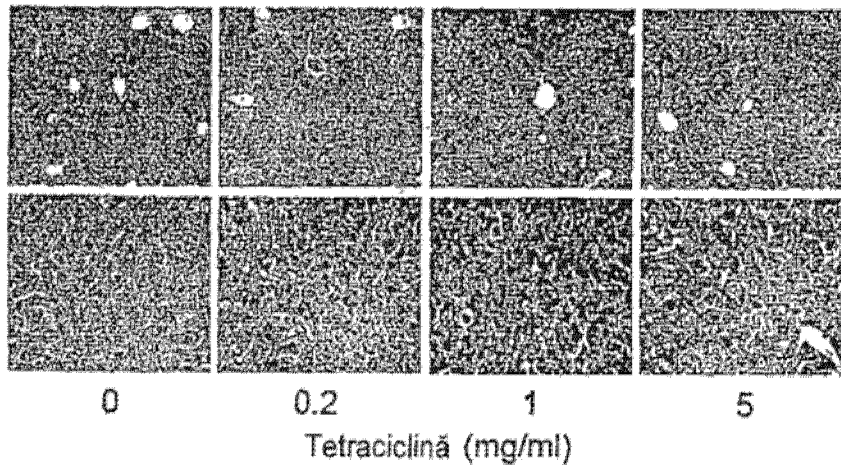
Fig. 12D4

(51) Int.Cl.

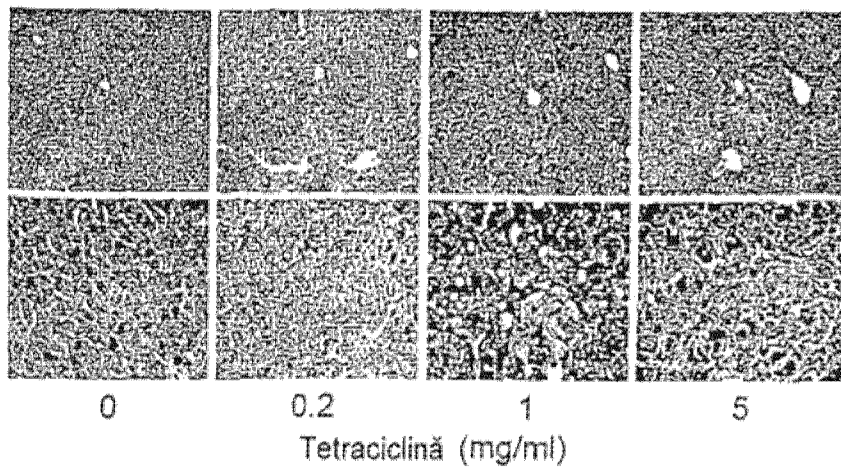
*A61K 39/395* (2006.01),  
*A61K 31/00* (2006.01),  
*A61K 38/00* (2006.01),  
*A61K 39/00* (2006.01),  
*A61P 35/00* (2006.01),  
*C07K 16/00* (2006.01),  
*C12N 1/00* (2006.01)



**Fig. 13A**



**Fig. 13D**



**Fig. 13F**

(51) Int.Cl.

**A61K 39/395** (2006.01);  
**A61K 31/00** (2006.01);  
**A61K 38/00** (2006.01);  
**A61K 39/00** (2006.01);  
**A61P 35/00** (2006.01);  
**C07K 16/00** (2006.01);  
**C12N 1/00** (2006.01)

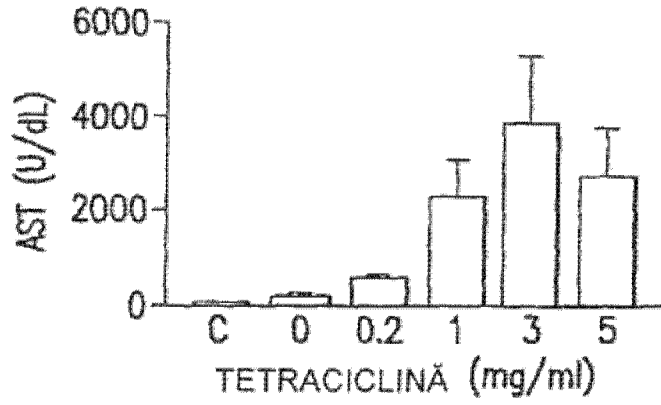


Fig. 13B

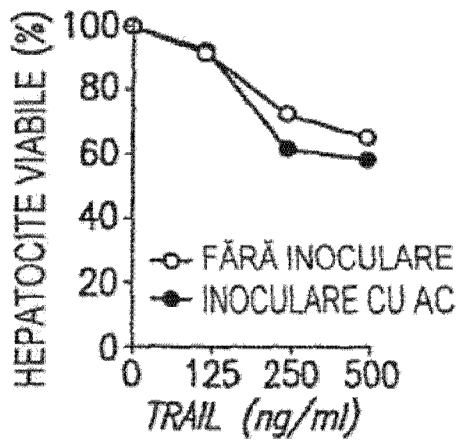


Fig. 13C1

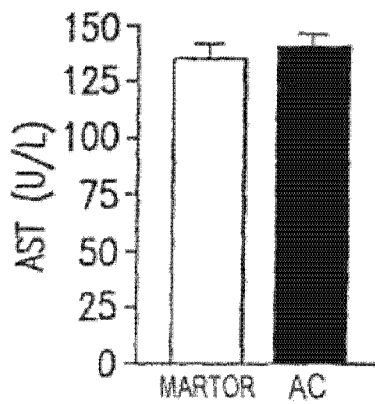


Fig. 13C2

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01);  
 A61K 31/00 (2006.01);  
 A61K 38/00 (2006.01);  
 A61K 39/00 (2006.01);  
 A61P 35/00 (2006.01);  
 C07K 16/00 (2006.01);  
 C12N 1/00 (2006.01)

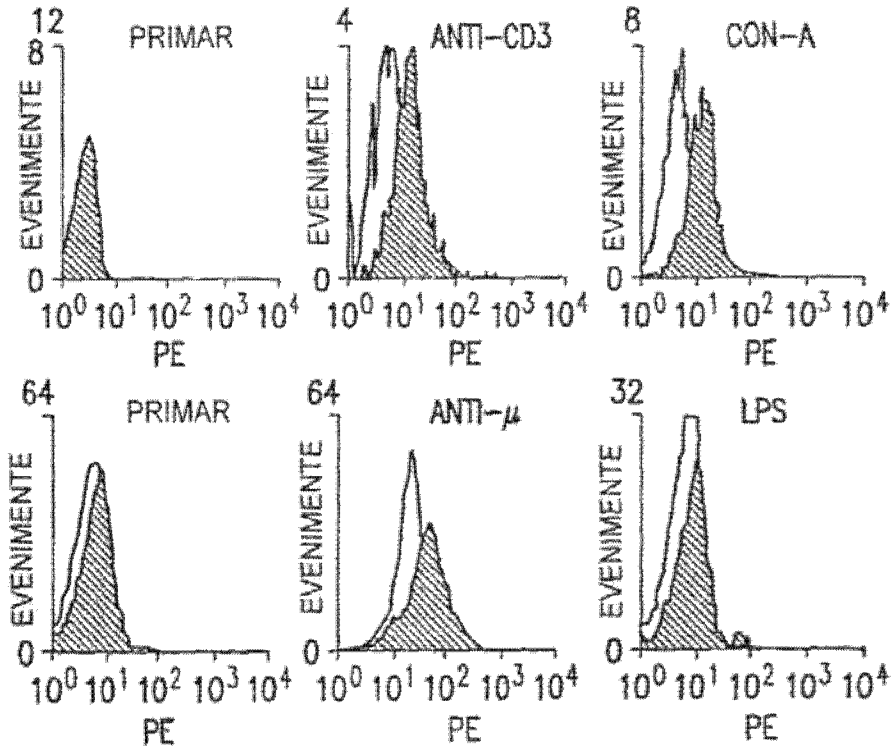


Fig. 14

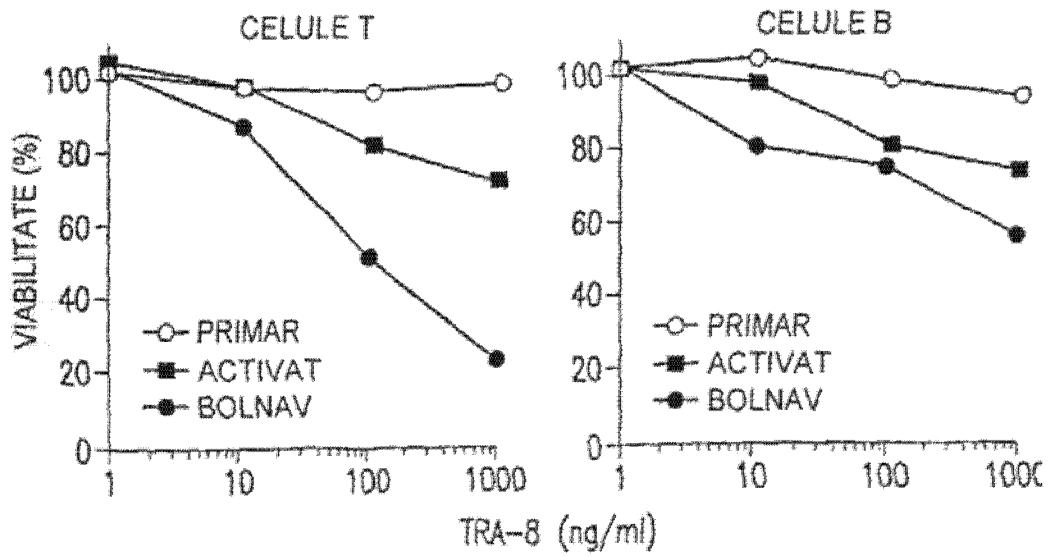


Fig. 15

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01);  
A61K 31/00 (2006.01);  
A61K 38/00 (2006.01);  
A61K 39/00 (2006.01);  
A61P 35/00 (2006.01);  
C07K 16/00 (2006.01);  
C12N 1/00 (2006.01)

