

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(51) Classificação Internacional:

A61K 38/16 (2007.10) **A61K 38/17** (2007.10)
A61K 39/395 (2007.10) **A61K 48/00** (2007.10)
C07H 21/04 (2007.10) **C07K 14/435** (2007.10)
C07K 14/47 (2007.10) **C07K 16/18** (2007.10)
C07K 16/28 (2007.10)

(22) Data de pedido: **1998.08.07**

(30) Prioridade(s): **1997.08.08 US 55060 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.02.09**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.10.08**
009/2009

(73) Titular(es):

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA
12TH FLOOR, 1111 FRANKLIN STREET
OAKLAND, CALIFORNIA 94607-5200

US

(72) Inventor(es):

XIAOZHU HUANG
DEAN SHEPPARD
ROBERT PYTELA

US

US

US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **TRATAMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA COM ANTICORPOS CONTRA INTEGRINA ALFA-V-BETA 6**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO**"Tratamento da fibrose hepática com anticorpos contra integrina alfa-V-beta 6"**

ANTECEDENTES DO INVENTO

As integrinas são receptores de adesão celular heterodiméricos compostos por duas subunidades, α e β . A integrina $\alpha v \beta 6$ é um receptor de fibronectina e tenascina predominantemente expresso por células epiteliais. Em tecidos de primatas adultos saudáveis, o ARNm e a proteína $\beta 6$ raramente são detectados, embora $\beta 6$ seja expressa durante o desenvolvimento fetal, a cicatrização de feridas e nalguns tumores epiteliais. Quando a subunidade $\beta 6$ é expressa numa linha celular de carcinoma do cólon, na qual está normalmente ausente, a expressão da subunidade confere uma capacidade aumentada para proliferar. É necessária uma região de 11 aminoácidos do terminal-COOH, única para a subunidade $\beta 6$, para a actividade intensificadora de proliferação da integrina $\alpha v \beta 6$ (Agrez *et al.*, J. Cell. Biol. 127: 547-556 (1994)). A expressão de $\beta 6$ é induzida em células epiteliais alveolares tipo II durante a lesão causada por injeção de bactérias vivas, sendo a expressão de $\beta 6$ observada em sítios focais de inflamação subclínica, assim como numa variedade de espécimes clínicos de doentes com inflamação crónica ou aguda dos pulmões ou rins (Breuss *et al.*, J. Cell. Sci. 108: 2241-2251 (1995)).

Huang *et al.* (J. Cell. Biol. 133: 921-928 (1996)) descreveram ratinhos homozigóticos para uma mutação nula no gene que codifica a subunidade $\beta 6$, que tinham calvície juvenil associada a infiltração de macrófagos na pele e linfócitos activados acumulados à volta das vias aéreas de condução nos pulmões.

A fibrose pulmonar é uma desordem comum que se pensa ser devida aos efeitos destrutivos de produtos libertados a partir de leucócitos (ver, por exemplo, Marshall *et al.*, Int. J. Biochem. Cell. Bio. 29: 107-120 (1997)). A lesão dos pulmões e a fibrose pulmonar induzidas por bleomicina estão associadas a, e podem depender do, recrutamento e activação de linfócitos

(Scherier, D. J. *et al.*, Am. J. Pathol. 116: 270-278 (1984)). Entre as terapêuticas propostas para lesão do parênquima pulmonar e fibrose pulmonar encontra-se a utilização de abordagens terapêuticas "anti-citoquinas" (Coker *et al.*, Thorax 52 (2): 294-296 (1997)).

No entanto, as terapêuticas actuais para lesão pulmonar aguda e fibrose pulmonar são amplamente inadequadas (ver, por exemplo, King *et al.*, "Isiopathic Pulmonary Fibrosis and Other Interstitial Lung Diseases of Unknown Etiology" em Textbook of Respiratory Medicine, Murray e Nadel, eds., W.B. Saunders, Philadelphia PA, pg. 1827-1839 (1994)). Griffiths *et al.*, Molecular Biology of the Cell, Bethesda, MD, US, vol. 7, 1996, página 166A descrevem que a inactivação do gene da subunidade $\beta 6$ de integrina protege contra a fibrose pulmonar induzida por bleomicina. Existe uma necessidade de terapêuticas para fibrose. Esta necessidade é visada pelo presente invento.

SUMÁRIO DO INVENTO

Um aspecto do invento é a utilização de um anticorpo que se liga especificamente à integrina $\alpha\beta 6$ e bloqueia a ligação de um ligando à integrina $\alpha\beta 6$, para o fabrico de um medicamento para tratamento de fibrose hepática num doente.

É revelado um anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma ATCC HB12382.

É também revelado o hibridoma ATCC HB12382.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1A é um gráfico que compara o teor de hidroxiprolina nos pulmões de ratinhos que expressam uma mutação nula do gene da subunidade $\beta 6$ da integrina com ratinhos de controlo, na presença de bleomicina (blm) ou solução salina (sal).

