



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0720477-9 A2



(22) Data de Depósito: 20/12/2007
(43) Data da Publicação: 14/01/2014
(RPI 2245)

(51) Int.Cl.:
C07K 16/00
C12P 21/08

(54) Título: ANTICORPOS DE CD44

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 21/12/2006 US 60/876.109

(73) Titular(es): Medarex, Inc., Pfizer Inc.

(72) Inventor(es): Advait V. Badkar, Erika Meaddough, Haichun Huang, Kristopher Toy, Lan Yang, Mohan Srinivasan, Vahe Bedian, Xu Xu

(74) Procurador(es): Nellie Anne Daniel-Shores

(86) Pedido Internacional: PCT US2007025975 de 20/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/079246 de 03/07/2008

“ANTICORPOS DE CD44”

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS DE PATENTE E PATENTES RELACIONADAS

Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório U.S. No. Serial 60/876109 depositado em 21 de dezembro de 2006; que está incorporado por referência aqui em sua totalidade.

Campo da Invenção

A presente invenção se refere às porções de ligação de antígeno e anticorpos dos mesmos que ligam-se ao CD44 humano. A invenção da mesma forma se refere a moléculas de ácido nucléico que codificam tais porções de ligação de antígeno e anticorpos, métodos de preparar os anticorpos de CD44 e porções de ligação de antígeno, composições que compreendem estas porções de ligação de antígeno ou anticorpos dos mesmos e métodos de usar os anticorpos, porções de ligação de antígeno, e composições ou medicamentos para tratamento.

Antecedente da Invenção

Inflamação, um acúmulo local de fluido, causada por exemplo por, lesão física, infecção ou uma resposta imune, é iniciada pelo recrutamento de células inflamatórias, tais como monócitos e células T na matriz extracelular. Naor, D. e outro, (2003) *Arthritis Res Ther*, 5:105-115. Este recrutamento celular resulta tipicamente na infiltração adicional e aumento de citocinas, tais como TNF- β , IL-6 e IL-1 β , na matriz extracelular (Ibid). Tal recrutamento e infiltração de células, junto com vários outros processos celulares, tais como por exemplo, regulamento de crescimento, adesão, diferenciação, invasão e sobrevivência são mediados por moléculas de adesão celular de glicoproteína de transmembrana, uma super-família de receptores de adesão. Membros da família do receptor de adesão celular incluem CD44, uma glicoproteína de transmembrana de classe I amplamente distribuída. CD44 desempenha um papel principal em uma variedade de comportamentos celulares, incluindo adesão, migração, ativação, e sobrevivência. Ponta, H. e outro, (2003) *Molecular Cell Biology*, 4:33-45.

CD44 varia no peso molecular de 80 a 90 kDa e pode gerar perto de 800 isoformas variantes por entrançamento alternativo diferencial. Cichy, J. e outro, (2003) *Journal of Cell Biology*, 161 :5, 839-843. No momento, várias dúzias de isoformas são conhecidas. CD44 é ubiquamente expresso em muitos tipos de célula incluindo leucócitos, fibroblastos, células epiteliais, ceratinócitos e algumas células endoteliais, com a forma de CD44 padrão (CD44s), que necessita de quaisquer exons variante, sendo a isoforma mais abundantemente expressa.

CD44 junto com seu ligante primário, hialuronano ou ácido hialurônico (HA), um polissacarídeo hidrofílico, linear, extracelular, desempenha um papel principal na inflamação.

Naor D., (2003) *Arthritis Res Ther*, 5:105-115 e Aruffo, A. (1990) *Cell* 61, 1301 - 1313. Por exemplo, em um estudo in vivo um anticorpo anti-CD44 monoclonal, IRAWB14, que induz atividade de ligação de HA mediada por CD44 na exacerbação dos sintomas inflamatórios em camundongos com artrite induzida por proteoglicano. Pure, E. e outro, (2001) *TRENDS in Molecular Medicine*, 7:213-221.

Sumário da Invenção

A presente invenção fornece porções de ligação de antígeno ou anticorpos isolados do mesmo que especificamente ligam CD44 e podem agir como um antagonista de CD44, e composições ou medicamentos compreendendo as referidas porções de ligação de antígeno ou anticorpo do mesmo. Outro aspecto da presente invenção fornece quaisquer das porções de ligação de antígeno ou anticorpos do mesmo como descrito aqui, onde o referido anticorpo ou porção de ligação de antígeno é um anticorpo humano. Em um outro aspecto, o referido anticorpo ou porção de ligação de antígeno é um anticorpo recombinante humano.

A invenção fornece anticorpos que especificamente ligam CD44 compreendendo: (i) uma cadeia leve e/ou pesada, ou (ii) os domínios variáveis da mesma, ou (iii) porções de ligação de antígeno dos mesmos, ou (iv) região(ões) de determinação de complementaridade (CDR) dos mesmos.

A invenção também fornece anticorpos de CD44 ou porções de ligação de antígeno em que o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo tendo pelo menos uma das propriedades funcionais como descrito abaixo em a) a g).

a) liga-se a CD44 com uma K_D de 1000 nM ou menos como medido por ressonância de plasmônio de superfície;

b) tem uma taxa de dissociação (k_{off}) para CD44 menor que ou igual a $0,01^{s^{-1}}$ como medido por ressonância de plasmônio de superfície;

c) liga-se a CD44 com uma EC_{50} menor que 500 nM, 75 μ g/ml como medido por FACS ou ensaio de ligação ELISA;

d) inibe a interação entre CD44 e HA com uma IC_{50} menor que 500 nM, 75 μ g/ml como medido por um ensaio de ligação ELISA;

e) reduz a expressão de superfície in vivo de receptores de CD44 em células inflamatórias, tal como células CD3+ T em uma IC_{50} menor que aproximadamente 100 nM como medido por FACS;

f) reduz a expressão de superfície de receptores de CD44 in vitro com uma IC_{50} menos que 50 nM;

g) tem uma seletividade para CD44 sobre a proteína do receptor 1 de hiauronano endotelial de vaso linfático (LYVE-1) por pelo menos 100 vezes. Em outra modalidade, a invenção fornece uma molécula de ácido nucléico isolada que compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica qualquer das porções de ligação de antígeno ou anticorpos co-

mo descrito aqui. Em uma modalidade particular, a invenção fornece uma molécula de ácido nucléico isolada que compreende uma seqüência de nucleotídeo mencionada em qualquer das SEQ ID NOs descritas aqui. A invenção também fornece um vetor que compreende quaisquer das moléculas de ácido nucléico descritas aqui, em que o vetor opcionalmente
5 compreende uma seqüência de controle de expressão operavelmente ligada à molécula de ácido nucléico.

Outra modalidade fornece uma célula hospedeira que compreende quaisquer dos vetores descritos aqui ou compreendendo qualquer das moléculas de ácido nucléico descritas aqui. A presente invenção também fornece uma linha celular isolada que produz qual-
10 quer das porções de ligação de antígeno ou anticorpos como descrito aqui ou que produz a cadeia pesada ou cadeia leve de quaisquer anticorpos ou referidas porções de ligação de antígeno.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para produzir um anticorpo de CD44 ou porção de ligação de antígeno do mesmo, compreendendo cultivar
15 quaisquer das células hospedeiras ou linhagens celulares descritas aqui sob condições adequadas e recuperar o referido anticorpo ou porção de ligação de antígeno.

A presente invenção da mesma forma fornece um animal transgênico não humano ou planta transgênica compreendendo quaisquer dos ácidos nucléico descritos aqui, em que o animal transgênico não humano ou planta transgênica expressa o referido ácido nucléico.

20 A presente invenção também fornece um método para isolar um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo que liga-se ao CD44, compreendendo a etapa de isolar o anticorpo do animal transgênico não humano ou planta transgênica como descrito aqui.

A invenção fornece composições que compreendem: (i) a cadeia leve e/ou pesada,
25 os domínios variáveis da mesma, ou porções de ligação de antígeno da mesma, ou CRDs da mesma, do referido anticorpo anti-CD44, ou moléculas de ácido nucléico que os codificam; e (ii) um veículo farmacêuticamente aceitável. Composições da invenção podem também compreender outro componente, tal como agente terapêutico ou um agente diagnóstico.

30 A presente invenção da mesma forma fornece uma composição farmacêutica ou medicamento que compreende quaisquer das porções de ligação de antígeno ou anticorpos do mesmo como descrito aqui e opcionalmente um veículo farmacêuticamente aceitável ligado ou na suspensão. Composições da invenção podem também compreender outro componente, tal como agente terapêutico ou agente diagnóstico.

35 Métodos diagnósticos e terapêuticos são da mesma forma fornecidos pela invenção.

A presente invenção da mesma forma fornece um método para tratar recrutamento

ou infiltração de célula inflamatória em um mamífero em necessidade do mesmo, compreendendo a etapa de administrar ao referido mamífero quaisquer das porções de ligação de antígeno ou anticorpos, ou quaisquer das composições farmacêuticas, como descrito aqui.

Outro aspecto da presente invenção fornece quaisquer das porções de ligação de antígeno ou anticorpos do mesmo como descrito aqui, onde o referido anticorpo ou porção de ligação de antígeno é um anticorpo humano. Em um outro aspecto, o referido anticorpo ou porção de ligação de antígeno é um anticorpo recombinante humano.

Breve Descrição dos Desenhos

FIG. 1 é uma representação esquemática de uma Imunoglobulina (IgG).

FIG. 2 é um alinhamento de seqüência de seqüências de aminoácido preditas dos domínios variáveis de cadeia leve e pesada de anticorpos monoclonais anti-CD44 isolados com as seqüências de aminoácido da linha germinativa dos genes de cadeia leve e pesada luz correspondentes. Resíduos idênticos entre os clones e as seqüências de linha germinativa são mostrados por traços, deleções/inserções são mostradas por marcas misturadas, mutações são listadas, e CDRs são sublinhadas.

FIG. 3 é um gráfico que ilustra o anticorpo 1A9.A6.B9 anti-CD44 que bloqueia a ligação de HA à proteína de fusão de CD44-Ig.

FIG. 4A-4C são gráficos que mostram a ligação de anticorpos anti-CD44 em células quando analisados por classificação de citometria de fluxo (FACS).

FIG. 4A é um gráfico que ilustra a ligação de anticorpos 1A9.A6.B9 e 14G9.B8.B4 anti-CD44 em células T de sangue totais humanas quando analisados por FACS.

FIG. 4B é um gráfico que ilustra a ligação de anticorpos 1A9.A6.B9 e 14G9.B8.B4 anti-CD44 em células T de sangue totais de macaco cinomolgo quando analisados por FACS.

FIG. 4C é um gráfico que ilustra ligação de anticorpos anti-CD44 em células 300-19 transduzidas com o CD44 de ciano e humano quando analisados por FACS.

FIG. 5 é um gráfico que ilustra o estudo de ligação de anticorpo 1A9.A6.B9 anti-CD44 usando as proteínas de fusão de CD44-Ig de ciano e humano quando medido por ensaios ELISA.

FIG. 6 mostra um gráfico que ilustra anticorpos 1A9.A6.B9 e 14G9.B8.B4 anti-CD44 que bloqueia a liberação de IL-1 β estimulada por lipopolissacarídeo (LPS) e HA de monócitos totais humanos, como quantificados usando ELISA.

FIG. 7 é um gráfico que mostra anticorpos 1A9.A6.B9 e 14G9.B8.B4 anti-CD44 que reduzem a expressão de superfície de receptores de CD44 em células T periféricas CD3⁺ quando medidas por FACS.

FIG. 8A é um gráfico que mostra a redução de expressão de superfície de receptores de CD44 em leucócitos periféricos humanos (linfócitos) por anticorpo 1A9.A6.B9 anti-

CD44.

FIG. 8B é um gráfico que mostra a redução de expressão de superfície de receptores de CD44 em leucócitos periféricos humanos (monócitos) por anticorpo 1A9.A6.B9 anti-CD44.

5 FIG. 8C é um gráfico que mostra a redução de expressão de superfície de receptores de CD44 em neutrófilos periféricos humanos (PMNs) por anticorpo 1A9.A6.B9 anti-CD44.

10 FIG. 9A e 9B mostra gráficos que ilustram o estudo in vivo de dose única de anticorpo 1A9.A6.B6 anti-CD44 administrado em macacos cinomolgos, quando quantificado usando FACS.

FIG. 10A é um gráfico que ilustra a ligação de 1A9.A6.B9 anti-CD44 em competição direta com anticorpo anti-CD44 MEM 85 usando células T periféricas humanas, quando quantificado usando FACS.

15 FIG. 10B é um gráfico que ilustra a ligação de 1A9.A6.B9 anti-CD44 em competição direta com anticorpo anti-CD44 MEM 85 usando as células 300-19 transfectadas com CD44 humano como descrito no EXEMPLO 1, quando quantificado usando FACS.

FIG. 11 é um gráfico que ilustra o agregado presente formado (espécies de massa molecular alta (HMMS)) a 50°C (11a), 25°C (11b) e 40°C (11c) quando medido por SE-HPLC.

20 FIG. 12 é um gráfico que mostra as espécies de ácido total formado a 50°C (12a), 25°C (12b) e 40°C (12c) quando medido por ICE.

Descrição Detalhada Da Invenção

Definições

25 Ao longo desta especificação e reivindicações, a palavra "compreender", ou variações tal como "compreende" ou "compreendendo," será entendido para insinuar a inclusão de um número inteiro declarada ou grupo de números inteiros porém não a exclusão de qualquer outra número inteiro ou grupo de números inteiros.

30 A menos que de outra maneira definido aqui, termos científicos e técnicos usados com relação à presente invenção terão os significados que são geralmente compreendido por aqueles de experiência ordinária na técnica. Além disso, a menos que de outra maneira requerido por contexto, termos singulares incluirão pluralidades e termos plurais incluirão o singular. Geralmente, a nomenclatura usada aqui com relação à cultura de tecido ou célula, biologia molecular, imunologia, microbiologia, genéticas e proteína e química de ácido nucleico e hibridização são aqueles geralmente usados na técnica.

35 A unidade estrutural de anticorpo básico é conhecida por compreender um tetrâmero. Cada tetrâmero é composto de dois pares idênticos de cadeias de polipeptídeo, cada par tendo uma cadeia "leve" (cerca de 25 kDa) e uma cadeia "pesada" (cerca de 50-70 kDa). O

porção de amino-terminal de cada cadeia inclui uma região variável de cerca de 100 a 120 ou mais aminoácidos principalmente responsáveis para o reconhecimento de antígeno. A porção de terminal carbóxi de cada cadeia define uma região constante principalmente responsável pela função efetora. Cadeias leves humanas são classificadas como cadeias leves de capa e lambda. Cadeias pesadas são classificadas como mu, delta, gama, alfa, ou epsilon, e define o isótipo do anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. Dentro de cadeias leves e pesadas, as regiões variáveis e constantes são unidas por uma região "J" de cerca de 12 ou mais aminoácidos, com a cadeia pesada da mesma forma incluindo uma região "D" de cerca de 3 ou mais aminoácidos. Veja geralmente, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2º ed. Raven Press, N.Y. (1989)). As regiões variáveis de cada par de cadeia pesada/leve (V_H e V_L), respectivamente, formam o sítio de ligação de anticorpo. Desse modo, um anticorpo IgG intacto, por exemplo, tem dois sítios de ligação. Exceto nos anticorpos bifuncionais ou biespecíficos, os dois sítios de ligação são os mesmos.

As regiões variáveis da exibição das cadeias pesada e clara exibem a mesma estrutura geral de regiões de estrutura relativamente conservadas (FR) unidas por três regiões hiper variáveis, da mesma forma chamadas regiões de determinação de complementaridade ou CDRs. O termo "variável" refere-se ao fato que certas porções dos domínios variáveis diferem-se extensivamente na seqüência entre os anticorpos e são usadas na ligação e especificidade de cada anticorpo particular para seu antígeno particular. A variabilidade, entretanto, não é distribuída uniformemente ao longo dos domínios variáveis de anticorpos, porém é concentrada nas CDRs, que são separadas pelas FRs altamente conservadas. As CDRs das duas cadeias de cada par são alinhadas pelas FRs, permitindo a ligação a um epitopo específico. A partir de N-terminal a C-terminal, tanto a cadeia leve quanto a pesada compreendem os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. A designação de aminoácidos a cada domínio está de acordo com as definições das Sequências de Kabat de Proteínas de Interesse Imunológico (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 e 1991)), ou Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia e outro (1989) Nature 342:878-883. Como aqui usado, um anticorpo que é referido por número é o mesmo como o anticorpo monoclonal que é obtido a partir do hibridoma do mesmo número. Por exemplo, anticorpo monoclonal 1A9.A6.B9 é o mesmo anticorpo como obtido a partir do hibridoma 1A9.A6.B9, ou um subclone do mesmo. Como aqui usado, um fragmento Fd significa um fragmento de anticorpo que consiste nos domínios V_H e C_H1 ; um fragmento Fv consiste nos domínios V_L e V_H de uma única ramificação de um anticorpo; e um fragmento dAb (Ward e outro, (1989) Nature 341 :544-546) consiste em um domínio de V_H . Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo de cadeia simples (scFv) em que os domínios de V_L e V_H são emparelhados para formar uma molécula monovalente por um ligador sintético que os

permite ser feitos como uma cadeia de proteína simples. (Bird e outro, (1988) Science 242:423-426 e Huston e outro, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Em algumas modalidades, os anticorpos são diacorpos, isto é, anticorpos bivalentes nos quais os domínios de V_H e V_L são expressos em uma cadeia de polipeptídeo simples, porém usando um ligador que é muito curto para permitir emparelhar entre os dois domínios na mesma cadeia, desse modo forçando os domínios emparelharem com domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação de antígeno. (Veja por exemplo, Holliger P. e outro, (1993) Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 90:6444-6448, e Poljak R. J. e outro, (1994) Structure 2:1121-1123.

Em uma modalidade, um ou mais CDRs de um anticorpo da invenção podem ser incorporadas em uma molécula covalentemente ou não covalentemente para torná-la uma imunoadesina que especificamente liga-se ao CD44. Em tais modalidades, a(s) CDR(s) pode(m) ser incorporada(s) como parte de uma cadeia de polipeptídeo maior, pode(m) ser covalentemente ligada(s) a outra cadeia de polipeptídeo, ou pode(m) ser incorporada(s) não covalentemente.

No anticorpo, modalidades que têm um ou mais sítios de ligação, os sítios de ligação podem ser idênticos um ao outro ou podem ser diferentes.

O termo "análogo" ou "polipeptídeo análogo" como usado aqui refere-se a um polipeptídeo que compreende um segmento que tem identidade significativa a alguma seqüência de aminoácido de referência e tem substancialmente a mesma função ou atividade como a seqüência de aminoácido de referência. Tipicamente, análogos de polipeptídeo compreendem uma substituição de aminoácido conservadora (ou inserção ou deleção) com respeito à seqüência de referência. Análogos podem ser pelo menos 20 ou 25 aminoácidos no comprimento, ou podem ser pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 ou 200 aminoácidos no comprimento ou mais longos e podem ser freqüentemente tão longos quanto o polipeptídeo de tamanho natural. Algumas modalidades da invenção incluem fragmentos de polipeptídeo ou anticorpos de análogo de polipeptídeo com 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 17 substituições da seqüência de aminoácido da linha germinativa. Fragmentos ou análogos de anticorpos ou moléculas de imunoglobulina podem ser preparados facilmente por aqueles de experiência ordinária na técnica que segue os ensinamentos desta especificação.

Em uma modalidade, substituições de aminoácido para um anticorpo ou porção de ligação de antígeno de CD44 do mesmo são aquelas que: (1) reduzem a suscetibilidade à proteólise, (2) reduzem a suscetibilidade à oxidação, (3) alteram a afinidade de ligação para formar os complexos de proteína, ou (4) conferem ou modificam outras propriedades funcionais ou físico-químicas de tais análogos, porém ainda mantêm a ligação específica ao CD44. Análogos podem incluir várias substituições à seqüência de peptídeo de ocorrência natural. Por exemplo, substituições de aminoácido simples ou múltiplos, preferivelmente

substituições de aminoácido conservadoras, podem ser feitas na seqüência de ocorrência natural, por exemplo na porção do polipeptídeo fora do(s) domínio(s) que formam os contatos intermoleculares. Substituições de aminoácido podem da mesma forma ser feitas no(s) domínio(s) que formam contatos intermoleculares que podem melhorar a atividade do polipeptídeo. Uma substituição de aminoácido conservadora não deve mudar substancialmente as características estruturais da seqüência de origem; por exemplo, um aminoácido de substituição deve alterar a folha β anti-paralela que prepara o domínio de ligação de imunoglobulina que ocorre na seqüência de origem, ou romper outros tipos de estrutura secundária que caracteriza a seqüência de origem. Em geral, glicina e prolina não seriam usadas em uma folha β anti-paralelo. Exemplos de estruturas secundárias e terciárias de polipeptídeo reconhecidas na técnica são descritos em *Proteins, Structure and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden e J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); e Thornton e outro, (1991) *Nature* 354:105.

Como aqui usado, o termo "anticorpo" é sinônimo com imunoglobulina e deve ser entendido como geralmente conhecido na técnica. Em particular, o termo anticorpo não está limitado por qualquer método particular de produzir o anticorpo. Por exemplo, o termo anticorpo inclui, inter alia, anticorpos recombinantes, anticorpos monoclonais, e anticorpos policlonais.

O termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente "porção de anticorpo" ou "porção"), Como aqui usado, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que mantém a capacidade de especificamente ligar-se a um antígeno (por exemplo, CD44). Foi mostrado que a função de ligação de antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de tamanho natural. Exemplos de fragmentos de ligação abrangidos dentro do termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo incluem: (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste nos domínios de V_L , V_H , C_L e C_H1 ; (ii) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de articulação; (iii) um fragmento Fd que consiste nos domínios de V_H e C_H1 ; (iv) um fragmento Fv que consiste nos domínios V_L e V_H de uma ramificação simples de um anticorpo; (v) um fragmento dAb (Ward e outro, (1989) *Nature* 341 :544-546), que consiste em um domínio de V_H ; e (vi) uma região de determinação de complementaridade (CDR). Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, V_L e V_H , sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligador sintético que os permite ser feito como uma cadeia de proteína simples em que as regiões de V_L e V_H emparelham-se para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia simples (scFv)); veja por exemplo, Bird e outro, (1988) *Science* 242:423-426 e Huston e outro, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

85:5879-5883). Tais anticorpos de cadeia simples são da mesma forma pretendidos ser abrangidos dentro do termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo. Outras formas de anticorpos de cadeia simples, tais como diacorpos são da mesma forma abrangidos. Diacorpos são bivalentes, anticorpos biespecíficos nos quais os domínios de V_H e V_L são expressados em uma cadeia de polipeptídeo simples, porém usando um ligador que é muito curto para permitir emparelhar entre os dois domínios na mesma cadeia, desse modo forçando os domínios emparelharem-se com domínios complementares de outra cadeia e criando dois sítios de ligação de antígeno (veja por exemplo, Holliger e outro, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak e outro, (1994) *Structure* 2:1 121-1 123).

Ainda também, um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo pode ser parte de moléculas de imunoadesão maiores, formada por associação covalente ou não covalente do anticorpo ou porção de anticorpo com uma ou mais outras proteínas ou peptídeos. Exemplos de tais moléculas de imunoadesão incluem o uso da região de núcleo de estreptavidina para tornar uma molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov e outro, (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) e uso de um resíduo de cisteína, um peptídeo marcador e um rótulo de poliistina C-terminal para tornar as moléculas de scFv bivalentes e biotinizadas (Kipriyanov e outro, (1994) *Mol. Immunol.* 31 :1047-1058). Outros exemplos incluem-se onde uma ou mais CDRs de um anticorpo são incorporadas em uma molécula covalentemente ou não covalentemente para torná-las uma imunoadesão que especificamente liga-se a um antígeno de interesse, tal como CD44. Em tais modalidades, a(s) CDR(s) pode(m) ser incorporada(s) como parte de uma cadeia de polipeptídeo maior, pode(m) ser covalentemente ligada(s) a outra cadeia de polipeptídeo, ou pode(m) ser incorporada(s) não covalentemente. Porções de anticorpo, tais como fragmentos $F(ab')_2$, pode(m) ser preparadas a partir de anticorpos inteiros usando técnicas convencionais, tal como digestão de papaína ou pepsina, respectivamente, de anticorpos inteiros. Além disso, anticorpos, porções de anticorpo e moléculas de imunoadesão podem ser obtidos usando técnicas padrões recombinantes de ADN, como descrito aqui.

A menos que especificamente indicado de outra maneira, o termo "CD44" se refere a CD44 humano. CD44 é um receptor de matriz extracelular multiestrutural e um membro da família clássica de glicoproteínas de transmembrana que regula atividades de célula-célula e célula-matriz. A clonagem e seqüência de um CD44 humano foram relatadas, por exemplo Arrofo, A. (1990) *Cell*, 16. (No. de Acesso NM_001001391), e é mencionado em SEQ ID NO:1. O termo CD44 é pretendido incluir CD44 humano recombinante e formas quiméricas recombinantes de CD44, que podem ser preparadas por métodos de expressão recombinante padrões ou adquiridos comercialmente (por exemplo, R&D Systems Cat. NO.861-PC-100). Particularmente, CD44 é uma proteína de transmembrana tipo 1 glicosilada de 80-90 kDa codificada por um gene de 60 kb simples compreendendo 20 exons. Dez dos 20 exons,

(exons padrões 1s a 10s) são expressos em todas as células positivas de CD44 e codificam o "CD44 padrão" ou "CD44s". Os 10 outros exons (exons variantes 1v a 10v) são submetidos ao entrançamento alternativo e codificam seqüências peptídicas inseridas no domínio extracelular de CD44s. O "domínio extracelular de CD44" compreende uma região globular N-terminal estabilizada por 3 ligações de dissulfeto, e é separado da membrana celular por uma estrutura linear e tem aproximadamente 247 resíduos no comprimento e é mencionado em SEQ ID NO:3. (Gadhoum Z. e outro, (2004) *leukemia & Lymphoma* 45(8):1501-1510). Esta escada de ligação de tri-dissulfeto inclui a região globular que exhibe o domínio de ligação de ácido hialurônico (HA, hialuronato, hialuronano) "domínio de ligação de HA", localizado dentro do domínio extracelular de CD44s e inclui o "módulo de ligação" que tem aproximadamente 100 resíduos no comprimento, (resíduos 32-123 do domínio extracelular de CD44s e como mencionado em SEQ ID NO:5). O "domínio ligação de HA" pode também ser caracterizado como compreendendo pelo menos resíduos de aminoácido Lys38, Arg41, Tyr42, Arg78, Tyr79, Asn100, Asn101, Arg150, Arg154 e Arg162. (Teriete P. e outro, (2004) *Molecular Cell*, 13, 483-496).

O termo "anticorpo quimérico" como aqui usado significa um anticorpo que compreende regiões de dois ou mais anticorpos diferentes, incluindo anticorpos de espécies diferentes. Por exemplo, uma ou mais das CDRs de um anticorpo quimérico pode ser derivado de um anticorpo de CD44 humano. Em um exemplo, as CDRs de um anticorpo humano podem ser combinadas com CDRs de um anticorpo não humana, tal como camundongo ou rato. Em outro exemplo, todas as CDRs podem ser derivadas de anticorpos de CD44 humanos. Em outro exemplo, as CDRs de mais de um anticorpo de CD44 humano podem ser combinadas em um anticorpo quimérico. Por exemplo, um anticorpo quimérico pode compreender uma CDR1 da cadeia leve de um primeiro anticorpo de CD44 humano, uma CDR2 da cadeia leve de um segundo anticorpo de CD44 humano e uma CDR3 da cadeia leve de um terceiro anticorpo de CD44 humano, e CDRs da cadeia pesada podem ser derivadas de um ou mais outros anticorpos de CD44. Além disso, as regiões de estrutura podem ser derivadas de um dos anticorpos de CD44 dos quais uma ou mais das CDRs são consideradas ou de um ou mais anticorpos humanos diferentes. Além disso, o termo "anticorpo quimérico" é pretendido abranger quaisquer das combinações supracitadas onde as combinações envolveram anticorpos humano e não humanos.

O termo "competição", como aqui usado com respeito a um anticorpo, significa que um primeiro anticorpo, ou uma porção de ligação de antígeno do mesmo, compete para ligação com um segundo anticorpo, ou uma porção de ligação de antígeno do mesmo, onde a ligação do primeiro anticorpo com seu epítipo cognato é detectavelmente diminuída na presença do segundo anticorpo comparado à ligação do primeiro anticorpo na ausência do segundo anticorpo. A alternativa, onde a ligação do segundo anticorpo ao seu epítipo é da mes-

ma forma detectavelmente diminuída na presença do primeiro anticorpo, pode, porém não necessariamente, ser o caso. Isto é, um primeiro anticorpo pode inibir a ligação de um segundo anticorpo a seu epítopo sem aquele segundo anticorpo que inibe a ligação do primeiro anticorpo ao seu respectivo epítopo. Entretanto, onde cada anticorpo detectavelmente inibe a ligação do outro anticorpo com seu epítopo cognato ou ligante, seja à mesma, maior ou menor extensão, os anticorpos são referidos para "competirem cruzado" um com o outro para ligação de seu(s) epítopo(s) respectivo(s). Tanto os anticorpos de competição quanto o de competição cruzada são abrangidos pela presente invenção. Independente do mecanismo por qual tal competição ou competição cruz ocorre (por exemplo, impedimento estérico, mudança conformacional, ou ligação a um epítopo comum, ou porção do mesmo), o técnico versado apreciaria, com base nos ensinamentos fornecidos aqui, que tais anticorpos de competição e/ou competição cruzada são abrangidos e podem ser úteis para os métodos descritos aqui.

Como o termo é usado aqui, uma "substituição de aminoácido conservadora" é aquela em que um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido que tem um grupo R de cadeia lateral com propriedades químicas similares (por exemplo, carga ou hidrofobicidade). Em geral, uma substituição de aminoácido conservadora não mudará substancialmente as propriedades funcionais de uma proteína. Em casos onde duas ou mais seqüências de aminoácido diferem-se uma da outra por substituições conservadoras, o percentual de similaridade de seqüência pode ser ajustado para cima para corrigir a natureza conservadora da substituição. Meios para preparar este ajuste são bem conhecidos por aqueles de experiência na técnica. Pearson, (1994) *Methods Mol. Biol.* 243:307-31. Exemplos de grupos de aminoácidos que têm cadeias laterais com propriedades químicas similares incluem 1) cadeias laterais alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; 2) cadeias laterais de hidroxila alifáticas: serina e treonina; 3) cadeias laterais contendo amida: asparagina e glutamina; 4) cadeias laterais aromáticas: fenilalanina, tirosina, e triptofano; 5) cadeias laterais básicas: lisina, arginina, e histidina; 6) cadeias laterais ácidas: ácido aspártico e ácido glutâmico; e 7) cadeias laterais contendo enxofre: cisteína e metionina. Grupos de substituição de aminoácidos conservadora podem ser, por exemplo, valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato, e asparagina-glutamina.

Uma substituição conservadora é da mesma forma qualquer mudança que tem um valor positivo na matriz de probabilidade de log PAM250 descrita em Gonnet e outro, (1992) *Science* 256:1443-45. Uma substituição "moderadamente conservadora" é qualquer mudança que tem um valor não negativo na matriz de probabilidade de log PAM250.

"Contatar" refere-se a trazer um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo da presente invenção e um CD44 alvo, ou epítopo do mesmo, junto de uma tal ma-

neira que o anticorpo pode afetar a atividade biológica do CD44. Tal "contatar" pode ser realizada "in vitro", por exemplo, em um tubo teste, uma placa de petri, ou similar. Em um tubo teste, contatar pode envolver apenas um anticorpo ou porção de ligação de antígeno e CD44 ou epítipo do mesmo ou pode envolver células inteiras. Células podem da mesma forma ser mantidas ou crescidas em placas de cultura de célula e contatadas com porções de ligação de antígeno ou anticorpos dos mesmos neste ambiente. Neste contexto, a capacidade de um anticorpo ou porção de ligação de antígeno particular do mesmo afetar um distúrbio relacionado à CD44, isto é, o IC₅₀ do anticorpo, pode ser determinada antes do uso do anticorpo *in vivo* com organismos vivos mais complexos ser possível. Para células fora do organismo, existem múltiplos métodos, e são bem conhecidos por aqueles versados na técnica, para contatar CD44 do mesmo com as porções de ligação de antígeno ou anticorpos.

Como aqui usado, o termo "ELISA" refere-se a um ensaio imunossorvente ligado à enzima unido. Este ensaio é bem conhecido por aqueles de experiência na técnica. Exemplos deste ensaio podem ser encontrados em Vaughan, T.J. e outro, (1996) Nat. Biotech. 14:309-314, bem como nos EXEMPLOS 5, 6, 7 e 11 do presente pedido.

O termo "epítipo" inclui qualquer proteína determinante capaz de ligação específica a um receptor de célula T ou imunoglobulina ou de outra maneira interação com uma molécula. Determinantes epitópicos geralmente consistem em agrupamentos de superfície quimicamente ativa de moléculas tais como aminoácidos ou carboidrato ou cadeias laterais de açúcar e geralmente têm características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específica. Um epítipo pode ser "linear" ou "conformacional". Em um epítipo linear, todos os pontos de interação entre a proteína e a molécula de interação (tal como um anticorpo) ocorrem linearmente ao longo da sequência de aminoácido primária da proteína. Em um epítipo conformacional, os pontos de interação ocorrem por resíduos de aminoácido na proteína que são separados um do outro. Entretanto, logo que um epítipo desejado em um antígeno é determinado, anticorpos para esse epítipo podem ser gerados, por exemplo, usando as técnicas descritas na presente invenção. Durante o processo de descoberta, a geração e caracterização de anticorpos podem da mesma forma elucidar informação a cerca de epítipos desejáveis. A partir desta informação, é em seguida possível avaliar competitivamente anticorpos para ligação ao mesmo epítipo. Uma abordagem para obter isto é conduzir estudos de competição cruzada para encontrar anticorpos que competitivamente ligam-se um ao outro, isto é, os anticorpos competem para ligação ao antígeno. Um processo de alta produtividade para "guardar" anticorpos com base em competição cruzada é descrito na Publicação PCT No. WO 03/48731.