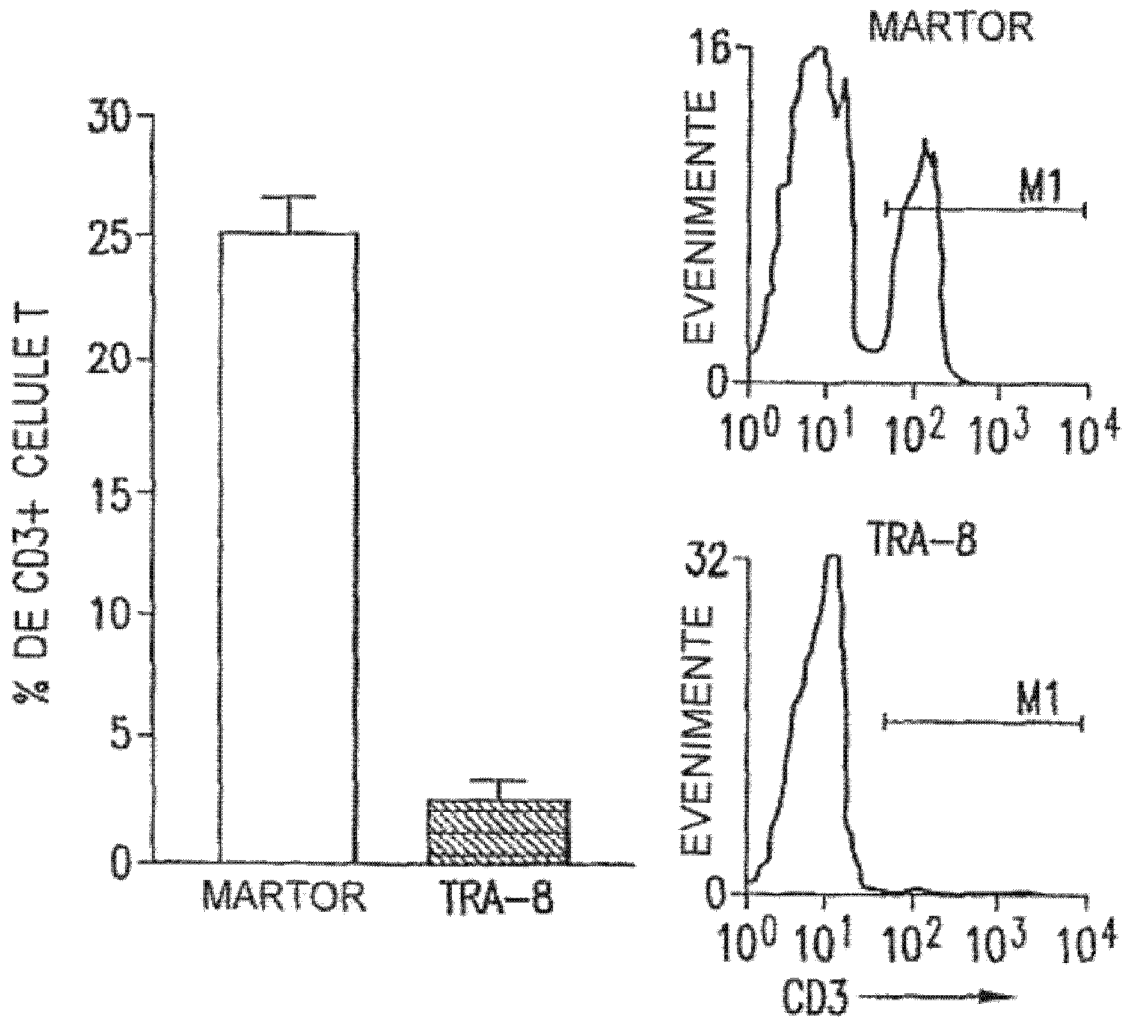


Fig. 16

(51) Int.Cl.

*A61K 39/395* (2006.01),  
*A61K 31/00* (2006.01),  
*A61K 38/00* (2006.01),  
*A61K 39/00* (2006.01),  
*A61P 35/00* (2006.01),  
*C07K 16/00* (2006.01),  
*C12N 1/00* (2006.01)

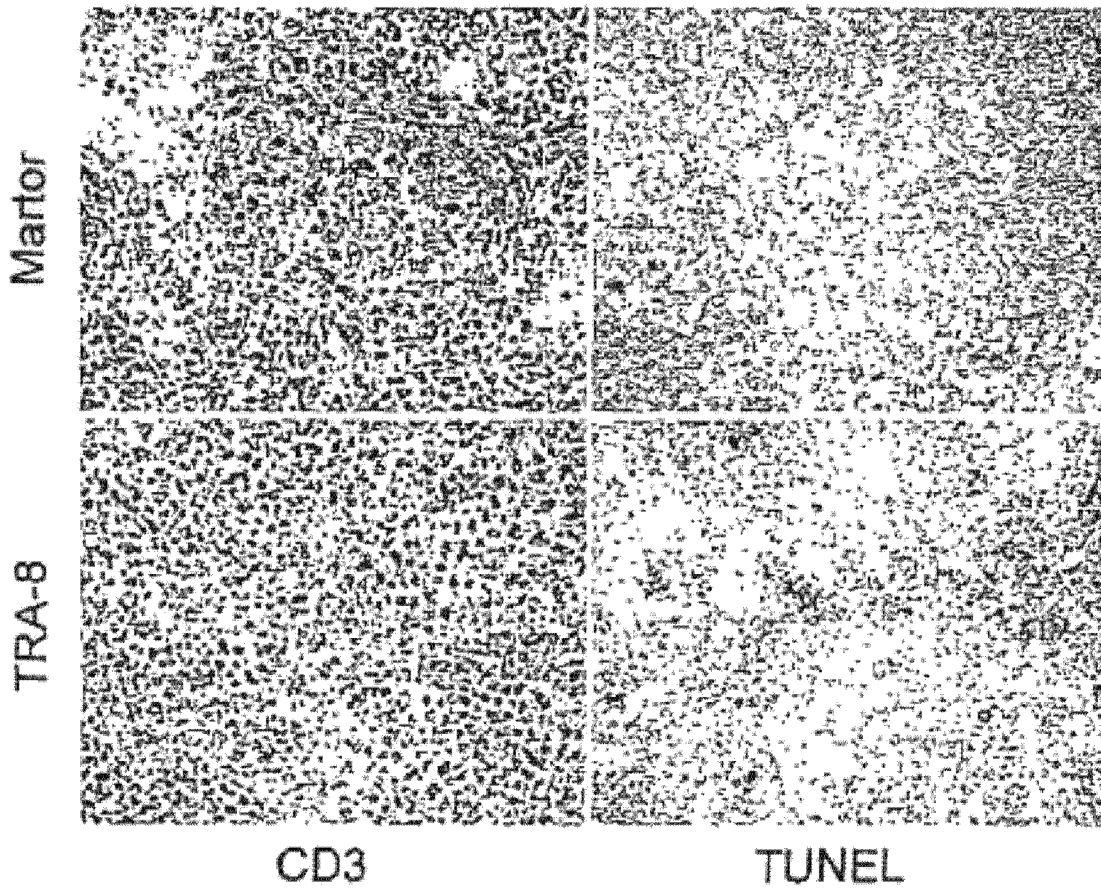


Fig. 17

(51) Int.Cl.

- A61K 39/395 (2006.01);
- A61K 31/00 (2006.01);
- A61K 38/00 (2006.01);
- A61K 39/00 (2006.01);
- A61P 35/00 (2006.01);
- C07K 16/00 (2006.01);
- C12N 1/00 (2006.01)