A Figura 1B é uma fotografia da coloração tricromática de secções de pulmão de baixa potência que demonstra acumulação densa de matriz extracelular colagenosa nos pulmões de

ratinhos de tipo selvagem ($\beta 6+/+$) mas não nos ratinhos $\beta 6-/-$, tratados com bleomicina, 30 dias após o tratamento.

A Figura 2 é um gráfico que compara o aumento da água dos pulmões em ratinhos de tipo selvagem ($\beta 6+/+$) comparado com ratinhos $\beta 6-/-$, na presença de bleomicina (blm) ou solução salina (sal).

A Figura 3 é um gráfico que compara o recrutamento de linfócitos em ratinhos de tipo selvagem ($\beta 6+/+$) e ratinhos $\beta 6-/-$ após administração de bleomicina (blm) ou solução salina (sal).

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

O presente invento proporciona a utilização de um anticorpo que se liga especificamente a integrina $\alpha v\beta 6$ e bloqueia a ligação de um ligando a integrina $\alpha v\beta 6$, para o fabrico de um medicamento para tratamento de fibrose hepática.

Estes anticorpos podem ser proporcionados profiláctica ou terapêuticamente a doentes com, ou em risco de ter, sintomas de fibrose. Tipicamente, os anticorpos são administrados numa base diária durante pelo menos um período de 1-5 dias. Tal como aqui se utiliza, uma "dose terapêutica" é uma dose que previne, alivia, elimina ou reduz de outro modo a gravidade dos sintomas num doente.

São revelados anticorpos que se ligam especificamente a $\alpha v\beta 6$.

Os anticorpos podem ser sintéticos, monoclonais ou policlonais, e podem ser preparados por técnicas bem conhecidas na especialidade. Numa concretização preferida, o anticorpo reconhece especificamente região citoplasmática da subunidade $\beta 6$ (por exemplo, veja-se Weinacker *et al.* J. Biol. Chem. 269: 6940-6948 (1994)). Para aplicações terapêuticas, os anticorpos monoclonais "humanos" possuindo regiões constantes e variáveis humanas, são frequentemente preferidos de modo a minimizar a resposta imunitária de um doente contra o anticorpo. Estes anticorpos podem ser gerados através da imunização de animais transgênicos que contêm genes de

imunoglobulinas humanas. Veja-se Jakobovits *et al.*, Ann. NY Acad. Sci. 764: 525-535 (1995). Relativamente aos anticorpos sintéticos e semi-sintéticos, estes termos destinam-se a cobrir, mas sem limitação, fragmentos de anticorpos, anticorpos de isotipo trocado, anticorpos humanizados (e.g., ratinho-humano, humano-ratinho e semelhantes), híbridos, anticorpos com múltiplas especificidades, moléculas sintéticas semelhantes a anticorpo, e semelhantes

Como discutido abaixo, os anticorpos podem ser rastreados quanto à capacidade para bloquear a ligação de um ligando a $\alpha\beta6$ e/ou quanto a outras propriedades, tais como a capacidade para proteger *in vivo* contra a fibrose pulmonar induzida por bleomicina. Um anticorpo monoclonal anti- $\beta6$ exemplificativo é o 10D5 (depósito no ATCC n.º HB12382, depositado a 6 de Agosto de 1997).

Os anticorpos candidatos contra $\alpha\beta6$ podem ser rastreados quanto à sua função através de uma variedade de técnicas conhecidas na arte e/ou descritas no presente pedido, tais como protecção contra fibrose induzida por bleomicina num modelo de ratinho; inibição da proliferação de células tumorais (Agrez *et al.*, J. Cell Bio., 127: 547-556 (1994)); e inibição da migração celular e/ou inibição da adesão celular (ver secção de Exemplos Experimentais).

Pode-se encontrar uma pluralidade de formulações adequadas dos anticorpos no formulário conhecido de todos os químicos farmacêuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences (15ª Edição, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1975)), particularmente no seu Capítulo 87, de Blaug, Seymour. Estas formulações incluem por exemplo, pós, pastas, pomadas, géis, ceras, óleos, lípidos, bases de absorção anidras, emulsões óleo-em-água ou água-em-óleo, emulsões de Carbowax (polietilenoglicóis de vários pesos moleculares), géis semi-sólidos e misturas semi-sólidas contendo Carbowax.

As quantidades do ingrediente activo necessárias para uma terapêutica eficaz vão depender de muitos factores diferentes, incluindo o meio de administração, o local alvo, o estado fisiológico do doente e outros medicamentos administrados. Assim, as doses de tratamento devem ser tituladas para

optimizar a segurança e a eficácia. As doses tipicamente utilizadas *in vitro* podem proporcionar um guia útil das quantidades úteis para administração *in situ* dos ingredientes activos. O teste em animais de doses eficazes para tratamento de desordens particulares vai proporcionar mais indicação para previsão da dose humana. São descritas várias considerações, por exemplo, em Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7^a Edição (1985), MacMillan Publishing Company New York e Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Edição (1990) Mack Publishing Co., Easton Penn. Os métodos para administração são aqui discutidos, incluindo administração oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, transdérmica, nasal, iontoforética e semelhantes.