O termo "sequência de controle de expressão" como aqui usado significa seqüências de polinucleotídeo que são necessárias para realizar a expressão e processamento de

seqüências de codificação às quais elas são ligadas. Seqüências de controle de expressão incluem a iniciação de transcrição apropriada, terminação, promotor e seqüências de realçador; sinais de processamento de ARN eficientes tais como entrançamento e sinais de poliadenilação; seqüências que estabilizam mRNA citoplásmico; seqüências que realçam a eficiência de translação (isto é, seqüência de consenso de Kozak); seqüências que realçam a estabilidade de proteína; e quando desejado, seqüências que realçam a secreção de proteína. A natureza de tais seqüências de controle difere dependendo do organismo hospedeiro; em procariotas, tais seqüências de controle incluem geralmente o promotor, sítio de ligação ribossômico, e seqüência de terminação de transcrição; em eucariotos, geralmente, tais seqüências de controle incluem os promotores e seqüência de terminação de transcrição. O termo "seqüências de controle" é pretendido incluir, em um mínimo, todos os componentes cuja presença é essencial para expressão e processamento, e pode da mesma forma incluir componentes adicionais cuja presença é vantajosa, por exemplo, seqüências líder e seqüências de par de fusão.

Como aqui usado, o termo "linha germinativa" refere-se às seqüências de nucleotídeo dos genes de anticorpo e segmentos de gene visto que eles são de parentes a descendências pelas células germinativas. Esta seqüência de linha germinativa é distinguida a partir das seqüências de nucleotídeo que codificam anticorpos em células B maduras que foram alteradas por eventos de hipermutação e recombinação durante o curso da maturação de célula B. Os anticorpos de linha germinativa da presente invenção são designados como g-1A9.A6.B9, g-2D1.A3.D12 e g-14G9.B8.B4.

Como aqui usado, o termo "anticorpo humano" significa qualquer anticorpo no qual as seqüências de domínio variáveis e constantes são seqüências humanas. O termo abrange anticorpos com seqüências derivadas de genes humanos, incluindo aqueles que foram mudados, por exemplo, para diminuir a possível imunogenicidade, aumentar a afinidade, eliminar resíduos de cisteína que podem causar a duplicação indesejável, etc. O termo da mesma forma abrange tais anticorpos produzidos recombinantemente em células não humanas, que não poderiam conceder glicosilação típica de células humanas. Estes anticorpos podem ser preparados em uma variedade de maneiras, como descrito abaixo.

Como aqui usado, o termo "anticorpo humanizado" refere-se a anticorpos de origem não natural, em que os resíduos de aminoácido são substituídos os quais são característicos de seqüências de anticorpo das espécies não humanas são substituídos com resíduos encontrados nas posições correspondentes de anticorpos humanos. Este processo de "humanização" é pensado reduzir a imunogenicidade em humanos do anticorpo resultante. Será apreciado que anticorpos de origem não humana podem ser humanizadas usando técnicas bem conhecidas na técnica. Winter e outro, (1993) *Immunol. Today* 14:43-46. O anticorpo de interesse pode ser criado por técnicas de ADN recombinantes para substituir o CH1,

CH2, CH3, domínios de articulação, e/ou o domínio de estrutura com a sequência humana correspondente. Publicação PCT No. WO 92/02190, e Patente U.S. Nos.: 5.530.101, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.792, 5.714.350, e 5.777.085. O termo "anticorpo humanizado", como aqui usado, também inclui dentro de seu significado, anticorpos humanos quiméricos e anticorpos enxertados com CDR. Anticorpos humanos quiméricos da invenção incluem o V_H e V_L de um anticorpo de uma espécie não humano e os domínios CH e CL de um anticorpo humano. Os anticorpos transplantados com CDR da invenção resultam da substituição de CDRs de V_H e V_L de um anticorpo humano com aqueles do V_H e V_L , respectivamente, de um anticorpo de um animal diferente de um humano.

O termo "polinucleotídeo isolado" como usado aqui significa um polinucleotídeo de origem genômica, cDNA, ou sintética ou uma combinação dos mesmos, que devido a sua origem o "polinucleotídeo isolado" (1) não está associado com toda ou uma porção de polinucleotídeos com que o "polinucleotídeo isolado" é encontrado na natureza, (2) é

operavelmente ligado a um polinucleotídeo ao qual não é ligado na natureza, ou (3) não ocorra na natureza como parte de uma sequência maior.

O termo "proteína isolada", "polipeptídeo isolado" ou "anticorpo isolado" é uma proteína, polipeptídeo ou anticorpo que devido a sua origem ou fonte de derivação: (1) não está associado com componentes naturalmente associados que acompanham em seu estado nativo; (2) está livre de outras proteínas das mesmas espécies; (3) é expresso por uma célula de uma espécie diferente; ou (4) não ocorrem na natureza. Desse modo, um polipeptídeo que é, por exemplo, quimicamente sintetizado ou sintetizado em um sistema celular diferente da célula da qual origina-se naturalmente será "isolado" de seus componentes naturalmente associados. Uma proteína pode da mesma forma ser tornada substancialmente livre de componentes naturalmente associados por isolamento, usando bem técnicas de purificação de proteína conhecidas na técnica.

Exemplos de anticorpos isolados incluem um anticorpo de CD44 que foi purificado por afinidade usando CD44, e um anticorpo de CD44 que foi sintetizado por uma linhagem celular in vitro.

"In vitro" refere-se a procedimentos realizados em um ambiente artificial tal como, por exemplo, sem limitação, em um tubo teste ou meio de cultura.

"In vivo" refere-se a procedimentos realizados dentro de um organismo vivo tal como, sem limitação, um mamífero, por exemplo, um macaco, camundongo, rato ou coelho.

O termo " K_D " refere-se à constante de equilíbrio de afinidade de ligação de uma interação anticorpo-antígeno particular. Um anticorpo é referido para especificamente ligar um antígeno quando a K_D é ≤ 1 nM, preferivelmente ≤ 100 nM e ainda mais preferivelmente ≤ 10 nM. Uma constante de afinidade de ligação K_D pode ser medida por ressonância de plasmônio de superfície, por exemplo, usando o sistema BIACORETM como discutido no

EXEMPLO 5.

O termo " k_{off} " recorre à constante de taxa de dissociação de uma interação anticorpo-antígeno particular. Uma constante de taxa de dissociação k_{off} pode ser medida por ressonância de plasmônio de superfície, por exemplo, usando o sistema BIACORE™ como discutido no EXEMPLO 5.

O termo "nucleotídeos de ocorrência natural" como aqui usado inclui desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos. O termo "nucleotídeos modificados" como aqui usado inclui, por exemplo, nucleotídeos com grupos de açúcar modificados ou substituídos.

O termo "ligações de oligonucleotídeo" referidas aqui inclui ligações de oligonucleotídeos tais como, por exemplo, fosfortioato, fosforoditioato,

fosforoselenoato, fosforodisselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforamidato, LaPlanche e outro, (1986) Nucl. Acids Res. 14:9081; Stec e outro, (1984) J. Am. Chem. Soc. 106:6077; Stein e outro, (1988) Nucl. Acids Res. 16:3209; Zon e outro, (1991) Anti-Cancer Drug Design 6:539; Zon e outro, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Patente U.S. No. 5.151.510; Uhlmann e Peyman, (1990) Chemical Reviews 90:543. Um oligonucleotídeo pode incluir um rótulo para detecção, se desejado.

"Sequências operavelmente ligadas" incluem ambas as sequências de controle de expressão que são contíguas com o gene de interesse e sequências de controle de expressão que agem em trans ou em uma distância para controlar o gene de interesse.

O termo "percentual da identidade de sequência" no contexto das sequências de ácido nucléico significa os resíduos em duas sequências que são as mesmas quando alinhadas para correspondência máxima. O comprimento da comparação de identidade de sequência pode ser em uma extensão de pelo menos cerca de nove nucleotídeos, normalmente pelo menos cerca de 18 nucleotídeos, mais normalmente pelo menos cerca de 24 nucleotídeos, tipicamente pelo menos cerca de 28 nucleotídeos, mais tipicamente pelo menos cerca de 32 nucleotídeos, e preferivelmente pelo menos cerca de 36, 48 ou mais nucleotídeos. Há vários algoritmos diferentes conhecidos na técnica que podem ser usados para medir a identidade de sequência de nucleotídeo. Por exemplo, sequências de polinucleotídeo podem ser comparadas usando FASTA, Gap ou Bestfit que são programas em Wisconsin Package Versão 10,0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA que inclui por exemplo, os programas FASTA2 e FASTA3, fornece alinhamentos e percentual de identidade de sequência das regiões da melhor sobreposição entre as sequências de investigação e pergunta (Pearson, (1990) Methods Enzymol. 183:63-98; Pearson, (2000) Methods Mol. Biol. 132:185-219; Pearson, (1996) Methods Enzymol. 266:227-258; Pearson, (1998) J. Mol. Biol. 276:71-84. A menos que de outra maneira especificado, parâmetros básicos para um programa particular ou algoritmo são usados. Por exemplo, percentual de

identidade de seqüência entre as seqüências de ácido nucléico pode ser determinado usando FASTA com seus parâmetros básicos (um tamanho de palavra de 6 e o fator de NOPAM para a matriz de contagem) ou usando Gap com seus parâmetros básicos como fornecido em GCG Versão 6.1.

5 Uma referência a uma seqüência de nucleotídeo abrange seu complemento a menos que de outra maneira especificado. Desse modo, uma referência a um ácido nucléico que tem uma seqüência particular deve ser entendido para abranger seu filamento complementar, com sua seqüência complementar.

10 O termo "percentual de identidade de seqüência" no contexto de seqüências de aminoácido significa os resíduos em duas seqüências que são as mesmas quando alinhadas para correspondência máxima. O comprimento de comparação da identidade de seqüência pode estar em uma extensão de pelo menos cerca de cinco aminoácidos, normalmente pelo menos cerca de 20 aminoácidos, mais normalmente pelo menos cerca de 30 aminoácidos, tipicamente pelo menos cerca de 50 aminoácidos, mais tipicamente pelo menos cerca de 15 100 aminoácidos, e ainda mais tipicamente cerca de 150, 200 ou mais aminoácidos. Há vários algoritmos diferentes conhecidos na técnica que podem ser usados para medir a identidade de seqüência de aminoácido. Por exemplo, seqüências de aminoácido podem ser comparadas usando FASTA, Gap ou Bestfit que são programas em Wisconsin Package Versão 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin.

20 Identidade de seqüência para polipeptídeos é tipicamente medida usando *software* de análise de seqüência. Software de análise de proteína compara as seqüências usando medidas de semelhança nomeadas à várias substituições, deleções e outras modificações, incluindo substituições de aminoácido conservadoras. Por exemplo, GCG contém programas tal como "Gap" e "Bestfit" que podem ser usados com parâmetros básicos como especificado pelos programas para determinar a homologia de seqüência ou identidade de seqüência entre os polipeptídeos intimamente relacionados, tais como polipeptídeos homólogos de espécies diferentes de organismos ou entre uma proteína tipo selvagem e um análogo da mesma. Veja, por exemplo, GCG Versão 6.1 (University of Wisconsin, WI). Seqüências de polipeptídeo podem ser comparadas usando FASTA que usa parâmetros básicos ou 25 recomendados, veja GCG Versão 6.1. FASTA (por exemplo, FASTA2 e FASTA3) fornece alinhamentos e percentual de identidade de sequencia das regiões da melhor sobreposição entre as seqüências de investigação e pergunta (Pearson, (1990) Methods Enzymol. 183:63-98; Pearson, (2000) Methods Mol. Biol. 132:185-219). Outro algoritmo preferido quando comparando uma seqüência da invenção a uma base de dados que contém um número 30 grande de seqüências de organismos diferentes é o programa de computação BLAST, especialmente blastp ou tblastn, usando parâmetros básicos quando fornecidos com os programas. Veja, por exemplo, Altschul e outro, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul e 35

outro, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389 - 402.

O comprimento das seqüências de polipeptídeo comparado quanto a homologia geralmente será pelo menos cerca de 16 resíduos de aminoácido, normalmente pelo menos cerca de 20 resíduos, mais normalmente pelo menos cerca de 24 resíduos, tipicamente pelo menos cerca de 28 resíduos, e preferivelmente mais que cerca de 35 resíduos. Ao procurar uma base de dados que contém seqüências de um número grande de organismos diferentes, é preferível comparar seqüências de aminoácido.

O termo "polinucleotídeo" como referido aqui significa uma forma polimérica de nucleotídeos de pelo menos 10 bases no comprimento, ribonucleotídeos ou desoxinucleotídeos ou uma forma modificada de qualquer tipo de nucleotídeo. O termo inclui formas de filamento único ou duplo.

O termo "polipeptídeo" abrange proteínas nativo ou artificiais, fragmentos de proteína e análogos de polipeptídeo de uma seqüência de proteína. Um polipeptídeo pode ser monomérico ou polimérico.

O termo "fragmento de polipeptídeo" como aqui usado refere-se a um polipeptídeo que tem uma deleção amino-terminal e/ou carbóxi-terminal, porém onde a seqüência de aminoácido restante é idêntica às posições correspondentes na seqüência de ocorrência natural. Em algumas modalidades, fragmentos tem pelo menos 5, 6, 8 ou 10 aminoácidos no comprimento. Em outras modalidades, os fragmentos tem pelo menos 14, pelo menos 20, pelo menos 50, ou pelo menos 70, 80, 90, 100, 150 ou 200 aminoácidos no comprimento.

O termo "célula hospedeira recombinante" (ou simplesmente "célula hospedeira"), como aqui usado, significa uma célula na qual um vetor de expressão recombinante foi introduzido. Deve ser entendido que "célula hospedeira recombinante" e "célula hospedeira" significa não apenas a célula objeto particular mas também a descendência de uma tal uma célula. Porque certas modificações podem ocorrer em gerações sucessivas devido à mutação ou influências ambientais, tal descendência não pode, na realidade, ser idêntica à célula de origem, porém ainda está incluída dentro do escopo do "célula hospedeira" como aqui usado.

Uma proteína ou polipeptídeo é "substancialmente puro," "substancialmente homogêneo", ou "substancialmente purificado" quando pelo menos cerca de 60 a 75% de uma amostra exibem uma única espécie de polipeptídeo. O polipeptídeo ou proteína pode ser monomérico ou multimérico. Uma proteína ou polipeptídeo substancialmente puro pode tipicamente compreender cerca de 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% em p/p de uma amostra de proteína, mais normalmente cerca de 95%, e preferivelmente pode ser mais de 99% puro. Pureza de proteína ou homogeneidade pode ser indicada por vários meios conhecidos na técnica, tal como eletroforese de gel de poliacrilamida de uma amostra de proteína seguido visualizando uma faixa de polipeptídeo no manchamento do gel com uma mancha bem co-

nhecida na técnica. Visto que alguém versado na técnica apreciará,

Resolução mais alta pode ser fornecida usando HPLC ou outros meios conhecidos na técnica para purificação.

O termo "similaridade significativa" ou "similaridade de seqüência substancial", ao referir-se a um ácido nucléico ou fragmento do mesmo, significa que quando idealmente alinhada com deleções ou inserções de nucleotídeo apropriadas com outro ácido nucléico (ou seu filamento complementar), há identidade de seqüência de nucleotídeo em pelo menos cerca de 85%, preferivelmente pelo menos cerca de 90%, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% das bases de nucleotídeo, quando medidas por qualquer algoritmo bem conhecido da identidade de seqüência, tal como FASTA, BLAST ou Gap, como discutido acima.

Como aplicado aos polipeptídeos, o termo "identidade substancial" ou "similaridade significativa" significa que duas seqüências de aminoácido, quando idealmente alinhadas, tais como pelos programas GAP ou BESTFIT que usa pesos de abertura básicos como fornecidos com os programas, compartilha pelo menos 70%, 75% ou 80% de similaridade de seqüência, preferivelmente pelo menos 90% ou 95% de identidade de seqüência, e mais preferivelmente pelo menos 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de seqüência. Em certas modalidades, posições de resíduo que não são idênticas diferem-se por substituições de aminoácido conservadoras.

O termo "ressonância de plasmônio de superfície", como aqui usado, refere-se a um fenômeno ótico que permite a análise de interações bioespecíficas de tempo real por detecção de alterações em concentrações de proteína dentro de uma matriz de biosensor, por exemplo, usando o sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden e Piscataway, N. J.). Para descrições adicionais, veja Jonsson U. e outro, (1993) a Ann. Biol. Clin. 51 :19-26; Jonsson U. e outro, (1991) Biotechniques 11 :620-627; Jonsson B. e outro, (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; e Johnsson B. e outro, (1991) Anal. Biochem. 198:268-277.

"Quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se àquela quantidade do agente terapêutico a ser administrado que aliviará até certo ponto um ou mais dos sintomas do distúrbio a ser tratado. Em referência ao tratamento de artrite reumatóide, uma quantidade terapeuticamente eficaz refere-se àquela quantidade que tem pelo menos um dos seguintes efeitos: reduzir o o dano estrutural das articulações; inibir (isto é, reduzir até certo ponto, preferivelmente interromper) ao acúmulo de fluido na área da articulação comum; e aliviar até certo ponto (ou, preferivelmente, eliminar) um ou mais sintomas associados com artrite reumatóide.

"Tratar", "tratando" e "tratamento" referem-se a um método de aliviar ou ab-rogar um distúrbio biológico e/ou seus sintomas auxiliares. Com respeito a uma variedade de do-

ença auto-imune, tal como artrite reumatóide, aterosclerose, doenças granulomatosas e esclerose múltipla, estes termos simplesmente significam que a expectativa de vida de um indivíduo afetado com uma doença de autoimune será aumentada ou que um ou mais dos sintomas da doença será reduzido.

5 Como aqui usado, o termo "utiliza" com referência a um gene particular significa que a seqüência de aminoácido de uma região particular em um anticorpo foi derivada finalmente desse gene durante a maturação de célula B. Por exemplo, a frase "uma seqüência de aminoácido de região variável de cadeia pesada que utiliza um gene da família V_H-3 humana" refere-se à situação onde a região de V_H do anticorpo foi derivada da família de
10 V_H-3 de segmentos de gene durante a maturação de B-célula. Em células B humanas, há mais de 30 genes variáveis de cadeia pesada funcionais distintas que geram anticorpos. Uso de um gene variável de cadeia pesada particular, portanto, é indicativo de um motivo de ligação preferido da interação anticorpo-antígeno com respeito às propriedades combinadas de ligação ao antígeno e atividade funcional. Como será apreciado, análise de utilização de
15 gene fornece apenas uma avaliação limitada de estrutura de anticorpo. Como células B humanas estocasticamente geram transcrições de cadeia leve de capa V-J ou pesada V-D-J, há vários processos secundários que ocorrem, incluindo, sem limitação, hipermutação somática, n-adições, e extensões de CDR3. Veja, por exemplo, Mendez e outro Nature Genetics 15:146-156 (1997).

20 Como aqui usado, os vinte aminoácidos convencionais e suas abreviações seguem o uso convencional. Veja Immunology - A Synthesis (2ª Edição, E. S. Golub e D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, MA (1991)).

O termo "vetor", como aqui usado, significa uma molécula de ácido nucléico capaz de transportar outro ácido nucléico ao qual foi unido. Em algumas modalidades, o vetor é um
25 plasmídeo, isto é, uma peça de filamento duplo circular de ADN em que os segmentos de ADN adicionais podem ser ligados. Em uma modalidade, o vetor é um vetor viral, em que os segmentos de ADN adicionais podem ser ligados no genoma viral. Em uma modalidade, os vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira na qual eles são apresentados (por exemplo, vetores bacterianos tendo uma origem bacteriana de vetores
30 mamíferos epissômico e replicação). Em outra modalidade, os vetores (por exemplo, vetores mamíferos não epissômicos) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira na introdução na célula hospedeira, e desse modo são replicados junto com o genoma hospedeiro. Além disso, certos vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais eles são operavelmente ligados. Tais vetores são referidos aqui como "vetores de expressão
35 recombinantes" (ou simplesmente, "vetores de expressão").

Como aqui usado, os termos "rótulo" ou "rotulado" referem-se a incorporação de outra molécula no anticorpo. Em uma modalidade, o rótulo é um marcador delectável, por

exemplo, incorporação de um aminoácido radiorrotulado ou ligação a um polipeptídeo de porções de biotinila que podem ser detectadas por avidina marcada (por exemplo, estreptavidina contendo um marcador fluorescente ou atividade enzimática que pode ser detectada por métodos óticos ou colorimétricos). Em outra modalidade, o rótulo ou marcador pode ser terapêutico, por exemplo, uma toxina ou conjugado de fármaco. Vários métodos de rotular polipeptídeos e glicoproteínas são conhecidos na técnica e podem ser usados. Exemplos de rótulos para polipeptídeos incluem, porém não são limitados aos seguintes: radioisótopos ou radionuclídeos, rótulos fluorescentes (por exemplo, FITC, rodamina, lantanídeo fósforos), rótulos enzimáticos, marcadores quimioluminescentes, grupos biotinila, epítopos de polipeptídeo pré-determinados reconhecidos por um receptor secundário (por exemplo, sequências de par de zipper de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, rótulos de epítipo), agentes magnéticos, tais como quelatos de gadolínio, toxinas da coqueluche, taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposídeo, tenoposídeo, vincristina, vimblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorubicina, diidróxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotestosterona, glicocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, e puromicina e análogos ou homólogos dos mesmos. Em algumas modalidades, rótulos são ligados por ramificações espaçadoras de vários comprimentos para reduzir o impedimento estérico potencial.

A lisina C-terminal da cadeia pesada do anticorpo anti-CD44 da invenção pode ser clivada quando o anticorpo é recombinantemente produzido como um resultado da atividade de uma ou mais carboxipeptidases quando o anticorpo é expresso em cultura de célula de mamífero (Lewis D. A., e outro, *Anal. Chem*, 66(5): 585-95 (1994); Harris R. J., *J. of Chromatography A*, 705: 129-134 (1995)). Várias variações da estrutura esperada podem ser encontradas em anticorpos recombinantemente produzidos que resultam de tipos conhecidos ou novos de modificação in vivo (pós-translacional) ou da degradação de proteína espontânea (não enzimática), tal como oxidação de metionina, formação de dicetopiperazina, isomerização de aspartato e desamidação de resíduos de asparagina, ou formação de succinimida.

Anticorpos anti-CD44 humanos e Caracterização Dos Mesmos

Esta invenção fornece anticorpos humanos isolados, ou porções de ligação de antígeno dos mesmos, que ligam-se ao CD44 humano. Vários aspectos da invenção referem a tais porções de ligação de antígeno e anticorpos, e composições farmacêuticas dos mesmos, bem como ácidos nucleicos, vetores de expressão recombinantes e células hospedeiras para preparar tais porções de ligação de antígeno e anticorpos. Métodos de usar as porções de ligação de antígeno e anticorpos da presente invenção para detectar CD44 humano ou inibir a atividade de CD44 humano, ou in vitro ou in vivo, são da mesma forma abrangentes.

dos pela invenção. Anticorpos anti-CD44 humanos de acordo com modalidades preferidas da presente invenção minimizam as respostas imunogênicas e alérgicas intrínsecas aos anticorpos monoclonais derivados não humanos ou não humanos (Mabs) e desse modo aumenta a eficácia e segurança dos anticorpos administrados. O uso de anticorpos completamente humanos fornece uma vantagem substancial no tratamento de doenças humanas recorrentes e crônicas, tal como artrite reumatóide, Artrite reumatóide Juvenil, aterosclerose, doenças granulomatosas, esclerose múltipla, asma, Doença de Crohn, Espondilite Ancilossante, Artrite Psoriática, Psoríase de Placa e câncer, que podem requerer administrações de anticorpo repetidas.

O aminoácido de CD44 e seqüências de nucleotídeo de várias espécies, incluindo humanas, são conhecidas, SEQ ID NO: 1 e 2 (veja, por exemplo, No. Acesso NM_001001391). CD44 humano, ou porções antigênicas dos mesmos, podem ser preparados de acordo com métodos bem conhecidos por aqueles na técnica, ou podem ser adquiridos de vendedores comerciais (para por exemplo, de R&D Systems Cat. No. 861-PC-100). O aminoácido de CD44 e seqüências de nucleotídeo de macaco cinomolgos, não são conhecidos na técnica e são descritos aqui, SEQ ID NOs: 5, 7 (aminoácido), 8 e 153 (ácido nucléico).

Em algumas modalidades, anticorpos anti-CD44 humanos são produzidos imunizando-se um animal transgênico não humana, por exemplo, um roedor, cujo genoma compreende genes de imunoglobulina humana para que os genes animal transgênico produza anticorpos humanos. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-CD44 e porções de ligação de antígeno incluem, porém não são limitadas a, anticorpos ou porções de ligação de antígeno que ligam-se ao sítio de ligação de HA.

Em uma outra modalidade, a presente invenção fornece um anticorpo ou porção de ligação de antígeno, em que o referido anticorpo ou porção de ligação de antígeno compreende pelo menos uma CDR selecionada a partir de: uma CDR1 de V_H que é selecionada independentemente de qualquer uma de SEQ ID NOs: 17, 53, 89 e 125 ou uma seqüência que difere de qualquer uma de SEQ ID NOs: 17, 53, 89 e 125 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservadora; uma CDR2 de V_H que é selecionada independentemente de qualquer uma de SEQ ID NOs: 19, 55, 91 e 127 ou uma seqüência que difere de qualquer uma de SEQ ID NOs: 19, 55, 91 e 127 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservadora; e uma CDR3 de V_H que é selecionada independentemente de qualquer uma de SEQ ID NOs: 21, 57, 93 e 129 ou uma seqüência que difere de qualquer uma de SEQ ID NOs: 21, 57, 93 e 129 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservadora. Por exemplo, as seqüências de CDR1, CDR2, e CDR3 de V_H mencionadas acima podem cada qual independentemente diferir-se da SEQ ID NOs relacionadas respectivas por 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições de aminoácido conservadoras.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo, em que o referido anticorpo ou porção de ligação de antígeno compreende pelo menos uma CDR selecionada de: uma CDR1 de V_L que é selecionado independentemente a partir de qualquer uma de SEQ ID NOs: 23, 59, 95 e 131 ou uma sequência que difere a partir de qualquer uma de SEQ ID NOs: 23, 59, 95 e 131 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservadora; uma CDR2 de V_L que é selecionada independentemente a partir de qualquer uma de SEQ ID NOs: 25, 61, 97 e 133 ou uma sequência que difere a partir de qualquer uma de SEQ ID NOs: 25, 61, 97 e 133 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservadora; e uma CDR3 de V_L que é selecionada independentemente a partir de qualquer uma de SEQ ID NOs: 27, 63, 99 e 137 ou uma sequência que difere a partir de qualquer uma de SEQ ID NOs: 27, 63, 99 e 135 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservadora. Por exemplo, as sequências de CDR1, CDR2, e CDR3 de V_L mencionadas acima podem cada qual independentemente diferir-se das SEQ ID NOs relacionadas respectivas por 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições de aminoácido conservadoras.

Em ainda um outro aspecto da presente invenção um anticorpo ou porção de ligação de antígeno compreende: uma CDR1 de V_H como mencionada em SEQ ID NO: 17, uma CDR2 de V_H como mencionada em SEQ ID NO: 19, uma CDR3 de V_H como mencionada em SEQ ID NO: 21, uma CDR1 de V_L como mencionada em SEQ ID NO: 23, uma CDR2 de V_L como mencionada em SEQ ID NO: 25, e uma CDR3 de V_L como mencionada em SEQ ID NO: 27.

Em ainda um outro aspecto da presente invenção um anticorpo ou porção de ligação de antígeno compreende: uma CDR1 de V_H como mencionado em SEQ ID NO: 53, uma CDR2 de V_H como mencionado em SEQ ID NO: 55, uma CDR3 de V_H como mencionado em SEQ ID NO: 57, uma CDR1 de V_L como mencionado em SEQ ID NO: 59, uma CDR2 de V_L como mencionado em SEQ ID NO: 61, e uma CDR3 de V_L como mencionado em SEQ ID NO: 63.

Em ainda um outro aspecto da presente invenção um anticorpo ou porção de ligação de antígeno compreende: uma CDR1 de V_H como mencionado em SEQ ID NO: 89, uma CDR2 de V_H como mencionado em SEQ ID NO: 91, uma CDR3 de V_H como mencionado em SEQ ID NO: 93, uma CDR1 de V_L como mencionado em SEQ ID NO: 95, uma CDR2 de V_L como mencionado em SEQ ID NO: 97, e uma CDR3 de V_L como mencionado em SEQ ID NO: 99.

Em ainda outro aspecto da presente invenção um anticorpo ou porção de ligação de antígeno compreende: uma CDR1 de V_H como mencionado em SEQ ID NO: 125, uma CDR2 de V_H como mencionado em SEQ ID NO: 127, uma CDR3 de V_H como mencionado em SEQ ID NO: 129, uma CDR1 de V_L como mencionado em SEQ ID NO: 131, uma CDR2

de V_L como mencionado em SEQ ID NO: 133, e uma CDR3 de V_L como mencionado em SEQ ID NO: 135

Em uma outra modalidade, a CDR1, CDR2 de V_H e V_L , e sequências de CDR3 mencionadas acima podem da mesma forma cada qual diferir a partir do SEQ ID NOs específico recitados acima por pelo menos uma substituição de aminoácido conservadora. Por exemplo, as sequências de CDR1, CDR2, e CDR3 podem cada qual independentemente diferir por 1, 2, 3, 4, ou 5 substituições de aminoácido conservadoras a partir da SEQ ID NOs específica respectiva recitada acima.

A presente invenção também fornece um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo em que o referido anticorpo ou porção de ligação de antígeno compreende a CDR1 de V_H e V_L , a CDR2 de V_H e V_L , e a CDR3 de V_H e V_L como encontrado em qualquer um dos anticorpos 1A9.A6.B9; 2D1.A3.D12; 14G9.B8.B4 e 10C8.2.3.

Em uma outra modalidade, o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo compreendendo um domínio de V_H que é qualquer de SEQ ID NOs: 11, 47, 83 e 119, ou difere a partir de qualquer um de SEQ ID NOs: 11, 47, 83 e 119 tendo pelo menos uma substituição de aminoácido conservadora. Por exemplo, o domínio de V_H pode diferir em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 substituições de aminoácido conservadoras a partir de qualquer de SEQ ID NOs: 11, 47, 83 e 119. Em uma outra modalidade, quaisquer destas substituições de aminoácido conservadoras pode ocorrer nas regiões de CDR1, CDR2, e/ou CDR3.

Um outro aspecto da presente invenção é um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo compreendendo um domínio de V_H que é pelo menos 90%, preferivelmente 95%, e mais preferivelmente 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntico em sequência de aminoácido para qualquer de SEQ ID NOs: 11, 47, 83 e 119.

Em uma outra modalidade, o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo compreende um domínio de V_L que é qualquer de SEQ ID NOs: 15, 51, 87 e 123, ou difere a partir de qualquer de SEQ ID Nos: 15, 51, 87 e 123 tendo pelo menos uma substituição de aminoácido conservadora. Por exemplo, o domínio de V_L pode diferir em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 substituições de aminoácido conservadoras a partir de qualquer de SEQ ID NOs: 15, 51, 87 e 123. Em uma outra modalidade, quaisquer destas substituições de aminoácido conservadoras pode ocorrer nas regiões de CDR1, CDR2, e/ou CDR3.

Um outro aspecto da presente invenção é um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo compreendendo um domínio de V_L que é pelo menos 90%, preferivelmente 95%, e mais preferivelmente 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntico em sequência de aminoácido a qualquer dentre SEQ ID NOs: 15, 51, 87 e 123.

Em outro aspecto da presente invenção o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo é selecionada a partir do grupo que consiste em: a) um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo que compreende um domínio de V_H como mencionado

SEQ ID NO:11, e um domínio de V_L como mencionado em SEQ ID NO: 15; b) um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo que compreende um domínio de V_H como mencionado em SEQ ID NO:47, e um domínio de V_L como mencionado em SEQ ID NO:51; c) um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo que compreende um domínio de V_H como mencionado em SEQ ID NO:83 e um domínio de V_L como mencionado em SEQ ID NO:87; e d) um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo que compreende um domínio de V_H como mencionado em SEQ ID NO:119 e um domínio de V_L como mencionado em SEQ ID NO:123.

Em uma outra modalidade, para quaisquer dos anticorpos ou porções de ligação de antígeno dos mesmos como descrito acima em grupos a) a d) os domínios de V_H e/ou V_L podem diferir a partir da SEQ ID NOs específica recitada aqui por pelo menos uma substituição de aminoácido conservadora. Por exemplo, os domínios de V_H e/ou V_L podem diferir a partir da SEQ ID NO recitada por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 substituições de aminoácido conservadoras. Em uma outra modalidade, quaisquer destas substituições de aminoácido conservadoras pode ocorrer nas regiões de CDR1, CDR2, e/ou CDR3.

Em ainda outro aspecto, a presente invenção é um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo que é selecionado a partir do grupo que consiste em: a) um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo que compreende uma cadeia pesada que é pelo menos 90%, preferivelmente 95%, e mais preferivelmente 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica em sequência de aminoácido a SEQ ID NO:9, e uma cadeia leve que é pelo menos 90%, preferivelmente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica em sequência de aminoácido a SEQ ID NO: 13; b) um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo que compreende uma cadeia pesada que é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido a SEQ ID NO:45, e uma cadeia leve que é pelo menos preferivelmente 95% 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a SEQ ID NO:49; c) um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo que compreende uma cadeia pesada que é pelo menos 95%, mais preferivelmente 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a SEQ ID NO:81, e uma cadeia leve que é 95%, preferivelmente 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a SEQ ID NO:85; e d) um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo que compreende uma cadeia pesada que é pelo menos 90% idêntica para SEQ ID NO:117, e uma cadeia leve que é preferivelmente 95%, mais preferivelmente 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a SEQ ID NO:121.