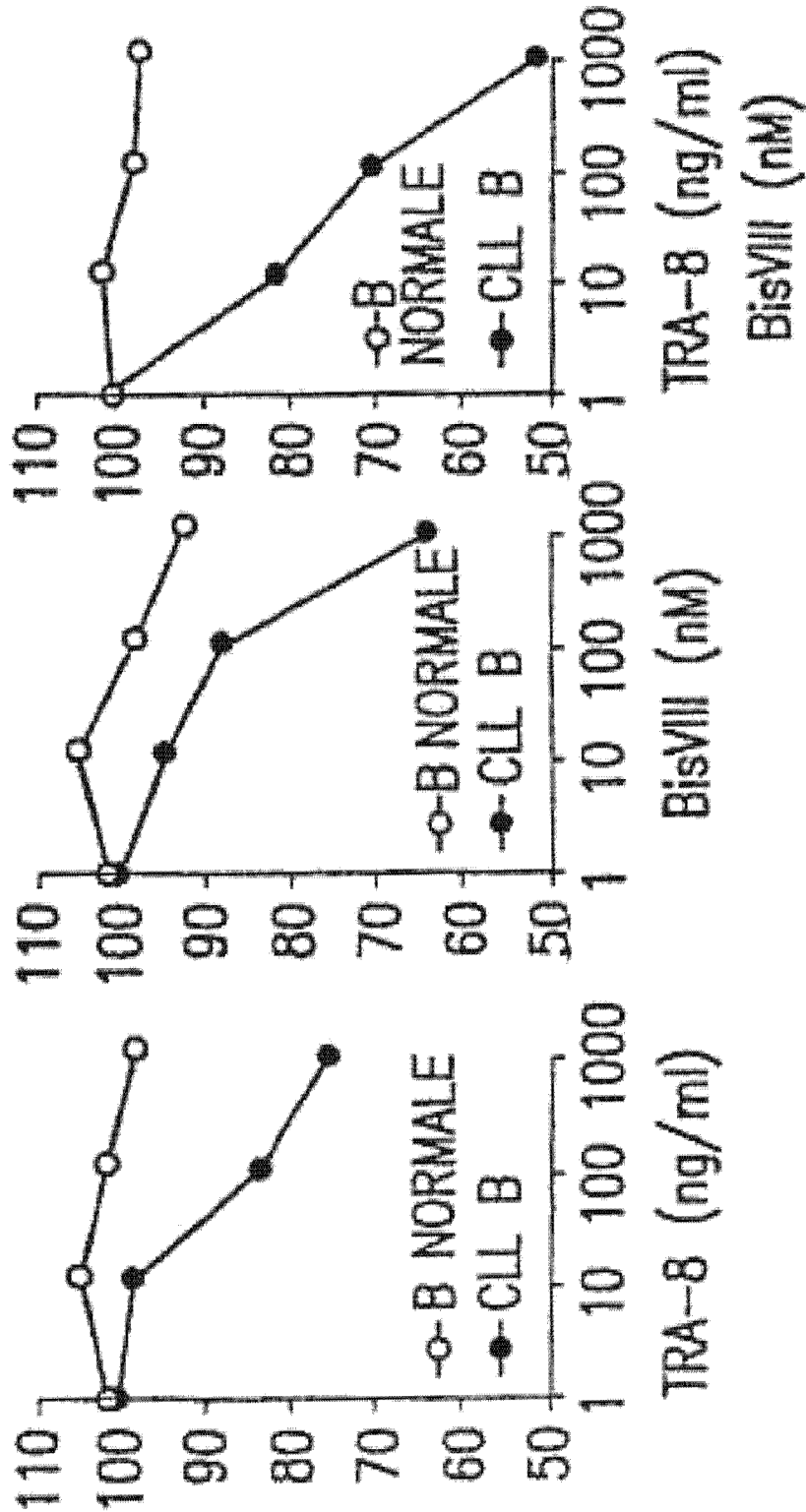


Fig. 18

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01),  
 A61K 31/00 (2006.01),  
 A61K 38/00 (2006.01),  
 A61K 39/00 (2006.01),  
 A61P 35/00 (2006.01),  
 C07K 16/00 (2006.01),  
 C12N 1/00 (2006.01)

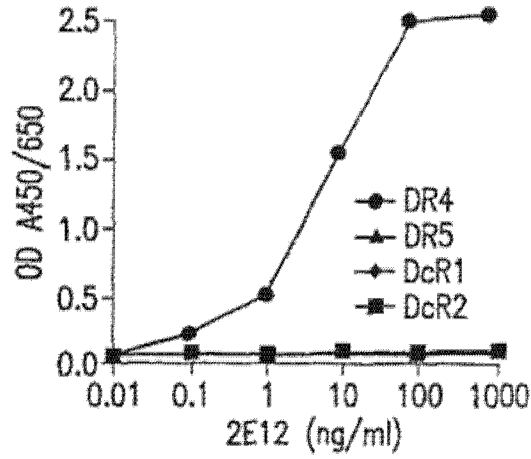


Fig. 19A

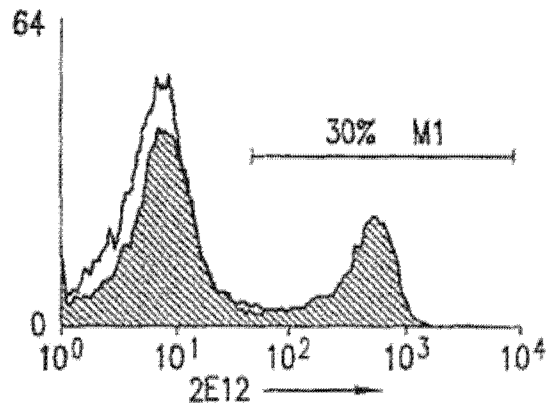


Fig. 19B

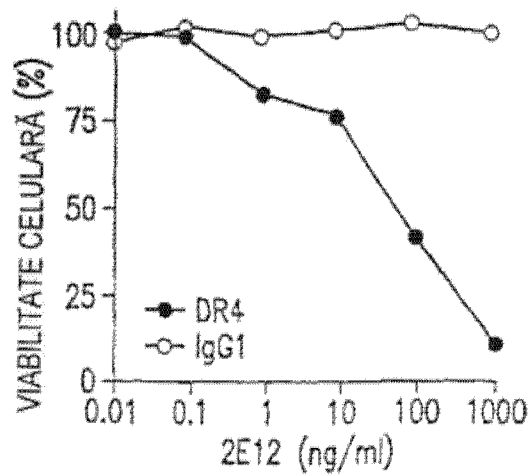


Fig. 19C

(51) Int.Cl.

*A61K 39/395* (2006.01);  
*A61K 31/00* (2006.01);  
*A61K 38/00* (2006.01);  
*A61K 39/00* (2006.01);  
*A61P 35/00* (2006.01);  
*C07K 16/00* (2006.01);  
*C12N 1/00* (2006.01)

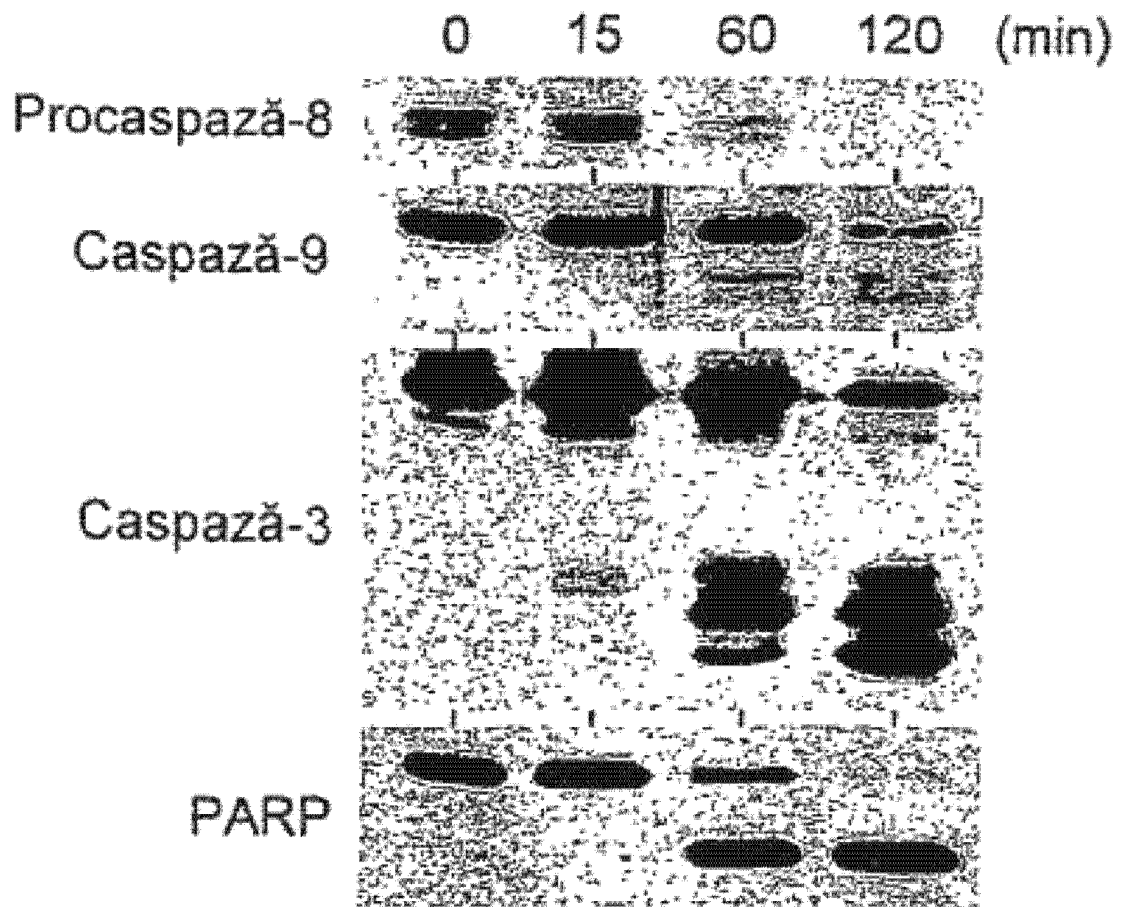


Fig. 19D

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01),  
 A61K 31/00 (2006.01),  
 A61K 38/00 (2006.01),  
 A61K 39/00 (2006.01),  
 A61P 35/00 (2006.01),  
 C07K 16/00 (2006.01),  
 C12N 1/00 (2006.01)