As composições do invento podem ser administradas numa variedade de formas de dose unitária dependendo do método de administração. Por exemplo, as formas de dose unitária adequadas para administração oral incluem formas de administração sólidas tais como pós, comprimidos, pílulas, cápsulas e drageias e formas de administração líquidas, tais como elixires, xaropes e suspensões. Os ingredientes activos podem também ser parentericamente administrados em formas de administração líquidas estéreis. As cápsulas de gelatina contêm o ingrediente activo e como ingredientes inactivos veículos em pó, tais como glucose, lactose, sacarose, manitol, amido, celulose ou derivados da celulose, estearato de magnésio, ácido esteárico, sacarina sódica, talco, carbonato de magnésio e semelhantes. Exemplos de ingredientes inactivos adicionais que podem ser adicionados para proporcionar cor, sabor, estabilidade, capacidade de tamponamento, dispersão, desejáveis, ou outras características desejáveis conhecidas são o óxido de ferro vermelho, sílica gel, laurilsulfato de sódio, dióxido de titânio, tinta branca comestível e semelhantes. Podem ser utilizados diluentes similares para preparar comprimidos prensados. Os comprimidos e cápsulas podem ser produzidos na forma de produtos de libertação sustentada para proporcionar a libertação contínua do medicamento durante um período de horas. Os comprimidos prensados podem ser revestidos com açúcar ou revestidos com película para mascarar qualquer sabor desagradável e proteger o comprimido da atmosfera, ou revestidos entericamente para

desintegração selectiva no tracto gastrointestinal. As formas de administração líquidas para administração oral podem conter corantes e aromatizantes para aumentar a aceitação do doente.

A concentração das composições do invento nas formulações farmacêuticas pode variar amplamente, i.e., de menos de cerca de 0,1%, normalmente de ou pelo menos cerca de 2%, até tanto quanto 20% a 50% ou mais em peso, e vai ser seleccionada principalmente em relação aos volumes de fluido, viscosidades, etc., de acordo com o modo de administração particular seleccionado.

As composições do invento podem também ser administradas através de lipossomas. Os lipossomas incluem, emulsões, espumas, micelas, monocamadas insolúveis, cristais líquidos, dispersões de fosfolípidos, camadas lamelares e semelhantes. Nestas preparações, a composição do invento a administrar é incorporada como parte de um lipossoma, isolada ou em conjunto com uma molécula que se liga a um alvo desejado, tal como um anticorpo ou com outras composições terapêuticas ou imunogénicas. Assim, os lipossomas cheios ou decorados com uma composição desejada do invento podem ser sistemicamente distribuídos ou podem ser direccionados para um tecido de interesse, onde os lipossomas entregam então as composições peptídicas terapêuticas/imunogénicas, seleccionadas.

Os lipossomas para utilização no invento são formados a partir de lípidos padrão formadores de vesículas, que incluem, geralmente, fosfolípidos neutros e negativamente carregados e um esterol, tal como colesterol. A selecção dos lípidos é geralmente guiada por consideração, por exemplo, da dimensão do lipossoma, da instabilidade em ácidos e da estabilidade dos lipossomas na corrente sanguínea. Está disponível uma variedade de métodos para preparação de lipossomas, como descrito em, por exemplo, Szoka *et al.*, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980), Patentes U.S. Nos. 4235871, 4501728, 4837028 e 5019369.

Uma suspensão de lipossomas contendo uma composição do invento pode ser administrada por via intravenosa, local, cutânea, etc., numa dose que varia de acordo com, *inter alia*,

a forma de administração, a composição do invento a administrar e a fase da doença a tratar.

Para composições sólidas, podem ser utilizados veículos sólidos não tóxicos convencionais que incluem, por exemplo, qualidades farmacêuticas de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, talco, celulose, glucose, sacarose, carbonato de magnésio e semelhantes. Para administração oral, forma-se uma composição não tóxica farmacologicamente aceitável por incorporação de qualquer um dos excipientes normalmente utilizados, tais como os veículos previamente indicados e, em geral, 10-95% de ingrediente activo, isto é, uma ou mais composições do invento e mais preferivelmente numa concentração de 25%-75%.