Em outra modalidade, a presente invenção é um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo que é selecionada a partir do grupo que consiste em: a) um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo que compreende uma cadeia pesada mencionada em SEQ ID NO:9, e uma cadeia leve como mencionado em SEQ ID NO: 13; b) um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo que compreende uma cadeia pesada

como mencionado em SEQ ID NO:45 e uma cadeia leve como mencionado em SEQ ID NO:49; c) um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo que compreende uma cadeia pesada mencionada em SEQ ID NO:81, e uma cadeia leve como mencionado em SEQ ID NO:85; e d) um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo que compreende uma cadeia pesada que é mencionada em SEQ ID NO:117, e uma cadeia leve que é mencionada em SEQ ID NO:121.

Em algumas modalidades, a lisina C-terminal da cadeia pesada do anticorpo anti CD44 da invenção é clivada (Lewis D. A., e outro, *Anal. Chem*, 66(5): 585 - 95 (1994); Harris R. J., J. de *Chromotography*, 705: 129-134 (1995)).

Em várias modalidades da invenção, a(s) cadeia(s) pesada(s) e/ou leve(s) dos anticorpos anti-CD44 ou porção de ligação de antígeno do mesmo pode opcionalmente incluir uma sequência de sinal.

A invenção também fornece anticorpos de CD44 ou porções de ligação de antígeno do mesmo em que o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo, ou CDR(s) do mesmo como descrito tem pelo menos uma de várias propriedades funcionais como descrito abaixo em A) a G).

A) por exemplo, em uma modalidade, os anticorpos ou porções de ligação de antígeno do mesmo ligam-se a CD44 com uma K_D de 1000 nM ou menos como medido através de ressonância de plasmônio de superfície. Em uma outra modalidade, o anticorpo ou porção liga-se a CD44 com uma K_D menor que 500 nM ou preferivelmente, menor que 100 nM, menor que 50 nM, menor que 20 nM, menor que 10 nM, menor que 5 nM, menor que 4 nM, menor que 3 nM, menor que 2 nM, menor que 1 nM, menor que 900 pM, menor que 800 pM, menor que 700 pM, menor que 600 pM, menor que 500 pM, ou menor que 100 pM, como medido por ressonância de plasmônio de superfície. Tipicamente, não há limite inferior no valor de K_D . Para propósitos práticos, entretanto, o limite inferior pode ser assumido a cerca de 1 pM.

B) Em outra modalidade, os anticorpos ou porções de ligação de anticorpo do mesmo têm uma taxa (k_{off}) para CD44 menor que ou igual a $0,01^{s^{-1}}$ como medido por ressonância de plasmônio de superfície. Por exemplo, em certas modalidades o anticorpo ou porção tem uma K_{off} para CD44 menor que $0,005^{s^{-1}}$, menor que $0,004^{s^{-1}}$, menor que $0,003^{s^{-1}}$, menor que $0,002^{s^{-1}}$, ou menor que $0,001^{s^{-1}}$. Tipicamente, não há limite inferior para o valor de k_{off} . Para propósitos práticos, entretanto, o limite inferior pode ser assumido em cerca de $1 \times 10^{-7s^{-1}}$.

C) Em uma outra modalidade os anticorpos ou porções de ligação de antígeno do mesmo ligam-se a CD44 com um EC_{50} menor que 500 nM, 75 $\mu g/ml$ como medido por ensaio de ligação de ELISA ou FACS. Em uma outra modalidade, o anticorpo ou porção liga-se a CD44 com um EC_{50} menor que 100 nM, menor que 50 nM, menor que 20 nM, menor

que 10 nM, menor que 1 nM, menor que 500 pM, ou menor que 100 pM, como medido por ELISA. Preferivelmente, o anticorpo ou porção liga-se a CD44 com um EC_{50} menor que 10 nM, 1,5 μ g/ml. Tipicamente, entretanto, não há limite inferior no valor de EC_{50} . Para propósitos práticos, entretanto, o limite inferior pode ser assumido em cerca de 1 pM.

5 D) Em ainda outra modalidade, os anticorpos ou porções de ligação de antígeno do mesmo inibem a interação entre CD44 e HA com um IC_{50} menor que 500 nM, 75 μ g/ml como medido por um ensaio de ligação ELISA. Em uma outra modalidade, o anticorpo ou porção liga-se a CD44 com um IC_{50} menor que 100 nM, menor que 50 nM, menor que 20 nM, menor que 10 nM, menor que 5 nM, menor que 4 nM, menor que 3 nM, menor que 2
10 nM, menor que 1 nM, menor que 500 pM, ou menor que 100 pM, como medido por um ensaio de ligação ELISA.

E) Em ainda outra modalidade, os anticorpos ou porções de ligação de antígeno do mesmo reduzem a expressão de superfície *in vivo* e monócitos e em um IC_{50} menor que cerca de 100 nM, como medido por FACS.

15 F) Em outra modalidade, os ou anticorpos porções de ligação de antígeno reduzem a expressão de superfície de receptores de CD44 *in vitro* com um IC_{50} menor que 50 nM, menor que 20 nM, menor que 10 nM, menor que 1 nM, menor que 500 pM, ou menor que 100 pM, menor que cerca de 20 nM, menor que cerca de 10 nM, ou menor que cerca de 5 nM) como medido por FACS. Preferivelmente, o anticorpo ou porção de ligação de antígeno
20 reduz a expressão de superfície de receptores de CD44 com um IC_{50} menor que 30 nM, 4,5 μ g/ml. Para propósitos práticos, entretanto, o limite inferior pode ser assumido ser cerca de 1 pM.

G) Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD44 ou porções de ligação de antígeno do mesmo têm seletividade para CD44 sobre proteína de hiauronano endotelial de vaso lin-
25 fático 1 (LYVE-1) por pelo menos 100 vezes.

Em uma modalidade, a invenção fornece anticorpos monoclonais anti-CD44 humanos (mAbs), designados como: 1A9.A6.B9; 2D1.A3.D12; 14G9.B8.B4; e 10C8.2.3; e as linhagens celulares de hibridoma que os produzem. TABELAS 1 e 9-12 do pedido mostram os identificadores de sequência (SEQ ID NOs:) dos ácidos nucléico codificando as cadeias
30 pesadas e leves de tamanho natural, as sequências de aminoácido deduzidas de tamanho natural correspondente, e o nucleotídeo e sequências de aminoácido deduzidos das regiões variáveis de cadeia leve e pesada.

Em modalidades, anticorpos são IgGs designados como: 1A9.A6.B9; 2D1.A3.D12; 14G9.B8.B4; e 10C8.2.3. As sequências de aminoácido específicas das porções de ligação
35 de antígeno ou anticorpos do mesmo ou domínios de anticorpo da presente invenção são descritas nas Tabelas 9, 10, 11 & 12, e FIG. 2.

Em uma modificação de modalidade, o V_L do anticorpo de CD44 compreende uma

ou mais substituições de aminoácido relativo à sequência de aminoácido de linha germinativa do gene humano. Em algumas modalidades, o V_L do anticorpo anti-CD44 compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 substituições de aminoácido relativo à sequência de aminoácido de linha germinativa. Em uma modalidade, uma ou mais daquelas substituições a partir da

5 linha germinativa está nas regiões de CDR da cadeia leve. Em uma modalidade, as substituições de aminoácido relativo à linha germinativa estão em uma ou mais das mesmas posições como as substituições relativas à linha germinativa em qualquer um ou mais dos anticorpos de V_L 1A9.A6.B9; 2D1.A3.D12; 14G9.B8.B4; e 10C8.2.3. Por exemplo, o V_L de um anticorpo anti-CD44 da invenção pode conter uma ou mais substituições de aminoácido

10 comparadas à linha germinativa encontrada no anticorpo de V_L 1A9.A6.B9. Em algumas modalidades, as mudanças de aminoácido estão em uma ou mais das mesmas posições, porém envolvem uma substituição diferente do que no anticorpo de referência.

Em uma modalidade, mudanças de aminoácido relativo à linha germinativa ocorrem em uma ou mais das mesmas posições como em qualquer do V_L de anticorpos 1 A9.A6.B9;

15 2D1.A3.D12; 14G9.B8.B4 e 10C8.2.3, porém as mudanças podem representar substituições de aminoácido conservadoras em tal(is) posição(ões) relativo ao aminoácido no anticorpo de referência. Por exemplo, se uma posição particular em um destes anticorpos for mudada relativo à linha germinativa e for glutamato, alguém pode substituir aspartato nessa posição. Similarmente, se uma substituição de aminoácido comparada à linha germinativa for serina,

20 alguém pode conservativamente substituir treonina em serina nessa posição. Substituições de aminoácido conservadoras são supra discutidas.

Em algumas modalidades, a cadeia leve do anticorpo anti-CD44 humano compreende a sequência de aminoácido de V_L de anticorpo 1A9.A6.B9 (SEQ ID NO:15); 2D1.A3.D12 (SEQ ID NO:51); 14G9.B8.B4 (SEQ ID NO:87) ou 10C8.2.3 (SEQ ID NO: 123)

25 ou a referida sequência de aminoácido tendo até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 substituições de aminoácido conservadoras e/ou um total de até 3 substituições de aminoácido não conservadoras. Em algumas modalidades, a cadeia leve compreende a sequência de aminoácido desde o princípio do CDR1 para o final do CDR3 de qualquer um dos anticorpos anteriores.

Em algumas modalidades, a cadeia leve pode compreender regiões CDR1, CDR2 e CDR3 selecionadas a partir da cadeia leve CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente, independentemente da cadeia leve de anticorpos 1A9.A6.B9; 2D1.A3.D12; 14G9.B8.B4 e 10C8.2.3, ou regiões de CDR cada qual tendo menor que 4 ou menor que 3 substituições de aminoácido conservadoras e/ou um total de três ou menos substituições de aminoácido não

35 conservadoras. Em algumas modalidades, a cadeia leve do anticorpo anti-CD44 compreende uma cadeia leve CDR1, CDR2, e CDR3 cada das quais são independentemente selecionadas a partir das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve do anticorpo monoclonal

1A9.A6.B9 (SEQ ID NO:13); 2D1.A3.D12 (SEQ ID NO:49); 14G9.B8.B4 (SEQ ID NO:85) ou 10C8.2.3 (SEQ ID NO: 121). Em certas modalidades, a cadeia leve do anticorpo anti-CD44 compreende as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve de um anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido da região de V_L de um anticorpo selecionado a partir de
 5 1A9.A6.B9 (SEQ ID NO:15); 2D1.A3.D12 (SEQ ID NO:51); 14G9.B8.B4 (SEQ ID NO:87) ou 10C8.2.3 (SEQ ID NO:123) ou as referidas regiões de CDR cada qual tendo menor que 4 ou menor que 3 substituições de aminoácido conservadoras e/ou um total de três ou menos substituições de aminoácido não conservadoras.

Um anticorpo anti-CD44 da invenção pode compreender uma cadeia leve de capa
 10 humana ou uma lambda humana ou uma sequência de aminoácido derivadas destas. Em algumas modalidades compreendendo uma cadeia leve de capa, o domínio variável de cadeia leve (V_L) é codificado em parte por um gene da família de VK1, V.2 ou V_k3 humano. Em certas modalidades, a cadeia leve utiliza uma sequência de aminoácido humana, ou de macaco ou combinação do mesmo.

15 Com respeito às cadeias pesadas, em uma modalidade, os domínios variáveis (V_H) são codificados, em parte, por um gene humano. Em algumas modalidades, a sequência de V_H do anticorpo anti-CD44 contém uma ou mais substituições de aminoácido, deleções ou inserções (adições) relativo à sequência de aminoácido de linha germinativa. Em algumas modalidades, o domínio variável da cadeia pesada compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,
 20 11, 12, 13, 14, 15, 16, ou 17 mutações a partir da sequência de aminoácido de linha germinativa. Em algumas modalidades, a(s) mutação(ões) são substituições não conservadoras, deleções ou inserções, comparadas à sequência de aminoácido de linha germinativa. Em algumas modalidades, as mutações estão nas regiões de CDR da cadeia pesada. Em algumas modalidades, as mudanças de aminoácido são feitas em uma ou mais das mesmas
 25 posições como as mutações a partir de linha germinativa em qualquer um ou mais dos anticorpos de V_H 1A9.A6.B9; 2D1.A3.D12; 14G9.B8.B4 ou 10C8.2.3. Em outras modalidades, as mudanças de aminoácido estão em uma ou mais das mesmas posições porém envolvem uma mutação diferente do que no anticorpo de referência.

Em algumas modalidades, a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácido de V_H de anticorpo 1A9.A6.B9 (SEQ ID NO:11); 2D1.A3.D12 (SEQ ID NO:47);
 30 14G9.B8.B4 (SEQ ID NO:83) ou 10C8.2.3 (SEQ ID NO:119) a referida sequência de aminoácido de V_H tendo até 1, 2, 3, 4, 6, 8, ou 10 substituições de aminoácido conservadoras e/ou um total de até 3 substituições de aminoácido não conservadoras. Em algumas modalidades, a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácido desde o princípio do CDR1
 35 ao final do CDR3 de qualquer um dos anticorpos anteriores.

Em uma modalidade, a cadeia pesada compreende as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada de anticorpo 1A9.A6.B9; 2D1.A3.D12; 14G9.B8.B4 ou 10C8.2.3 ou

as referidas regiões de CDR cada qual tendo menor que 8, menor que 6, menor que 4, ou menor que 3 substituições de aminoácido conservadoras e/ou um total de três ou menos substituições de aminoácido não conservadoras. Em algumas modalidades, as regiões de CDR de cadeia pesada são independentemente selecionadas a partir das regiões de CDR de anticorpos 1 A9.A6.B9; 2D1.A3.D12; 14G9.B8.B4 ou 10C8.2.3. Em outra modalidade, a cadeia pesada compreende regiões de CDR independentemente selecionadas a partir de duas ou mais regiões de V_H selecionadas a partir de 1A9.A6.B9 (SEQ ID NO:1 1); 2D1.A3.D12 (SEQ ID NO:47); 14G9.B8.B4 (SEQ ID NO:83) ou 10C8.2.3 (SEQ ID NO:119).

Em outra modalidade, o anticorpo compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada. Em uma outra modalidade, as CDRs de cadeia leve e as CDRs de cadeia pesada são do mesmo anticorpo.

Um tipo de substituição de aminoácido que pode ser feita é mudar uma ou mais cisteínas no anticorpo, que pode ser quimicamente reativa, a outro resíduo, tal como, sem limitação, alanina ou serina. Em uma modalidade, há uma substituição de uma cisteína não canônica. A substituição pode ser feita em uma região de CDR ou estrutura de um domínio variável ou no domínio constante de um anticorpo. Em algumas modalidades, a cisteína é canônica.

Outro tipo de substituição de aminoácido que pode ser feita é mudar quaisquer sítios proteolíticos potenciais no anticorpo. Tais locais podem ocorrer em uma região de CDR ou estrutura de um domínio variável ou no domínio constante de um anticorpo. Substituição de resíduos de cisteína e remoção de sítios proteolíticos pode diminuir o risco de qualquer heterogeneidade no produto de anticorpo e desse modo aumentar sua homogeneidade. Outro tipo de substituição de aminoácido é eliminar pares de asparagina-glicina, que forma sítios de desamidação potenciais, alterando-se um ou ambos os resíduos.

Em modalidades da invenção, as cadeias pesadas e leves dos anticorpos anti-CD44 podem opcionalmente incluir uma sequência de sinal.

Em um aspecto, a invenção fornece quatro anticorpos monoclonais anti-CD44 humanos inibitórios preferidos e as linhagens celulares de hibridoma que os produzem. TABELA 1 lista os identificadores de sequência (SEQ ID NOs:) dos ácidos nucléico que codificam as porções compreendendo domínio de tamanho natural e variáveis de cadeias pesadas e leves, e as sequências de aminoácido correspondentes ou deduzidas.

TABELA 1

ANTICORPOS ANTI-CD44 HUMANO									
Anticorpo Monoclonal	IDENTIFICADOR DE SEQUÊNCIA								
	(SEQ ID NO:)								
	Domínio Variável Compreendendo Porção					Tamanho Natural			
	Pesada		Leve		Pesada		Leve		
	Proteína	DNA	Proteína	DNA	Proteína	DNA	Proteína	DNA	

1A9.A6.B9	11	12	15	16	9	10	13	14
2D1.A3.D12	47	48	51	52	45	46	49	50
14G9.B8.B4	83	84	87	88	81	82	85	86
10C8.2.3	119	120	123	124	117	118	121	122

Em algumas modalidades, a invenção fornece variantes de cadeia pesadas e leves de anticorpos monoclonais 1A9.A6.B9; 2D1.A3.D12; 14G9.B8.B4 ou 10C8.2.3. Como discutido em maiores detalhes no EXEMPLO 3 da presente invenção, numerosas mutações de variantes de cadeia leve e pesada foram feitas para emparelhar aquelas nas regiões de CDR de linha germinativa. Por exemplo em uma modalidade da presente invenção, g-1A9.A6.B9, g - 2D1.A3.D12, g-14G9.B8.B4 e g-10C8.2.3 são as versões de linha germinativa de 1A9.A6.B9, 2D1.A3.D12, 14G9.B8.B4, e 10C8.2.3, respectivamente. Os aminoácidos específicos que foram mutados para chegar nas versões de linha germinativa são evidentes para aqueles de experiência na arte comparando as sequências da linha germinativa vs. um anticorpo de linha não germinativa. Por exemplo, a invenção fornece uma substituição de aminoácido na cadeia pesada de anticorpo 2D1.A3.D12, em que treonina no resíduo 28 é mudada para uma isoleucina. Uma mutação de segundo ponto está na cadeia leve de anticorpo 2D1.A3.D12, e substitui a glutamina no resíduo 38 com uma histidina.

Como será apreciado, análise de utilização de gene fornece apenas uma avaliação limitada de estrutura de anticorpo. Como células B humanas estocasticamente geram transcrições de cadeia leve de capa V-J ou pesada V-D-J, há vários processos secundários que ocorrem, incluindo, sem limitação, hipermutação somática, n-adições, e extensões de CDR3. Veja, por exemplo, Mendez e outro, (1997) Nature Genetics 15:146-156 e Pedido de Patente de Publicação U.S. No. 2003-0070185. Desta maneira, para também examinar estruturas de anticorpo da presente invenção, sequências de aminoácido preditas dos anticorpos foram geradas a partir do cDNAs obtidos a partir do

clones. Além disso, sequências de aminoácido N-terminais foram obtidas através do sequenciamento de proteína. TABELA 2 abaixo de ilustra o uso de segmento de gene de linha germinativa e isótipos dos quatro anticorpos derivados de hibridoma anti-CD44.

TABELA 2

Clone	Cadeia pesada			Cadeia leve		Isótipo
	V _H	D	JH	V _L	JK	
1A9.A6.B9	3-33	D4-17	JH6b	L6	JK4	igG2
2D1.A3.D12	1-03	nd	JH6b	L19	JK1	igd
14G9.B8.B4	1-03	D3-10	JH5b	A27	JK4	igGi
10C8.2.3	3-21	D6-19	JH6b	A27	JK4	igG4

nd = não determinado

Em uma modalidade alternada, a invenção se refere a um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo que especificamente liga-se a CD44 humano e tem uma utilização de gene de V_H e V_L selecionada a partir do grupo que consiste em 1) V_H D4-17 e V_L L6; 2) V_H D3 - 10 e V_L A27; e 3) V_H D6-19 e V_L A27.

Outra modalidade fornece quaisquer dos anticorpos ou porções de ligação de antígeno descritas acima que é um fragmento de Fab, um fragmento de $F(ab')_2$, um fragmento de F_v , um fragmento de F_v de cadeia simples, um fragmento de V_H de cadeia simples, um fragmento de V_L de cadeia simples, um anticorpo humanizado, um anticorpo quimérico ou um anticorpo bispecífico.

Em uma outra modalidade é fornecido um anticorpo derivado ou porção de ligação de antígeno compreendendo quaisquer dos anticorpos ou porções do mesmo como descrito aqui e pelo menos uma entidade molecular adicional. Por exemplo, a pelo menos uma entidade molecular adicional pode ser outro anticorpo (por exemplo, um anticorpo biespecífico ou um diacorpo), um agente de detecção, um rótulo, um agente citotóxico, um agente farmacêutico, e/ou uma proteína ou peptídeo que podem mediar associação do anticorpo ou porção de ligação de antígeno com outra molécula (tal como uma região de núcleo de estreptavidina ou um rótulo de poliistidina) e/ou uma proteína de portador (por exemplo, uma albumina de proteína de sangue ou transferrina) ligada ou fundida (proteína de fusão) ao anticorpo ou porção de ligação de antígeno. Por exemplo, agentes de detecção úteis com que um anticorpo ou porção de ligação de antígeno da invenção podem ser que derivatizados incluem compostos fluorescentes; entre outros, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloreto de 5-dimetilamina-1-naftalenossulfonila, ficoeritrina, lantanídeo fósforo. Um anticorpo pode da mesma forma ser rotulado com enzimas que são úteis para detecção, tal como, por exemplo, rábano picante peroxidase, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina, glicose oxidase. Em uma outra modalidade os anticorpos ou porções de ligação de antígeno do mesmo da presente invenção podem ser rotulados com biotina, ou com um epítipo de polipeptídeo pré-determinado reconhecido por um repórter secundário (por exemplo, sequências de pares de zipper da leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, rótulos de epítipo). Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, quaisquer dos anticorpos ou porções de ligação de antígeno do mesmo podem da mesma forma ser derivadas com um grupo químico tal como polietileno glicol (PEG), um grupo metila ou etila, ou um grupo carboidrato.

Em algumas modalidades, os anticorpos de CD44 ou porções de ligação de antígeno descritos aqui são ligados a um suporte sólido ou partícula. Tais partículas podem ser usadas para usos diagnósticos *in vivo* ou *in vitro*.

Classe e Subclasse de Anticorpos anti-CD44

A classe (por exemplo, IgG, IgM, IgE, IgA, ou IgD) e subclasse (por exemplo IgG1, IgG2, IgG3, ou IgG4) de anticorpos de CD44 podem ser determinadas por qualquer método conhecido na arte. Em geral, a classe e subclasse de um anticorpo podem ser determinadas usando anticorpos que são específicos para uma classe particular e subclasse de anticorpo.

5 Tais anticorpos estão comercialmente disponíveis. A classe e subclasse podem ser determinadas por ELISA, ou Mancha do Oeste bem como outras técnicas. Alternativamente, a classe e subclasse podem ser determinadas através de sequenciamento de toda ou uma porção dos domínios constantes das cadeias pesadas e/ou leves dos anticorpos, comparando suas sequências de aminoácido às sequências de aminoácido conhecidas de várias classes e subclasse

10 subclasse de imunoglobulinas, e determinando a classe e subclasse dos anticorpos. Os anticorpos de CD44 da presente invenção podem ser uma molécula de IgG, uma de IgM, uma de IgE, uma de IgA, ou uma de IgD. Por exemplo, os anticorpos de CD44 podem ser um IgG que é uma subclasse de IgG1, IgG2, IgG3, ou IgG4.

Um aspecto da invenção fornece um método para converter a classe ou subclasse de um anticorpo de CD44 a outra classe ou subclasse. Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucléico que codifica um V_L ou V_H que não inclui sequências que codificam C_L ou C_H é isolada usando métodos bem conhecidos na arte. A molécula de ácido nucléico em seguida é operativamente ligada a uma sequência de ácido nucléico que codifica um C_L ou C_H a partir de uma classe de imunoglobulina desejada ou subclasse. Isto pode ser obtido

15 usando um vetor ou uma molécula de ácido nucléico compreendendo uma cadeia de C_L ou C_H , como descrito acima. Por exemplo, um anticorpo de CD44 que foi originalmente IgM pode ser classe trocada a um IgG. Além disso, a mudança de classe pode ser usada para converter uma subclasse de IgG a outra, por exemplo, de IgG1 a IgG2. Outro método para produzir um anticorpo da invenção compreendendo um isótipo desejado compreende as etapas de isolar um ácido nucléico codificando uma cadeia pesada de um anticorpo de CD44 e um ácido nucléico codificando uma cadeia leve de um anticorpo de CD44, isolar a sequência codificando a região de V_H , ligando a sequência de V_H a uma sequência que codifica um domínio constante de cadeia pesada do isótipo desejado, expressar o gene de cadeia leve e a construção de cadeia pesada em uma célula, e coletar o anticorpo de CD44

25 com o isótipo desejado.

Espécies e Seletividade Molecular

Em outro aspecto da invenção, os anticorpos anti-CD44 demonstram igualmente espécies e seletividade molecular. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD44 liga-se a um CD44 de humano e primata. Preferivelmente, o anti-CD44 liga-se a CD44 humano, e de macaco cinomolgo. Seguindo os ensinamentos da especificação, alguém pode determinar a seletividade de espécies para o anticorpo anti-CD44 usando métodos bem conhecidos na arte. Por exemplo, alguém pode determinar a seletividade de espécies usando uma Man-

35

cha do Oeste, citometria de fluxo, um ELISA, uma imunoprecipitação ou um RIA. (Veja, por exemplo, EXEMPLO 5).

Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD44 tem uma seletividade para CD44 sobre a proteína de receptor de hialuronano endotelial de vaso linfático 1, (LYVE-1) por pelo menos 100 vezes. (Veja EXEMPLO 11) Alguém pode determinar a seletividade do anticorpo anti-CD44 para CD44 usando métodos bem conhecidos na arte seguindo os ensinamentos da especificação. Por exemplo, alguém pode determinar a seletividade usando uma Mancha do Oeste, citometria de fluxo, uma ELISA, uma imunoprecipitação ou um RIA.

Afinidade de ligação de Anticorpos Anti-CD44 ao CD44

Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD44 liga-se a CD44 mamífero preferivelmente o humano com alta afinidade.

Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD44 liga-se dentro do domínio de ligação HA.

Em outra modalidade, os anticorpos anti-CD44 ligam-se com afinidade alta a um polipeptídeo consistindo na sequência de aminoácido mencionada em SEQ ID NO:3

(fusão de IgG de domínio extracelular) ou em SEQ ID NO: 154 (fusão de IgG extracelular de macaco), e preferivelmente liga-se com afinidade alta a um polipeptídeo que consiste na sequência de aminoácido do domínio de ligação de HA.

Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD44 liga-se a CD44, ou mais preferivelmente ao domínio de ligação de HA, com uma K_D de 500 nM ou menor. Em ainda outras modalidades, o anticorpo liga-se a CD44, ou mais preferivelmente ao domínio de ligação de HA de CD44, com uma K_D de 2×10^{-8} M, 2×10^{-9} M, ou 5×10^{-10} M ou menos. Em uma outra modalidade ainda mais preferida, o anticorpo liga-se a CD44, no domínio de ligação de HA com uma K_D de $2,5 \times 10^{-12}$ M ou menor. Em algumas modalidades, o anticorpo liga-se a CD44 com substancialmente a mesma K_D como anticorpo 1A9.A6.B9; 2D1.A3.D12; 14G9.B8.B4; ou 10C8.2.3.

Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD44 tem uma baixa taxa de constante da taxa de dissociação (k_{Off}). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD44 liga-se a CD44, ou mais preferivelmente ao domínio de ligação de HA de CD44, com uma K_{Off} de $1,0 \times 10^{-3}$ s⁻¹ ou menor ou uma K_{Off} de $5,0 \times 10^{-4}$ s⁻¹ ou menor. Em ainda outras modalidades, a k_{Off} é substancialmente a mesma como um anticorpo descrito aqui, incluindo um anticorpo selecionado a partir de 1A9.A6.B9; 2D1.A3.D12; 14G9.B8.B4; e 10C8.2.3. Em algumas modalidades, o anticorpo liga-se a CD44, com substancialmente a mesma k_{Off} como um anticorpo que compreende as regiões de CDR de uma cadeia pesada, ou as regiões de CDR de uma cadeia leve, a partir de um anticorpo selecionado a partir de 1A9.A6.B9; 2D1.A3.D12; 14G9.B8.B4; e 10C8.2.3. Em algumas modalidades, o anticorpo liga-se a CD44, ou mais preferivelmente ao Domínio de ligação de HA de CD44, com substancialmente a mesma k_{Off}

como um anticorpo que compreende um domínio variável de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácido da região de V_H encontrada em SEQ ID NOs: 9, 45, 81 e 117 um domínio variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da região de V_L encontrada em SEQ ID NOs: 13, 49, 85 ou 121. Em ainda outra modalidade, o anticorpo liga-se a CD44, ou mais preferivelmente ao domínio de ligação de HA de CD44, com substancialmente a mesma k_{off} como um anticorpo que compreende as regiões de CDR de um domínio variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da região de V_L encontrada em SEQ ID NOs: 15, 49, 85 ou 121; ou as regiões de CDR de um domínio variável de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácido da região de V_H encontrada em SEQ ID NOs: 9, 45, 81 e 117.

A afinidade de ligação e taxa de dissociação de um anticorpo anti-CD44 para CD44 podem ser determinados por métodos conhecidos na arte. A afinidade de ligação pode ser medida por ELISAs, RIAs¹, citometria de fluxo (FACS), ressonância de plasmônio de superfície, tal como BIACORETM. A taxa de dissociação pode ser medida por ressonância de plasmônio de superfície. Preferivelmente, a afinidade de ligação e taxa de dissociação são medidas por ressonância de plasmônio de superfície. Mais preferivelmente, a afinidade de ligação e taxa de dissociação são medidas usando BIACORETM. Alguém pode determinar se um anticorpo tem substancialmente o mesmo K_D como um anticorpo anti-CD44 usando-se métodos conhecidos na arte. EXEMPLO 5 fornece um método para determinar constantes de afinidade de anticorpos monoclonais anti-CD44.

Identificação de Epítopos de CD44 Reconhecidos por Anticorpos Anti-CD44

A invenção fornece um anticorpo monoclonal anti-CD44 humano que liga-se a CD44 e compete ou compete cruzado com e/ou liga o mesmo epítipo como: (a) um anticorpo selecionado a partir de 1A9.A6.B9; 2D1.A3.D12; 14G9.B8.B4; e 10C8.2.3; (b) um anticorpo que compreende um domínio variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido do domínio variável encontrada em SEQ ID NOs: 9, 45, 81 e 117; (c) um anticorpo que compreende um domínio variável de cadeia leve tendo uma sequência de aminoácido do domínio variável encontrada em SEQ ID NOs: 13, 49, 85 ou 121; ou (d) um anticorpo que compreende igualmente um domínio variável de cadeia pesada como definido em (b) e um domínio variável de cadeia leve como definido em (c). Se dois anticorpos reciprocamente competem entre si para ligar-se a CD44, eles são referidos para competirem cruzado.

Alguém pode determinar se um anticorpo liga-se ao mesmo epítipo ou compete cruzado para ligação com um anticorpo anti-CD44 usando-se métodos conhecidos na arte. Em uma modalidade, alguém permite ao anticorpo anti-CD44 da invenção ligar-se a CD44 sob condições de saturação e em seguida mede a capacidade do anticorpo teste ligar-se a CD44. Se o anticorpo teste é capaz de ligar-se a CD44 ao mesmo tempo que o anticorpo anti-CD44, em seguida o anticorpo teste liga-se a um epítipo diferente como o anticorpo

anti-CD44, Entretanto, se o anticorpo teste não é capaz de ligar-se a CD44 ao mesmo tempo, em seguida o anticorpo teste liga-se ao mesmo epítopo, um epítopo de sobreposição, ou um epítopo que está em proximidade íntima ao epítopo ligado pelo anticorpo anti-CD44 humano. Esta experiência pode ser realizada usando um ELISA, um RIA, BIACORE™, ou citometria de fluxo (FACS).

Para testar se um anticorpo anti-CD44 compete cruzado com outro anticorpo anti-CD44, alguém pode usar o método de competição descrito acima em duas direções, isto é, determinar se o anticorpo de referência bloqueia o anticorpo teste e vice-versa. Em uma modalidade, a experiência é realizada usando uma ELISA. Métodos de determinar K_D são discutidos também abaixo.

Inibição de Atividade de CD44 por Anticorpos Anti-CD44

Em outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo anti-CD44 que inibe a sinalização mediada por CD44. Em outras modalidades, a invenção fornece um anticorpo anti-CD44 que inibe a sinalização co-estimuladora para linfócitos e monócitos através de CD44. Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo anti-CD44 que bloqueia a produção de citocina, e particularmente citocinas tais como TNF- α , IL-6 E IL-1 β . Em uma outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo anti-CD44 que inibe a ligação de HA ao receptor de CD44. Em uma modalidade, o receptor de CD44 é humano. Em ainda outra modalidade, o anticorpo anti-CD44 é um anticorpo humano. O IC_{50} pode ser medido em um ensaio de ligação de ligante por ELISA, RIA, ou outros ensaios e ensaios com base em célula tais como ensaios de FACS ou células que expressam CD44. Em uma modalidade, o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo inibe a ligação de ligante entre HA e CD44 com um IC_{50} não maior do que 5 μ g/ml, preferivelmente não maior do que 1 μ g/ml, preferivelmente maior do que 0,5 μ g/ml, ainda mais preferivelmente não maior do que 0,20 μ g/ml como medido por um ensaio ELISA. EXEMPLO 4 fornece um método para determinar a inibição por anticorpos monoclonais de ligação de CD44 ao HA.