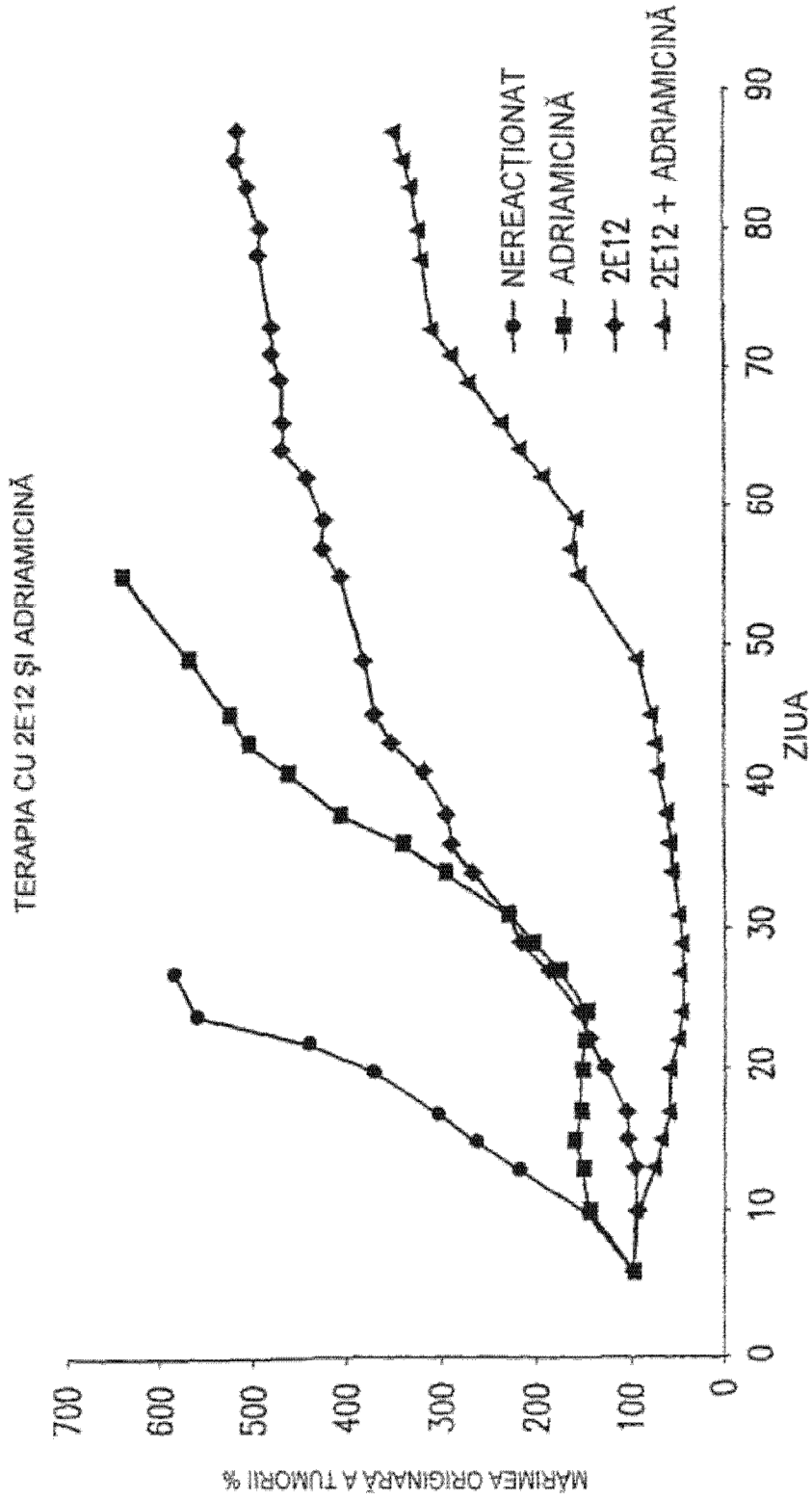


Fig. 20

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01),  
 A61K 31/00 (2006.01),  
 A61K 38/00 (2006.01),  
 A61K 39/00 (2006.01),  
 A61P 35/00 (2006.01),  
 C07K 16/00 (2006.01),  
 C12N 1/00 (2006.01)

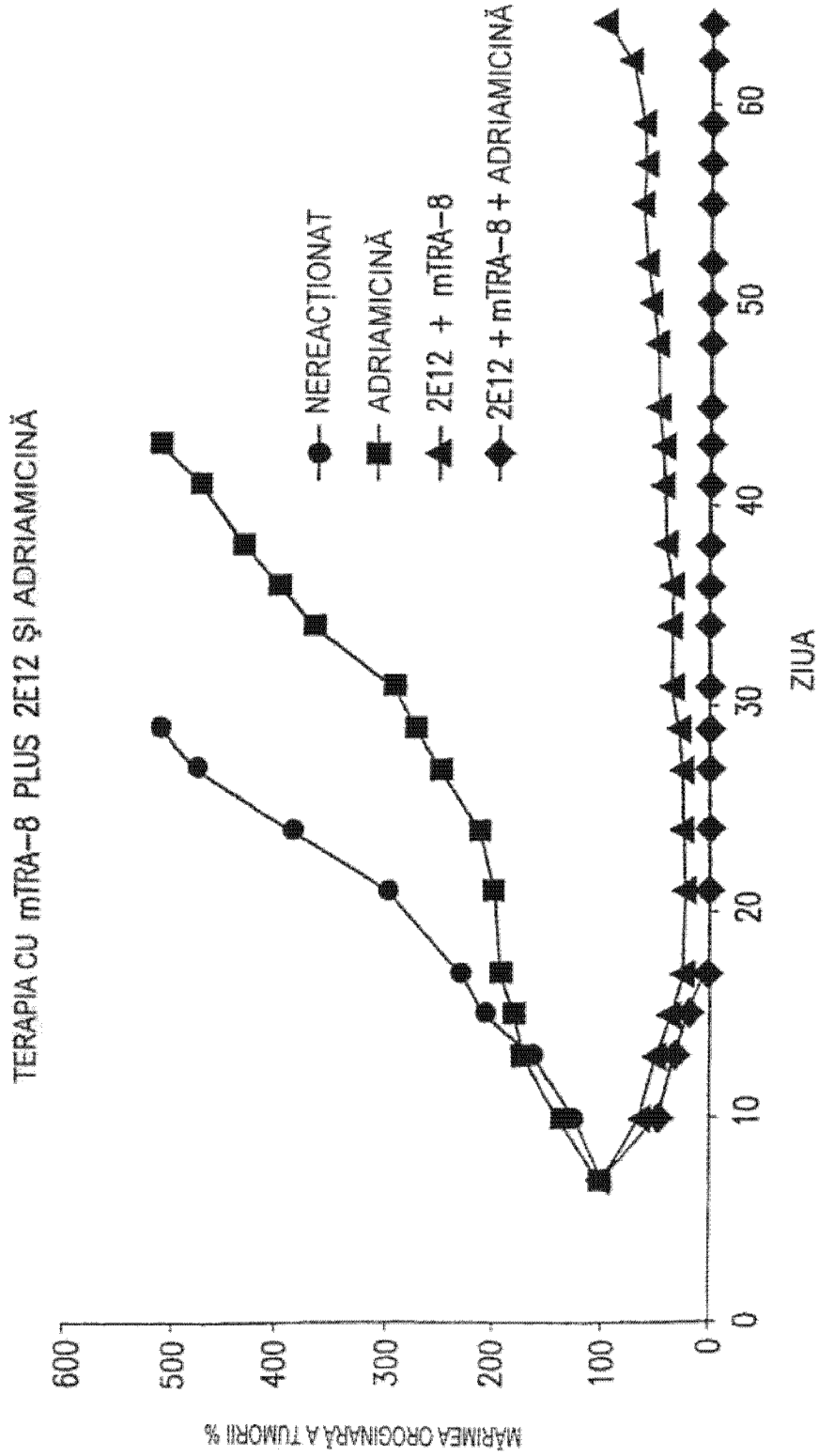


Fig. 21

(51) Int.Cl.

- A61K 39/395 (2006.01),
- A61K 31/00 (2006.01),
- A61K 38/00 (2006.01),
- A61K 39/00 (2006.01),
- A61P 35/00 (2006.01),
- C07K 16/00 (2006.01),
- C12N 1/00 (2006.01)

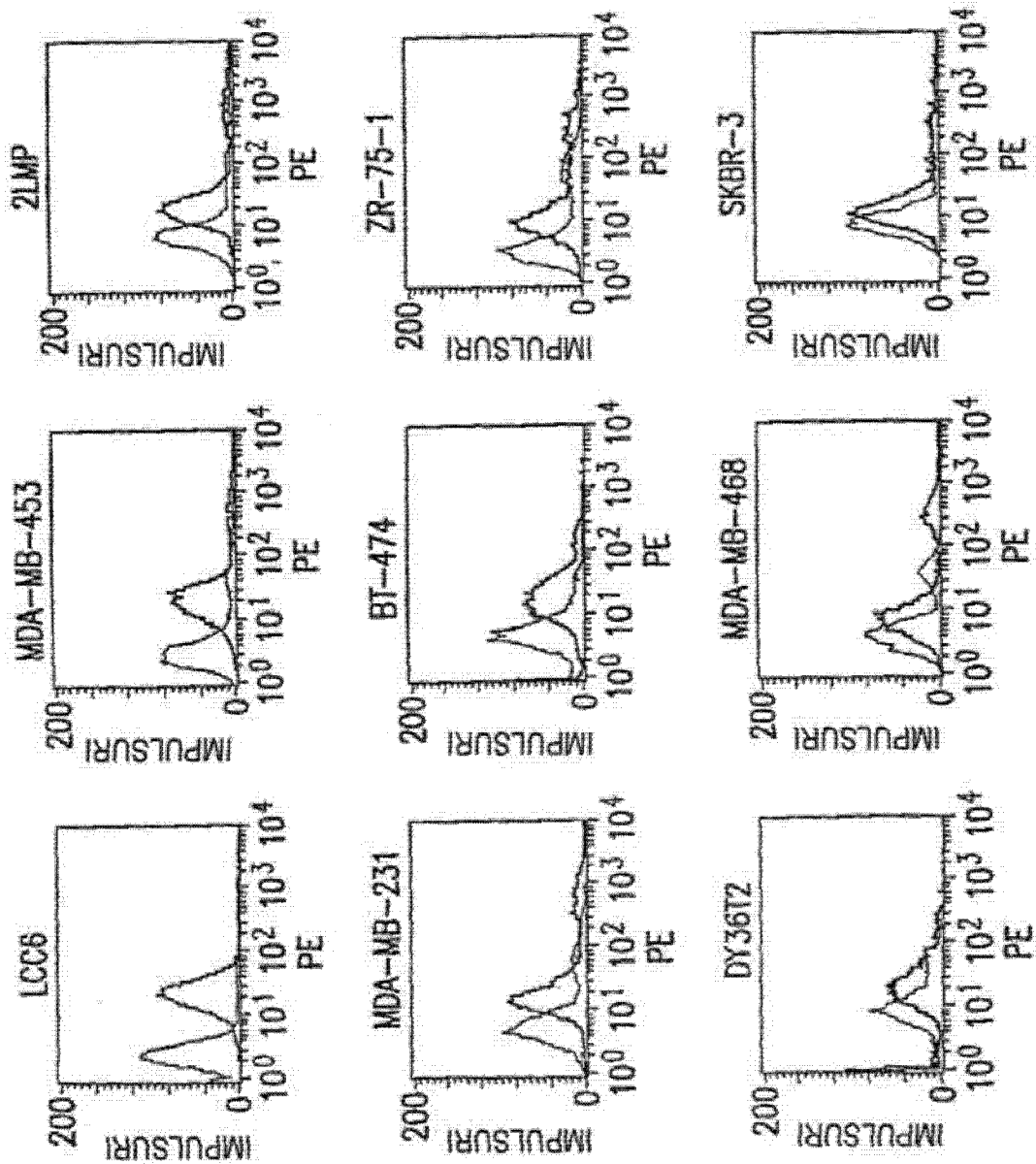


Fig. 22A

(51) Int.Cl.