Para administração em aerossol, as composições do invento são fornecidas, de preferência, na forma finamente dividida juntamente com um tensioactivo e um propulsor. As percentagens típicas das composições do invento são de 0,01%-20% em peso, de preferência 1%-10%. O tensioactivo deve ser, evidentemente, não tóxico e preferivelmente solúvel no propulsor. São representativos de tais agentes os ésteres ou ésteres parciais de ácidos gordos contendo de 6 a 22 átomos de carbono, tais como os ácidos capríco, octanóico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linolénico, olestérico e oleico com um álcool poli-hídrico alifático ou seu anidrido cíclico. Podem ser utilizados ésteres mistos tais como glicéridos mistos ou naturais. O tensioactivo pode constituir 0,1%-20% em peso da composição, de preferência 0,25-5%. O equilíbrio da composição é normalmente o propulsor. Quando desejável, pode também ser incluído um veículo, tal como, por exemplo, lecitina para entrega intranasal.

As construções do invento podem ser adicionalmente administradas num sistema tipo depósito, numa forma encapsulada ou num implante por técnicas bem conhecidas na arte. Similarmente, as construções podem ser administradas através de uma bomba num tecido de interesse.

Qualquer uma das formulações anteriores pode ser adequada em tratamentos e terapêuticas de acordo com o presente invento, desde que o agente activo na formulação não seja

inativado pela formulação e a formulação seja fisiologicamente compatível.

Os exemplos seguintes são fornecidos para ilustrar certos aspectos do presente invento e não se destinam a limitar o seu âmbito.

EXEMPLOS EXPERIMENTAIS

I. Introdução

A fibrose pulmonar é uma desordem comum que se pensa ser devida aos efeitos destrutivos de produtos libertados a partir de leucócitos. Embora o epitélio respiratório seja danificado durante o desenvolvimento de fibrose, não se mostrou previamente que as células epiteliais, elas próprias, contribuam para este processo. Examinámos os efeitos da bleomicina, um fármaco que se sabe causar fibrose pulmonar, em ratinhos que expressam uma mutação nula de um único gene de subunidade de integrina ($\beta 6$) que está completamente restringido a células epiteliais. Os ratinhos $\beta 6^{-/-}$ foram drasticamente protegidos da fibrose induzida por bleomicina. As terapêuticas alvo desta integrina podiam proporcionar, por conseguinte, novas abordagens para o tratamento desta desordem largamente não tratável.

A integrina $\alpha v \beta 6$ é exclusivamente expressa em células epiteliais, principalmente durante a organogénese e em resposta à lesão. Os ratinhos $\beta 6^{-/-}$ têm respostas inflamatórias exageradas a lesões cutâneas e das vias aéreas, mas desenvolvem-se e reproduzem-se normalmente (Huang, X.Z. et al., J. Cell Biol., 133: 921-928 (1996)).

II. A Inativação do Gene da Subunidade de Integrina $\beta 6$ Protege os Ratinhos Contra a Fibrose Pulmonar Induzida por Bleomicina

A toxicidade pulmonar da bleomicina (0,03 unidades (u) em 60 μ l de solução salina) ou veículo de solução salina (60 μ l) administrados por injeção intratraqueal foi examinada em ratinhos de tipo selvagem ($\beta 6^{+/+}$) e ratinhos $\beta 6^{-/-}$ de idade e sexo correspondentes, da estirpe 129 SVEMS/ter. A fibrose

pulmonar foi avaliada 15, 30 e 60 dias após o tratamento por exame da morfologia dos pulmões e por medição do teor de hidroxiprolina, um índice de deposição de colagénio. A fibrose foi significativa nos ratinhos de tipo selvagem tratados com bleomicina durante 30 dias e progrediu até aos 60 dias (Figuras 1A-1B). Pelo contrário, nos ratinhos $\beta 6^{-/-}$ a morfologia dos pulmões permaneceu quase normal ao longo da experiência, apenas com pequenas porções de fibrose; e o teor de hidroxiprolina dos pulmões não foi significativamente diferente daquele medido em animais tratados com solução salina em qualquer momento. Esta verificação não foi única para os ratinhos 129 puros, uma vez que foram obtidos resultados similares na descendência de 129 por intercruzamentos C57B1/6. Estes resultados inesperados indicam que a expressão da integrina $\alpha \beta 6$ é necessária para a indução de fibrose pulmonar.

Para determinar o papel de $\alpha \beta 6$ nos estádios precoces da fibrose induzida por bleomicina, mediu-se o teor de água dos pulmões, um marcador de edema pulmonar que resulta da permeabilidade vascular aumentada, 1, 5 e 15 dias após a administração de bleomicina ou solução salina. Nos ratinhos de tipo selvagem, a água nos pulmões estava aumentada ao máximo em 5 dias e permaneceu aumentada durante 15 dias após a bleomicina (Figura 2). Tal como a fibrose pulmonar, os ratinhos $\beta 6^{-/-}$ estavam largamente protegidos deste efeito precoce da bleomicina, o que indica um papel para a $\alpha \beta 6$ epitelial antes do desenvolvimento de perda vascular induzida por bleomicina.