Em outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo anti-CD44 que previne a ligação de CD44 ao HA. Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD44 inibe induzido por HA: (i) recrutamento de leucócito; (ii) interações de matriz celular e interações diretas entre células, tais como por exemplo, leucócitos e células endoteliais; (iii) regulação de função celular de leucócitos; (iv) metabolismo de HA; e/ou (v) a contribuição de CD44 à reunião, organização e remodelagem de matriz. Alguém pode determinar se um anticorpo anti-CD44 pode prevenir, inibir ou reduzir a ativação de CD44 na presença de HA determinando-se a liberação de citocina inflamatória a partir de leucócitos ativados por lipopolissacarídeo (LPS) e HA. Ensaio para detectar a ativação de CD44 e/ou ligação de HA a CD44 são descritos nos EXEMPLOS 4, 5, 6 e 7. Em uma modalidade, alguém determinaria os níveis de ativação de CD44 usando um ensaio de citocina. Em algumas modalidades, o IC_{50} , medido usando um

ensaio de ligação de competição de HA, é não mais que 5 $\mu\text{g/ml}$, preferivelmente não mais do que 1 $\mu\text{g/ml}$, mais preferivelmente do que 0,5 $\mu\text{g/ml}$, ainda mais preferivelmente não mais do que 0,20 $\mu\text{g/ml}$.

Redução de Expressão de Célula de Superfície por Anticorpos Anti-CD44

Em outro aspecto da invenção, o anticorpo causa uma sub-regulação de expressão de CD44 de superfície de célula após incubação com o anticorpo. Em uma modalidade, a incubação pode ter um período de tempo curto (por exemplo, 4 horas) ou um período de tempo mais longo (por exemplo, 24 horas). Particularmente, a presente invenção fornece um anticorpo anti-CD44 que induz a sub-regulação de expressão de CD44 em circulação de linfócitos, e preferivelmente, em linfócitos de T CD3+. Uma sub-regulação de expressão de CD44 de superfície de célula pode ser medida usando FACS. Em modalidades particulares da invenção, o anticorpo pode causar preferivelmente uma diminuição de 6% de expressão de CD44 de superfície de célula, preferivelmente uma diminuição de 10%, ou mais preferivelmente uma sub-regulação de 20%, ou até mesmo mais preferivelmente diminuição de pelo menos 50% de expressão de CD44 de superfície de célula como medido por FACS. O EXEMPLO 8 exemplifica um tipo de ensaio de FACS que mede a sub-regulação de expressão de CD44 de superfície de célula em leucócito e células T em duas espécies: humano e macaco cinomolgo.

Métodos de Produção de Anticorpos

Os anticorpos monoclonais da presente invenção podem ser produzidos por uma variedade de técnicas, incluindo metodologia de anticorpo monoclonal convencional, por exemplo, a técnica de hibridização de célula somática padrão de Kohler e Milstein (1975) Nature 256: 495. Embora os procedimentos de hibridização de célula somática sejam preferidos, em princípio, outras técnicas para produzir anticorpo monoclonal podem ser empregadas, por exemplo, transformação viral ou oncogênica de linfócitos B.

O sistema animal preferido para preparar hibridomas é o sistema de murino.

A produção de hibridoma no camundongo é um procedimento muito bem estabelecido. Os protocolos de imunização e técnicas para isolamento de esplenócitos imunizados para fusão são conhecidos na arte. Os pares de fusão (por exemplo, células de mieloma de murino) e procedimentos de fusão são também conhecidos.

Os anticorpos quiméricos ou humanizados da presente invenção podem ser preparados com base na seqüência de um anticorpo monoclonal de murino preparado como descrito acima. O DNA que codifica as imunoglobulinass de cadeia pesada e leve pode ser obtido a partir do hibridoma de murino de interesse e planejado para conter sequencias de imunoglobulina de não murino (por exemplo, humano) usando técnicas de biologia molécula padrões. Por exemplo, para criar um anticorpo quimérico, as regiões variáveis de murino podem ser unidas às regiões constantes humanas que usam métodos conhecidos na arte

(Patente U.S. No. 4.816.567). Para criar um anticorpo humanizado, as regiões de CDR de murino podem ser inseridas em uma estrutura humano usando métodos conhecidos na arte, Patentes U.S. Nos. 5.225.539, 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762; e 6.180.370.

Em uma modalidade preferida, os anticorpos da invenção são anticorpos monoclonais humanos. Tais anticorpos monoclonais humanos direcionados contra CD44 podem ser gerados usando partes de carregamento de camundongo transgênico ou transcromossômico do sistema imune humano em lugar do sistema de camundongo. Este camundongo transgênico e transcromossômico inclui camundongos referidos aqui como o HuMAb Mouse® e KM Mouse®, respectivamente, e são coletivamente referidos aqui como "camundongos de Ig humano".

O HuMAb Mouse® (Medarex, Inc.) contém minilocos de gene de imunoglobulinas humana que codificam as seqüências de imunoglobulinas de cadeia leve κ e pesada humana sem nova disposição (μ e γ), junto com mutações alvejadas que inativam o loco de cadeia κ e μ endógena (veja, por exemplo, Lonberg, e outros (1994) *Nature* 368: 856-859). Consequentemente, os camundongos exibem expressão reduzida de camundongo IgM ou κ , e com em resposta a imunização, os transgenes de cadeia pesada e leve humanos introduzidos sofrem mudança de classe e mutação somática para gerar IgG κ monoclonal humano de alta afinidade (Lonberg, N. e outros (1994), supra; revisado em Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101 ; Lonberg, N. e Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, e Harding, F. e Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). A preparação e uso do HuMAb Mouse®, e as modificações genômicas carregadas por tais camundongos, é descrito também em Taylor, L. e outros (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. e outros (1993) *International Immunologia* 5: 647-656; Tuaillon e outros (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:3720 - 3724; Choi e outros (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. e outros (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon e outros (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. e outros (1994) *International Immunology* 6: 579-591; e Fishwild, D. e outros (1996) *Nature Biotecnologia* 14: 845-851. Veja também, as Patentes U.S. Nos.: 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; e 5.770.429; Patente U.S. No. 5.545.807; Publicações de PCT Nos.: WO 92/03918, WO,

93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 e WO 99/45962; e WO 01/14424.

Em outra modalidade, anticorpos humanos da invenção podem ser elevados usando um camundongo que carrega as seqüências de imunoglobulina humana em transgenes e transcromossomas, tal como um camundongo que carrega um transgene de cadeia pesada humano e um transcromossoma de cadeia leve humano. Tais camundongos, referidos aqui como "KM miceTM", são descritos em detalhes na Publicação PCT No. WO 02/43478.

Entretanto também, sistemas de animal transgênico alternativo que expressam genes de imunoglobulinas humanos estão disponíveis na técnica e podem ser usados para elevar anticorpos anti-CD44 da invenção. Por exemplo, um sistema transgênico alternativo referido como Xenomouse™ (Abgenix, Inc.) pode ser usado; tais camundongos são descritos em, por exemplo, Patentes U.S.A. Nos.: 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584; e 6.162.963.

Além disso, sistemas de animal transcromossômico alternativos que expressam genes de imunoglobulinas humanos estão disponíveis na técnica e podem ser usados para elevar anticorpos anti-CD44 da invenção. Por exemplo, os camundongos que carregam um transcromossoma de cadeia pesada humano e um transcromossoma de cadeia leve humano, referido como "camundongos TC" podem ser usados; tais camundongos são descritos em Tomizuka e outros (2000) Proc. Natl. Acad. Sci.

U.S.A. 97:722-727. Além disso, vacas que carregam os transcromossomas de cadeia pesada e leve humanos foram descritas na técnica (Kuroiwa e outros (2002) Nature Biotechnology 20:889-894) e podem ser utilizadas para carregar anticorpos anti-CD44 da invenção.

Os anticorpos monoclonais humanos da invenção também podem ser preparados usando camundongos de SCID nos quais células imunes humanas foram reconstituídas tal que uma resposta de anticorpo humana possa ser gerada na imunização. Tais camundongos são descritos, por exemplo, na Patente U.S.A. ,Nos.: 5.476.996; e 5.698.767.

Imunização de Camundongos de Ig Humano

Produção de Anticorpos e Linhagens de Célula de Produção de Anticorpos

Após imunização de um animal com um antígeno de CD44, anticorpos e/ou células de produção de anticorpos podem ser obtidas a partir do animal. Em algumas modalidades, o soro anticorpo anti-CD44 é obtido a partir do animal sangrando ou sacrificando o animal. O soro pode ser usado quando for obtido a partir do animal, uma fração de imunoglobulinas pode ser obtida a partir do soro, ou os anticorpos anti-CD44 podem ser purificados a partir do soro.

Em algumas modalidades, as linhagens de célula imortalizadas de produção de anticorpos são preparadas a partir de células isoladas a partir do animal imunizado. Após a imunização, o animal é sacrificado e linfonodo e/ou células B esplênicas são imortalizadas por qualquer meio conhecido na técnica. Métodos de imortalizar células incluem, porém não estão limitados a, os transfectar com oncogenes, os infectar com um vírus oncogênico e os cultivar sob condições que selecionam para células imortalizadas, os submetendo aos compostos carcinogênicos ou de mutação, os fundindo com uma célula imortalizada, por exemplo, uma célula de mieloma, e inativando um gene supressor de tumor. Veja, por exemplo, Harlow and Lane, supra. Se fusão com células de mieloma for empregada, as células de

mieloma preferivelmente não segregam polipeptídeos de imunoglobulinas (uma linhagem celular não secretória). As células imortalizadas são avaliadas usando CD44, uma porção disto, ou uma célula que expressa CD44. Em uma modalidade preferida, a porção de CD44 compreende: (i) o sítio de ligação de HA de CD44; (ii) compreende a seqüência de aminoácido truncada ou completa apresentada em SEQ ID NO:1 e/ou SEQ ID NO:2; ou (iii) combinações destes. Em uma modalidade, a avaliação inicial é realizada usando um imunoenensaio ligado a enzima (ELISA) ou um radioimunoensaio. Um exemplo de avaliação de ELISA é fornecido na Publicação PCT No. WO 00/37504.

As células de produção de anticorpos anti-CD44, por exemplo, hibridomas, são selecionadas, clonadas e também avaliadas quanto às características desejáveis, incluindo crescimento robusto, alta produção de anticorpo e características de anticorpo desejáveis, como descrito também abaixo. Os hibridomas podem ser expandidos *in vivo* em animais singênicos, em animais que necessitam de um sistema imune, por exemplo, camundongo nu, ou em cultura de célula *in vitro*. Os métodos de selecionar, clonar e expandir os hibridomas são bem conhecidos por aqueles de experiência ordinária na técnica.

Em uma modalidade, o animal imunizado é um animal não humano que expressa genes de imunoglobulina humanos e as células B esplênicas são fundidas a uma linhagem celular de mieloma a partir das mesmas espécies como o animal não humano. Em uma modalidade mais preferida, o animal imunizado é um camundongo Kirin TC MouseTM e a linhagem celular de mieloma é um mieloma de camundongo não secretório. Em uma modalidade ainda mais preferida, a linhagem celular de mieloma é Sp2/0-Ag14 (Coleção de Cultura do Tipo Americano (ATCC) CRL-1581) e a linhagem celular de hibridoma de camundongo é 1376.3.2d1.A3.D12 (ATCC No.PTA-6928), 1376.3.1A9.A6.B9 (ATCC No.PTA-6929) ou 1376.2.14G9.B8.B4 (ATCC No.PTA-6927). Veja, por exemplo, EXAMPLE 1.

Desse modo, em uma modalidade, a invenção fornece métodos para produzir uma linhagem celular que produz um anticorpo monoclonal humano ou porções de ligação de antígeno do mesmo direcionados a CD44 compreendendo: (a) imunizar um animal transgênico não humano descrito aqui com CD44, uma porção de CD44 ou uma célula ou tecido que expressam CD44; (b) permitir o animal transgênico montar uma resposta imune a CD44; (c) isolar as células de produção de anticorpos a partir do animal transgênico; (d) imortalizar as células de produção de anticorpos; (e) criar populações monoclonais individuais das células de produção de anticorpos imortalizadas; e (f) avaliar as células de produção de anticorpo imortalizado para identificar um anticorpo direcionado a CD44. Em uma modalidade, a etapa (f) compreende avaliar as células de produção de anticorpos imortalizadas para identificar um anticorpo direcionado ao sítio de ligação de HA de CD44, e opcionalmente, que não liga externamente o Sítio de ligação de HA de CD44.

A avaliação das células de produção de anticorpos imortalizadas para identificar um

anticorpo direcionado ao sítio de ligação de HA de CD44 pode ser obtida testando-se os anticorpos produzidos pela ligação de célula a um peptídeo que compreende a sequência de aminoácido do sítio de ligação de HA de CD44.

Em outro aspecto, a invenção fornece hibridomas que produzem um anticorpo anti-CD44 humano. Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD44 humano produzido pelo hibridoma é um antagonista de CD44. Em ainda outra modalidade, o anticorpo anti-CD44 humano produzido pelo hibridoma (i) se liga ao sítio de ligação de HA de CD44; (ii) não liga externamente ao sítio de ligação de HA ; (iii) não se ligue ao sítio de ligação de IM7; ou (iv) combinações destes. Mikecz e outros, (1999) *Arthritis Rheumatism* 42: 659, 668, Zheng (1995) *J. Cell Biol.* 130: 485-495, Peach e outros, (1993) *J. Cell Biol.* 122: 257-264 e Patente U.S.A. No. 6.001.356. Em uma modalidade, os hibridomas são hibridomas de camundongo, como descrito acima. Em outras modalidades, os hibridomas são produzidos em outros mamíferos.

Em uma modalidade da invenção, as células de produção de anticorpos são isoladas e expressadas em uma célula hospedeira, por exemplo, células de mieloma. Em ainda outra modalidade, um animal transgênico é imunizado com CD44, células primárias, (por exemplo, células do sangue periférico ou baço) são isoladas de um animal transgênico imunizado e células individuais produzindo anticorpos específicos para o antígeno desejado são identificadas. O mRNA poliadenilado de cada célula individual é isolado e a reação em cadeia de polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) é realizada usando iniciadores de sentido que anelam-se às sequências de região variável, por exemplo, degenerar iniciadores que reconhecem a maioria ou todas as regiões de FR1 de genes de região variável de cadeia leve e pesada humana e iniciadores de anti-sentido que anelam-se às sequências de região de união ou constante. Os cDNAs dos domínios variáveis de cadeia pesada e leve são então clonados e expressados em qualquer célula hospedeira adequada, por exemplo, uma célula de mieloma, como anticorpos quiméricos com respectivas regiões constantes de imunoglobulina, tal como os domínio constantes κ ou λ e cadeia pesada. Veja Babcook, J. S. e outros (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 7843-48. Os anticorpos anti-CD44 podem então ser identificados e isolados como descrito aqui.

Métodos Recombinantes de Produção de Anticorpos

Um anticorpo, ou porção de ligação de anticorpo, da invenção pode ser preparado por expressão recombinante de genes de cadeia leve e pesada de imunoglobulinas em uma célula hospedeira. Por exemplo, para expressar um anticorpo recombinantemente, uma célula hospedeira é transfectada com um ou mais vetores de expressão recombinantes que carregam fragmentos de DNA de codificação das cadeias leves e pesadas de imunoglobulina do anticorpo tal que as cadeias leves e pesadas sejam expressas na célula hospedeira e, preferivelmente, segregadas no meio no qual as células hospedeiras são cultivadas, a partir

de qual meio os anticorpos podem ser recuperados. As metodologias de DNA recombinante padrões são utilizadas para obter genes de cadeia pesada e leve de anticorpo, para incorporar estes genes em vetores de expressão recombinante e introduzir os vetores em células hospedeiras, tal como aquelas descritas em Sambrook, Fritsch e Maniatis (eds), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Segunda Edição, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F. M. e outros (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989) e na Patente U.S. No. 4.816.397.

Mutações e Modificações

Para expressar os anticorpos de CD44 da presente invenção, os fragmentos de DNA de codificação de regiões de V_H e V_L podem primeiro ser obtidos usando quaisquer dos métodos descritos acima. Várias, modificações, por exemplo, mutações, deleções, e/ou adições podem também ser introduzidas nas sequências de DNA usando métodos padrões conhecidos por aqueles de experiência na técnica. Por exemplo, a mutagênese pode ser realizada usando métodos padrões, tais como mutagênese mediada por PCR, na qual os nucleotídeos mutados são incorporados nos iniciadores de PCR tal que o produto de PCR contenha as mutações desejadas ou mutagênese direcionada ao sítio.

Um tipo de substituição, por exemplo, que pode ser feita é para mudar uma ou mais cisteínas no anticorpo, que pode ser quimicamente reativo, a outro resíduo, tal como, sem limitação, alanina ou serina. Por exemplo, pode haver uma substituição de uma cisteína não canônica. A substituição pode ser feita em uma região de esqueleto ou CDR de um domínio variável ou no domínio constante de um anticorpo. Em algumas modalidades, a cisteína é canônica.

Os anticorpos também podem ser modificados, por exemplo, nos domínios variáveis das cadeias pesadas e/ou leves, por exemplo, para alterar uma propriedade de ligação do anticorpo. Por exemplo, uma mutação pode ser feita em uma ou mais das regiões de CDR para aumentar ou diminuir o K_D do anticorpo para CD44, aumentar ou diminuir a k_{off} , ou alterar a especificidade de ligação do anticorpo. As técnicas em mutagênese direcionada ao sítio são bem conhecidas na técnica. Veja, por exemplo, Sambrook e outros e Ausubel e outros, supra.

Uma modificação de mutação também pode ser feita em uma região de esqueleto ou domínio constante para aumentar a meia-vida de um anticorpo de CD44. Veja, por exemplo, Publicação PCT No. WO 00/09560. Uma mutação em uma região de esqueleto ou domínio constante também pode ser feita para alterar a imunogenicidade do anticorpo, para fornecer um sítio para ligação covalente ou não covalente a outra molécula, ou alterar tais propriedades como fixação de complemento, ligação de FcR e citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC). De acordo com a invenção, um único anticorpo pode ter mutações em qualquer um ou mais dos CDRs ou regiões de esqueleto do domínio

variável ou no domínio constante.

Em um processo conhecido como "linha de germinação", certos aminoácidos nas seqüências de V_H e V_L podem ser mutados para compatibilidade com aqueles encontrados naturalmente em seqüências de V_H e V_L de linha germinativa. Em particular, as seqüências de aminoácido das regiões de esqueleto nas seqüências de V_H e V_L podem ser mudadas para compatibilidade com as seqüências de linha germinativa para reduzir o risco de imunogenicidade quando o anticorpo é administrado. As seqüências de DNA de linha germinativa para genes de V_H e V_L humanos são conhecidas na técnica (veja, por exemplo, o banco de dados de sequencia de linha germinativa humana "Vbase"; veja também Kabat, E. A., e outros (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson e outros (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798; e Cox e outros, (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:827-836.

Outro tipo de substituição de aminoácido que pode ser feita é para remover sítios proteolíticos potenciais no anticorpo. Tais sítios podem ocorrer em uma região de esqueleto ou CDR de um domínio variável ou no domínio constante de um anticorpo. A substituição de resíduos de cisteína e a remoção de sítios proteolíticos podem diminuir o risco de heterogeneidade no produto de anticorpo e desse modo pode aumentar sua homogeneidade. Outro tipo de substituição de aminoácido é eliminar os pares de asparagina-glicina, que formam sítios de desamidação potenciais, alterando-se um ou ambos os resíduos. Em outro exemplo, a lisina de terminal C da cadeia pesada de um anticorpo de CD44 da invenção pode ser clivada. Em várias modalidades da invenção, as cadeias pesadas e leves dos anticorpos de CD44 podem opcionalmente incluir uma seqüência de sinal.

Uma vez que os fragmentos de DNA de codificação dos segmentos de V_H e V_L da presente invenção são obtidos, estes fragmentos de DNA podem ser também manipulados através de técnicas de DNA recombinantes padrão, por exemplo, para converter os genes de região variável para genes de cadeia de anticorpo de tamanho natural, para genes de fragmento Fab, ou para um gene de scFv. Nestas manipulações, um fragmento de DNA de codificação de V_L ou V_H é operativamente unido a outro fragmento de DNA codificando outra proteína, tal como uma região constante de anticorpo ou um ligador flexível. O termo "operativamente unido", como usado neste contexto, é pretendido significar que os dois fragmentos de DNA são unidos tal que as seqüências de aminoácido codificadas pelos dois fragmentos de DNA permaneçam no esqueleto.

O DNA isolado codificando a região de V_H pode ser convertido para um gene de cadeia pesada de tamanho natural operativamente unindo-se o DNA de codificação de V_H a outra molécula de DNA codificando as regiões constantes de cadeia pesada (CH1, CH2 e CH3). As seqüências de genes de região constante de cadeia pesada humana são conhecidas na técnica (veja, por exemplo, Kabat, E. A., e outros (1991) *Sequences of Proteins of*

Immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação de NIH No. 91-3242) e os fragmentos de DNA abrangendo estas regiões podem ser obtidos por amplificação de PCR padrão. A região constante de cadeia pesada pode ser uma região constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM ou IgD, porém mais preferivelmente é uma região constante de IgG1 ou IgG2. A sequência de região constante de IgG1 pode ser quaisquer dos vários alelos ou alotipos conhecidos por ocorrer entre indivíduos diferentes, tal como Gm(1), Gm(2), Gm(3), e Gm(17). Estes alotipos representam substituição de aminoácido de ocorrência natural nas regiões constantes de IgG1. Para um gene de cadeia pesada de fragmento Fab, o DNA de codificação de V_H pode ser operativamente unido a outra molécula de DNA que codifica somente a região constante de CH 1 de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada CH 1 pode ser derivada a partir de quaisquer dos genes de cadeia pesada.

O DNA isolado que codifica a região de V_L pode ser convertido para um gene de cadeia leve de tamanho natural (bem como um gene de cadeia leve de Fab) operativamente unindo-se o DNA de codificação de V_L a outra molécula de DNA que codifica a região constante de cadeia leve, C_L . As sequências de genes de região constante de cadeia leve humana são conhecidas na técnica (veja, por exemplo, Kabat, E. A., e outros (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação de NIH No. 91 - 3242) e os fragmentos de DNA abrangendo estas regiões podem ser obtidos por amplificação de PCR padrão. A região constante de cadeia leve pode ser uma região constante de capa ou lambda. A região constante de capa pode ser quaisquer dos vários alelos conhecidos por ocorrer entre indivíduos diferentes, tal como Inv(1), Inv(2), e Inv(3). A região constante de lambda pode ser derivada de quaisquer dos três genes de lambda.

Para criar um gene de scFv, os fragmentos de DNA de codificação de V_H e V_L são operativamente unidos a outro fragmento codificando um ligador flexível, por exemplo, codificando a sequência de aminoácido $(Gly_4-Ser)_3$, tal que as sequências V_H e V_L possam ser expressadas como uma proteína de cadeia única contígua, com as regiões de V_L e V_H unidas pelo ligador flexível (Veja, por exemplo, Bird e outros, (1988) *Science* 242:423-426; Huston e outros, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-5883; McCafferty e outros, (1990) *Nature* 348:552-554. O anticorpo de cadeia única pode ser monovalente, se somente um único V_H e V_L forem empregados, bivalentes, se dois V_H e V_L forem empregados, ou polivalente, se mais de dois V_H e V_L forem empregados. Os anticorpos biespecíficos ou polivalentes podem ser gerados os quais especificamente se liguem a CD44 e a outra molécula.

Em outra modalidade, um anticorpo de fusão ou imunoadesina podem ser feitos o qual compreenda todo ou uma porção de um anticorpo de CD44 da invenção unido a outro polipeptídeo. Em outra modalidade, somente os domínios variáveis do anticorpo de CD44

são unidos ao polipeptídeo. Em outra modalidade, o domínio de V_H de um anticorpo de CD44 é unido a um primeiro polipeptídeo, ao mesmo tempo em que o domínio de V_L de um anticorpo de CD44 é unido a um segundo polipeptídeo que se associa com o primeiro polipeptídeo de uma maneira tal que os domínios de V_H e V_L possam interagir com outro para formar um sítio de ligação de antígeno. Em outra modalidade preferida, o domínio de V_H é separado do domínio de V_L por um ligador tal que os domínios de V_H e V_L possam interagir um com o outro. O anticorpo de V_H -ligador- V_L é em seguida unido ao polipeptídeo de interesse. Além disso, anticorpos de fusão podem ser criados nos quais dois (ou mais) anticorpos de cadeia única estejam unidos um ao outro. Isto é útil se alguém quiser criar um anticorpo divalente ou polivalente em uma cadeia de polipeptídeo única, ou se alguém quiser criar um anticorpo biespecífico.

Em outras modalidades, outros anticorpos modificados podem ser preparados usando anticorpo de CD44 que codifica moléculas de ácido nucléico. Por exemplo, "corpos de capa" (III e outros, (1997) *Protein Eng.* 10: 949-57), "Minicorpos" (Martin e outros, (1994) *EMBO J.* 13: 5303-9), "Diacorpos" (Holliger e outros, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 6444 - 6448), ou "Janusinas" (Traunecker e outros, (1991) *EMBO J.* 10:3655-3659 e Traunecker e outros, (1992) *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52) podem ser preparados usando técnicas biológicas moleculares padrão seguindo os ensinamentos da especificação.

Os anticorpos biespecíficos ou fragmentos de ligação de antígeno podem ser produzidos por uma variedade de métodos incluindo fusão de hibridomas ou união dos fragmentos de Fab. Veja, por exemplo, Songsivilai & Lachmann, (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321, Kostelny e outros, (1992) *J. Immunol.* 148:1547-1553. Além disso, anticorpos biespecíficos podem ser formados como "diacorpos" ou "Janusinas". Em algumas modalidades, o anticorpo biespecífico se liga a dois epítomos diferentes de CD44. Em algumas modalidades, os anticorpos modificados descritos acima são preparados usando um ou mais dos domínios variáveis ou regiões de CDR a partir de um anticorpo de CD44 humano fornecido aqui.

Vetores e Células Hospedeiras

Para expressar os anticorpos e porções de ligação de antígeno da invenção, os DNAs que codificam cadeias leves e pesadas parciais ou de tamanho natural, obtidas como descrito aqui, são inseridos em vetores de expressão tal que os genes sejam operativamente unidos às seqüências de controle transcricional e translacional. Neste contexto, o termo "operativamente unido" é pretendido significar que um gene de anticorpo é ligado em um vetor tal que as seqüências de controle transcricionais e translacionais dentro do vetor sirvam a sua pretendida função de regular a transcrição e translação do gene de anticorpo. O vetor de expressão e as seqüências de controle de expressão são escolhidos serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão utilizada. Por exemplo, os vetores de expres-

são incluem plasmídeos, retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associados (AAV), vírus de planta tal como vírus em mosaico da couve-flor, vírus em mosaico de tabaco, cosmídeos, YACs¹, epissomas derivados de EBV. O gene de anticorpo é ligado em um vetor tal que as seqüências de controle transcricional e translacional dentro do vetor sirvam a sua função pretendida de regular a transcrição e translação do gene de anticorpo. O vetor de expressão e as seqüências de controle de expressão são escolhidos por serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão utilizada. O gene de cadeia leve de anticorpo e o gene de cadeia pesada de anticorpo podem ser inseridos em vetores separados. Em uma modalidade preferida, ambos os genes são inseridos no mesmo vetor de expressão. Os genes de anticorpo são inseridos no vetor de expressão através de métodos padrões (por exemplo, ligação de sítios de restrição complementares no fragmento e vetor de gene de anticorpo, ou ligação de extremidade cega se nenhum sítio de restrição estiver presente).

Um vetor conveniente é um que codifica uma seqüência de imunoglobulina de C_H ou C_L humana funcionalmente completa, com sítios de restrição apropriados criados de forma que qualquer seqüência de V_H ou V_L possa ser inserida facilmente e expressada, como descrito acima. Em tais vetores, o entrançamento normalmente ocorre entre o sítio doador de união na região J inserida e o sítio aceitante de união que precede o domínio C humano, e também nas regiões de união que ocorrem dentro dos exons de C_H humanos. A terminação de transcrição e a poliadenilação ocorrem em sítios cromossômicos nativos a jusante das regiões de codificação. O vetor de expressão recombinante também pode codificar um peptídeo de sinal que facilite a secreção da cadeia de anticorpo de uma célula hospedeira. O gene de cadeia de anticorpo pode ser clonado no vetor tal que o peptídeo de sinal esteja unido no esqueleto ao terminal de amino da cadeia de imunoglobulinas. O peptídeo de sinal pode ser um peptídeo de sinal de imunoglobulinas ou um peptídeo de sinal heterólogo (isto é, um peptídeo de sinal a partir de uma proteína de não imunoglobulinas).

Além dos genes de cadeia de anticorpo, os vetores de expressão recombinantes da invenção carregam seqüências reguladoras que controlam a expressão dos genes de cadeia de anticorpo em uma célula hospedeira. Será apreciado por aqueles versados na técnica que o desígnio do vetor de expressão, incluindo a seleção de seqüências reguladoras pode depender de tais fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão de proteína desejada, e assim sucessivamente. As seqüências reguladoras preferidas para expressão de célula hospedeira de mamífero incluem elementos virais que direcionam níveis altos de expressão de proteína em células de mamífero, tal como promotores e/ou realçadores derivados a partir de LTRs retrovirais, citomegalovírus (CMV) (tal como o promotor/realçador de CMV), Vírus Símio 40 (SV40) (tal como o promotor/realçador de SV40), adenovírus, (por exemplo, promotor tardio principal de adenovírus (AdMLP)), polioma e promotores de mamífero fortes tal como imunoglobulinas nativas e

promotores de actina. Para descrição adicional de elementos reguladores virais, e seqüências destes, veja, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5.168.062, 4.510.245 e 4.968.615. Os métodos para expressar anticorpos em plantas, incluindo uma descrição de promotores e vetores, bem como transformação de plantas, são conhecidos na arte. Veja, por exemplo, Patente U.S. No. 6.517.529. Os métodos para expressar polipeptídeos em células bacterianas ou células fúngicas, por exemplo, células de levedura, são também bem conhecidos na arte.

Além dos genes de cadeia de anticorpo e seqüências reguladoras, os vetores de expressão recombinantes da invenção podem carregar seqüências adicionais, tal como seqüências que regulam a replicação do vetor em células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e genes marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita a seleção de células hospedeira nas quais o vetor foi introduzido (veja, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 4.399.216, 4.634.665 e 5.179.017). Por exemplo, tipicamente o gene de marcador selecionável confere resistência aos fármacos, tal como G418, higromicina ou metotrexato, em uma célula hospedeira na qual o vetor foi introduzido. Os genes marcadores selecionáveis preferidos incluem o gene de diidrofolato reductase (DHFR) (para uso em células de hospedeiras de dhfr com seleção/amplificação de metotrexato), o gene de neomicina fosfo-transferase (para seleção de G418), e o gene de glutamato sintetase.

As moléculas de ácido nucléico que codificam anticorpos de CD44 e vetores que compreendem estas moléculas de ácido nucléico podem ser utilizadas para transfecção de uma célula hospedeira de mamífero, planta, bacteriana ou de levedura adequada. A transformação pode ser por qualquer método conhecido para introduzir polinucleotídeos em uma célula hospedeira. Os métodos para introdução de polinucleotídeos heterólogos em células de mamífero são bem conhecidos na arte e incluem transfecção mediada por dextrana, precipitação de fosfato de cálcio, transfecção mediada por polibreno, fusão de protoplasto, eletroporação, encapsulação do polinucleotídeo(s) em lipossomas, e microinjeção direta do DNA nos núcleos. Além disso, as moléculas de ácido nucléico podem ser introduzidas em células de mamífero através de vetores virais. Os métodos de transformação de células são bem conhecidos na arte. Veja, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461, e 4.959.455. Os métodos de transformar células de planta são bem conhecidos na arte, incluindo, por exemplo, transformação mediada por *Agrobacterium*, transformação biolística, injeção direta, eletroporação e transformação viral. Os métodos de transformar células bacterianas e de levedura também são bem conhecidos na arte.

As linhagens de célula de mamífero disponíveis como hospedeiras para expressão são bem conhecidas na técnica e incluem muitas linhagens de célula imortalizadas disponíveis a partir da Coleção de Cultura de Tipo Americana (ATCC). Por exemplo, estes incluem células ovário de *hamster* chinês (CHO), células de NSO, células de SP2, células de HEK-

293T, células de NIH-3T3, células de HeLa, células de rim de *hamster* (BHK), células de rim de macaco verdes africano (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por exemplo, Hep G2), células de A549, e várias outras linhagens de célula. As linhagens de célula de preferência particular são selecionadas através de determinação de quais linhagens de célula têm níveis de expressão altos. Outras linhagens de célula que podem ser utilizadas são linhagem celular de inseto, tal como células de Sf9 ou Sf21. Quando vetores de expressão recombinantes que codificam genes de anticorpo são introduzidos em células hospedeiras de mamífero, os anticorpos são produzidos cultivando-se as células hospedeiras durante um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeira ou, mais preferivelmente, secreção do anticorpo no meio de cultura no qual as células hospedeiras são desenvolvidas. Os anticorpos podem ser recuperados a partir do meio de cultura usando métodos de purificação de proteína padrões. As células hospedeiras de planta incluem, por exemplo, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, *duckweed*, milho, trigo, batata, e assim por diante. As células hospedeiras bacterianas incluem *E. coli* e espécies de *Streptomyces*. As células hospedeiras de levedura incluem espécies de *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*.

Além disso, a expressão de anticorpos da invenção a partir de linhagens de célula de produção pode ser aumentada usando várias técnicas conhecidas. Por exemplo, a glutamina sintetase (o sistema de GS) e sistemas de expressão de gene de DHFR são abordagens comuns por aumentar a expressão sob certas condições. Os clones de célula de expressão elevada podem ser identificados usando técnicas convencionais, tal como clonagem por diluição limitada e tecnologia de Microdrop. O sistema de GS é descrito nas Patentes Européias Nos. EP 0 216 846, EP 0 256 055, EP 0 323 997 e EP 0 338 841.