- A61K 39/395 (2006.01).
- A61K 31/00 (2006.01).
- A61K 38/00 (2006.01).
- A61K 39/00 (2006.01).
- A61P 35/00 (2006.01).
- C07K 16/00 (2006.01).
- C12N 1/00 (2006.01)

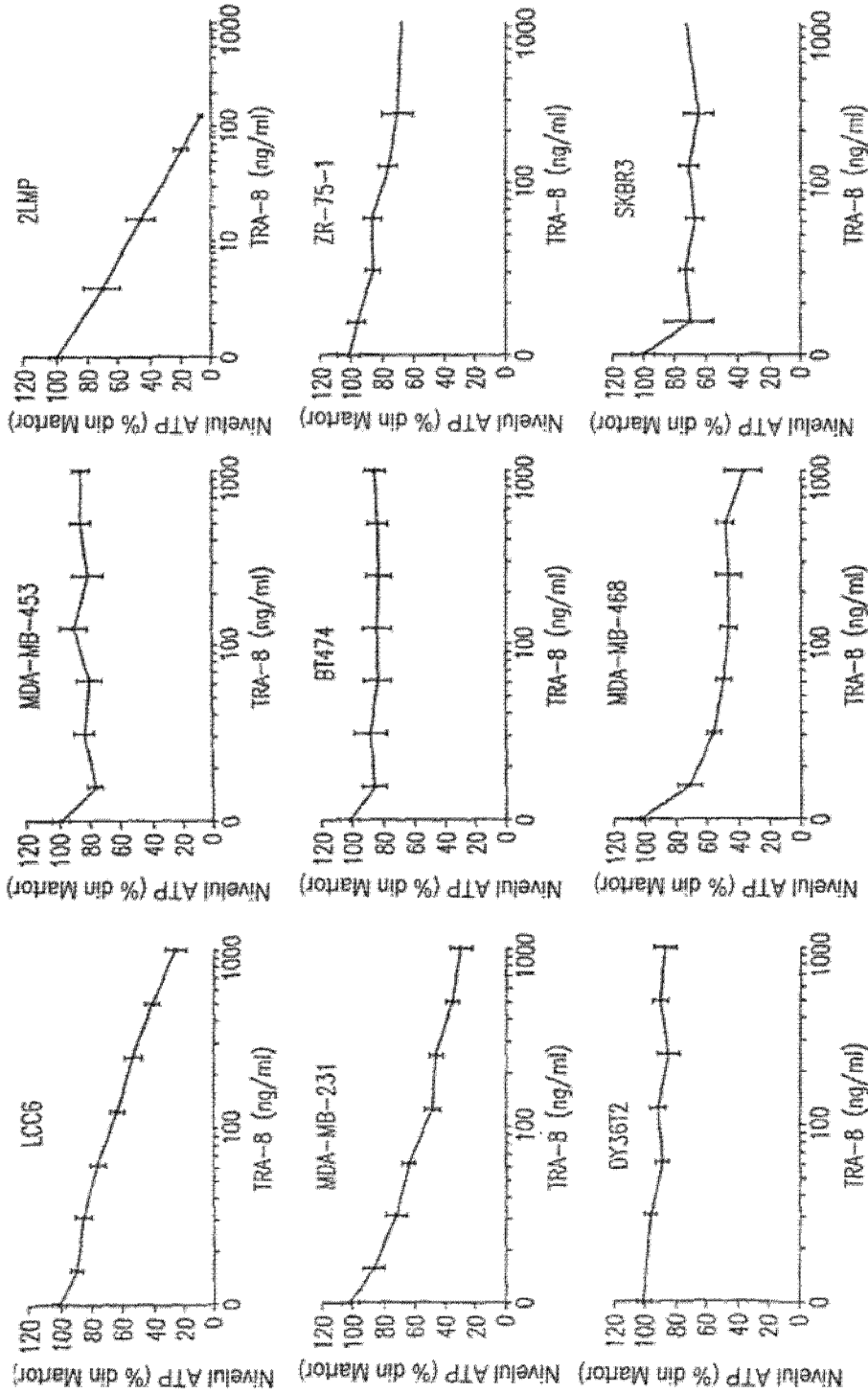


Fig. 22B

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01),  
 A61K 31/00 (2006.01),  
 A61K 38/00 (2006.01),  
 A61K 39/00 (2006.01),  
 A61P 35/00 (2006.01),  
 C07K 16/00 (2006.01),  
 C12N 1/00 (2006.01)

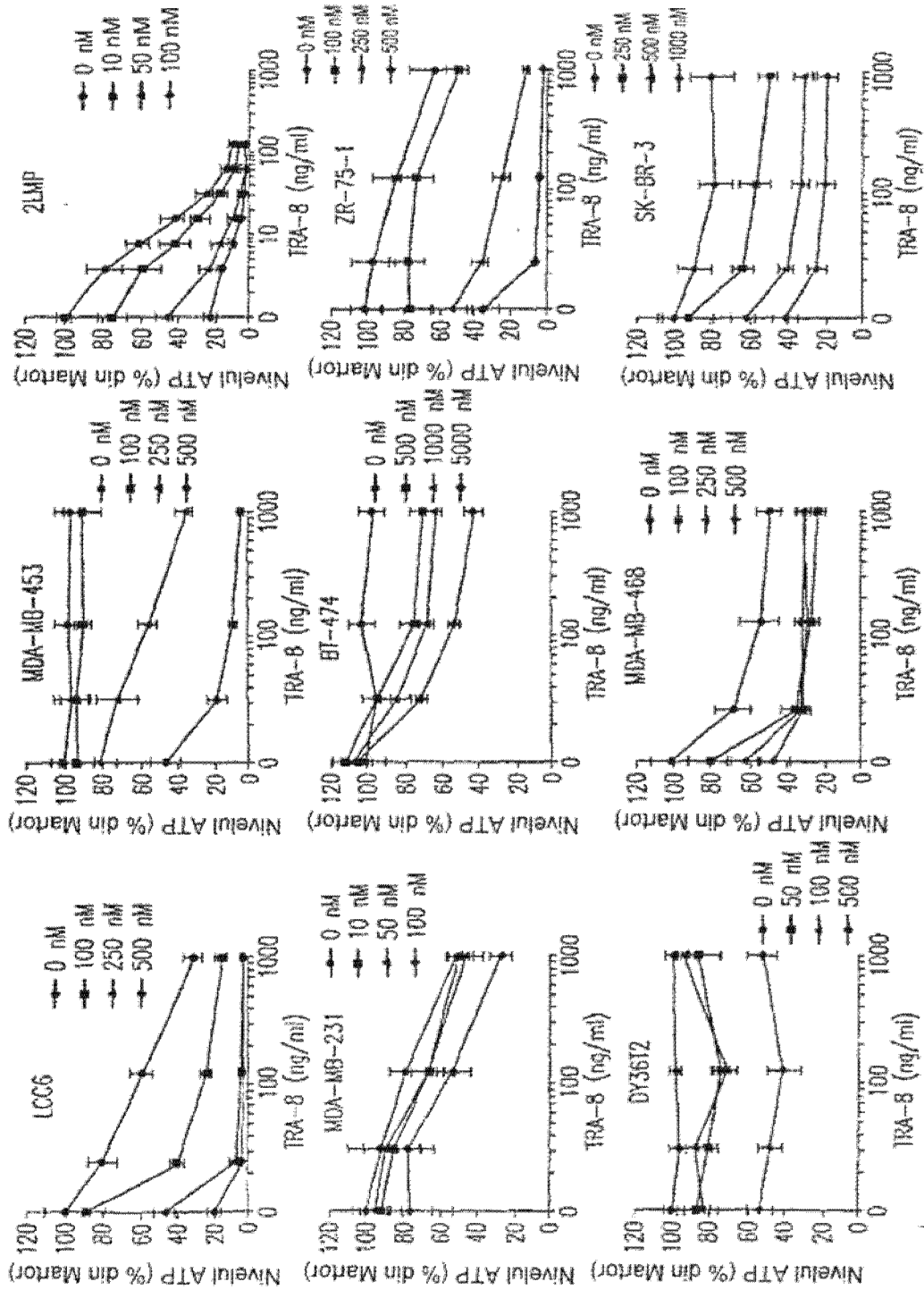


Fig. 23A

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01);  
 A61K 31/00 (2006.01);  
 A61K 38/00 (2006.01);  
 A61K 39/00 (2006.01);  
 A61P 35/00 (2006.01);  
 C07K 16/00 (2006.01);  
 C12N 1/00 (2006.01)