Descrevemos previamente que os ratinhos $\beta 6^{-/-}$ demonstram respostas inflamatórias exageradas de células mononucleares na pele e vias aéreas (Huang, X.Z. *et al.*, J. Cell Biol. 133: 921-928 (1996)). A lesão dos pulmões e fibrose pulmonar induzidas por bleomicina estão associadas a, e podem depender do, recrutamento e activação de linfócitos (Schrier, D.J. *et al.*, Am. J. Pathol. 116: 270-278 (1984)). Contámos os linfócitos CD4+ e CD8+ e avaliámos a activação dos linfócitos por medição da expressão do receptor de interleucina 2 (CD25) em células obtidas a partir de pulmões cortados de ratinhos tratados com solução salina ou bleomicina, 5 e 15 dias após o tratamento, de forma a determinar se a resistência dos

ratinhos $\beta 6^{-/-}$ à lesão e à fibrose induzidas por bleomicina era devida ao recrutamento ou activação de linfócitos alterados. Observaram-se mais células CD4+, CD8+ e CD25+ nos pulmões de ratinhos $\beta 6^{-/-}$ do que nos animais de tipo selvagem o que é consistente com a descrição anterior. A bleomicina induziu um grande aumento nos números de linfócitos que expressam CD4 e CD8 e um aumento marcado na percentagem de linfócitos que expressam CD25 (Figura 3), quer em ratinhos de tipo selvagem quer em ratinhos $\beta 6^{-/-}$. Quer nos ratinhos de tipo selvagem quer nos ratinhos $\beta 6^{-/-}$ o recrutamento e activação de linfócitos pulmonares foi máximo 5 dias após administração de bleomicina e começou a declinar aos 15 dias. Sem limitação por uma qualquer teoria, estes dados sugerem que uma falha no recrutamento ou activação de linfócitos em ratinhos $\beta 6^{-/-}$ é improvável estar subjacente à sua protecção contra os efeitos de danos pulmonares da bleomicina.

A interacção de integrinas com os seus ligandos de matriz modula várias funções celulares importantes incluindo a proliferação (Agrez, M. *et al.*, J. Cell Biol. 127: 547-556 (1994)), sobrevivência (Lukacs, N.W. *et al.*, Eur. J. Immunol. 25: 245-251 (1995)) e expressão de citocinas (Miyake, S. *et al.*, J. Exp. Med. 177: 863-868 (1993)) e metaloproteinases (Werb, Z. *et al.*, J. Cell Biol. 109: 877-889 (1989)). A subunidade $\beta 6$ foi apenas descrita formando um único heterodímero de integrina, $\alpha \beta 6$ e está restringida a células epiteliais. Em paralelo com a rápida indução de expressão de $\alpha \beta 6$ após lesão epitelial, as concentrações locais de, pelo menos, dois ligandos para esta integrina (fibronectina e tenascina) aumentam. Descrevemos previamente que a expressão de $\alpha \beta 6$ desempenha um papel na terminação de respostas inflamatórias de células mononucleares na pele e na vias aéreas de condução dos pulmões (Huang, X.Z. *et al.*, J. Cell Biol. 133: 921-928 (1996)). Os resultados aqui descritos indicam que esta integrina desempenha também um papel crítico na indução de lesão dos pulmões e fibrose pulmonar em resposta à bleomicina.

As células epiteliais respiratórias têm sido consideradas desde à longo tempo principalmente como componentes de uma barreira passiva, separando outras células pulmonares dos componentes potencialmente tóxicos do ar inalado. No entanto,

nesta interface estas células estão bem posicionadas para iniciar e modular respostas locais à lesão. A evidência recente sugere que as células epiteliais respiratórias têm a capacidade de sintetizar e segregar um certo número de proteínas que podem iniciar e modular respostas à lesão, incluindo quimioquinas (por exemplo, interleucina-8, GRO α , GRO γ , RANTES, GMCSF, MIP-1 α e MCP-1), outras citoquinas (por exemplo, IL-6, IL-11 e IL-15) e factores de crescimento (por exemplo, TGF β). Sem limitação por uma qualquer teoria, um mecanismo possível pelo qual a $\alpha\beta 6$ epitelial pode contribuir para o desenvolvimento de lesão dos pulmões e fibrose pulmonar é por modulação da expressão de uma ou mais destas proteínas.

As presentes terapêuticas de fibrose pulmonar são amplamente inadequadas. Os resultados do presente estudo indicam que as células epiteliais respiratórias e a integrina epitelial, $\alpha\beta 6$, desempenham papéis importantes na patogénese da lesão do parênquima dos pulmões e fibrose pulmonar e que as terapêuticas especificamente concebidas para interferir com a função desta integrina são úteis no tratamento destas doenças dos pulmões amplamente intratáveis.