É provável que os anticorpos expressos através de linhagens de célula diferentes ou em animais transgênicos tenham glicosilação diferente de outro. Porém, todos os anticorpos codificados pelas moléculas de ácido nucléico fornecidas nisto, ou compreendendo as seqüências de aminoácido fornecidas nisto são parte da presente invenção, independente da glicosilação dos anticorpos.

Bibliotecas de Exibição de Fago

A invenção fornece um método para produzir um anticorpo anti-CD44 ou porção de ligação de antígeno do mesmo que compreende as etapas de sintetizar uma biblioteca de anticorpos humanos em fago, avaliar a biblioteca com CD44 ou uma porção do mesmo, isolar o fago que liga CD44, e obter o anticorpo a partir do fago. Por via de exemplo, um método para preparar a biblioteca de anticorpos para uso em técnicas de exibição de fago compreende as etapas de imunizar um animal não humano que compreende locos de imunoglobulinas humanas com CD44 ou uma porção antigênica do mesmo para criar uma resposta imune, extraíndo células de produção de anticorpos a partir do animal imunizado; isolando

RNA que codifica cadeias pesadas e leves de anticorpos da invenção a partir das células extraídas, transcrevendo de modo reverso o RNA para produzir cDNA, ampliando o cDNA usando iniciadores, e inserindo o cDNA em um vetor de exibição de fago tal que os anticorpos sejam expressados no fago. Os anticorpos anti-CD44 recombinantes da invenção podem ser obtidos deste modo.

Os anticorpos humanos anti-CD44 recombinantes da invenção podem ser isolados avaliando-se uma biblioteca de anticorpo combinatório recombinante. Preferivelmente a biblioteca é uma biblioteca de exibição de fago de scFv, gerada usando cDNAs de V_L e V_H humano preparados a partir de mRNA isolado a partir de células B. Os métodos para preparar e avaliar tais bibliotecas são conhecidos na arte. Os *kits* para gerar bibliotecas de exibição de fago estão comercialmente disponíveis (por exemplo, Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catálogo no. 27-9400-01; e o *kit* de exibição de fago Stratagene Surf-ZAP™, catálogo no. 240612). Também há outros métodos e reagentes que podem ser usados na geração e avaliação de bibliotecas de exibição de anticorpo (veja, por exemplo, Patente U.S. No. 5.223.409; Publicação PCT Nos. WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, e WO 92/09690; Fuchs e outros (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay e outros, (1992) *Hum. Antibod. Híbridomas* 3:81-85; Huse e outros (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty e outros, (1990) *Nature* 348:552-554; Griffiths e outros, (1993) *EMBO J.* 12:725-734; Hawkins e outros, (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clackson e outros, (1991) *Nature* 352:624-628; Grama e outros, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:3576-3580; Garrad e outros, (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom e outros, (1991) *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137; e Barbas e outros, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:7978-7982.

Em uma modalidade para isolar e produzir anticorpos anti-CD44 humanos com as características desejadas, um anticorpo anti-CD44 humano como descrito aqui é primeiro usado para selecionar as seqüências de cadeia pesada e leve humanas tendo atividade de ligação similar a CD44, usando os métodos de impressão de epítipo descritos na Publicação PCT No. WO 93/06213. As bibliotecas de anticorpo utilizadas neste método são preferivelmente bibliotecas de scFv preparadas e avaliadas como descrito na Publicação de PCT No. WO 92/01047, McCafferty e outros, *Nature* 348:552-554 (1990); e Griffiths e outros, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). As bibliotecas de anticorpo de scFv preferivelmente são avaliadas usando CCR2 humano como o antígeno.

Uma vez que domínios de V_L e V_H humanos iniciais são selecionados, as experiências de "mistura e compatibilidade" são realizadas nas quais pares diferentes dos segmentos de V_H e V_L inicialmente selecionados são avaliados quanto à ligação de CD44 para selecionar combinações de pares de V_L/V_H preferidas. Adicionalmente, para também melhorar a qualidade do anticorpo, os segmentos V_L e V_H do par(s) de V_L/V_H preferido podem ser muta-

dos aleatoriamente, preferivelmente dentro da região de CDR3 de V_H e/ou V_L , em um processo análogo ao processo de mutação somática *in vivo* responsável pela maturação de afinidade de anticorpos durante uma resposta imune natural. Esta maturação de afinidade *in vitro* pode ser realizada ampliando-se domínios de V_H e V_L usando iniciadores de PCR complementares ao V_H CDR3 ou V_L CDR3, respectivamente, cujos iniciadores foram "reforçados" com uma mistura aleatória das quatro bases de nucleotídeo em certas posições tal que os produtos de PCR resultantes codifiquem os segmentos V_H e V_L nos quais mutações aleatórias tenham sido introduzidas nas regiões de CDR3 de V_H e/ou V_L . Estes segmentos de V_L e V_H aleatoriamente mutados podem ser re-avaliados quanto à ligação a CD44.

Seguinte à avaliação e isolamento de um anticorpo anti-CD44 da invenção a partir de uma biblioteca de exibição de imunoglobulina recombinante, os ácidos nucleicos que codificam o anticorpo selecionado podem ser recuperados da embalagem de exibição (por exemplo, do genoma de fago) e subclonados em outros vetores de expressão por técnicas de DNA recombinantes padrão. Se desejado, o ácido nucleico pode também ser manipulado para criar outras formas de anticorpo da invenção, como descrito abaixo. Para expressar um anticorpo humano recombinante isolado avaliando-se uma biblioteca combinatória, o DNA que codifica o anticorpo é clonado de em um vetor de expressão recombinante e introduzido em uma célula hospedeira de mamífero, como descrito acima.

Anticorpos Desimunizados

Em outro aspecto da invenção, os anticorpos ou porções de ligação de antígeno dos mesmos podem ser desimunizados para reduzir a sua imunogenicidade usando as técnicas descritas em, por exemplo, Publicação PCT Nos.: WO98/52976 e WO00/34317.

Anticorpos Derivados e Rotulados

Um anticorpo anti-CD44 ou porção de ligação de antígeno da invenção pode ser derivado ou unido a outra molécula (por exemplo, outro peptídeo ou proteína). Em geral, os anticorpos ou porção de ligação de antígeno dos mesmos são derivados tal que a ligação de CD44 não seja adversamente afetada pela derivação ou rotulação. Consequentemente, os anticorpos e porções de ligação de antígeno da invenção são pretendidos incluir ambas as formas intactas e modificadas dos anticorpos de CD44 humanos descritas aqui. Por exemplo, um anticorpo ou porção de ligação de antígeno da invenção pode ser unida funcionalmente (através de acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou de outro modo) a uma ou mais outras entidades moleculares, tal como outro anticorpo (por exemplo, um anticorpo biespecífico ou um diacorpo), um agente de detecção, um rótulo, um agente citotóxico, um agente farmacêutico, uma proteína ou peptídeo que possa mediar a associação do anticorpo ou porção de ligação de antígeno com outra molécula (tal como uma região núcleo de estreptavidina ou um rótulo de poliestidina) e/ou uma proteína veículo (por exemplo, proteína de sangue, albumina ou transferrina).

Um tipo de anticorpo derivado é produzido por reticulação de dois ou mais anticorpos (do mesmo tipo ou de tipos diferentes, por exemplo, para criar os anticorpos biespecíficos). Os reticuladores adequados incluem aqueles que são heterobifuncionais, tendo dois grupos distintamente reativos separados por um espaçador apropriado (por exemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida) ou homobifuncional (por exemplo, substrato de dissuccinimida). Tais ligadores são comercialmente disponíveis a partir de Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Outro tipo de anticorpo derivado é um anticorpo rotulado. Os agentes de detecção úteis com os quais um anticorpo ou porção de ligação de antígeno da invenção pode ser derivado incluem compostos fluorescentes, incluindo, por exemplo, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloreto de 5-dimetilamina-1-naftalenossulfonila, ficoeritrina, fósforos de lantanídeo. Um anticorpo também pode ser rotulado com enzimas que são úteis para detecção, tal como, por exemplo, rábano picante peroxidase, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina, glicose oxidase. Quando um anticorpo é rotulado com uma enzima detectável, é detectada adicionando-se reagentes adicionais que a enzima usa para produzir um produto de reação que pode ser discernido. Por exemplo, quando o rábano picante peroxidase do agente está presente a adição de peróxido de hidrogênio e diaminobenzidina leva a um produto de reação colorido que é detectável. Um anticorpo também pode ser rotulado com biotina, e detectado através de medição indireta de ligação de avidina ou estreptavidina. Um anticorpo também pode ser rotulado com um epítipo de polipeptídeo predeterminado reconhecido por um repórter secundário (por exemplo, sequências de par de zíper de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, rótulos de epítipo). Em algumas modalidades, os rótulos são unidos por braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir o impedimento estérico potencial. Um anticorpo de CD44 também pode ser derivado com um grupo químico tal como polietileno glicol (PEG), um grupo de metila ou etila, ou um grupo de carboidrato. Estes grupos são úteis para melhorar as características biológicas do anticorpo, por exemplo, para aumentar a meia vida do soro.

Composições Farmacêuticas e Administração

Esta invenção também fornece uma composição farmacêutica para o tratamento de infiltração de célula anormal em um mamífero, incluindo um humano, compreendendo uma quantidade de um anticorpo de CD44 ou porção de ligação de antígeno do mesmo, como descrito aqui, que seja eficaz no tratamento de infiltração de célula anormal, e um veículo farmacêuticamente aceitável. As composições preferidas proporcionam um benefício terapêutico a pacientes com uma das mais de uma variedade de doenças inflamatórias e autoimunes, tal como artrite reumatóide, Artrite reumatóide Juvenil, aterosclerose, doença granulomatosa, esclerose múltipla, asma, Doença de Crohn, Espondilite Ancilosante, Artrite Pso-

riática, Psoríase de Placa e câncer.

Os anticorpos e porções de ligação de antígeno da presente invenção podem ser incorporados em composições farmacêuticas adequadas para administração a um paciente como descrito, por exemplo, na publicação PCT WO 2006/096488 e referências citadas aqui. Tipicamente, a composição farmacêutica compreende um anticorpo ou porção de ligação de antígeno da invenção e um veículo farmaceuticamente aceitável adaptado para manter a estabilidade, solubilidade e bioatividade da proteína. Como usado aqui, "veículo farmaceuticamente aceitável" significa qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes de retardamento de absorção e isotônicos, e similares que sejam fisiologicamente compatíveis. Alguns exemplos de veículos farmaceuticamente aceitáveis são salinas, salina tamponada de fosfato, dextrose, glicérol, etanol e similares, bem como combinações destes. Em muitos casos, será preferível incluir os agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliólcoois tais como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio na composição. Os exemplos adicionais de substâncias farmaceuticamente aceitáveis são agentes umectantes ou quantidades menores de substâncias auxiliares, tal como agentes umectantes ou emulsificantes, preservativos, tampões incluindo aminoácidos, e agentes de quelação, por exemplo, EDTA, DTPA, DFM e misturas dos mesmos, que realçam a vida de prateleira ou eficácia do anticorpo. Em uma modalidade, uma composição farmacêutica inclui um IgG, preferivelmente um IgG1 ou IgG2, anticorpo monoclonal e um agente de quelação farmaceuticamente aceitável. Uma concentração molar representativa do anticorpo varia de cerca de 0,0006 milimolares a cerca de 1,35 milimolares e a concentração molar do agente de quelação varia de cerca de 0,003 milimolar a cerca de 50 milimolares e a relação molar de anticorpo para agente de quelação varia a partir de cerca de 0,00001 a cerca de 2000.

As composições desta invenção podem estar em uma variedade de formas, por exemplo, formas de dosagem líquida, semi-sólida e sólida, tal como soluções líquidas (por exemplo, soluções injetáveis e infusíveis), dispersões ou suspensões, comprimidos, pílulas, pós, lipossomas e supositórios. A forma preferida depende do modo pretendido de administração e aplicação terapêutica. As composições preferidas típicas estão na forma de soluções injetáveis ou infusíveis, tal como composições similar às aquelas usadas para imunização passiva de humanos. O modo preferido de administração é parenteral (por exemplo, intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, intramuscular). Em uma modalidade preferida, o anticorpo é administrado por infusão ou injeção intravenosa. Em outra modalidade preferida, o anticorpo é administrado através de injeção intramuscular ou subcutânea. As formulações para injeção podem ser apresentadas na forma de dosagem de unidade, por exemplo, em ampolas ou em recipientes de multi-dose, com ou sem um preservativo adicionado. As composições podem tomar tais formas como suspensões, soluções, ou emulsões em veícu-

los oleosos ou aquosos, e podem conter os agentes formuladores tal como agentes de suspensão, estabilizantes e/ou dispersantes. Alternativamente, o ingrediente ativo pode estar na forma de pó para constituição com um veículo adequado, por exemplo, água livre de pirogênio estéril, antes do uso.

5 As composições terapêuticas devem ser tipicamente estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, dispersão, lipossoma, ou outra estrutura ordenada adequada para alta concentração de fármaco. As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando-se o anticorpo de CD44 na quantidade exigida em um solvente apropriado com um
10 ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, como exigido, seguido por esterilização filtrada. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando-se o composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes exigidos a partir daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem a vácuo
15 e liofilização que produz um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional de uma solução previamente estéril-filtrada do mesmo. A fluidez apropriada de uma solução pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula exigido no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. A absorção prolongada de composições injetáveis pode ser realizada incluindo-se na
20 composição um agente que retarde a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

Os anticorpos ou porções de ligação de antígeno da presente invenção podem ser administrados por uma variedade de métodos conhecidos na arte, embora para muitas aplicações terapêuticas, a rotina/modo preferido de administração seja infusão subcutânea, intramuscular, ou intravenosa. Como será apreciado pelo técnico versado, a rotina e/ou modo de administração variarão, dependendo dos resultados desejados.

Em certas modalidades, as composições de anticorpo da presente invenção podem ser preparadas com um veículo que protegerá o anticorpo contra liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastros transdérmicos, e
30 sistemas de liberação microencapsulados. Os polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser usados, tal como acetato de vinil etileno, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação de tais formulações geralmente são conhecidos por aqueles versados na técnica. Veja, por exemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems J. R. Robinson, ed., Marcel
35 Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978.

Compostos ativos adicionais também podem ser incorporados nas composições.

Em certas modalidades, um anticorpo de CD44 inibidor da invenção é co-

formulado com e/ou co-administrado com um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Estes agentes incluem, sem limitação, anticorpos que ligam outros alvos, agentes anti-tumor, agentes anti-angiogênese, inibidores de transdução notáveis, agentes anti-proliferativos, agentes quimioterapêuticos, ou análogos de peptídeo que inibem CD44. Tais terapias de
 5 combinação podem requerer dosagens mais baixas do anticorpo de CD44 inibidor bem como os agentes co-administrados, desse modo evitando possíveis toxicidades ou complicações associadas com as várias monoterapias.

Os compostos presentes também podem ser usados em co-terapias (pré-tratamento, pós-tratamento ou tratamento simultâneo), parcialmente ou completamente, além de outro antiinflamatórios ou DMARDS, incluindo, porém não limitado a ciclosporina,
 10 ácido zoledrônico, efalizumabe, alefacepte, etodolaco, lornoxicam, OM-89, valdecóxibe, tocilizumabe, abatacepte, meloxicam, etanercepte, nambumetona, rimexolona, 153Sm-EDTMP, prosorba, salicilato de imidazol, oprelvecina, ácido hialurônico, naproxeno, piroxicam, diace-reína, lumericóxibe, rofecóxibe tacrolimus, aceclofenaco, actarite, tenoxicam, rosiglitazona, deflazacorte, adalimumabe, leflunomida, risedronato sódico, misoprostol e diclofenaco, SK-
 15 1306X, infliximabe, anacinra, celecoxibe, diclofenaco, etoricoxibe e felbinaco, reumacona, golimumabe, denosumabe, ofatumumabe, anticorpo 10rT1, pelubiprofeno, licofelona, temsi-rolimus, eculizumabe, iguratimode, acetato de metilprednisolona, ibuprofeno, triancinolona acetonida, nabumetona, oxaprozina, hcl de oxicodona, fentanil, sulindaco, piridoxina, aceta-
 20 minofeno, alendronato, indometacina, glicosamina, olopatadina, omeprazol, Azatioprina, Sulfasalazina, Hidroxicloroquina, Ciclosporina e prednisona. Outros antiinflamatórios adequados incluem aqueles designados por número de código da companhia tal como 480156S, AA861, AD1590, AFP802, AFP860, AI77B, AP504, AU8001, BPPC, BW540C, CHINOIN 127, CN100, EB382, EL508, F1044, FK-506, GV3658, ITF 182, KCNTEI6090,
 25 KME4, LA2851, MR714, MR897, MY309, ON03144, PR823, PV102, PV108, R830, RS2131, SCR152, SH440, SIR133, SPAS510, SQ27239, ST281, SY6001, TA60, TAI-901 (ácido 4-benzoil-1-indancarboxílico), TVX2706, U60257, UR2301 e WY41770, CP - 481715, ABN-912, MLN-3897, HuMax-IL-15, RA-1, paclitaxel, Org-37663, Org 39141, AED-9056, AMG-108, fontolizumabe, pegsunercepte, pralnacasana, apilimode, GW - 274150, A-001, 681323
 30 (GSK) K-832, R-1503, ocrelizumabe, DE-096, Cpn10, THC+CBD (GW Pharma), 856553 (GSK), ReN-1869, imunoglobulinas, mm-093, amelubante, SCIO-469, ABT-874, LenkoVAX, LY-2127399, TRU-015, KC-706, amoxapineta e dipiridamol, TAK-715, PG 760564, VX-702, prednisolona e dipiridamol, PMX-53, belimumabe, prinaberel, CF-101, tgAAV-TNFR:Fc, R-788, prednisolona e SSRI, CP-690550 e PMI-001.

35 Em outra modalidade, os agentes terapêuticos adicionais incluem os agentes biológicos. Em uma modalidade adicional, um ou mais agentes biológicos são selecionados a partir de um antagonista do fator-alfa de necrose de tumor (TNF- α), um antagonista da inter-

leucina-1alfa (IL-1 α), um antagonista CD28 e um antagonista de CD20. Em ainda uma modalidade adicional, um ou mais agentes biológicos são selecionados a partir do grupo que consiste em etanercepte (ENBREL™), adalimumabe (HUMIRA™), infliximabe (REMICADE™), anacinra (KINERET™), abatacepte (ORENCIA™), rituximabe (RITUXAN™) e certolizumabe pegol (CIMZIA™).

Os exemplos de outro farmacologicamente agentes ativos que podem ser empregados em combinação com compostos de fórmula (eu) e os seus sais e solvatos para terapia de artrite reumatóide incluem: imunossuppressores tal como antolmetina guacil, mizoribina e rimexolona; anti-TNF. alfa, agentes tais como etanercepte, infliximabe, diacereína; inibidores de tirosina cinase tal como leflunomida; os antagonistas de caliceína tal como subreum; agonistas de interleucina 11 tal como oprelvecina; agonistas de beta interferona 1; agonistas de ácido hialurônico tal como NRD-101 (Aventis); antagonistas de receptor de interleucina 1 tal como anacinra; os antagonistas de CD8 tal como cloridrato de amiprilose; os antagonistas de proteína precursora beta amilóide tal como reumacona; inibidores de metaloprotease matriz tal como cipemastate e outros fármacos antirreumatóides de modificação de doença (DMARDs) tais como metotrexato, sulfassalazina, ciclosporina A, hidroxiclороquina, aurano-fina, aurotioglucoose, ouro thiomalate de sódio e penicilamine.

As composições da invenção podem incluir uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou uma "quantidade profilaticamente eficaz" de um anticorpo ou porção de ligação de antígeno da invenção. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e durante períodos de tempo necessário, alcançar o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo ou porção de ligação de antígeno pode variar de acordo com fatores tal como o estado de doença, idade, sexo, e peso do indivíduo, e a capacidade do anticorpo ou porção de anticorpo para extrair uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz também é um no qual qualquer efeito tóxico ou prejudicial do anticorpo ou porção de ligação de antígeno é excedido em valor pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma "quantidade profilaticamente eficaz" se recorre a uma quantidade eficaz, a dosagens e durante períodos de tempo necessário, alcançar o resultado profilático desejado. Tipicamente, desde que uma dose profilática é empregada em indivíduos antes de ou em um estágio mais cedo de doença, o profilaticamente quantidade eficaz pode ser menos que a quantidade terapeuticamente eficaz.

Os regimes de dosagem podem ser ajustados para fornecer a resposta desejada ótima (por exemplo, uma resposta terapêutica ou profilática). Por exemplo, um único bolo pode ser administrado, podem ser administradas várias doses divididas com o passar do tempo ou a dose pode seja proporcionalmente reduzido ou aumentado como indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso para formular composições

de parenteral em forma de unidade de dosagem para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. Forma de unidade de dosagem como usado nisto recorre a unidades fisicamente discretas servidas como dosagens unitárias para os indivíduos mamíferos a ser tratados; cada unidade que contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculou para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico exigido. A especificação para a unidade de dosagem forma da invenção é ditado por e diretamente dependente em (um) as características sem igual do anticorpo de CD44 ou porção de ligação de antígeno do mesmo e o particular efeito terapêutico ou profilático ser alcançado, e (b) as limitações inerente na técnica de compor um tal anticorpo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

Uma faixa não limitante exemplar, para uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção é 0,025 a 50 mg/kg, mais preferivelmente 0,1 a 50 mg/kg, mais preferivelmente 0,1-25, 0,1 a 10 ou 0,1 a 3 mg/kg. Em uma modalidade, o anticorpo ou porção de anticorpo da invenção é administrado em uma formulação como uma solução aquosa estéril tendo um pH que varia a partir de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 6.5 e compreendendo a partir de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml de anticorpo, a partir de aproximadamente 1 milimolar a aproximadamente 100 milimolar de, por exemplo, histidina, acetato, ou tampão de succinato, a partir de aproximadamente 0.01 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de polissorbato 80, a partir de aproximadamente 100 milimolar a aproximadamente 400 milimolar de trealose, e a partir de aproximadamente 0.01 milimolar a aproximadamente 1.0 milimolar de diidrato de dissódio de EDTA. As composições da presente invenção podem compreender um farmacologicamente opcionalmente antioxidante aceitável e/ou agente de quelação. Antioxidantes adequados incluem, porém não limitado a, metionina, tiosulfato de sódio, catalase, e platina. Por exemplo, a composição pode conter metionina em uma concentração que varia a partir de 1 mM a aproximadamente 100 mM, e em particular, é aproximadamente 27 mM. Isto será notado que valores de dosagem podem variar com o tipo e severidade da condição ser aliviado. É ser entendido mais adiante que para qualquer indivíduo particular, deveriam ser ajustados regimes de dosagem específicos com o passar do tempo de acordo com a necessidade individual e o julgamento profissional de alguém que administra ou supervisiona a administração das composições, e essas faixas de dosagem fixadas aqui são apenas exemplares e não são pretendidas limitar o escopo ou prática da composição reivindicada.

Outro aspecto da presente invenção fornece equipamentos que compreendem um anticorpo de CD44 ou porção de ligação de antígeno da invenção ou uma composição que compreendem tal um anticorpo ou porção de ligação de antígeno. Um *kit* pode incluir, além do anticorpo ou composição, diagnóstico ou agentes terapêuticos. Um *kit* também pode in-

cluir instruções para uso em um método diagnóstico ou terapêutico. Em uma modalidade preferida, o *kit* inclui o anticorpo ou uma composição que compreende isto e um agente diagnóstico que podem ser usados em um método descrito abaixo. Em outra modalidade preferida, o *kit* inclui o anticorpo ou uma composição que compreende isto e um ou agentes mais terapêuticos que podem ser usados em um método descrito abaixo.

Métodos diagnósticos de uso

Em outro aspecto, a invenção fornece em vivo e in vitro métodos diagnósticos. Os anticorpos anti-CD44 podem ser usados para detectar CD44 em uma amostra biológica in vitro ou em vivo. Em uma modalidade, a invenção fornece um método para diagnosticar a presença ou local de uma célula de expressão de CD44 do mesmo em um indivíduo em necessidade, enquanto compreendendo as etapas de injetar o anticorpo no indivíduo, determinando a expressão de CD44 no indivíduo localizando onde o anticorpo ligou-se, enquanto comparando a expressão no indivíduo com isso de um indivíduo de referência normal ou padrão, e diagnosticando a presença ou local das células. Os anticorpos anti-CD44 também podem ser usados como um marcador para inflamação e/ou para a infiltração de células imunes, tal como monócitos e células de T, em um tecido.

Os anticorpos anti-CD44 podem ser usados em um imunoensaio convencional, incluindo, sem limitação, um ELISA, um RIA, citometria de fluxo, imunistoquímica de tecido, um mancha de oosteo ou uma imunoprecipitação. Os anticorpos anti-CD44 da invenção podem ser usados para detectar CD44 a partir de humanos. Em outra modalidade, os anticorpos anti-CD44 podem ser usados para detectar CD44 a partir de macacos de cimo-molgo ou macacos reso.

A invenção fornece um método para detectar CD44 em uma amostra biológica compreendendo contatar a amostra biológica com um anticorpo anti-CD44 da invenção e descobrindo o anticorpo encadernado. Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD44 está diretamente rotulado com um rótulo detectável. Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD44 (o primeiro anticorpo) é sem etiqueta e um segundo anticorpo ou outra molécula que podem ligar o anticorpo anti-CD44 estão rotuladas. Como é conhecido bem a um de capacidade na técnica, um segundo anticorpo é escolhido que pode especificamente ligar as espécies particulares e classe do primeiro anticorpo. Por exemplo, se o anticorpo anti-CD44 for um IgG humano, em seguida o anticorpo secundário poderia ser um anti-humano-IgG. Outras moléculas que podem ligar a anticorpos incluem, sem limitação, Proteína A e Proteína G ambos das quais são comercialmente disponíveis, por exemplo, de Pierce Chemical Company.

Em outra modalidade, CD44 pode ser analisado em uma amostra biológica por um imunoensaio de competição que utiliza padrões de CD44 rotulado com uma substância detectável e um anticorpo anti-CD44 sem etiqueta. Neste ensaio, são combinados a amostra biológica, os padrões de CD44 rotulados e o anticorpo anti-CD44 e a quantidade de CD44

rotulado salto padrão para o anticorpo sem etiqueta é determinado. A quantidade de CD44 na amostra biológica é inversamente proporcional à quantidade de CD44 rotulado salto padrão para o anticorpo anti-CD44.

Alguém pode usar os imunoenaios descritos no pedido para vários propósitos. Por exemplo, os anticorpos anti-CD44 podem ser usados para detectar CD44 em células cultas. Em uma modalidade, os anticorpos anti-CD44 são usados para determinar a quantidade de CD44 na superfície de células que foram tratadas com vários compostos. Este método pode ser usado para identificar compostos que modulam CD44 proteína níveis. De acordo com este método, uma amostra de células é tratada com um composto teste durante um período de tempo enquanto outra amostra for esquerda sem tratar. Se a expressão de CD44 total será medida, as células são lisadas e a expressão de CD44 total é usando medido um dos imunoenaios descritos acima. A expressão de CD44 total nas células tratadas versus não tratadas é comparada para determinar o efeito do composto teste.

Um imunoenensaio preferido por medir expressão de CD44 total é citometria de fluxo ou imunistoquímica. Se a expressão de CD44 de superfície de célula for, as células não são lisadas, e os níveis de superfície de célula de CD44 são medidos usando um dos imunoenaios descritos acima. Um imunoenensaio preferido para determinar níveis de superfície de célula de CD44 inclui as etapas de rotular as proteínas de superfície de célula com um rótulo detectável, tal como biotina ou ^{125}I , imunoprecipitar o CD44 com um anticorpo anti-CD44 e em seguida detectar o CD44 rotulado.

Outro imunoenensaio preferido para determinar a localização de CD44, por exemplo, níveis de superfície celular, é usar a imunistoquímica. Um imunoenensaio preferido para detectar níveis de superfície de célula de CD44 inclui ligação de um anticorpo anti-CD44 rotulado com um fluoróforo apropriado, tal como fluoresceína ou ficoeritrina, e detectar o anticorpo primário usando citometria de fluxo. Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD44 é não rotulado e um segundo anticorpo ou outra molécula que pode ligar o anticorpo anti-CD44 é rotulada. Métodos tais como ELISA, RIA, citometria de fluxo, manchamento do oeste, imunistoquímica, rotulagem de superfície celular de proteínas de membrana integrais e imunoprecipitação são bem conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Harlow e Lane, supra). Além disso, os imunoenaios podem ser aumentados quanto a avaliação de alta produtividade para testar um número grande de compostos para ativação ou inibição de CD44.

Os anticorpos anti-CD44 da invenção podem da mesma forma ser usados para determinar os níveis de CD44 em um tecido ou em células derivadas a partir do tecido. Em algumas modalidades, o tecido é um tecido doente. Em algumas modalidades, o tecido é uma biópsia de tecido. Em algumas modalidades do método, um tecido ou uma biópsia é cortada do mesmo a partir de um paciente. O tecido ou biópsia é em seguida empregado em um imunoenensaio para determinar, por exemplo, expressão de CD44 total, níveis de superfí-

cie celular de CD44 ou localização de CD44 pelos métodos discutidos acima. Tais métodos podem ser usados para determinar se um tecido expressa níveis altos de CD44 que poderiam ser indicativos que o tecido é um alvo para tratamento com anticorpo anti-CD44.

Os anticorpos da presente invenção podem da mesma forma ser usados in vivo para identificar tecidos e órgãos que expressam CD44. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-CD44 são usados para identificar células de expressão de CD44. Uma vantagem de usar os anticorpos anti-CD44 humanos da presente invenção é que eles podem ser usados seguramente in vivo sem eliciar uma resposta imune significativa ao anticorpo na administração, ao contrário de anticorpos de origem não humana ou com anticorpos humanizados ou quiméricos.

O método compreende as etapas de administrar um anticorpo anti-CD44 detectavelmente rotulado ou uma composição os compreendendo a um paciente em necessidade de um tal teste diagnóstico e submetendo o paciente à análise de imageamento para determinar o local dos tecidos de expressão de CD44. Análise de imageamento é bem conhecida na técnica médica, e inclui, sem limitação, análise de radiografia, imageamento de ressonância magnética (MRI) ou tomografia computadorizada (CT). O anticorpo pode ser rotulado com qualquer agente adequado para imageamento in vivo, por exemplo um agente de contraste, tal como bário que pode ser usado para análise de radiografia ou agente de contraste magnético, tal como um

Gadolínio quelato que pode ser usado para MRI ou CT. Outros agentes de rotulagem incluem, sem limitação, radioisótopos, tal como ^{99}Tc . Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD44 será não rotulado e será imageado administrando-se um segundo anticorpo ou outra molécula que é detectável e pode ligar o anticorpo anti-CD44. Em modalidade, uma biópsia é obtida a partir do paciente para determinar se o tecido expressa o CD44 interesse.

Em uma modalidade, o anti-CD44 detectavelmente rotulado compreende um fluoróforo.

Em ainda uma modalidade adicional, os anticorpos anti-CD44 da presente invenção podem da mesma forma ser usados para determinar a redução na expressão de superfície celular de CD44 em células. Em uma modalidade preferida, as células são linfócitos e monócitos.

Métodos Terapêuticos de Uso

Em outra modalidade, a invenção fornece um método para inibir atividade de CD44 administrando um anticorpo de CD44 do mesmo a um paciente em necessidade. Quaisquer dos anticorpos ou porções de ligação de antígeno do mesmo descrito aqui pode ser usado terapeuticamente. Em uma modalidade, o anticorpo de CD44 é um anticorpo quimérico ou humanizado. Em uma modalidade preferida, o CD44 é humano e o paciente é um paciente humano. Alternativamente, o paciente pode ser um mamífero, por exemplo, um macaco, que

expressa um CD44 cujo anticorpo de CD44 reage cruzado com ele. O anticorpo pode ser administrado a um CD44 de expressão de mamífero não humano como um modelo animal de doença humana. Tais modelos animais podem ser úteis para avaliar a eficácia terapêutica de anticorpos desta invenção.

5 Em outra modalidade, um anticorpo de CD44 ou porção de anticorpo do mesmo pode ser administrado a um paciente que expressa inadequadamente níveis altos de CD44. O anticorpo pode ser administrado uma vez, porém mais preferivelmente é administrado múltiplas vezes por eficácia ideal. O anticorpo pode ser administrado de três vezes diariamente a uma vez a cada seis meses ou muito mais tempo. A administração pode ser em um
10 horário tal como três vezes, duas vezes diariamente, uma vez diariamente, uma vez a cada dois dias, uma vez a cada três dias, uma vez semanalmente, uma vez cada duas semanas, uma vez todos os meses, uma vez cada dois meses, uma vez cada três meses e uma vez cada seis meses. O anticorpo também pode ser administrado continuamente por uma mini-bomba. O anticorpo pode ser administrado por uma rotina mucosal, bucal, intranasal, inalável,
15 vel, intravenosa, subcutânea, intramuscular, parenteral, ou intratumor. O anticorpo pode ser administrado uma vez, pelo menos duas vezes ou durante pelo menos o período de tempo até que a condição seja tratada, aliviada ou curada. O anticorpo geralmente será administrado contanto que a condição esteja presente. O anticorpo geralmente será administrado como parte de uma composição farmacêutica como supra descrito. A dosagem de anticorpo
20 geralmente estará na faixa de 0,1 a 100 mg/kg, mais preferivelmente 0,5 a 50 mg/kg, mais preferivelmente 1 a 20 mg/kg, e ainda mais preferivelmente 1 a 10 mg/kg. A concentração de soro do anticorpo pode ser medida por qualquer método conhecido na técnica.