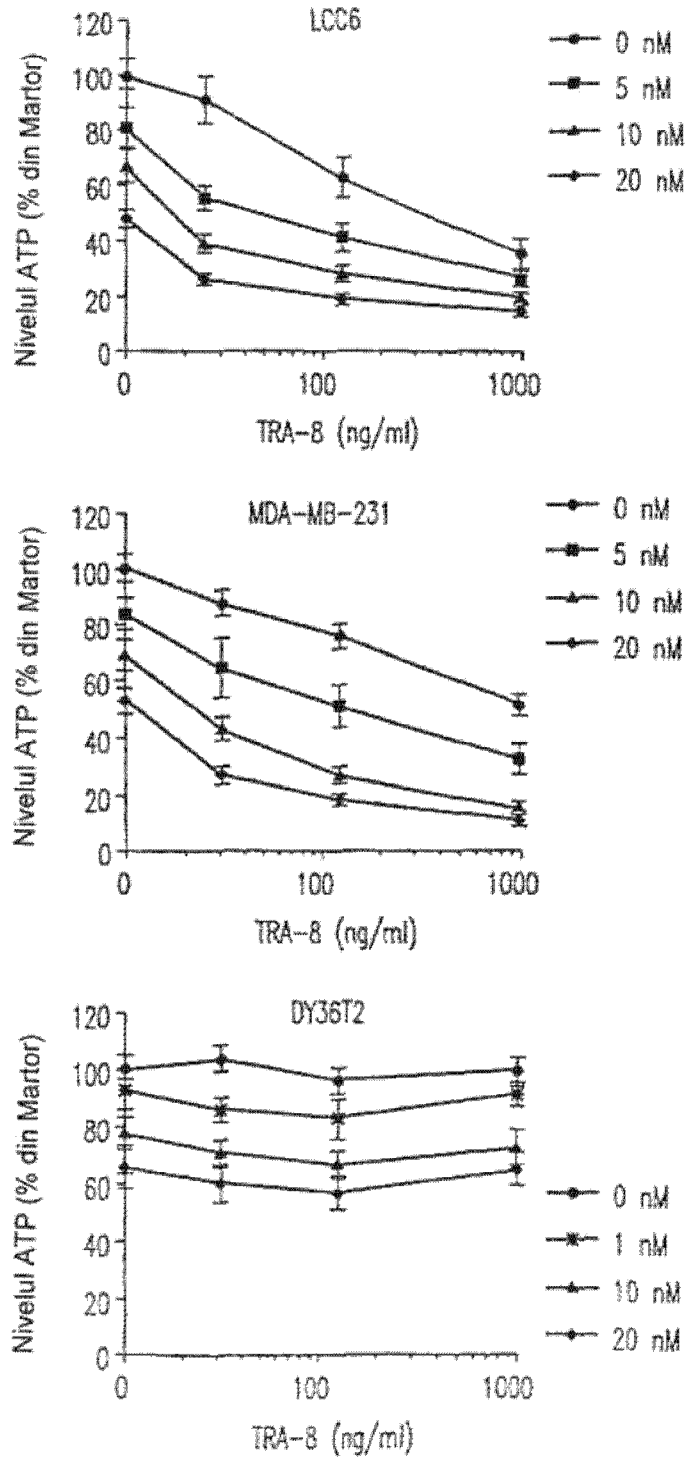


Fig. 23B1

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01),  
 A61K 31/00 (2006.01),  
 A61K 38/00 (2006.01),  
 A61K 39/00 (2006.01),  
 A61P 35/00 (2006.01),  
 C07K 16/00 (2006.01),  
 C12N 1/00 (2006.01)

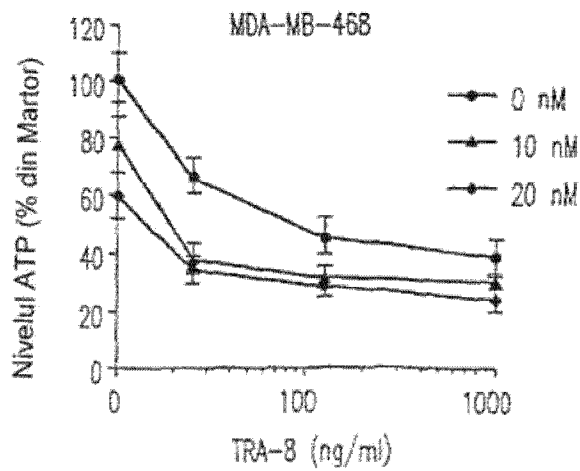
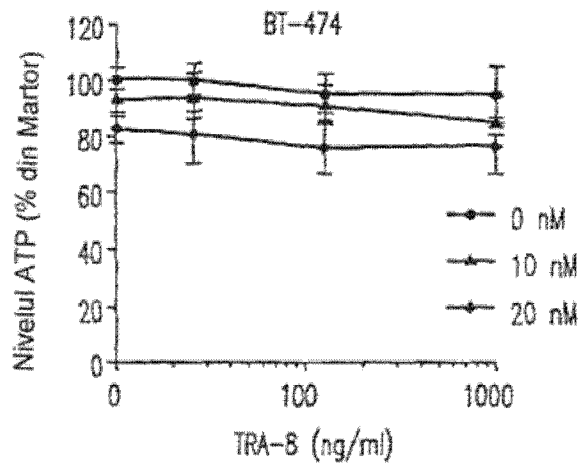
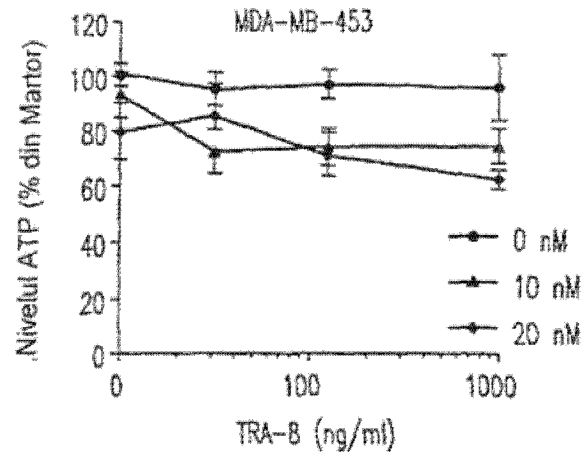


Fig. 23B2

(51) Int.Cl.

**A61K 39/395** (2006.01);  
**A61K 31/00** (2006.01);  
**A61K 38/00** (2006.01);  
**A61K 39/00** (2006.01);  
**A61P 35/00** (2006.01);  
**C07K 16/00** (2006.01);  
**C12N 1/00** (2006.01)

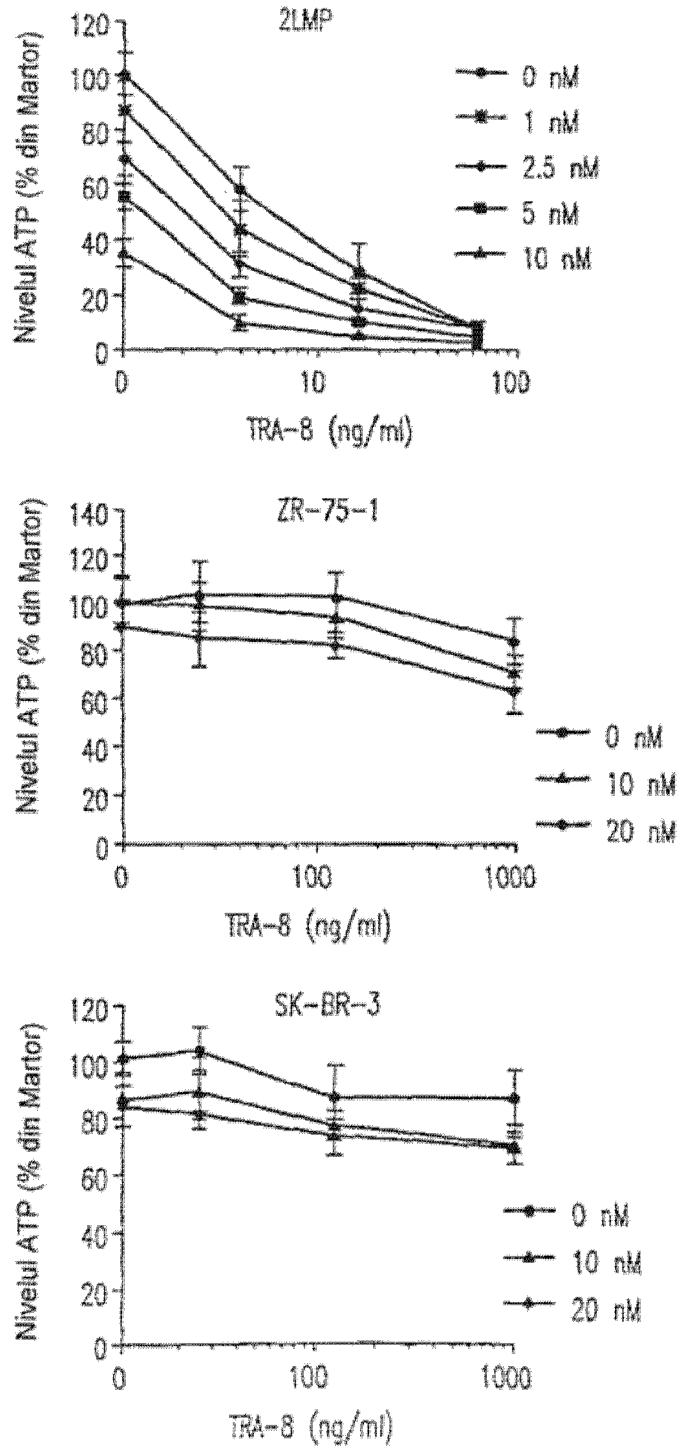


Fig. 23B3

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01),  
 A61K 31/00 (2006.01),  
 A61K 38/00 (2006.01),  
 A61K 39/00 (2006.01),  
 A61P 35/00 (2006.01),  
 C07K 16/00 (2006.01),  
 C12N 1/00 (2006.01)