III. Produção de um Anticorpo de Bloqueio

A. Produção de Anticorpo Monoclonal

Ratinhos $\beta 6^{-/-}$ foram imunizados com queratinócitos obtidos a partir de ratinhos de tipo selvagem ou com $\alpha\beta 6$ humana segregada recombinante (Weinacker *et al.*, J. Biol. Chem. 269: 6940-6948 (1994)) em adjuvante de Freund, para gerar anticorpos contra $\alpha\beta 6$. Colheram-se esplenócitos de ratinho e fundiram-se com células de mieloma de ratinho SP2/0 de acordo com os procedimentos padrão. Utilizaram-se células SW480 transfectadas com $\beta 6$ e com simulação de transfecção (*mock*) para análise do sobrenadante resultante por citometria de fluxo. Os anticorpos que se verificou reconhecerem células SW480 transfectadas com $\beta 6$ mas não as com transfecção simulada foram utilizados para experiências posteriores.

B. Caracterização dos Anticorpos Monoclonais

A $\alpha\beta 6$ humana segregada e os queratinócitos de murino foram utilizados como imunogénios em ratinhos $\beta 6^{-/-}$ de antecedente 129/C57, para produzir anticorpos contra $\alpha\beta 6$ de murino. Os sobrenadantes dos hibridomas produzidos foram analisados por coloração diferencial de células SW480 com transfecção simulada e transfectadas com $\beta 6$. Os anticorpos resultantes CS $\beta 6$ e 10D5 coraram $\beta 6$ humano expresso em células SW480 e $\beta 6$ de ratinho em queratinócitos de tipo selvagem. O CS $\beta 6$ foi posteriormente caracterizado por imunoprecipitação de lisado de queratinócitos de murino marcados com (^{35}S). Este anticorpo precipitou heterodímeros da massa molecular adequada para ser $\alpha\beta 6$ de queratinócitos $\beta 6^{+/+}$ mas não de queratinócitos $\beta 6^{-/-}$, o que indica que estes anticorpos são específicos para a integrina $\alpha\beta 6$.

Testámos também CS $\beta 6$ e 10D5 quanto à actividade de bloqueio por realização de testes de adesão celular com células SW480 transfectadas com $\beta 6$ e queratinócitos de murino em fibronectina. No entanto, apenas o 10D5 mostrou actividade de bloqueio em células de murino. O 10D5 inibiu a migração de queratinócitos de tipo selvagem em fibronectina, num grau idêntico ao observado em queratinócitos $\beta 6^{-/-}$.

C. Teste de Adesão Celular

Placas de microtitulação de múltiplos poços de poliestireno tratadas com culturas de não tecidos de 96 poços (Linbro/Titertek, Flow Laboratories, McLean, VA) foram revestidas com vitronectina, fibronectina ou colagénio. Adicionou-se aos poços uma solução de 100 μl contendo várias quantidades de matriz e incubou-se a 37°C durante 1 hora. Após incubação, os poços foram lavados com PBS, depois bloqueadas com BSA a 1% em DMEM isento de soro a 37°C durante 30 minutos. Os poços de controlo foram cheios com BSA a 1% em DMEM. As células foram colhidas da mesma forma que para o teste de migração e ressuspensas em KGM isento de soro e depois adicionadas a cada poço revestido com proteína na presença ou ausência de PMA. Para as experiências de bloqueio, as células foram incubadas com anticorpos durante 5 minutos a 4°C antes do plaqueamento. As placas foram centrifugadas (topo para

cima) a 10xg durante 5 minutos antes da incubação durante 1 hora a 34°C, em CO₂ humidificado a 7%. As células não aderentes foram removidas por centrifugação de topo para baixo a 48xg durante 5 minutos. As células ligadas foram fixadas com formaldeído a 1% e coradas com violeta de cristal a 0,5%, e em seguida os poços foram lavados com PBS. O número relativo de células em cada poço foi avaliado por medição da absorvância a 595 nm num leitor de microplacas "Microplate Reader" (Bio-Rad).

D. Teste de Migração

Os testes de migração de células foram realizados com placas Transwell revestidas com matriz (poros de 8 µm, Costar, Cambridge, MA). A superfície inferior da membrana foi revestida com colagénio (10 µg/ml), fibronectina (10 µg/ml) ou vitronectina (10 µg/ml) em PBS durante 1 hora a 37°C e bloqueada com BSA a 1%. Os queratinócitos cultivados primários foram colhidos com tripsina/EDTA e a tripsina foi inactivada com inibidor de tripsina de semente de soja. As células foram suspensas em KGM isento de soro e plaqueadas na câmara superior a uma densidade de $3,6 \times 10^4$ por poço em 100 µl de meio na presença ou ausência de miristato-acetato de forbol (PMA, 10 ng/ml). Para as experiências de inibição, os anticorpos foram adicionados nas câmaras superiores e inferiores na presença de PMA. Após uma incubação de 6 horas, as células foram fixadas com paraformaldeído a 2% e coradas com violeta de cristal a 0,5% em formaldeído a 1%. As células na câmara superior foram removidas e as células na superfície inferior foram contadas com uma grelha 10x numa amplificação de elevada potência (40x). Contaram-se múltiplos campos e calculou-se a média para cada condição estudada.