Esta invenção também fornece um método para o tratamento de infiltração de célula anormal em um mamífero, incluindo um humano, compreendendo administrar ao referido
25 mamífero uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo de CD44 ou porção de ligação de antígeno, como descrito aqui, que é eficaz no tratamento de infiltração de célula anormal.

Terapia de gene

As moléculas de ácido nucléico que codificam os anticorpos e porções de anticorpo
30 do mesmo da presente invenção podem ser administradas a um paciente em necessidade de terapia de gene. A terapia pode ser in vivo ou ex vivo. Em uma modalidade preferida, moléculas de ácido nucléico que codificam uma cadeia pesada e uma cadeia leve é administrada a um paciente. Em uma modalidade mais preferida, as moléculas de ácido nucléico são administradas tal que elas são estavelmente integradas em cromossomas de células B
35 porque estas células são especializadas para produzir anticorpos. Em uma modalidade preferida, células B precursoras são transfectadas ou infectadas e re-transplantadas em um paciente em necessidade do mesmo. Em outra modalidade, células B precursoras ou outras

células são infectadas em vivo usando um vírus conhecido para infectar o tipo de célula de interesse. Vetores típicos usados para terapia de gene incluem lipossomas, plasmídeos, e vetores virais. Vetores virais exemplares são retrovírus, adenovírus e vírus adeno-associados. Depois da infecção in vivo ou ex vivo, níveis de expressão de anticorpo podem ser monitorados retirando uma amostra do paciente tratado e usando qualquer imunoensaio conhecido na arte ou descrito aqui.

Em uma modalidade preferida, o método de terapia de gene compreende as etapas de administrar uma molécula de ácido nucléico isolada codificando a cadeia pesada ou uma porção de ligação de antígeno do mesmo de um anticorpo de CD44 e expressar a molécula de ácido nucléico. Em outra modalidade, o método de terapia de gene compreende as etapas de administrar uma molécula de ácido nucléico isolada que codifica a cadeia leve ou uma porção de ligação de antígeno do mesmo de um anticorpo de CD44 e expressar a molécula de ácido nucléico. Em um método mais preferido, o método de terapia de gene compreende as etapas de administrar uma molécula de ácido nucléico isolada que codifica a cadeia pesada ou uma porção de ligação de antígeno do mesmo e uma molécula de ácido nucléico isolada codificando a cadeia leve ou a porção de ligação de antígeno do mesmo de um anticorpo de CD44 da invenção e expressar as moléculas de ácido nucléico. O método de terapia de gene também pode compreender a etapa de administrar outro agente terapêutico, tal como quaisquer dos agentes discutidos no presente pedido com relação à terapia de combinação.

Para que esta invenção possa ser entendida ainda melhor, os exemplos seguintes são mencionados. Estes exemplos são apenas para propósitos de ilustração e não serão interpretados como limitantes do escopo da invenção de qualquer maneira.

EXEMPLOS

Nos exemplos seguintes e preparações, "BSA" quer dizer albumina de soro bovino; "EDTA" quer dizer ácido etilenodiaminotetraacético; "DMSO" quer dizer "sulfóxido de dimetila"; "MOPS" significa ácido propanossulfônico 3-(N-morfolino); "MES" quer dizer ácido de 2-(N -Morfolino)etanossulfônico; "PBS" quer dizer solução salina tamponada de fosfato; "dPBS" significa solução salina tamponada de fosfato de Dulbecco; "HEMA" quer dizer metacrilato de 2-hidróxi-etila; "DMEM" quer dizer meio de Eagle Modificado de Dulbecco; "FBS" quer dizer soro bovino fetal; "NEAA" quer dizer aminoácidos dispensáveis; "HEPES" quer dizer ácido de N-2 -hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfônico; e "DMF" quer dizer dimetil formamida.

EXEMPLO 1

Geração de Híbridomas de Produção de Anticorpo Anti-CD44

Os anticorpos preferidos de acordo com a invenção foram preparados, selecionados, e analisaram como segue:

Imunização e geração de hibridoma:

A proteína de fusão de CD44-Ig humana recombinante purificada (SEQ ID NO:1), linhagem de pré-célula B de murino, 300-19 (Reth, M. G. e outros, Nature 312 29: 418-42, 1984; Alt, F. e outros, Cell 27: 381-390, 1981), transfectadas para expressar CD44 humano e uma linhagem celular de leucemia monocítica humana, THP-1 (ATCC Cat. No. TIB-202), que naturalmente expressa CD44 humano, foram empregados como imunógenos.

Os anticorpos monoclonais completamente humanos para CD44 humano foram preparados usando cepas de HCo7 e HCo12 de camundongo transgênico de Ig humano, bem como a cepa transcromossômica/transgênica humana, KM (Mederex, Inc.). Todas estas cepas expressam anticorpos completamente humanos que são indistinguíveis de anticorpos isolados de humanos. Nestas cepas de camundongo, o gene de cadeia leve de capa de camundongo endógeno foi homozigoticamente rompido como descrito em Chen e outros (1993) EMBO J. 12:811 - 820 e o gene de cadeia pesada de camundongo endógeno foi homozigoticamente rompido como descrito no EXEMPLO 1 de Publicação de PCT WO 01/09187. Cada uma destas cepas de camundongo carregam um transgene de cadeia leve de capa humano, KCo5, como descrito em Fishwild e outros (1996) Nature Biotechnology 14:845-851. A cepa HCo7 carrega o transgene de cadeia pesada humano HCo7 como descrito nas Patentes U.S.A. Nos.: 5.545.806; 5.625.825; e 5.545.807. A cepa de HCo12 carrega transgene de cadeia pesada humano HCo12 como descrito no EXEMPLO 2 de Publicação de PCT WO 01/09187. A cepa KM carrega um míni-cromossomo humano como descrito em Ishida. E outros, (2002), Cloning and Stem Cells, 4: 91-102.

Para gerar anticorpos monoclonais completamente humanos para CD44, camundongos HuMab da cepa HCo7, HCo12 e KM, foram imunizados com células de THP-1, CD44-Fc recombinante purificado ou transfectantes 300-19 que expressam CD44 humano. Os esquemas de imunização geral para camundongos HuMab são descritos em Lonberg, N. e outros (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. e outros (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 e Publicação de PCT WO 98/24884. Os camundongos tinham 6-16 semanas de idade na primeira infusão de antígeno. Uma preparação recombinante purificada de antígeno de CD44-Fc (5-20 μ g), uma preparação de células de THP-1 ou células 300-19 transfectadas (1×10^7 de células) foi usada para imunizar os camundongos HuMab intraperitonealmente (IP), subcutaneamente (Sc) ou por injeção de pata (fp).

Os camundongos transgênicos foram imunizados com antígeno em adjuvante Ribi intraperitonealmente e subcutaneamente em intervalos de 1-4 semanas (até um total de 8 imunizações). A resposta imune foi monitorada em sangue tomado por sangramento retro orbital. O soro foi avaliado por FACS (como descrito abaixo), e camundongos com títulos suficientes de imunoglobulina humana anti-CD44 foram empregados para fusões. Os camundongos foram reforçados intravenosamente com antígeno 3 e 2 dias antes de sacrifício

e da remoção do baço e/ou linfonodos. Tipicamente, 10-20 fusões para cada antígeno foram realizadas. Um total de 81 camundongos HCo7, HCo12 e KM foram imunizados. Várias dúzias de que camundongos foram imunizadas para cada antígeno.

Seleção de camundongos HuMab Produzindo Anticorpos anti-CD44:

5 Para selecionar camundongos HuMab de produção de anticorpos que ligam CD44, soros de camundongos imunizados foram avaliados através de citometria de fluxo (FACS) para ligação a uma linhagem celular que expressa CD44 humano de tamanho natural, e não a uma linhagem celular de controle que não expressa CD44: Brevemente, as células 300-19 expressando CD44 foram incubadas com soro a partir de camundongos imunizados diluídos em 1:20. As células foram lavadas e a ligação de anticorpo específico foi detectada com IgG Ab anti-humano rotulado por FITC. As análises citométricas de fluxo foram realizadas em um instrumento de citometria de fluxo FACS (Becton Dickinson, San Jose, CA). Os camundongos que desenvolveram os títulos mais altos de anticorpos anti-CD44 foram empregados para fusões. As fusões foram realizadas como descrito abaixo e os sobrenadantes de hibridoma foram testados quanto à atividade anti-CD44 por FACS.

Geração de Hibridomas que Produzem Anticorpos Monoclonais Humanos para CD44:

Os esplenócitos de camundongo e/ou linfócitos de linfonodo, isolados a partir dos camundongos de HuMab, foram fundidos usando polietileno glicol (PEG) ou eletrofusão (E-fusão, Cyto Pulse™ technology, Cyto Pulse™ Science, Inc., Glen Burnie, MD) à linhagem celular de mieloma de camundongo, SP2/0 (ATCC, CRL-1581, Vendor, City, State), usando protocolos recomendados pelo fabricante ou padrão. Brevemente, suspensões de célula única de linfócitos esplênicos e/ou de linfonodo a partir de camundongos imunizados foram fundidas entre um-terço e número igual de células de mieloma de camundongo de não segregação Sp2/0 usando 50% de PEG (Sigma, St. Louis, MO) ou E-fusão, respectivamente. As células foram semeadas em aproximadamente 1×10^5 de esplenócitos/cavidade (PEG) ou 2×10^4 de esplenócitos/cavidade (E-fusão) em placa de microtítulo de fundo plano, e incubadas durante 10-14 dias em meio seletivo que contém 10% de soro bovino fetal, 10% de meio condicionado de P388D1 (ATCC, CRL-TIB-63), 3-5% de (IGEN) em DMEM (Mediatech, Herndon, VA, Cat.No. CRL 10013, com glicose elevada, L-glutamina e piruvato de sódio), 5 mM de HEPES, 0,055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 mg/ml de gentamicina e 1x HAT (Sigma, Cat. No. CRL - P-7185). Após 1-2 semanas, as células foram cultivadas em meio no qual o HAT foi substituído com HT. Aproximadamente 10-14 dias após a semeadura de célula, os sobrenadantes de poços individuais foram avaliados primeiro se eles continham anticorpos gama, capa humanos. Os sobrenadantes que foram marcados positivos para gama, capa humano foram em seguida avaliados subsequentemente por FACS (descrito acima) para anticorpos de IgG monoclonais anti-CD44 humano. Os hibridomas de segregação de anti-

corpo foram transferidos para placas de 24 poços, avaliados e, se confirmado positivo para anticorpos anti-CD44 monoclonais IgG humano, foram subclonados pelo menos duas vezes por diluição limitada. Os subclones estáveis foram em seguida semeados in vitro para gerar quantidades pequenas de anticorpo em meio de cultura de tecido para caracterização adicional.

Os hibridomas foram depositados no dia 10 de agosto de 2005, de acordo com o Tratado de Budapeste com a Coleção de Cultura de Tipo americana (ATCC), 10801 Blvd. University, Manassas, VA 20110-2209, e de acordo com as condições de depósito sob 37 C. F. R. §§1.801-1.809. Além disso, vetores que contêm cDNA que corresponde a mAb 10C8.2.3 foram depositados com o ATCC no dia 15 de junho de 2006, de acordo com as mesmas condições, sob designações de ATTC PTA-7658 e 7659. Todas as restrições em acesso público para os depósitos serão irrevogavelmente removidas em concessão de uma patente neste pedido e os depósitos serão substituídos se amostras viáveis não puderem ser dispensadas pelo depósito.

Os hibridomas foram nomeados os seguintes números de acesso:

TABELA 3

Anticorpo	Designação de Linhagem celular de Hibridoma de Camundongo	Designação de ATCC	Designação de Cepa
1A9.A6.B9	1376.3.1A9.A6.B9	ATCC No.PTA-6927	LN 15922
2D1.A3.D12	1376.3.2d1.A3.D12	ATCC No.PTA-6929	LN 15920
14G9.B8.B4	1376.2.14G9.B8.B4	ATCC No.PTA-6928	LN 15921

EXEMPLO 2

Clonagem de cDNA de CD44 de Cinomolgo e Humano para Gerar Linhagens de Célula Estáveis e Proteínas de Fusão de CD44-Ig

Clonagem de cDNA de CD44 humano:

CD44 humano (SEQ ID NO:1) foi clonado de a partir de cDNA de baço humano (Clontech Lab. Inc., Mountain View, CA, Cat. No. 639312) com os seguintes iniciadores: 5' - atggacaagtttgggtggcagcgagcctgg-3' (SEQ ID NO:155) e 5' - ttacacccaatcttcatgtccaca-3' (SEQ ID NO:156). O produto de PCR foi re-ampliado usando os seguintes iniciadores para adicionar sítios de restrição XhoI e XbaI: 5'-gactcgaggccaccatggacaagtttgggtggc-3' (SEQ ID:157) e 5' - gatctagatcactattacacccaatcttcatgtcc-3' (SEQ ID NO:158). Este segundo produto de PCR foi ligado em um vetor de expressão mamífero de pMIG e seqüência de CD44 foi verificada em ambos os postos. Hawley e outros, (1994) Gene Thera. 1 :136-138.

clonagem de cDNA de CD44 de Cinomolgo:

O gene de CD44 de cinomolgo foi ampliado por PCR a partir de cDNA cino PBMC com os seguintes iniciadores: 5'-atggacaagtttgggtgg-3' (SEQ ID NO: 159) e 5' - gttacacccaatcttcatgtcca-3' (SEQ ID NO:160). Produto de PCR foi ligado em vetor PCR2.1 TOPO (Invi-

trogen, City, Carlsbad, CA, Cat. No. K4510-20). Dezenove clones foram seqüenciados e a seqüência de cinoCD44 foi determinada por seqüência de consenso de todos os clones anteriores. A seqüência de ácido nucléico de dois clones, 5-2 (SEQ ID NO: 153) e 5-8 (SEQ ID NO:8) é mostrada. O CD44 de cinomolgo verificado por seqüência (SEQ ID NO:8) foi subclonado em um vetor de expressão de mamífero pMIG. Hawley e outros, (1994).

Linhagem celular de super-expressão 300-19 de CD44 de Cinomolgo e Humana 300-19:

Ambos pMIG-humano CD44 e pMIG-cinoCD44 foram transfectados em células 293T/17 (ATCC No. CRL-11263) com reagente de transfecção FUGENE 6 (Hoffman-La Roche Inc., Nutley, NJ, Cat. No. 11815091001) geraram retrovírus de CD44 humano e cinoCD44. Ambos os retrovírus foram subsequentelemente transduzidos em células 300-19 para gerar linhagens de célula de expressão de CD44 humano e CD44 de cino.

Clonagem de proteína humana de fusão CD44-IgG1:

O domínio extracelular de CD44 humano foi expresso como uma proteína de fusão IgG humana (SEQ ID NO:3). O cDNA que codifica o domínio extracelular maduro de CD44 foi ampliado por PCR (kit de PCR de KlenTaq, Clontech Lab Inc., Mountain View, CA, Cat. No.639108) a partir de cDNA de leucócito humano (Clontech Lab. Inc.) e subclonado em um vetor de expressão de mamífero - PCDMamp que contém uma seqüência líder CD5 e um rótulo de IgG1 humano. Os seguintes iniciadores de PCR foram designados para a seqüência publicada da forma de CD44 padrão (G. R. Screaton, e outros, (1992) PNAS 89:12160-12164)

(CD44+C: AGTGAGACTAGTCAGATCGATTGGAATATAACCTGCCGCTTTG) (SEQ ID NO:161),

(CD44-D: ATCACTGAGATCTTCTGGAATTTGGGGTGTCTTATAG) (SEQ ID NO:162).

O cDNA de CD44IgG1 completo foi seqüenciado e verificado em ambas as cepas.

Clonagem de Proteína de CD44-IgG1 de Cinomolgo:

O domínio extracelular de CD44 de cinomolgo foi expresso como uma proteína de fusão de Fc de IgG1 humano (SEQ ID NO:5). O cDNA que codifica o domínio extracelular maduro de cino CD44 foi ampliado por PCR a partir do vetor de pMIG-cinoCD44 e subclonado em um vetor de expressão mamífero internamente pLNp que contém uma seqüência líder CD5, um rótulo de IgG1 humano bem como sítios de restrição XhoI e HpaI. Os iniciadores de PCR foram projetados para alinhar com domínio extracelular de CD44 humano com sítios de restrição XhoI e EcoRV. As seqüências de iniciadores são como segue: 5' - atcggcgatccagatcgattggaatataacc-3' (SEQ ID NO:163), 5' - ctgtgcctcgagccattctggaatttgggtgtcc-3' (SEQ ID NO:164). O cDNA de IgG1 extaceluar de CD44 de cino completo foi a seqüência verificada em ambas filamentos.

A condição de PCR para toda a clonagem anterior usou platino Taq polimerase (Invitrogen, Cat. No. 11304-011) seguido por protocolo padrão de PCR: 3 minutos a 95°C; 25x (30 segundos a 55°C, 1 minuto a 78°C); 7 minutos a 72°C.

Domínio extracelular de expressão e purificação de CD44 humano e cinoCD44:

5 Ambas as proteínas de fusão de CD44IgG1 humano (SEQ ID NO:3) e cinoCD44 IgG1 (SEQ ID NO: 5) foram expressas usando o Freestyle 293 Expression System (Invitrogen, Cat. No. K9000-01) de acordo com os protocolos do fabricante.

A proteína de fusão foi purificada em contas de agarose de Proteína A. (Pierce, Rockford, IL, Cat. No. 15918-014). Após o meio de cultura ter sido coletado, os comprimidos de inibidor de protease (Hoffman La-Roche Cat. No. 1 697 498,1 comprimido/50 ml de meio), tampão Tris (pH 8,0, concentração final, 10 mM) e azida de sódio (concentração final, 0,02%) foram adicionado e filtrados através de um filtro de 0,22 micron. Um ml de 50% de lama de contas de Proteína A foi adicionado a cada meio de 100 ml. Girar a mistura de meios/lama durante pelo menos 2 horas a 4°C. O giro em 1000xg durante 10 minutos resultou em pelota de agarose. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e a pelota de agarose foi re-suspensa em 2-3 volumes de tampão de lavagem (0,1M de Tris HCL pH 7,5, 0,1 M de NaCl) e aplicado a coluna. A coluna foi lavada com 20 volumes de leite de tampão de lavagem e eluída com 5 volumes de leite de tampão de eluição (ImmunoPure IgG Elution Buffer, Pierce, Cat. No. 21004) em um tubo que contém 1/2 volume de coluna de 1 M de Tris pH 8. O tampão foi permutado em PBS, enquanto usando concentradores de Amicon 10.000 MW de redução (Millipore, Billerica, MA) de acordo com o protocolo do fabricante.

EXEMPLO 3

Seqüências de Anticorpos anti-CD44 Preparados de acordo com a Invenção

25 Para analisar a estrutura de anticorpos produzidos de acordo com a invenção, ácidos nucléicos foram clonados codificando fragmentos de cadeia pesada e leve a partir de hibridomas produzindo anticorpos monoclonais anti-CD44. A clonagem e seqüenciamento foram realizados como segue:

30 MRNA de Poly(A)+ foi silado usando um Míni kit RNeasy (Qiagen, San Diego, CA) e cDNA sintetizado a partir do mRNA com o kit de RT-para-PCR de Advantage (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) usando iniciação de oligo(dT). Os cDNA iniciados por oligo(dT) para clone 1A9.A6.B9, 2D1.A3.D12, e 14G9.B8.B4 foram ampliados usando iniciadores de generados listados nas TABELAS 4, 5, e 6, respectivamente. A amplificação foi obtida usando Polimerase de Alta fidelidade (Roche) e uma Máquina de DNA PTC-200 (MJ Research) com ciclagem como segue: 2'@95°C; 25x (20"@95°C, 30"@52°C, 2'@72°C); 10'@72°C.

35 Amplicons de PCR foram clonados no pCR2.1 TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA Cat. No. K4500-01) e transformados em células quimicamente competentes TOP10 (Invitrogen) usando o protocolo padrão. Os clones foram seqüências verificadas usando substância

química de Grills 16th BDTv3.1/dGTP (Applied Biosystems Inc) e um Analisador de DNA 3730xl (Applied Biosystems Inc., Foster, CA). Todas as seqüências foram analisadas por alinhamentos para o 'diretório de seqüência V BASE' (Tomlinson, e outros, (1992) J. Mol. Biol., 227, 776-798; Hum, (1995) Mol. Genet., 3, 853-860; EMBO J., 14, 4628-638.

5 TABELA 4: Iniciadores Degenerados (5' a 3') para 1A9.A6.B9

VH3c_5UTR_F	ATTYRGTGATCAGSACTGAACASAG (SEQ ID NO:165)
G_3UTR_R	TACGTGCCAAGCATCCTCGC (SEQ ID NO:166)
VK3_5UTR_F	ATCAATGCCTGKGTCAGAGCYYTG (SEQ ID NO:167)
K_3UTR_R	AGGCTGGAAGTGAAGAGCAGGTG (SEQ ID NO:168)

TABELA 5: Iniciadores Degenerados (5' a 3') para 2D1.A3.D12

VH1a_5UTR_F	CCCTGAGAGCATCAYMYARMAACC (SEQ ID NO:169)
G_3UTR_R	TACGTGCCAAGCATCCTCGC (SEQ ID NO:170)
VK1a_5UTR_F	GSARTCAGWCYCWVYCAGGACACAGC (SEQ ID NO:171)
K_3UTR_R	AGGCTGGAAGTGAAGAGCAGGTG (SEQ ID NO:172)

TABELA 6: Iniciadores Degenerados (5' a 3') para 14G9.B8.B4

VH1a_5UTR_F	CCCTGAGAGCATCAYMYARMAACC (SEQ ID NO:173)
G_3UTR_R	TACGTGCCAAGCATCCTCGC (SEQ ID NO:174)
VK3_5UTR_F	ATCAATGCCTGKGTCAGAGCYYTG (SEQ ID NO:175)
K_3UTR_R	AGGCTGGAAGTGAAGAGCAGGTG (SEQ ID NO:176)

Utilização de gene:

10 A TABELA 7 apresenta a utilização de gene evidenciada por clones de hibridoma selecionados de anticorpos de acordo com a invenção.

TABELA 7

Clone	Cadeia Pesada			Cadeia Leve		Isótipo
	V _H	D	J _H	V _L	J _k	
1A9.A6.B9	3-33	D4-17	JH6b	L6	JK4	IgG2
2D1.A3.D12	1-03	nd	JH6b	L19	JK1	IgGi
14G9.B8.B4	1-03	D3-10	JH5b	A27	JK4	IgGi
10C8.23	3-21	D6-19	JH6b	A27	JK4	IgG4

nd = não determinado

Análise de Mutação e Seqüência:

15 Como será apreciado por aqueles versados na arte, análise de utilização de gene fornece apenas uma avaliação limitada de estrutura de anticorpo. Como as células B nos animais de KM estocasticamente geram transcrições de cadeia leve e capa V-J e pesada V-D-J, há vários processos secundários que ocorrem, incluindo, sem limitação, hipermutação somática, deleções, N-adições, e extensões de CD3. Por exemplo, veja Mendez e outro, 20 (1997) Nature Genetics 15:146-156 e Publicação PCT WO 98/24893. Consequentemente, para também examinar a estrutura de anticorpo, geramos seqüências de aminoácido predi-

tas dos anticorpos de cDNAs obtidos dos clones.

FIG. 2 mostra o alinhamento de seqüências de aminoácido preditas dos domínios variáveis de cadeia pesada e leve de anticorpos monoclonais anti CD44 isolados com seqüências de aminoácido de linha germinativa dos genes de cadeia pesada e leve correspondentes.

TABELAS 9-12 fornecem as seqüências de aminoácido preditas e de nucleotídeo das cadeias leve de capa e pesada de anticorpos 1A9.A6.B9 (TABELA 9), 2D1.A3.D12 (TABELA 10), 14G9.B8.B4 (TABELA 11), e 10C8.2.3 (TABELA 12) com as regiões variáveis para cada um dos anticorpos mostrados em maiúscula.

Geramos um anticorpo mutado 2D1.A3.D12. A cadeia pesada no anticorpo 2D1.A3.D12 foi transformada para mudar um resíduo de treonina na posição 28 em uma isoleucina. A cadeia leve de anticorpo 2D1.A3.D12 na posição 38 foi mutada mudando um resíduo de glutamina em uma histidina.

Mutagenese, nas regiões de V_H (I28T) e V_L (H38Q) do clone 2D1.A3.D12, foi conduzida com os iniciadores listados na TABELA 8 usando o *Kit* de Mutagenese Direcionada ao Sítio QuickChange de Stratagen, de acordo com as instruções do fabricante. Mutações foram confirmadas através de sequenciamento automatizado, e inserções mutagenizadas foram subclonadas em vetores de expressão. Mutagenese de Anticorpo Anti-CD44 2D1.A3.D12 foi conduzida como segue:

TABELA 8: Iniciadores mutagênicos (5' a 3') para 2D1.A3.D12

2D1_VH_I28T	AAGGCTTCTGGATACacCTTCACTAGCTATGCT (SEQ ID NO:177)
2D1_VH_I28T_R	AGCATAGCTAGTGAAGgTGTATCCAGAAGCCTT (SEQ ID NO:178)
2D1_VL_H38Q	TTAGCCTGGTATCAGCAgAAACCAGGGAAAGCC (SEQ ID NO:179)
2D1_VL_H38Q_R	GGCTTTCCCTGGTTTcTGCTGATACCAGGCTAA (SEQ ID NO:180)

TABELA 9: Sequências de proteína e ADN de anticorpo 1A9.A6.B9

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA:
------------	------------

Sequência de ADN de cadeia pesada de células de hibridoma (domínio variável em maiúscula)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGG TCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTAT GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG GCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATTCTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGGAGAAGTGACTACAGGGGCTACTACGGTATGGACGTCTGGGGC CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGcctccaccaagggcccatcg gtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcg gccctgggctgctggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtg tcgtggaactcaggcgctctgaccagcggcggtgcacaccttcccagct gtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtg ccctccagcaacttcggcaccagacctacacctgcaacgtagatcac aagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatgttgt gtcgagtgccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtc ttcctcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctccccggacc cctgaggtcacgtgctggtggtggacgtgagccacgaagaccccag gtccagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcataatgccaag acaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagc gtcctcaccgttgtgacaccaggactggctgaacggcaaggagtacaag tgcaaggtctccaacaaaggcctcccagcccccatcgagaaaaccatc tccaaaaccaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgtccc ccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctg gtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaat gggcagccggagaacaactacaagaccacacctcccatgtgtgactcc gacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg tggcagcaggggaacgtcttctcatgtctccgtgatgcatgaggctctg cacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID NO: 10)
Sequência de proteína derivada (por translação) de cadeia pesada de células de hibridoma (domínio variável em maiúscula)	QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWV AVIWDGSKNFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARRSDYRGYYGMDVWQGQTTVTVSSastkgpsvfplapcsrcstsesta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavllqssglyslssvvtv pssnfgtqtytcnvdhkpsntkvdktkverkccecpappvapgsv flfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshdpevfwnwyvdgvevhnak tkpreeqfnstfrvsvltvvhqdlngkeykckvsnkglpapiekti sktkgqprepgvytlppsreemtknqvsltclvkgyfypsdiavewesn gqpennykttpmldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmheal hnhytqkslslspgk (SEQ ID NO: 9)
Sequência de ADN de cadeia leve de células de hibridoma (domínio variável em maiúscula)	Sequência de Cadeia Leve de Tamanho Natural de 1A9.A6.B9 - Se- quência de Nucleotídeo GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGG GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTATCAACTAC TTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC
	TATGATGCATCCAACAGGGCCTCTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGC AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCT GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTTCAGCAGCGTCGCAACTGGCCGCTC ACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACgaactgtggctgca ccatctgtcttcatcttccccgcatctgatgagcagttgaaatctgga actgcctctgttgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggcc aaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccag gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagc agcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctac gcctgcgaagtacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagc ttcaacaggggagagtg (SEQ ID NO: 14)

Seqüência de proteína derivada (por translação) de cadeia leve de células de hibridoma (domínio variável em maiúscula)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVINYLAWYQQKPGQAPRLLI YDASNRASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRNWPL TFGGGTKVEIKrtvaapsvfifppsdeqlksgrtasvvc1lnnfyprea kvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsksdstyslsstltlskadyekhkvy acevthqglsspvtksfnrgec (SEQ ID NO: 13)
--	---

TABELA 10: Sequências de proteína e ADN de anticorpo 2D1.A3.D12

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA:
Seqüência de ADN de cadeia pesada de células de hibridoma (domínio variável em maiúscula)	CAGGTCCAACCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCC TCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATACATCTTCACTAGCTAT GCTATGCATTGGGTGCGCCAGGCCCGGACAAAGGCTTGAGTGGATG GGGTGGATCAACGCTGCCATTGGTAGCACAAAATATTACAGAAGTTC CAGGGCAGAGTCACCATTACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCTAC ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAAGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGAGACGGGTGGGAGGACTACTACTACCACGGTATGGACGTCTGG GGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGcctccaccaagggccca tcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcaca gcggccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacg gtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccg gctgtcctacagtccctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgacc gtgccctccagcagccttgggcacccagacctaactctgcaacgtgaat cacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttagagcccaaactct tgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctg gggggaccgtcagtccttcttccccccaaaacccaaggacacctc atgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtgggtggagcgtgagc cacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggag gtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacg taccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaat ggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccc atcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtc agcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtg gagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcct cccgtgctggactccgacgggtccttcttctctacagcaagctcacc gtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtg atgcatgaggtcttgcaaacactacacgcagaagagcctctccctg tctccgggtaaa (SEQ ID NO: 46)
Seqüência de proteína derivada (por translação) de cadeia pesada de células de hibridoma (domínio variável em maiúscula)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYAMHWVRQAPGQRLEWM GWINAAIGSTKYSQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDFAVYYC ARDGWEDYYYHGMDVWQGQTTVTIVSSastkgpsvfplapsskstsggt aalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvt vpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccppcpapell ggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgve vhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpap iektiskakgpprepqvytlppsrde1tknqvs1tclvkgyfypsdiav ewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvdkswqqgnvfscsy mhealhnhytqksls1spgk (SEQ ID NO: 45)

Seqüência de ADN de cadeia clara de células de hibridoma (domínio variável em maiúscula)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGA GACAGAGTCACCATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGGGTATTAGTAGCTGG TTAGCCTGGTATCAGCATAAACCCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATC TATGCTGCATCCAGTTTGC AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT CAGCGGC AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT GAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAATAATTTCCCGTGG ACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACgaactgtggctgca ccatctgtcttcatcttccccgccatctgatgagcagttgaaatctgga actgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagagggcc aaagtacagtggagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccag gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagc agcaccttgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctac gcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagc ttcaacaggggagagagtgt (SEQ ID NO: 50)
Seqüência de proteína derivada (por translação) de cadeia leve de células de hibridoma (domínio variável em maiúscula)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQHKGPKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANFPW TFGQGTKVEIKrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcclnnfypprea kvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsdstyslslstltlskadyekhkvy acevthqglsspvtksfnrgec (SEQ ID NO: 49)

TABELA 11: Sequências de proteína e ADN de anticorpo 14G9.B8.B4

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA:
seqüência de ADN de cadeia pesada de células de hibridoma (domínio variável em maiúscula)	CAGGTCCAGCTTGTGCGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCC TCAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTAACTAT GCTATGCATTGGGTGCGCCAGGCCCGGACAAAGGCTTGAGTGGATG GGATGGATCAACACTGGCAATGGTAACACAAAATATTACAGAAGTTC CAGGGCAGAGTCACCATTACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCTAC ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAAGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGGTTTACTCTGGTTCGGGGAGTCCCTGGGGCCAGGGAACCCCTG GTCACCGTCTCCTCAGcctccaccaagggcccatcggtcttccccctg gcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcgccctgggctgc ctgggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactca ggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcc tcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagc ttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaac accaaggtggacaagaaagttagcccaaattctgtgacaaaactcac acatgccaccggtgccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtc ttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacc cctgaggtcacatgcgtgggtgggacgtgagccacgaagaccctgag gtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaag acaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagc gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaag tgcáaggtctccaacaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatc tccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcc ccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg gtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaat gggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgtctggactcc gacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg cacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID NO: 82)
Seqüência de proteína derivada (por translação) de cadeia pesada de células de hibridoma (domínio variável em maiúscula)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYAMHWVRQAPGQRLEWM GWINTGNGNTKYSQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYC ARFYSGSGSPWGGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalgc lvkdyfpepvtvswnsгалтsgvhtfpavlgssglyslssvvtvpsss lgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccppcpapellgppsv flfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnak tkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiecti skakgqprepvtytlppsrdeletknqvsltclvkgfypsdiavewesn ggpennykttpvldsdgsfflyskltvdksrwqggnvfscsvmheal hnhytqkslslspgk (SEQ ID NO: 81)
Seqüência de ADN de 14G9.B8.B4 cadeia de luz de células de hibridoma (domínio variável em maiúscula)	GAAATTGTGTTGACGCGAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGG GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTC ATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGAGCAGTATGGTAGCTCACCG CTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACgaactgtggct gcaccatctgtcttcatcttccccgccatctgatgagcagttgaaatct ggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagag gccaaagtacagtggaaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcc caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctc agcagcaccttgacgtgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtc tacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaag agcttcaacaggggagagtgt (SEQ ID NO: 86)

Seqüência de proteína derivada (por translação) de cadeia leve de células de hibridoma (domínio variável em maiúscula)	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGKVEIKrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcclnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskadyekhhkv yacevthqglsspvtksfnrgec (SEQ ID NO: 85)
--	---

TABELA 12: Seqüências de proteína e ADN de anticorpo 10C8.2.3

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA:
Seqüência de ADN de cadeia pesada de células de hibridoma (domínio variável em maiúscula)	GAGGTGCAGCTGATGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCATATCCATTACTGTTAGAAGTAGTTACATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGTCCCTCGCTATAGCAGTGCCTGCTACCTCCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAgcttccaccaagggcccatccgtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagccgccctgggctgcttggtcaaggactacttcccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaaacaccaagggtggacaagagagttagagccaaatattggtcccccatgcccattcatgcccagcacctgagttcctggggggaccatcagtccttccgtgttccccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccggaccctgagggtcacgtgcgtgggtgggtggacgtgagccaggaagaccccaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaagggtctccaacaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacaccctgcccccatcccaggaggagatgaccaagaacagggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggagggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctctgggtaaa (SEQ ID NO: 118)

Seqüência de proteína derivada (por translação) de cadeia pesada de células de hibridoma (domínio variável em maiúscula)	EVQLMESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWV SSITVRSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARVLAIAVPGTSYIIYYGMDVWGQGTITVTVSSastkgpsvfplapcsrs tsestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssglysl ssvvtvpssslgtktytcnvdhkpstkvdkrveskygppcpscpape flggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdg vevhnaktkpreeqfnstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglp ssiectiskakgqprepqvytlppsqeemtknqvsltclvkgyfypsdi avewesngqpennykttppvldsdgsfflysriltvdksrwqegnvfsc svmhealhnhytqkslsislslqk (SEQ ID NO: 117)
Seqüência de ADN de cadeia leve de células de hibridoma (domínio variável em maiúscula)	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGG GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTC ATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTTCAGCAGTATGGTAGCTCACGG CTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAacgaactgtgget gcaccatctgtcttcatcttccccgccatctgatgagcagttgaaatct ggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataacttctatcccagagag gcaaagtagcagtggaaggtggataacgccctccaatcggttaactcc caggagagtgtagcagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctc agcagcacctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtc tacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccggtcacaag agcttcaacaggggagagtggt (SEQ ID NO: 122)
Seqüência de proteína derivada (por translação) de cadeia leve de células de hibridoma (domínio variável em maiúscula)	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS LTFGGGKTKVEIKrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvccllnfy preakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsksdstyslsstltlskadyek hkv yacevthqglsspvtksfnrgec (SEQ ID NO: 121)

Domínios variáveis de anticorpos anti-CD44 foram clonados em vetores de expressão como segue:

Os domínios variáveis foram ampliados a partir de cDNA clonado de pCR2.1 usando iniciadores listados na TABELA 13, 14, e 15. Amplificação foi obtida usando a polimerase Pfx Platinum (Invitrogen) e uma Máquina PTC-200 ADN (MJ Research) com ciclagem como segue: 2 minutos a 94°C; 20x (30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C, 1 minuto a 68°C); minutos a 68°C. Os domínios variáveis foram em seguida clonados em vetores de expressão que contêm domínios constantes do isótipo apropriado. Estes clones foram verificados por seqüência usando química Grills 16^a BDTv3.1/dGTP (Applied Biosystems Inc) e um analisador de ADN 3730xl (Applied Biosystems).