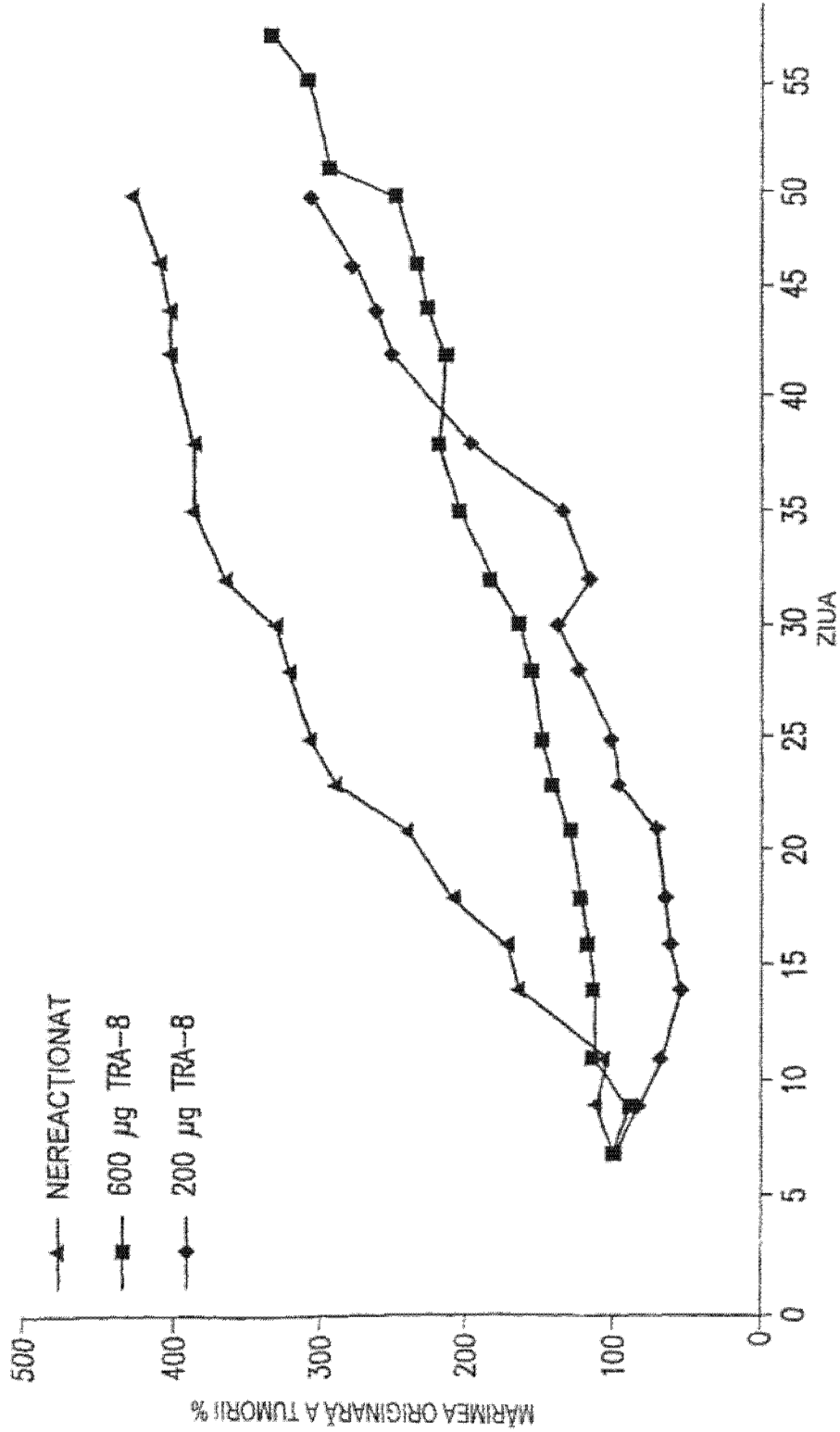


Fig. 24

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01);  
 A61K 31/00 (2006.01);  
 A61K 38/00 (2006.01);  
 A61K 39/00 (2006.01);  
 A61P 35/00 (2006.01);  
 C07K 16/00 (2006.01);  
 C12N 1/00 (2006.01)

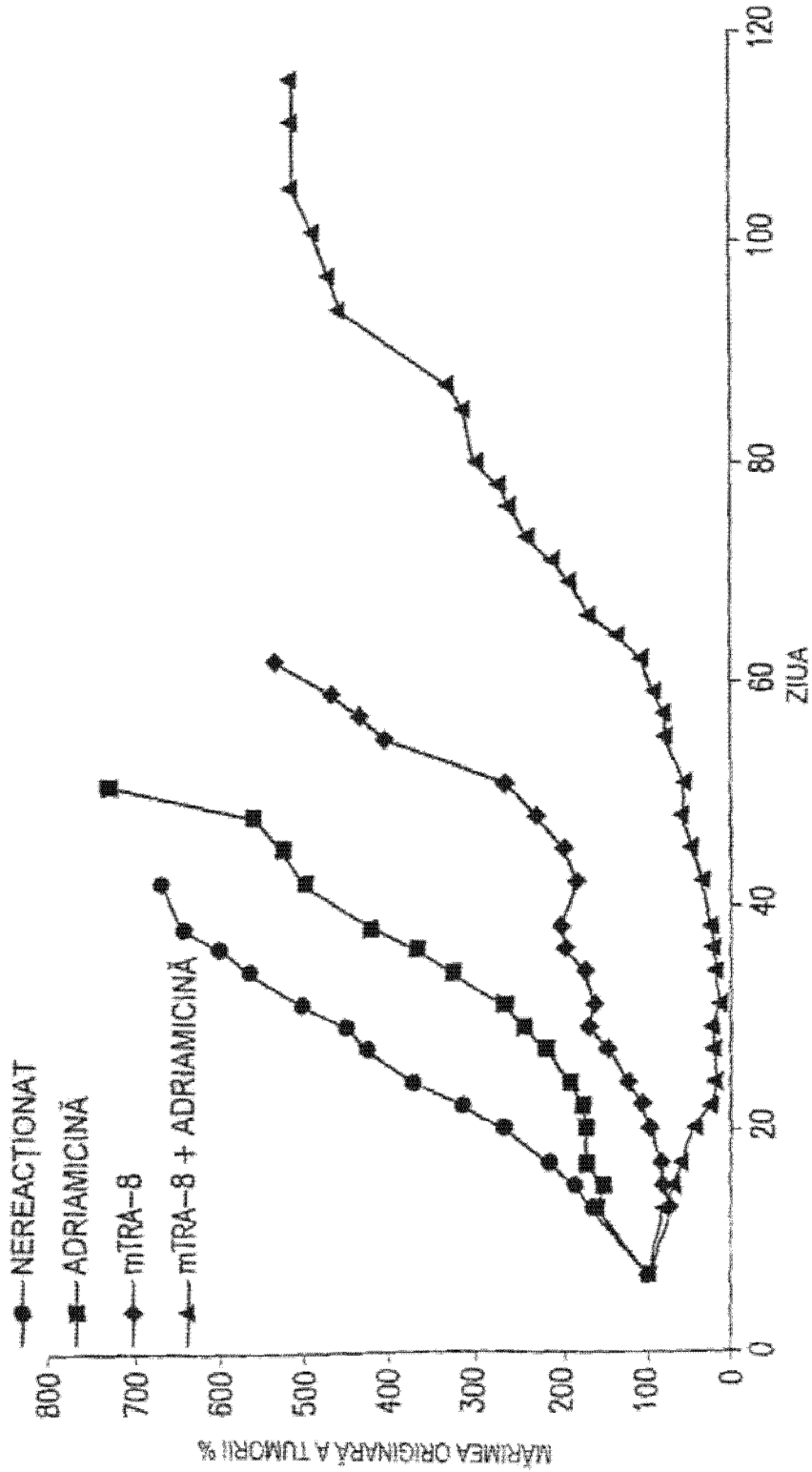


Fig. 25

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01),  
 A61K 31/00 (2006.01),  
 A61K 38/00 (2006.01),  
 A61K 39/00 (2006.01),  
 A61P 35/00 (2006.01),  
 C07K 16/00 (2006.01),  
 C12N 1/00 (2006.01)