IV. Ratinhos *Knockout* β6 Têm Incidência Reduzida de Metástases nos Pulmões

Uma linha transgénica de ratinho que desenvolve espontaneamente cancro da mama metastático (ratinhos MMTV-mTAG) foi cruzada com ratinhos "knockout" beta-6. Os ratinhos da descendência que careciam de β6 desenvolveram tumores mamários primários de crescimento rápido, mas tinham uma incidência e extensão muito reduzidas de metástases nos

pulmões quando comparados com ratinhos da mesma ninhada que expressaram $\beta 6$. A imuno-histoquímica mostrou que a $\beta 6$ é fortemente expressa à volta da extremidade das lesões metastáticas. Isto sugere que a $\beta 6$ é necessária para metástases máximas neste modelo.

Uma vez que os ratinhos "*knockout*" $\beta 6$ têm inflamação pulmonar crónica, é possível que a metástase reduzida seja devida à presença de inflamação no pulmão que interfere com o crescimento metastático. Realizaram-se duas experiências para abordar este assunto:

1. Injectou-se uma linha de células que expressa $\beta 6$ derivada do tumor primário em ratinhos singénicos que eram ou de tipo selvagem ou "*knockout*" $\beta 6$. As metástases dos pulmões ocorreram rapidamente nos dois grupos de ratinhos, sugerindo que a presença de inflamação nos ratinhos "*knockout*" não interfere com o crescimento de células tumorais no pulmão.

2. Injectaram-se linhas de células derivadas de tumores de ratinhos "*knockout*" beta-6 ou de tipo selvagem em ratinhos de tipo selvagem singénicos. As linhas de células de tipo selvagem deram invariavelmente origem a tumores nos pulmões, enquanto que as linhas de células "*knockout*" não deram. Esta experiência sugere que a célula tumoral de $\beta 6$ é necessária para metástase máxima neste sistema.

Embora o invento tenha sido descrito em conjunto com as suas concretizações específicas deve-se compreender que é capaz de posterior modificação, pretendendo este pedido abranger quaisquer variações, utilizações ou adaptações do invento seguindo, em geral, os princípios do invento e incluindo os afastamentos à presente descrição como na prática conhecida ou habitual da arte à qual o invento pertence e como pode ser aplicada às características essenciais anteriormente descritas e que caiem no âmbito do invento e dos limites das reivindicações apenas.

Lisboa, 2009-01-05

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um anticorpo que se liga especificamente a integrina $\alpha\beta6$ e bloqueia a ligação de um ligando à integrina $\alpha\beta6$, para o fabrico de um medicamento para tratamento da fibrose hepática num doente.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o anticorpo é administrado terapêuticamente.

4. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o anticorpo é administrado profilacticamente.

Lisboa, 2009-01-05

RESUMO

"Tratamento da fibrose hepática com anticorpos contra integrina alfa-V-beta 6"

O invento proporciona a utilização de um anticorpo que se liga especificamente a $\alpha v\beta 6$ e bloqueia a ligação de um ligando a $\alpha v\beta 6$ para o fabrico de um medicamento para tratamento de fibrose hepática num doente.