TABELA 13: Iniciadores de domínio variáveis (5' a 3') para 1A9.A6.B9

H3_11	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG (SEQ ID NO:181)
G1/2_VH_R	TGGAGGCTGAGGAGACGGTGAC (SEQ ID NO:182)
K_L6	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAG (SEQ ID NO:183)
JK4_R	tatattccttaattaagttattctactcacGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC T (SEQ ID NO:184)

TABELA 14: Iniciadores de domínio variável (5' a 3') para 2D1.A3.D12

H1_03	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTG (SEQ ID NO:185)
G1/2_VH_R	TGGAGGCTGAGGAGACGGTGAC (SEQ ID NO:186)
K_O12	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC (SEQ ID NO:187)
JK1_R	tatattccttaattaagttattctactcacGTTTGATTTCACCTTGGTCCCT (SEQ ID NO:188)

TABELA 15: Iniciadores de domínio variável (5' a 3') para 14G9.B8.B4

H1_03	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTG (SEQ ID NO:189)
G1/2_VH_R	TGGAGGCTGAGGAGACGGTGAC (SEQ ID NO:190)
K_A27	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAG (SEQ ID NO:191)
JK4_R	tatattccttaattaagttattctactcacGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC T (SEQ ID NO:192)

EXEMPLO 4

Anticorpos anti-CD44 humanos foram avaliados quanto a sua capacidade de inibir a
5 interação entre HA (Sigma, Cat. No. H5388) e proteína de CD44 humana (SEQ ID NO:3)
como descrito no EXEMPLO 2.

Ensaio de ligação foram conduzidos em placas de ensaio ELISA de 96 poços (pla-
cas de 96 poços Immunolux HB Maxisorp, Nunc. Cat. No. 442404). Em primeiro dia, 100 µl
de HA de crista de galo diluídos em 50 mM de tampão de Nabibcarb, pH 9,6 em 2,5 mg/ml
10 foram adicionados aos poços de ensaio na placa e incubados a 4 °C durante a noite. Apro-
ximadamente, 24 horas depois, as placas revestidas com HA foram lavadas quatro vezes
usando 300 µl de tampão de PBS com 0,05% de Tween-20 (Sigma, Cat. No. P1379). As
placas foram em seguida bloqueadas adicionando 200 µl de BSA a 3% em PBS a cada poço
e incubadas durante 2 horas a 37 °C. As placas bloqueadas foram em seguida lavadas com
15 PBS com 0,05% de Tween-20. Em uma placa de polipropileno de 96 poços separada (Falco,
Cat. No. 351190), anticorpos anti-CD44 1A9.A6.B9;

2D1.A3.D12; 14G9.B8.B4; e 10C8.2.3 foram diluídos em PBS com BSA a 1% em
várias concentrações foram misturados com proteína de fusão de CD44-Ig humana em uma
concentração final de 0,6 µg/ml em um volume de 50 µl. A mistura foi incubada em tempera-
20 tura ambiente durante 60 minutos e em seguida transferida para as placas revestidas com
HA e incubada em temperatura ambiente durante uma hora. As placas foram lavadas com
PBS com 0,05% de Tween-20. IgG-HRP anti-humano (Amersham Biosciences, Piscataway,
NJ, State, Cat. No. NA933) diluídas 1:500 entre BSA a 1% (para detectar CD44-Ig que é
ligado a HA) foram adicionadas a cada poço e incubadas em temperatura ambiente. As pla-

cas foram em seguida lavadas novamente e 50 µl de TMB (substrato de peroxidase de micropoço de TMB, KPL, 52-00-02) foram adicionados e incubados durante cerca de 10 minutos. As reações foram em seguida interrompidas com 50 µl de solução de interrupção e valores de OD₄₅₀ foram medidos em uma leitora de placa. Figura 3 ilustra a representação gráfica de anticorpo de CD44 1A9.A6.B9 que bloqueia a interação entre HA e proteína de fusão de CD44-Ig. TABELA 16 mostra as IC₅₀'s dos anticorpos anti-CD44.

TABELA 16

Clone de Anticorpo	IC ₅₀ (µg/mL)
1A9.A6.B9	0,41 ±0,03(n=3)
2D1.A3.D12	0,33 ±0,01 (n=2)
14G9.B8.B4	0,43 ± 0,01 (n=3)
10C8.2.3	0,64 (n=2)
IM7	1,85 ± 0,35 (n=9)
515	0,32 (n=1)

EXEMPLO 5

Determinação de Constantes de Ligação de Anticorpos Monoclonais Anti-CD44

Conduzimos outro ensaio in vitro para demonstrar a afinidade de ligação dos anticorpos da invenção para CD44.

Estudos de ligação demonstraram que Abs anti-CD44 ligam-se a CD44 em células transfectadas em uma análise de ligação de equilíbrio tem uma constante de ligação de 0,98 µg/mL (6,8 nM, veja FIGS. 4 A-C, especificamente Figura 4C). As células 300-19 que foram transduzidas com vetor retroviral que codifica proteína de CD44 humana e foram lavadas duas vezes por PBS. As células 300-19 foram em seguida ressuspensas em tampão de FACS [PBS, (Sigma, Cat. No. D-8537; Azida a 0,02% (Sigma, Cat. No. S-2000); 5 µg/ml de citocalasina B, (Sigma, Cat. No.C-6762) e Soro Bovino Fetal a 2% (Gibco, City, Cat. No.16140-071)] em densidade de célula de 1x10⁶ de células/ml. Transferimos 400 µl de células 300-19 de expressão de CD44 (2x10⁵ /400 µl) em tubos Nunc-Immuno, (VWR, Cat No. 443990), adicionamos 5 µl de FITC de IgG anti-hu (Jackson, Cat. No. 109-095-098) e 1A9.A6.B9 em várias concentrações e tubos incubados em placa agitadora (Thermolyne, rotomix tipo 48200) durante 3 horas em temperatura ambiente com agitação continuada. Depois de 3 horas, as células foram lavadas duas vezes com tampão de FACS. As células foram ressuspensas em 250 µl de paraformaldeído a 1%, (Electron Microscopy Science, Ft. Washington, PA, Cat. No. 15710). Os tubos foram lidos usando Becton Dickinson FACSCalibur e os dados foram analisados usando CellQuest Pro (Becton Dickinson). (Veja Figura 4C).

Anticorpos anti-CD44 da mesma forma ligam-se às proteínas de CD44 de ciano e

CD44 humanas expressas em célula CD3+ T periféricas (veja Figuras 4A e 4B). Especificamente, sangue periférico humano foi coletado de voluntários humanos normais em tubos *vacutainer* com heparina (Becton Dickinson, Cat No. 366480). Adicionamos 100 µl de sangue humano coletado aos tubos Nunc-Immuno (VWR Cat No. 443990). Adicionamos Abs

5 anti-CD44 em cada tubo para alcançar as concentrações finais de 0,2 µg/ml a 20 µg/ml. Depois disso, adicionamos 10 µl de anti-CD3-PerCP (BD Pharmingen, Cat. No. 347344) e 10 µl de anti-CD 14-APC (BD Pharmingen, Cat No. 555399) a cada tubo. Incubamos durante 30 minutos em gelo, seguido por centrifugação em 1200 rpm durante 10 minutos, e removemos o sobrenadante. Adicionamos 100 µl de tampão de lavagem de FACS (PBS-Sigma D8537;

10 azida a 0,02%, Sigma Cat. No. S2002 e soro bovino fetal a 2%, Gibco Cat. No. 16140-071) bem como adicionamos 50 µl/cavidade de anticorpo específico de IgG Fc anti humano de cabra rotulado por FITC secundário (Jackson Cat. No. 109-095-098) a diluição de 1:100 vezes. Incubamos durante 25 minutos a 4°C no escuro. Depois de 25 minutos de incubação adicionamos 2 mls de solução de lise de FACS (BD Pharmingen, diluído 1:10 em água),

15 vortexamos e novamente incubamos durante 10 minutos em temperatura ambiente. Depois de 10 minutos de incubação, centrifugamos em 1200 rpm durante 10 minutos e removemos o sobrenadante, lavamos as células com tampão de lavagem de FACS, seguido por centrifugação e remoção do sobrenadante. As células foram em seguida fixadas com 250 ml de 1% de paraformaldeído (Electron Microscope Science, Ft Washington, PA Cat. No. 15710) e

20 lemos usando Becton Dickson FACS Calibur, e analisamos usando CellQuest Pro (Becton Dickinson).

Estudos de Ligação de ELISA:

Estudos de ligação de ELISA demonstraram que 1A9.A6.B9 liga-se a proteína de fusão de CD44-Ig de cino e humanas revestida com placas de 96 poços (veja Figura 5). Para

25 começar o ensaio, 50 µl de proteína de fusão de CD44-Ig em 1 µg/ml de PBS foram adicionados a uma placa de ensaio de 96 poços (placa Immuno Maxisorp, Nunc. Cat. No. 442404) e incubados durante a noite a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS, 0,05% de Tween-20. As placas foram em seguida bloqueadas por BSA a 3% em PBS durante 2 horas a 37 °C, 200 µl por poço e lavadas novamente. Anticorpo anti

30 CD44 1A9.A6.A9 foi diluído em várias concentrações com PBS e BSA a 1%, e foi adicionado às placas e incubadas durante uma hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e 50 µl de anticorpo HRP de cadeia leve de capa anti-humano (Amersham Bioscience, Cat. No. NA 933), diluídas 1 :2000 entre BSA a 1% em PBS foram adicionados a cada poço e incubados em temperatura ambiente durante mais uma hora. As placas foram lava-

35 das novamente, e 50 µg/ml de substrato de peroxidase de micropoço de TMB (Cat. No. KPL S2-00-02)) foram adicionados e incubados durante 5 a 10 minutos. Reações de ELISA foram interrompidas com solução de interrupção e valores de OD450 foram medidos por uma

leitora de placa.

Estudos de ligação BIAcore:

Ressonância de plasmônio de superfície foi usada para medir a interação molecular em um *chip* sensor CM5 revestido com proteína de fusão de CD44-Fc humana (12 µg/ml, 10 mM de Acetato, pH 4,0) na superfície. Abs anti-CD44 em concentração de 5, 3, 2, 1, 0,5 e 0,25 µg/ml foi avaliado através de método direto. Padrões de IgG1 e IgG2 humanos foram usados para conferir a ligação base e não específica. Porção inicial da fase de associação e dissociação das curvas é usada para calcular as constantes de taxa de afinidade e é relatada na TABELA 17.

TABELA 17

Dados de ligação Biacore para Anticorpos anti-CD44

Anticorpo Anti-CD44	K_D de Afinidade x 10^{-9} (M)	k_{off} de taxa de dissociação x 10^{-4} 1/s
1A9.A6.A9	0,6	5,76
2D1.A3.D12	2,01	6,53
14G9.B8.B4	4,88	52,9

EXEMPLO 6

Anticorpos Monoclonais Anti-CD44 Bloqueiam a Produção de Citocina Inflamatória de Células Mononucleares de Sangue Periférico Humano (PBMC)

Anticorpos anti-CD44 foram da mesma forma avaliados quanto a sua capacidade de bloquear a liberação de IL-1 β estimulada HA (Sigma, Cat. No. H5388) de PBMC humana purificada (veja FIG. 6). Sangue periférico humano foi coletado a partir de voluntários humanos normais em tubos *vacutainer* com heparina (Becton Dickinson, Cat. No. 366480). PBMCs foram isoladas usando tubos Sigma Accuspin (Sigma, Cat. No. A7054) de acordo com as instruções do fabricante. As células purificadas foram lavadas duas vezes com RPMI 1640 (Gibco, Cat. No. 11875-093) e ressuspendas em 5×10^6 em RPMI e adicionadas a uma placa de ensaio de 96 poços (Costar, Cat. No.3596), 100 µl de PBMCs por poço. As PBMCs humanas foram em seguida estimuladas por HA (Sigma, Cat. No. H1751) na presença de várias concentrações de anticorpos anti-CD44 1A9.A6.B9; 2D1.A3.D12; 14G9.B8.B4; e 10C8.2.3 em RPMI. Especificamente, 100 µl de solução de matéria-prima de HA (10 µg/ml em RPMI) foram misturados com PBMCs e 20 µl de anticorpos anti-CD44 1A9.A6.B9; 2D1.A3.D12; 14G9.B8.B4; e 10C8.2.3 em várias concentrações. As placas de ensaio foram incubadas durante 24 horas a 37°C em atmosfera umedecida (incubadora de CO₂ Narco 6300). As placas foram em seguida centrifugadas durante 10 minutos em 1200 rpms. Os sobrenadantes foram em seguida removidos a partir de cada poço e medidos por ELISA de IL-1 β de acordo com o protocolo do fabricante (*kit* IL-1 β Quantikine ELISA, R&D

Cat. No.DLB.O). (Veja, TABELA 18).

TABELA 18

Ab monoclonal anti-CD44 no ensaio de liberação de IL-1 β usando PBMC purificada humana estimulada por HA

Clone de Anticorpo	IC50 (μ g/mL)
1A9.A6.A9	0,83 $\pm$ 0,61 (n=6)
2D1.A3.D12	0,23 $\pm$ 0,23 (n=1)
14G9.B8.B4	0,35 $\pm$ 0,02 (n=3)
10C8.2.3	0,40 (n=1)
IM7	1,62 $\pm$ 0,93 (n=4)
515	1,46 (n=1)

5

EXEMPLO 7

Anticorpos Monoclonais Anti CD44 Bloqueiam a Produção de Citocina de Células T Periféricas Humanas

Anticorpos monoclonais anti-CD44 bloquearam a produção de IL-2 e IFN- γ de células T periféricas humana estimuladas por anticorpos anti-CD3 e anti-CD28. Sangue periférico humano foi coletado de voluntários humanos normais em tubos *vacutainer* com heparina (Becton Dickinson, Cat. No. 366480). O sangue foi em seguida misturado com volume igual de anticorpo anti-CD3 (UCTH1, R&D, Cat. No.MABIOO) e anti-CD28 (R&D, Cat. No.AF-342-PB) diluído em PBS em tubos de polipropileno Falcon (Falcon Cat. No.2059). As concentrações finais de anticorpos th anti-CD3 e anti-CD28 foram cerca de 1 μ g/ml e 10 ng/ml respectivamente. Em placas de poliestireno de 96 poços (Costar, Cat. No.3596), 10 μ l de anticorpos anti-CD44 1A9.A6.B9; 2D1.A3.D12; e 14G9.B8.B4 em várias concentrações, foram adicionados a cada poço e em seguida misturados com 200 μ l de sangue total humano que foi pré-misturado com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28, incubados a 37°C durante 24 horas. Soro foi removido e testado por ensaios ELISA de IFN- γ e IL-2 (R&D, Cat. Nos. DIF50 e D2050, respectivamente). (Veja TABELA 19 abaixo).

TABELA 19

Abs Anti-CD44 Bloqueia a Liberação de IL-2 e IFN- γ de Sangue Periférico Humano Ativado por Anticorpos Anti-CD3 e Anti-CD28

Anticorpos Anti-CD-44	IC 50 (μ g/ml)	
	IL-2	IFN- γ
1A9.A6.A9	0,58 $\pm$ 0,21 (n = 6)	2,46 $\pm$ 1,46n = 7
14G9 B8.34	Inativo (n = 10)	Inativo (n = 10)
2D1 WT/H38Q	0,46 $\pm$ 0,06 (n = 5)	2,45 $\pm$ 2,2(n=2)

EXEMPLO 8

Redução de Expressão de Superfície de CD44

Análises de citometria de fluxo (FACS) foram realizadas para detectar uma redução de expressão de superfície de CD44 pelo anticorpo anti-CD44. Incubamos cada anticorpo anti-CD44 com sangue total humano sob condição *in vitro* durante aproximadamente 12 horas, e detectamos o nível de expressão de superfície de CD44 reduzido em leucócitos periféricos humanos (veja FIG. 7). Dez μ l de anticorpos anti-CD44 1A9.A6.B9; 2D1.A3.D12; 14G9.B8.B4; e 10C8.2.3 em várias concentrações foram adicionados uma placa de ensaio de poliestireno de base plana de 96 poços (Costar, Cat. No.3596). Sangue periférico humano foi coletado de voluntários humanos normais em tubos *vacutainer* com heparina (Becton Dickinson, Cat. No. 366480). Cem μ l por cavidade de sangue humano foram em seguida misturados com anti-CD44 Ab, incubados a 37°C durante 24 horas em atmosfera umedecida (incubadora de CO2 Narco 6300). Vinte μ ls de anticorpo de detecção de CD44, G-44-26-PE (BD PharMingen, Franklin Lakes, NJ, Cat. No. 555479), 10 μ l de anticorpo anti-CD3-perCP (BD PharMingen, Cat. No. 347344) e 10 μ l de anticorpo anti-CD 14-APC (BD PharMingen, Cat. No. 555399) foram em seguida adicionados aos poços, e mantidos em gelo durante 30 a 40 minutos no escuro. Cem μ l de sangue foram em seguida removidos das placas e transferidos para tubos nunc-immuno (VWR, Chester Ocidental, PA, Cat. No. 443990) e 2 mls de solução de lise de FACS (BD Pharmingen Cat. No. 349202) foram adicionados a uma diluição de 1:10 de água, vortexados e fixados aparte durante 10 minutos em temperatura ambiente. Depois de 10 minutos, o sangue foi centrifugado em 1200 rpms durante 10 minutos e as células foram lavadas com tampão de lavagem de FACS (PBS, azida a 0,02%, Sigma, Cat. No. S2002 e Soro Bovino Fetal a 2% (Gibco, Cat. No.16140-071). O sangue foi centrifugado novamente em 1200 rpms durante 10 minutos, e lavado com tampão de lavagem de FACS. As células foram em seguida fixadas com 250 ml de paraformaldeído a 1% (Electron Microscopy Science, Cat. No. 15710) e os tubos foram lidos usando *calibur* de FACS e os dados foram analisados usando o *software* Cellquest. (Veja TABELAS 20 e 21). Figura 8 mostra os resultados de FACS em uma concentração de 10 μ g/ml de anticorpo 1A9.A6.B9 para (a) Linfócitos, (b) monócitos, e (c) PMNs. O resultado do anticorpo 1A9.A6.B9 é mostrado em cinza e a expressão da linha de referência em preto.

TABELA 20

Abs Anti-CD44 reduzem a expressão de superfície de CD44 em células CD3+ T periféricas de cinomolgos e humanos

	Células CD3+ T periféricas humanas	Células CD3+ T periféricas de cinomolgos
	IC50 (μ g/ml)	IC50 (μ g/ml)

1A9.A6.B9	2,8 ±1,3 (n=6)	0,82 ±0,16 (n=3)
14G9.B8.B4	0,93 ± 0,85 (n=4)	0,39 ±0,18 (n=3)
2D1.A3.D12	>20 (n=4)	>20 (n=4)
10C8.2.3	>20 (n=2)	
IM7	1,5 ±0,71 (n=2)	9,9 (n=1)
515	Inativo*	

menor que 40% de inibição em 20 µg/ml

TABELA 21

1A9.A6.B9 Reduz a Expressão de CD44 em Leucócitos em Sangue Periférico de Cinomolgos e Humanos (Veja FIGS. 8A-8C)

Leucócitos	IC50 (µg/ml)	
	Humano	Cinomialgos
Células T	2,6 ±1,0 (n=10)	1,1 ±0,5 (n=5)
Monócitos	3,3 ±0,3 (n=3)	N.R.
Células B	2,4 ± 1,1 (n=4)	NT.

5 N. R. = Nenhuma resposta

N.T. = não testado

EXEMPLO 9

Estudo in vivo em dose única de Anticorpo anti-CD44 1A9.A6.B9 Induz uma Diminuição Dependente de Dose na Expressão de CD44 em Células CD3+ T Periféricas em Macacos Cinomialgos

10 Redução de expressão de superfície de CD44 de linfócitos (veja FIG. 9A) e monócitos (veja FIG. 9B) induzida através de anticorpos anti-CD44, foi examinada pela administração de uma única dose intravenosa de 1A9.A6.B9 (10 mg/ml em 25 mM de acetato de sódio, 140 mM de NaCl, 0,2 mg/ml de polissorbato-80, PH5,5) em 1, 10 e 100 mg/kg (2 animais machos e 2 fêmeas por grupo de dose) em macacos cinomialgos fornecidos por Charles River Primatas, BRF (Bio Research Facility, House Texas). Amostras de sangue (~ 2 ml)

15 foram coletadas duas vezes por venipunção femoral a partir de pré-tratamento em duas vezes em macacos jejuados e 2, 24, 48, 168, 336 e 504 horas pós-dose para análise citométrica de fluxo de três cores (CD3+, CD14+, CD44+).

20 Para detectar a expressão de CD44 por análise de FACS analisam, 100 µl de san-

gue periférico foram misturado com qualquer combinação de 20 µl de CD14-FITC (Clone M5E2, BD-Pharm. Cat. No. 67509), 20 µl de CD3-PerCP (BD-Pharm, Cat. No. 13043) e 10 µl de CD44-PE (IM7, BD-Pharm. Cat. No. 8900), ou combinação de 20 µl de CD14-FITC (Clone M5E2, BD-Pharm. Cat. No. 67509), 20 µl de CD3-PerCP (BD-Pharm, Cat. No. 13043) e 10 µl de Rt IgG2b-PE (IM7, BD-Pharm. Cat. No. 60254). O anticorpo foi misturado com o sangue usando um vórtice em uma velocidade moderada a baixa durante 1 segundo. O sangue com anticorpos foi incubado durante 20 a 30 minutos a 4 °C, adicionando 1,5 ml de 1:10 de solução de lise de FACS (B. D. Pharmingen, San Diego, a CA) a cada tubo. Cada tubo foi misturado no vórtice em velocidade baixa/moderada durante 1-3 segundos. Os tubos foram incubados em temperatura ambiente durante aproximadamente 12 minutos no escuro. Para garantir a lise completa, a opacidade de cada tubo foi conferida, e um adicional de 500 µl de lise de FACS foi adicionada aos tubos que pareceram nublados. Um adicional de 2 ml de tampão de mancha de BD (BD PharMingen, San Diego, CA, Cat. No. 55465C) foi adicionado; os tubos foram retampados e misturados por inversão dos tubos. Os tubos foram colocados em seguida em um balde oscilante e centrifugados em 250 x g durante 6-7 minutos em temperatura ambiente. As pelotas de célula foram lavadas através de tampão de mancha. Cem µl do tampão *cytofix* (PBS com 4% em p/v de paraformaldeído) foram adicionados às células. As amostras foram mantidas a 4°C no escuro até que elas fossem adquiridas no FACSCalibur. Cem µl do tampão *cytofix* (PBS com paraformaldeído a 4% em P/V) foram adicionados às células. As amostras foram armazenadas nos tampões *cytofix* a 4°C no escuro. Cem µl de PBS foram adicionados a todos os tubos antes das células serem analisadas em um FACSCalibur. Um total de 20.000 eventos em linfócitos controlados foi coletado.

EXEMPLO 10

Estudos de Classificação de Epítipo

Análise de ligação de competição foi realizada usando BIAcore™.

Experiências de Mapeamento de Epítipo em BIAcore:

Mapeamento de epítipo de anticorpos de CD44, 1A9.A6.B9, 2D1.A3.D12 e 14G9.B8.B4 foi realizado conduzindo-se o ensaio de competição em BIAcore™ (veja TABELA 22 para concentrações de anticorpo e mapa de epítipo da TABELA 23). O instrumento de análise de interação bioespecífico de Biosensor (BIAcore 2000) com ressonância de plasmônio de superfície foi usado para medir as interações moleculares em um *chip* de sensor CM5. Mudanças nos índices refrativos entre dois meios, vidro e dextrana carboximetilada, causadas pela interação de moléculas à lateral de dextrana do *chip* de sensor, foram medido e informadas como mudanças em unidades de refletância arbitrárias (RU) como detalhado nas notas de aplicação do fabricante.

A superfície de dextrana carboximetilada de uma célula de fluxo em um *chip* de

sensor foi ativada através de derivação com 0,05 M de N-hidroxissuccinimida mediada por 0,2 M de N-etil-N'-(dimetilaminopropil) carbodiimida durante 7 minutos. CD44-Ig em uma concentração de 30 µg/ml, em 10 mM de acetato de Na, pH 3,5, foi manualmente injetado na célula de fluxo em uma taxa de 5 µl/min e covalentemente imobilizado à superfície de célula de fluxo com a quantidade desejada de RU's. A desativação de ésteres de N-hidroxissuccinimida não reagidos foi realizada usando 1M de cloridrato de etanolamina, pH 8,5. Depois da imobilização, as células de fluxo foram limpas de qualquer material não reagido ou pobremente ligado com 5 injeções de regeneração de 5 µl de 50mM de NaOH até que uma linha de referência estável seja alcançada. Célula de fluxo 2 mediu aproximadamente 62 RU e célula de fluxo 3 mediu aproximadamente 153 RU. Para célula de fluxo 1, a superfície absoluta ativada, 35 µl de 10mM de tampão de acetato de Na foram injetados durante a imobilização no lugar de antígeno. Célula de fluxo 4 continha aproximadamente 200 RU's de CTLA4-Ig imobilizado, um controle de antígeno irrelevante.

A experiência de mapeamento de epítipo foi realizada usando tampão de diluente/fluente (HBS-EP). A taxa de fluxo foi de 5 µl/min e a temperatura de instrumento foi 20°C. Depois da ligação de cada par de anticorpos, a superfície de célula de fluxo foi em seguida regenerada à linha de referência usando uma injeção de 5 µl de 50 mM de NaOH. Anticorpos purificados em tampão fluente foram diluídos em 30 µg/ml e injetados em um volume de 25 µl.

A superfície de célula de fluxo foi saturada com um anticorpo primário e foi imediatamente seguida com uma injeção de um segundo anticorpo. A ligação do segundo anticorpo foi em seguida avaliada como "ligação", "não ligação" ou "ligação parcialmente" à superfície de CD44-Ig imobilizada. Depois que uma avaliação de ligação é feita, a superfície é regenerada e o mesmo anticorpo primário é reinjetado seguido pelo próximo anticorpo no painel. Este esquema de injeção é continuado até que todos os anticorpos no painel tenham sido avaliados quanto a sua ligação a CD44-Ig. Outro anticorpo é escolhido como o primário e os outros anticorpos são avaliados como os anticorpos secundários que ligam-se a CD44-Ig. Especificamente, quando o anticorpo anti-CD44 14G9.B8.B4, foi testado como o anticorpo primário, ele foi co-injetado com um segundo anticorpo visto que a taxa de dissociação para 14G9.B8.B4 é rápida com respeito à ligação.

Depois que todos os anticorpos foram testados como injeções primárias contra todos os anticorpos no painel, uma matriz reduzida que combina padrões de ligação similares em um grupo de epítipo é preparada. Um mapa topológico pode ser em seguida desenhado de acordo com a matriz reduzida. A matriz de ligação pode ser interpretada em termos de um mapa de superfície topológico do antígeno, CD44-Ig, mostrando interferência entre os epítopos diferentes. Um tal mapa mostra apenas relações funcionais e não necessariamente suporta qualquer correspondência à estrutura física atual da superfície de antígeno.

Análise de ligação de competição em BIAcore mostrou que o epítipo reconhecido através de 1A9.A6.B9 e 14G9.B8.B4 de mAbs sobrepõe-se com o epítipo reconhecido por anticorpo 515. Além disso, o estudo em BIAcore™ mostrou que 1A9.A6.B9 e 14G9.B8.B4 mAbs não sobrepuseram-se com o anticorpo IM7.

5 TABELA 22

Anticorpos

Concentração Final

IM7 (BD Bioscience, Lagos de Franklin,
NJ, Cat. No. 553134)

1,0 mg/mL

515 (BD Bioscience, Cat. No. 550990)

1,0 mg/ml

10 1A9.A6.B9

1,5 mg/ml

14G9.B9.B4

1,0 mg/ml

TABELA 23

Mapeamento de Epítipo de Competição de Anticorpos de CD44

	IM7 (BD)	1A9.A6.B9	515 (BD)	14G9.B8.B4	Rmáx
IM7 (BD)	X	O	O	O	233
1A9.A6.B9	O	X	X	X	226
515 (BD)	O	X	X	X	170
14G9.B8.B4	O	X	X	X	144

X = competição observada

15 O = competição não observada

EXEMPLO 11

Seletividade de Anticorpo Anti-CD44

Medimos a afinidade de ligação de anticorpo CD44 versus uma proteína receptora 1 de hiauronano de endotélis de vaso linfático (LYVE-1) (R&D, Cat. No. 2089-Ly) e constatamos que o anticorpo anti-CD44 tem mais que 100 vezes de seletividade para CD44 em LYVE-1 (veja TABELA 24). Uma placa ELISA de 96 poços (placa Immuno Maxisorp, Nunc Cat. No. 442404) foi revestida com 50 ng de proteína de fusão de CD44-Ig ou LYVE-1 e incubadas durante a noite a 4°C. As placas foram em seguida lavados por PBS, 0,05% de Tween-20 e bloqueadas por BSA a 3% em PBS durante duas horas em temperatura ambiente. Os anticorpos anti-CD44 ou anticorpo anti-LYVE-1 (R&D, Cat. No. AF 2089) foram diluídos em BSA a 1% em PBS em várias concentrações e adicionados às placas. As placas de ELISA foram incubadas em temperatura ambiente durante 1,5 hora. As placas foram lavadas e 50 µl de qualquer anticorpo de HRP de cadeia leve de capa anti-humano (Bethyl, Cat. No. A80-115P.6) para anticorpo anti-CD44 ou IgG - HRP anti-cabra para anticorpo anti-LYVE-1 (Cappel/ICN, Cat. No. 55363), diluídos 1:2000 em 1% de BSA em PBS foram adicionados a cada poço e incubados em temperatura ambiente durante mais uma hora. As placas foram lavadas novamente, e 50 µg/ml de TMB foram adicionados incubados durante

5 a 10 minutos. Reações de ELISA foram interrompidas com solução de interrupção e valores de OD450 foram medido por uma leitora de placa.

TABELA 24

Seletividade de anticorpos anti-CD44

Anticorpos	CD44-Ig (EC50 $\mu\text{g/ml}$)	LYVE-1 (EC50 $\mu\text{g/ml}$)
1A9.A6.B9	0,011	nenhuma reatividade cruzada em 10 $\mu\text{g/ml}$
2D1.A3.D12	0,024	nenhuma reatividade cruzada às 10 $\mu\text{g/ml}$
14G9.B8.B4	0,018	nenhuma reatividade cruzada em 10 $\mu\text{g/ml}$
LYVE-1 Ab	»10	0,1

5 EXEMPLO 12

Estudos de Competição de Ligação de Anticorpos Anti-CD44 MEM-85 e 1A9.A6.B9

Conduzimos estudos de FACS para determinar se os anticorpos anti-CD44 humanos de acordo com a invenção ligam-se ao mesmo ou sítio distinto na molécula de CD44 como anticorpo anti-CD44 comercialmente disponível MEM-85 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, Cat. No. MHCD4404-4).