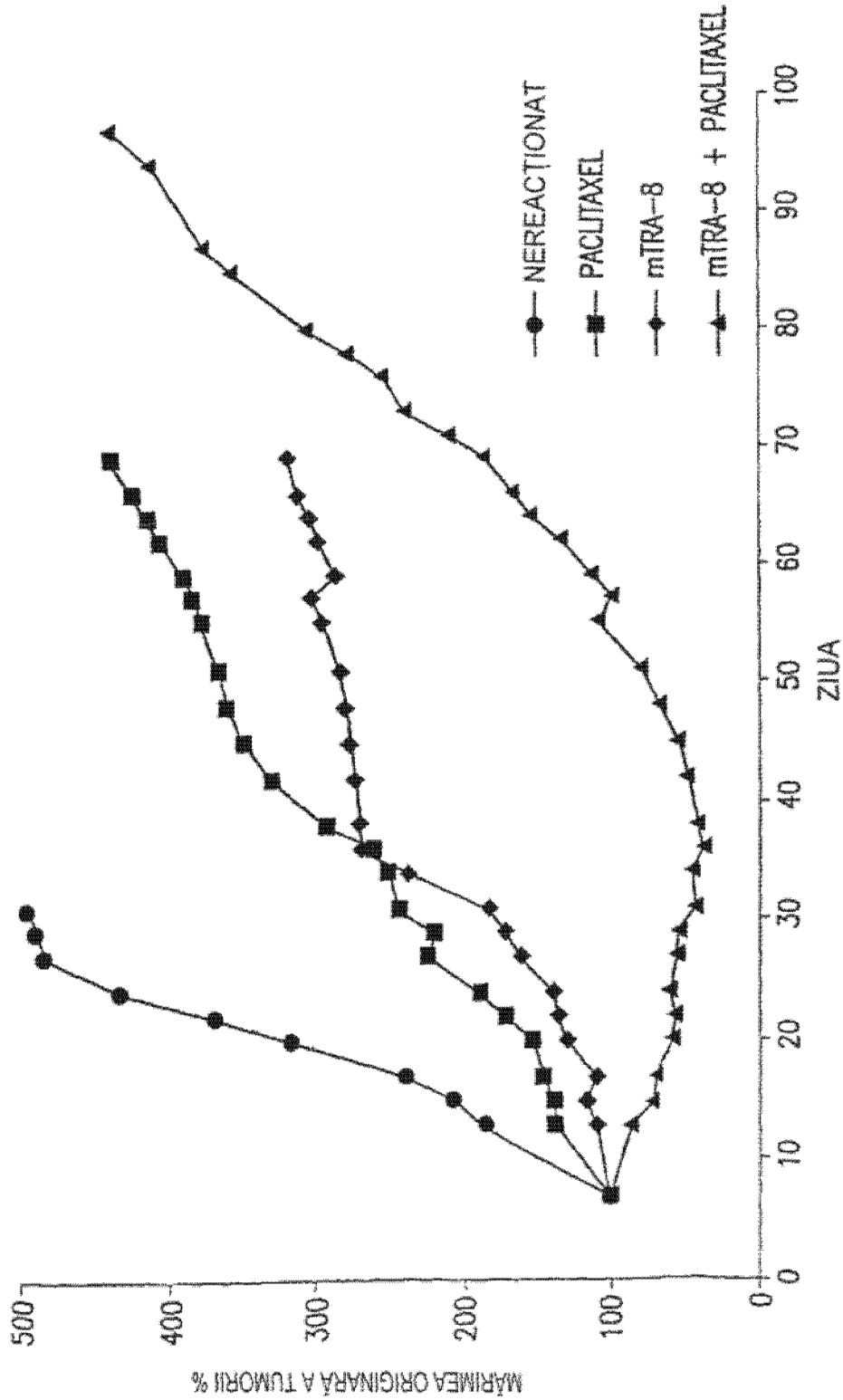


Fig. 26

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01);  
 A61K 31/00 (2006.01);  
 A61K 38/00 (2006.01);  
 A61K 39/00 (2006.01);  
 A61P 35/00 (2006.01);  
 C07K 16/00 (2006.01);  
 C12N 1/00 (2006.01)

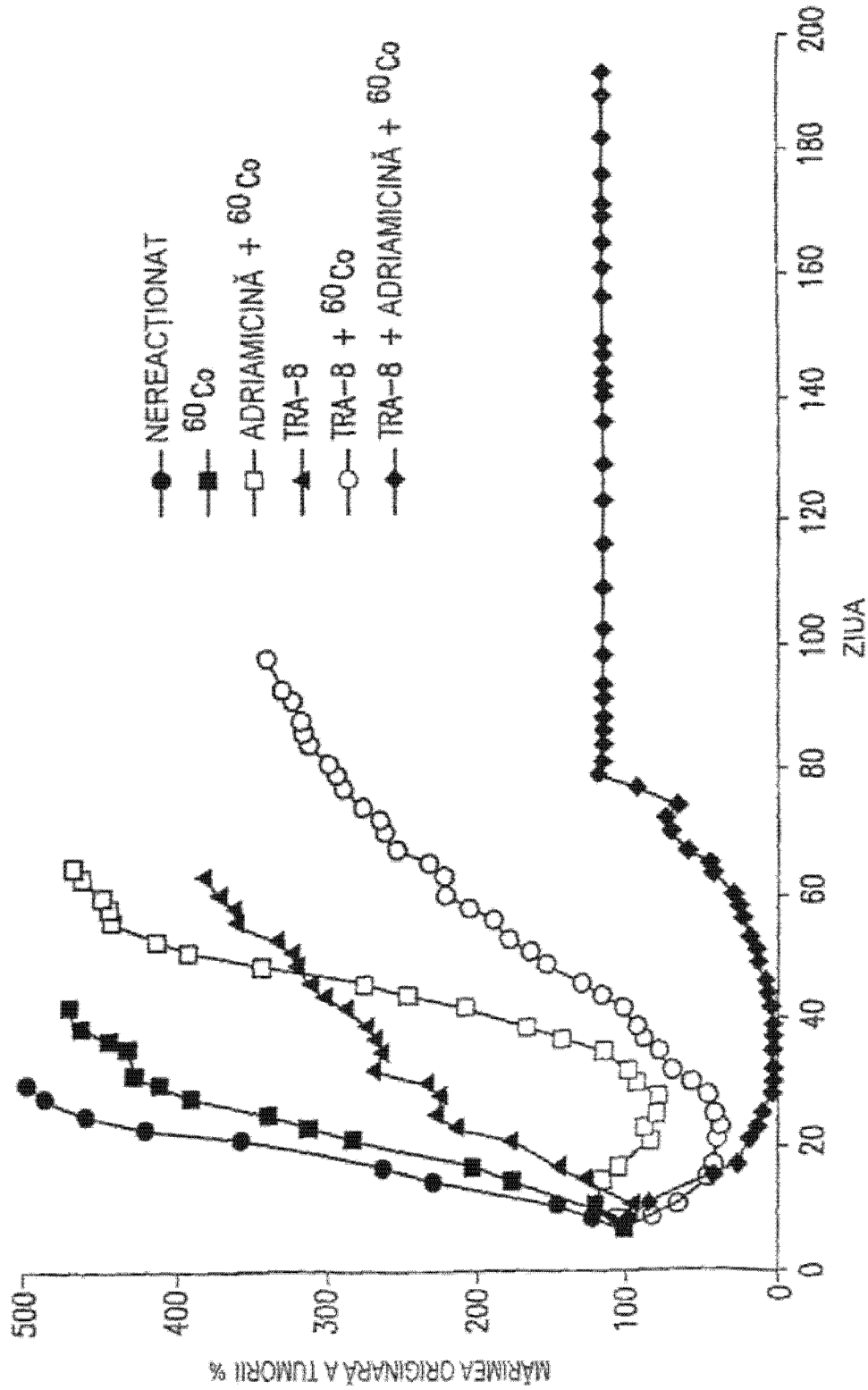


Fig. 27

(51) Int.Cl.

- A61K 39/395 (2006.01),
- A61K 31/00 (2006.01),
- A61K 38/00 (2006.01),
- A61K 39/00 (2006.01),
- A61P 35/00 (2006.01),
- C07K 16/00 (2006.01),
- C12N 1/00 (2006.01)

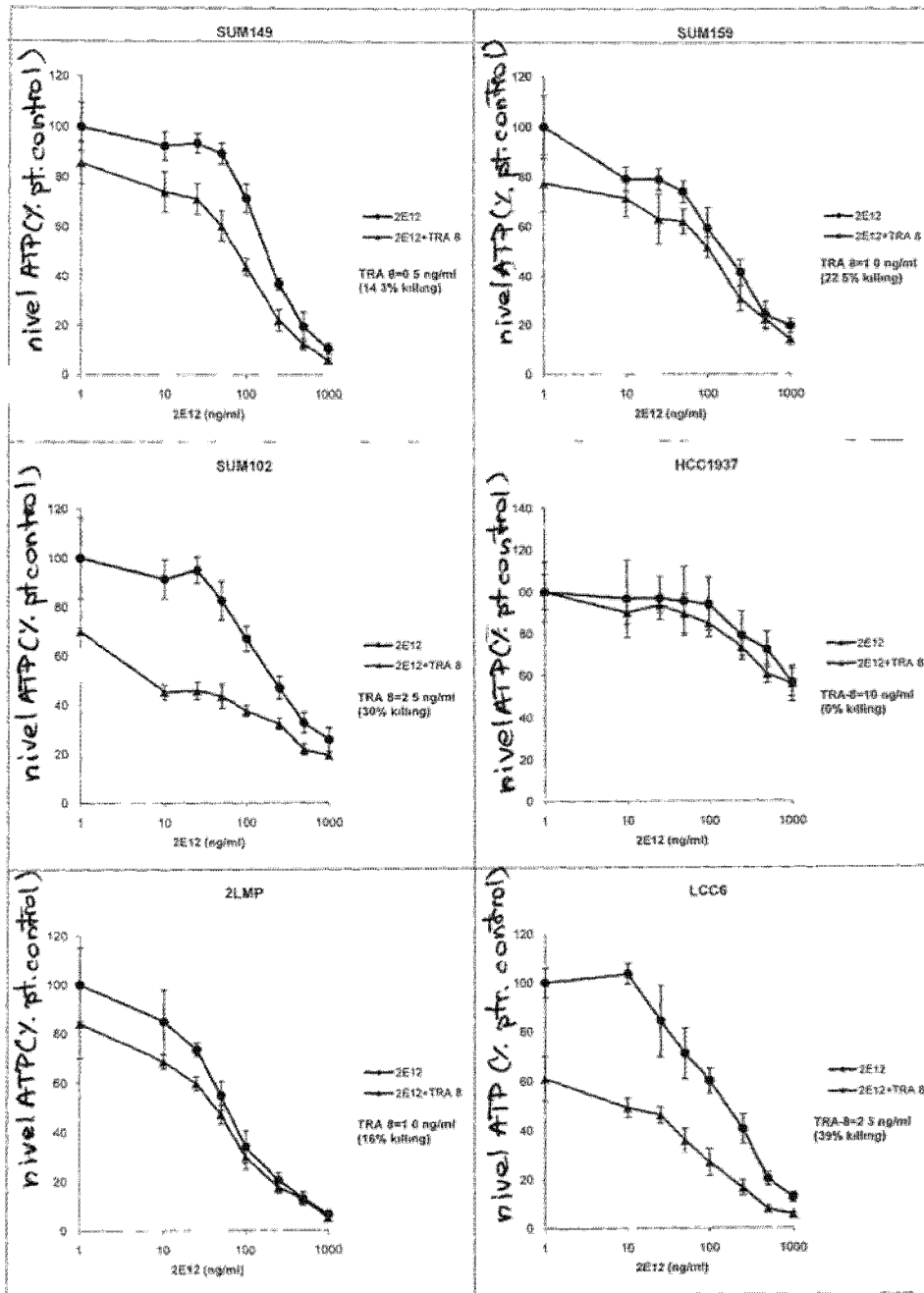


Fig. 28



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
 sub comanda nr. 310/2013