FIG. 1A

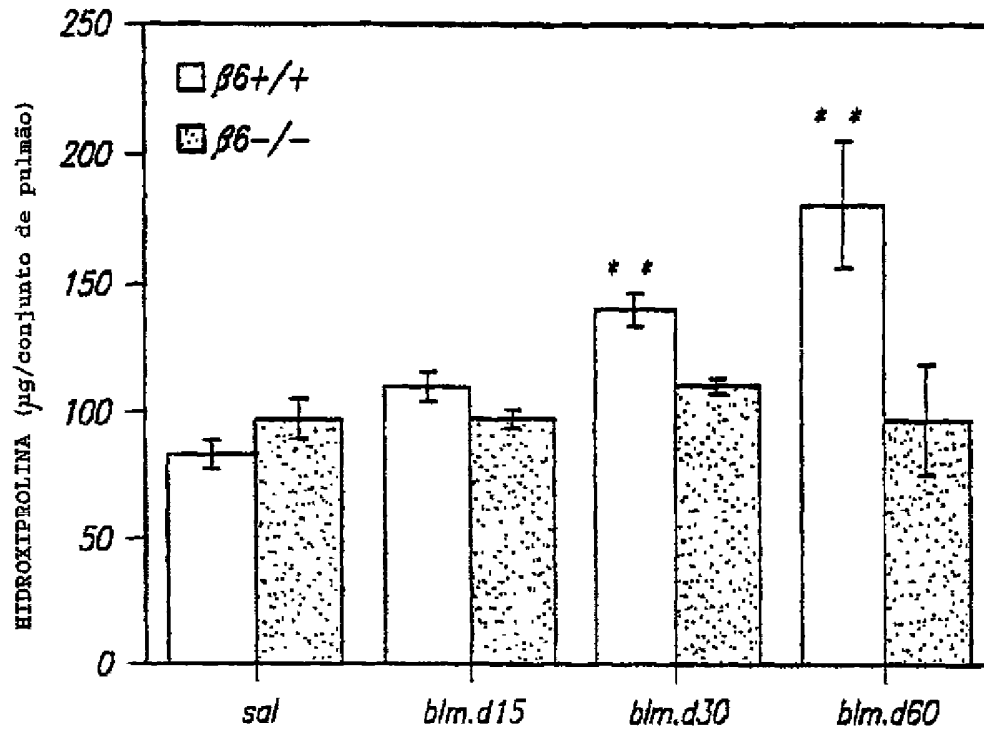


FIG. 1B

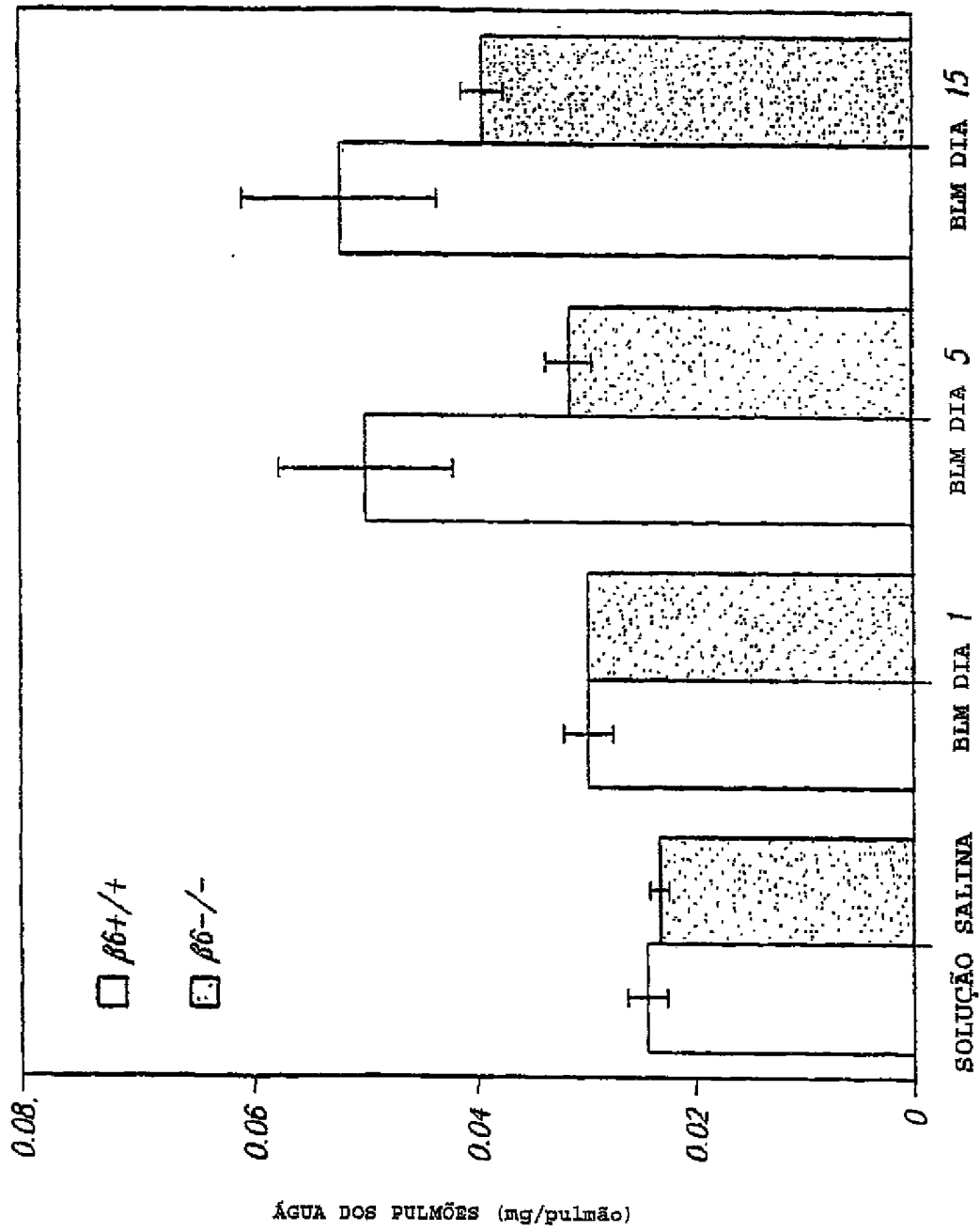


FIG. 2

FIG. 3