Realizamos o ensaio de ligação de competição de CD44 com base em FACS também usado em células T periféricas humanas CD3+ e células 300-19 transduzidas com molécula de CD44 humana em um vetor retroviral. Sangue periférico humano foi coletado a partir de voluntários humanos normais em tubos *vacutainer* com heparina (Becton Dickinson, Cat No. 366480).

Estudo de FACS de Célula T Periférica Humana:

Sangue periférico humano foi coletado de voluntários humanos normais em tubos *vacutainer* com heparina (Becton Dickinson, Cat No. 366480). Adicionamos 100 μl de sangue humano coletado em tubos Nunc-Immuno (VWR Cat. No. 443990), depois disso adicionamos 10 μl de anti-CD44 Ab 1A9.A6.B9 em cada tubo para alcançar concentrações finais de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ a 20 $\mu\text{g/ml}$. Os tubos foram incubados durante 5 minutos em gelo. Depois da incubação de 5 minutos, adicionamos 20 μl de Ab de detecção de CD44 (MEM-85, Cat. No. MHCD4404-4) e anti-CD3-PerCP (BD Pharmingen, Cat. No.347344), 10 μl de anti-CD14-APC (BD Pharmingen, Cat. No. 555399), e 10 μl de anti-CD4-APC (BD Pharmingen Cat. No. 555349) a cada tubo e mantidos em gelo durante 30 a 40 minutos, no escuro. Adicionamos 2 mls de solução de lise de FACS (BD Pharmingen, Cat. No. 349202, diluídos 1:10 em água), vortexados e incubados durante 10 minutos em temperatura ambiente. Células lavadas com tampão de lavagem de FACS, (PBS Sigma Cat. No. D8537, azida a 0,02%, Sigma Cat. No. S2002 e soro de bezerro fetal a 2%, Gibco Cat. No. 16140-071) seguido por centrifugação e removemos o sobrenadante. As células foram em seguida fixadas com 250

µl de 1% de paraformaldeído (Electron Microscope Science, Ft Washington, PA Cat. No. 15710). Os tubos foram lidos usando Becton Dickson FACS Calibur e analisamos os dados usando CellQuest Pro (Becton Dickinson).

Células 300-19 Transduzidas com Estudo de FACS de Molécula de CD44 Humana:

5 Cem mls de células 300-19 em 10^6 de célula/ml foram adicionadas em tubos Nunc-Immuno (VWR. Cat. No. 443990). Células foram em seguida misturadas com 10 µl de Ab anti-CD44 para obter a concentração final de 0 a 10 µg/ml (veja FIG. 10A) e incubadas em gelo durante 5 minutos. Depois da incubação, adicionamos 20 µl de detecção de CD44 Ab MEM-85 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, Cat. No. MHCD4404-4) aos tubos e incubamos as células em gelo durante 30 a 40 minutos. Lavar com tampão de lavagem de FACS (PBS Sigma D8537, azida a 0,02%, Sigma S2002 e soro de bezerro fetal a 2%, Gibco Cat. No. 16140-071). Centrifugamos em 12000 rpm durante 10 minutos e eliminamos o sobrenadante. Fixamos as células com 250 ml de 1% de paraformaldeído (Electron Microscope Science, Ft Washington, PA Cat. No. 15710). Os tubos foram lidos usando Becton Dickson FACS Calibur e analisamos os dados usando CellQuest Pro (Becton Dickinson).

Análise de ligação de competição de FACS mostrou que o epítipo reconhecido através de 1A9.A6.B9 de mAb sobrepõe com o epítipo reconhecido pelo anticorpo MEM-85, que foi mapeado ao domínio de LINK em molécula de CD44. Bajorath, J. e outro, (1998) JBC, 273:338-343 (Veja FIGS. 10A-B).

20 EXEMPLO 13

Duas formulações liofilizadas (secas por congelamento) de 1A9.A6.B9 (HIS lio & CIT lio) foram preparadas como pela Tabela 25, abaixo. As formulações continham 20 mg/mL de 1A9.A6.B9, histidina ou tampão de citrato, polissorbato 80, EDTA, e diidrato de trealose. Uma formulação líquida (HIS líquido) foi da mesma forma preparado, como mostrado na Tabela 25 abaixo (1A9.A6.B9). A composição da formulação líquida foi: 10 mg/mL de 1A9.A6.B9, 20 mM de tampão de histidina, 0,2 mg/mL de polissorbato 80, 0,05 mg/mL de EDTA, 84 mg/mL de diidrato de trealose e 0,1 mg/mL de L-metionina.

Tabela 25: Componentes de formulação para 1A9.A6.B9 líquido e formulações lio

Formulação	1A9.A6.B9 (mg/ml)	pH	Histidina (mM)	Citrato (mM)	PS80 (mg/mL)	Trealose (mg/mL)	Sacarose (mg/mL)	EDTA (mg/mL)	Metionina (mg/mL)
(HIS líquido)	10	5,5	20	-	0,2	84	-	0,05	0,1
(HIS lio)	20	5,5	20	-	0,2	-	80	0,05	-
(CIT lio)	20	5,5	-	5	0,2	-	80	0,05	-

30 Cada uma das formulações preparadas acima foi mantida a 2 - 8°C e aceleramos as condições de estabilidade (25 e 40°C) durante 52 semanas (a formulação liofilizada con-

tendo tampão de citrato foi mantida apenas 22 semanas). Amostras foram analisadas em 4, 8, 13, 22 e 52 semanas. A cada ponto de tempo, as amostras foram analisadas visualmente quanto a presença de particulados, mudança na cor, e clareza. Medidas de pH foram da mesma forma administradas. A presença de agregados foi monitorada por SE-HPLC. Todas as formulações testadas permaneceram visualmente claras, incolores e livres de partículas e não mostrou nenhuma mudança significativa no pH. Além disso, mais que 97% de recuperação de monômero de mAb (< 3% de formação de agregado) foram obtidos para todas as formulações da Tabela 25, e a formulação líquida que foi testada como um controle depois de ser submetida ao armazenamento a 2 - 8°C e 25°C durante 52 semanas bem como a 40°C durante 22 semanas (Figura 11 a, b & c) como medido por SE-HPLC usando 2 colunas em série (GS SW3000XL e GS SW2000XL) usando uma fase móvel que é 200 mM de tampão de Fosfato em pH 7,0. A taxa de fluxo foi mantida em 0,7 mL/min com um tempo de funcionamento de 40 min.

Cada uma das formulações foi analisada imageando-se a focalização iso-elétrica capilar (iCE) para avaliar a formação de variantes de carga de 1A9.A6.B9 (espécies ácidas, de origem, e básicas) depois de 52 semanas de armazenamento refrigerado (2-8°C) e sob condições de temperatura aceleradas (25°C durante 52 semanas bem como a 40°C durante 22 semanas). A separação destas espécies carregadas foi feita dentro de um capilar e a visualização e quantificação destas espécies usando um detector de UV e câmara de CCD. Os resultados do ensaio de iCE (espécies ácidas) são ilustrados na Figura 12 a, b & c. Os resultados demonstram que todas as formulações tiveram formação de espécies ácidas similares depois do armazenamento a 2 - 8°C e 25°C durante 52 semanas. A 40°C as formulações liofilizadas informaram a formação de espécies ácidas mais baixas que o controle.

Cada uma das formulações foi da mesma forma analisada através de SDS-PAGE para avaliar a formação de variantes de tamanho superior e inferior de mAb depois de 52 semanas de armazenamento refrigerado (2-8°C) e sob condições de estabilidade aceleradas (25°C durante 52 semanas bem como a 40°C durante 22 semanas). Este método fornece uma medida boa de pureza de mAb, incluindo níveis de formação de grampo e formação de agregado com o passar do tempo. Os resultados do ensaio de SDS-PAGE são ilustrados na Tabela 26, 27 & 28.

Cada uma das formulações foi da mesma forma analisada para avaliar a formação de oxidação de metionina na posição de metionina-256 na cadeia pesada depois de 52 semanas de armazenamento refrigerado (2-8°C) e sob condições de estabilidade aceleradas (25°C a 52 semanas ou 40°C durante 22 semanas). Os produtos de anticorpo monoclonal foram digeridos com Lys-C e um fragmento de peptídeo contendo metionina e sua forma oxidada respectiva foi monitorada. Tabelas 26, 27 & 28 mostram os resultados do ensaio de oxidação de metionina.

Cada uma das formulações foi da mesma forma analisada para avaliar a bioatividade relativo depois de 52 semanas de armazenamento refrigerado (2-8°C) e sob condições de estabilidade aceleradas (25°C durante 52 semanas bem como a 40°C durante 22 semanas). Os resultados do ensaio de bioatividade são ilustrados nas Tabelas 26, 27 & 28.

5

TABELA 26: Dados de Estabilidade obtidos a 5 C

Ponto de Tem-	22 semanas			52 semanas		
Formulação	HIS-líquido	HIS-lío	CIT-lío	HIS-líquido	HIS-lío	CIT-lío
SDS-PAGE						
% Impurezas >50K	0,8	0,5	0,7	0,6	0,6	Não analisado
% de Impurezas 25K-50K	0	0	0	0	0	Não analisado
% de Impurezas <25K	0	0	0	0	0	Não analisado
% de Impurezas Total	0,8	0,5	0,7	0,6	0,6	Não analisado
Oxidação						
met-256	3,1	3,2	3,4	Não analisado	Não analisado	Não analisado
CGE REDUZIDO						
% de Pureza	98,8	98,7	98,8	98,7	98,8	Não analisado
% de Fragmento	1,2	1,3	1,2	1,3	1,2	Não analisado
BioEnsaio	95%	Não analisado	Não analisado	Não analisado	Não analisado	Não analisado

Tabela 27: Dados de Estabilidade obtidos a 25 C

Ponto de Tem-	22 semanas			52 semanas		
Formulação	HIS-líquido	HIS-lío	CIT-lío	HIS-líquido	HIS-lío	CIT-lío
SDS-PAGE						
% de Impurezas >50K	1,0	0,6	2,4	1,4	0,3	Não analisado

% de Impurezas 25K-50K	0,9	0,1	0,2	0,6	0	Não analisado
% de Impurezas <25K	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	Não analisado
% de Impurezas Total	2,0	0,7	2,7	2,0	0,3	Não analisado
Oxidação						
met-256	Não analisado	Não analisado	Não analisado	Não analisado	Não analisado	Não analisado
BioEnsaio	Não analisado	Não analisado	Não analisado	Não analisado	Não analisado	Não analisado

Tabela 28: Dados de Estabilidade obtidos a 40 C

Ponto de Tempo	22 semanas		
Formulação	HIS-líquido	HIS-lío	CIT-lío
SDS-PAGE			
% de Impurezas >50K	2,0	0,6	1,1
% de Impurezas 25K -50K	4,1	0,2	0
% de Impurezas <25K	1,5	0	0
% de Impurezas Total	7,6	0,9	1,1
Oxidação			
met-256	8,8	3,5	3,4
CGE (Reduzido)			
% de Pureza	91,2	98,9	98,9
% de Fragmento	8,3	1,1	1,1
BioEnsaio	86	73	92

EXEMPLO 14

Afinidade de ligação de 1A9.A6.B9 para CD44 de macaco cinomologo e humano através da Análise em Biacore™

- 5 Outra análise em BiAcore™ foi conduzida para demonstrar a afinidade de ligação do anticorpo 1A9.A6.B9 em CD44 de cinomolgo e humano. CD44-Ig humano (55 RU, 86 RU) e CD44-Ig de cino (99 RU, 116 RU) foram imobilizados em *chips* CM-5 em uma concen-

tração de 10 ug/ml em 10 mM de Acetato de Na pH 3.5. Concentrações variadas de 1A9.A6.B9, (100 ug/ml a 0,1 ug/ml em diluições de meio-log) foram fluídas sobre o *chip* em uma taxa de fluxo de 5 ul/minuto. O *chip* foi em seguida regenerado com 50 mM de NaOH e lavado com HBS-EP (BIAcore 22-0512-44). Análise foi realizada no Biacore 2000. Os dados foram analisados usando o *software* BIAEvaluation (n=2).

Tabela 29. Análise cinética de 1A9.A6.B9

Ig de CD44	K _d (x 10 ⁻³) (1/s)	K _D (pM)
Humano	0,39	51 (n=3)
Cinomolgos	0,53	150 (n=3)

Todas as referências citadas nesta especificação, incluindo sem limitação todos os documentos, publicações, patentes, pedidos de patente, apresentações, textos, relatórios, manuscritos, panfletos, livros, posições da internet, artigos de jornal, periódicos, folhas impressas de fato de produto, e similares, por este meio incorporados por referência nesta especificação em suas totalidades. A discussão das referências aqui é pretendida resumir meramente as afirmações feitas pelos seus autores e nenhuma admissão é feita a qual qualquer referência constitui a técnica anterior e os requerentes reservam o direito de desafiar a precisão e pertinência das referências citadas.

Embora a invenção precedente tenha sido descrita em algum detalhe por meio de ilustração e exemplo para propósitos de clareza de entendimento, ficará facilmente evidente para àqueles de capacidade ordinária na técnica levando em conta os ensinamentos desta invenção que certas mudanças e modificações podem ser feitas a isso sem afastar-se do espírito ou escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo humano isolado ou porção de ligação de antígeno do mesmo que especificamente liga CD44 humano, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender uma sequência de aminoácido de domínio de variável de cadeia pesada (V_H) compreendendo uma região de CDR1, CDR2, e CDR3 selecionado a partir do grupo, consistir em:

a) uma CDR1 de V_H como mencionado em SEQ ID NO: 17, uma CDR2 de V_H como mencionado em SEQ ID NO:19, e uma CDR3 de V_H como mencionado em SEQ ID NO:21;

b) uma CDR1 de V_H como mencionado em SEQ ID NO:53, uma CDR2 de V_H como mencionado em SEQ ID NO:55, e uma CDR3 de V_H como mencionado em SEQ ID NO:57;

c) uma CDR1 de V_H como mencionado em SEQ ID NO:89, uma CDR2 de V_H como mencionado em SEQ ID NO:91, e uma CDR3 de V_H como mencionado em SEQ ID NO:93; e

d) uma CDR1 de V_H como mencionado em SEQ ID NO: 125, uma CDR2 de V_H como mencionado em SEQ ID NO:127, uma CDR3 de V_H como mencionado em SEQ ID NO:129.

2. Anticorpo humano isolado ou porção de ligação de antígeno, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de também compreender uma sequência de aminoácido de domínio de variável de cadeia leve (V_L) compreendendo uma região de CDR1, CDR2, e CDR3 selecionado a partir do grupo, consistir em:

a) uma CDR1 de V_L como mencionado em SEQ ID NOs:23, uma CDR2 de V_L como mencionado em SEQ ID NOs:25, e uma CDR3 de V_L como mencionado em SEQ ID NO:27;

b) uma CDR1 de V_L como mencionado em SEQ ID NOs:59, uma CDR2 de V_L como mencionado em SEQ ID NOs:61, e uma CDR3 de V_L como mencionado em SEQ ID NO:63;

c) uma CDR1 de V_L como mencionado em SEQ ID NOs:95, uma CDR2 de V_L como mencionado em SEQ ID NOs:97, e uma CDR3 de V_L como mencionado em SEQ ID NO:99;

e
d) uma CDR1 de V_L como mencionado em SEQ ID NOs: 131, uma CDR2 de V_L como mencionado em SEQ ID NOs: 133, e uma CDR3 de V_L como mencionado em SEQ ID NO: 135.

3. Anticorpo isolado ou porção de ligação de antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender uma CDR1 de V_H mencionada em SEQ ID NO:17, uma CDR2 de V_H como mencionado em SEQ ID NO: 19, uma CDR3 de V_H como mencionado em SEQ ID NO:21, uma CDR1 de V_L como mencionado em SEQ ID NO:23, uma CDR2 de V_L como mencionado em SEQ ID NO:25, e uma CDR3 de V_L como mencionado em SEQ ID NO:27.

4. Anticorpo isolado ou porção de ligação de antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender uma CDR1 de V_H mencionada em SEQ ID NO:89, uma CDR2 de V_H como mencionado em SEQ ID NO:91, uma CDR3

de V_H como mencionado em SEQ ID NO:93, uma CDR1 de V_L como mencionado em SEQ ID NO:95, uma CDR2 de V_L como mencionado em SEQ ID NO:97, e uma CDR3 de V_L como mencionado em SEQ ID NO:99.

5. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato da sequência de aminoácido de domínio de V_H ser selecionada a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NOs: 11, 47, 83 e 119, ou diferir-se de qualquer uma dentre SEQ ID NOs: 11, 47, 83 e 119 tendo uma substituição de aminoácido conservadora.

6. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de compreender um domínio de V_H que é pelo menos 95% idêntico na sequência de aminoácido a qualquer uma dentre SEQ ID NOs:11, 47, 83 e 119.

7. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 2, **CHARACTERIZADO** pelo fato da sequência de aminoácido de domínio de V_L ser selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 15, 51, 87 e 123, ou diferir-se a partir de qualquer uma dentre SEQ ID NOs: 15, 51, 87 e 123 tendo uma substituição de aminoácido conservadora.

8. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 2, **CHARACTERIZADO** pelo fato de compreender um domínio de V_L que é pelo menos 95% idêntico na sequência de aminoácido a qualquer uma dentre SEQ ID NOs:15, 51, 87 e 123.

9. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 7, **CHARACTERIZADO** pelo fato da sequência de aminoácido de domínio de (V_H) e a sequência de aminoácido de domínio de (V_L) ser selecionadas a partir do grupo que consiste em:

a) um domínio de V_H como mencionado em SEQ ID NO:11 e um domínio de V_L como mencionado em SEQ ID NO:15;

b) um domínio de V_H como mencionado em SEQ ID NO:47 e um domínio de V_L como mencionado em SEQ ID NO:51;

30 c) um domínio de V_H como mencionado em SEQ ID NO:83 e um domínio de V_L como mencionado em SEQ ID NO:87; e

d) um domínio de V_H como mencionado em SEQ ID NO:119 e um domínio de V_L como mencionado em SEQ ID NO:123.

10. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 9, **CHARACTERIZADO** pelo fato de compreender um domínio de V_H como mencionado em SEQ ID NO:11 e um domínio de V_L como mencionado em SEQ ID NO:15.

11. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação

dicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender um domínio de V_H como mencionado em SEQ ID NO:83 e um domínio de V_L como mencionado em SEQ ID NO:87.

12. Anticorpo humano isolado que especificamente liga-se a CD44, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender uma seqüência de aminoácido de cadeia pesada e uma seqüência de aminoácido de cadeia leve selecionadas a partir do grupo que consiste em:

a) uma cadeia pesada como mencionado em SEQ ID NO:9, e uma cadeia leve como mencionado em SEQ ID NO:13;

b) uma cadeia pesada como mencionado em SEQ ID NO:45, e uma cadeia leve como mencionado em SEQ ID NO:49;

c) uma cadeia pesada como mencionado em SEQ ID NO:81, e uma cadeia leve como mencionado em SEQ ID NO:85; e

d) uma cadeia pesada como mencionado em SEQ ID NO:117, e uma cadeia leve como mencionado em SEQ ID NO:121.

13. Anticorpo humano isolado ou porção de ligação de antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender uma cadeia pesada como mencionado em SEQ ID NO:9 e uma cadeia leve como mencionado em SEQ ID NO: 13.

14. Anticorpo humano isolado ou porção de ligação de antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender uma cadeia pesada como mencionado em SEQ ID NO:9 e uma cadeia leve como mencionado em SEQ ID NO: 13.

15. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser um IgG.

16. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato do IgG ser um IgG₂.

17. Composição farmacêutica, **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender a porção de ligação de antígeno ou anticorpo, de acordo com a reivindicação 1 e opcionalmente um veículo farmaceuticamente aceitável.

18. Método de tratar, prevenir ou aliviar os sintomas de um distúrbio mediado por CD44 em um indivíduo em necessidade do mesmo com uma porção de ligação de antígeno ou anticorpo de anti-CD44 do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender a etapa de administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma porção de ligação de antígeno ou anticorpo, de acordo com a reivindicação 1.

19. Método de tratamento, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADO** pelo fato do distúrbio mediado por CD44 ser uma doença inflamatória ou autoimune.

20. Método de tratamento, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO**

pelo fato da doença ser selecionada a partir do grupo que consiste em artrite reumatóide, artrite reumatóide juvenil, aterosclerose, doença granulomatosa, esclerose múltipla, asma, doença de Crohn, espondilite ancilosa, artrite psoriática, psoríase de placa e câncer.

5 21. Molécula de ácido nucléico isolada, **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender uma sequência de nucleotídeo que codifica a cadeia pesada ou uma porção de ligação de antígeno da mesma e/ou a cadeia leve ou uma porção de ligação de antígeno da mesma de um anticorpo, de acordo com a reivindicação 1.

10 22. Vetor compreendendo a molécula de ácido nucléico, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADO** pelo fato do vetor opcionalmente compreender uma sequência de controle de expressão operavelmente ligada à molécula de ácido nucléico.

23. Célula hospedeira, **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender o vetor, de acordo com a reivindicação 22.

15 24. Linhagem celular de hibridoma que produz um anticorpo humano, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato do hibridoma ser selecionado a partir do grupo que consiste em 2D1.A3.D12 (ATCC No.PTA-6929) (LN 15920), 1A9.A6.B9 (ATCC No.PTA-6927) (LN 15922) e 14G9.B8.B4 (ATCC No.PTA-6928) (LN 15921).

25. Linhagem celular de hibridoma, de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADA** pelo fato do hibridoma ser 1A9.A6.B9 (ATCC No.PTA-6927) (LN 15922).

FIG. 1

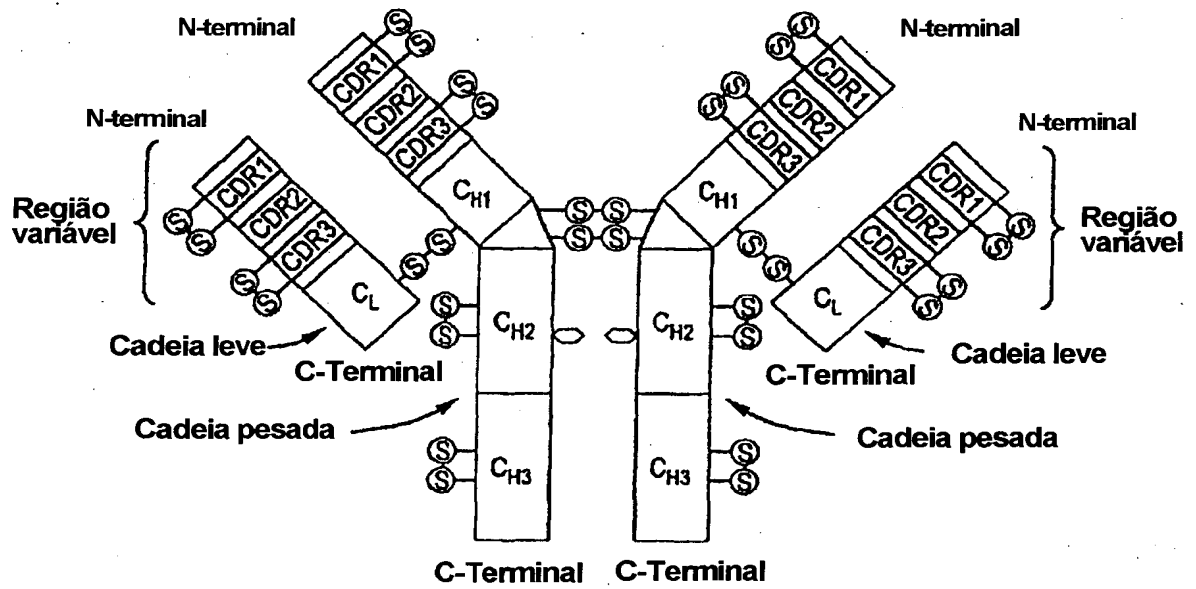


FIG. 2a

1A9.A6.B9

V_H

Linha germinativa

1A9.A6.B9

QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGTFSSYGMH WVRQAPGKLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKG
-----F-----

Linha germinativa

1A9.A6.B9

RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR##YYYYYGMDV WGQGTITVTVSS SEQ ID NO: 193
-----RSD-RG-----

V_L

Linha germinativa

1A9.A6.B9

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQOKPGQAPRLLIYDASNRAS
-----IN-----

Linha germinativa

1A9.A6.B9

GIPARFSGSGGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLT FGGGTKVEIK SEQ ID NO:194
-----R-----

FIG. 2b

2D1.A3.D12

V_H

Linha germinativa QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMH WVRQAPGQRLEWMMGWINAGNGNTKYSQKFG
2D1.A3.D12 -----I-----AI-S-----

Linha germinativa RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTA VYICARY##Y Y Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S SEQ ID NO:195
2D1.A3.D12 -----DGWED---H-----

V_L

Linha germinativa DIQMTQSPSSVSASVGDRTTITCRASQGISSLA WYQKPGKAPKLLIYAASSLQS
2D1.A3.D12 -----H-----

Linha germinativa GVPSTRFSGSGGTDFLTITSSLPEDFATYCCQQANSPFWT FGQGTKVEIK SEQ ID NO:196
2D1.A3.D12 -----N-----

FIG. 2c

14G9.B8.B4

V_H

Linha germinativa QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMH WVRQAPGQRLEWGMWINAGNGNTKYSQKFQG
 14G9.B8.B4 -----N-----T-----

Linha germinativa RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTA^YYCYARYYYGSGSP WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:197
 14G9.B8.B4 -----F-S-----

V_L

Linha germinativa EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT
 14G9.B8.B4 -----

Linha germinativa GIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYQCQYGSSPLT FGGGTKVEIK SEQ ID NO:198
 14G9.B8.B4 -----

FIG. 2d

10C8.2.3

V_R

Linha germinativa EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSMN WVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYADSVKG
 10C8.2.3 -----M-----TVR-----

Linha germinativa RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE-GIAVAGTYYYYYGMDV WGQGTITVTVSS

SEQ ID NO:199

10C8.2.3

-----VLA--P--S-----

5

V_L

Linha germinativa EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT
 10C8.2.3 -----

Linha germinativa GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLT FGGGTKVEIK SEQ ID NO:200
 10C8.2.3 -----R-----

FIG. 3

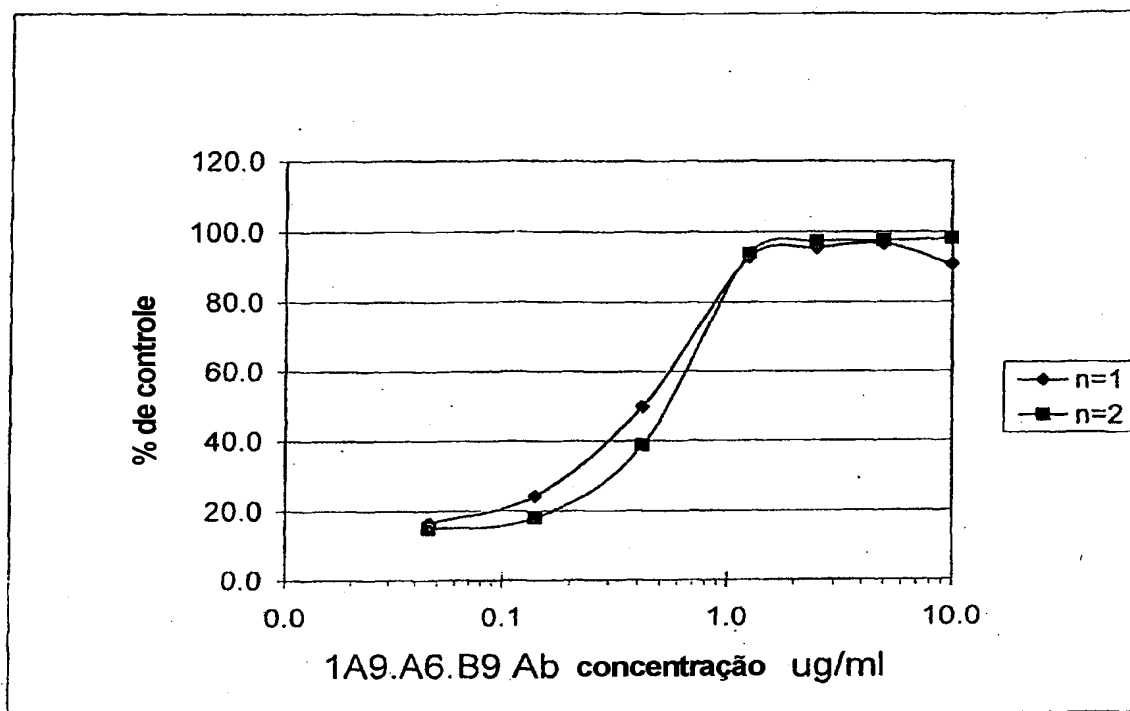


FIG. 4A

Ligação Direta de Anticorpo de CD44 em Célula
T Periféricas CD3+ no Sangue Total Humano

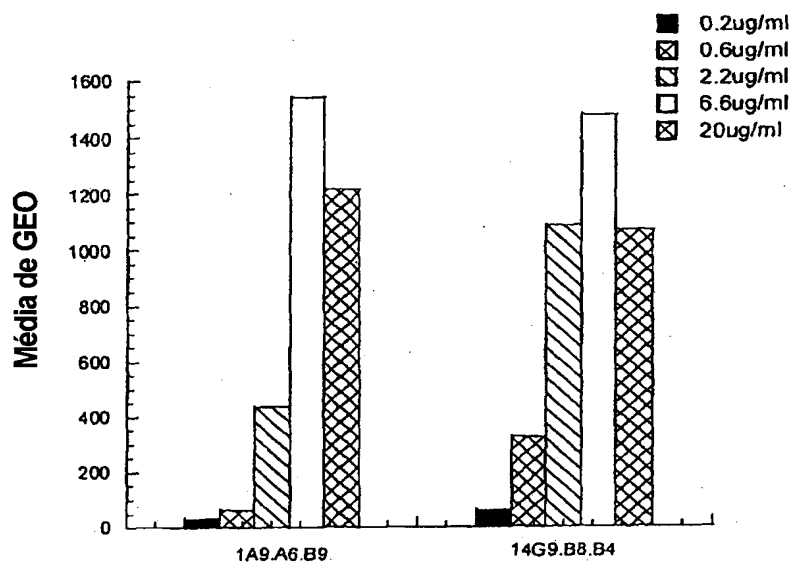
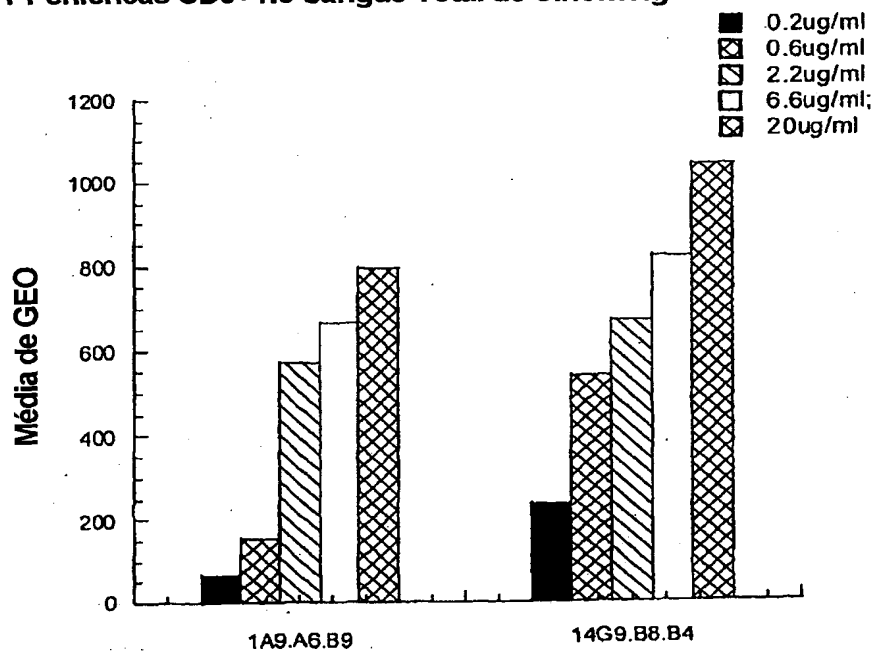


FIG. 4B

Ligação Direta de Anticorpo de CD44 em Célula
T Periféricas CD3+ no Sangue Total de Cinomolgo



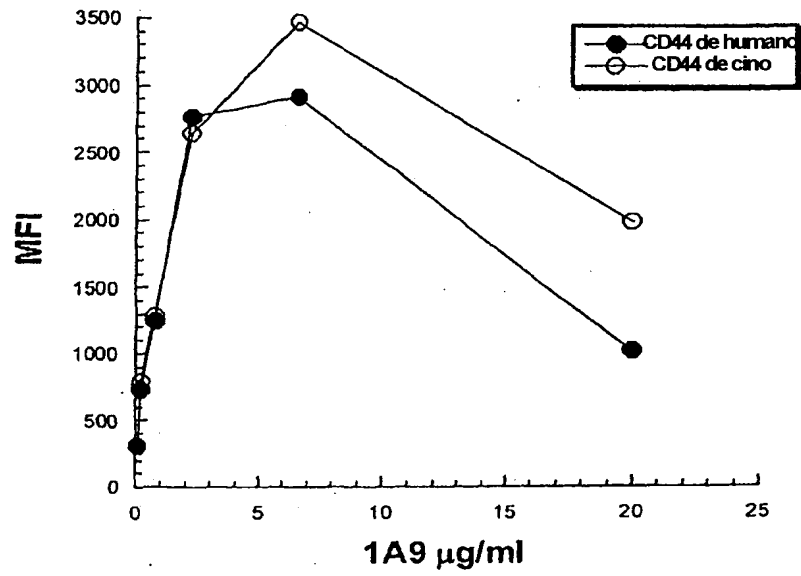


FIG. 5

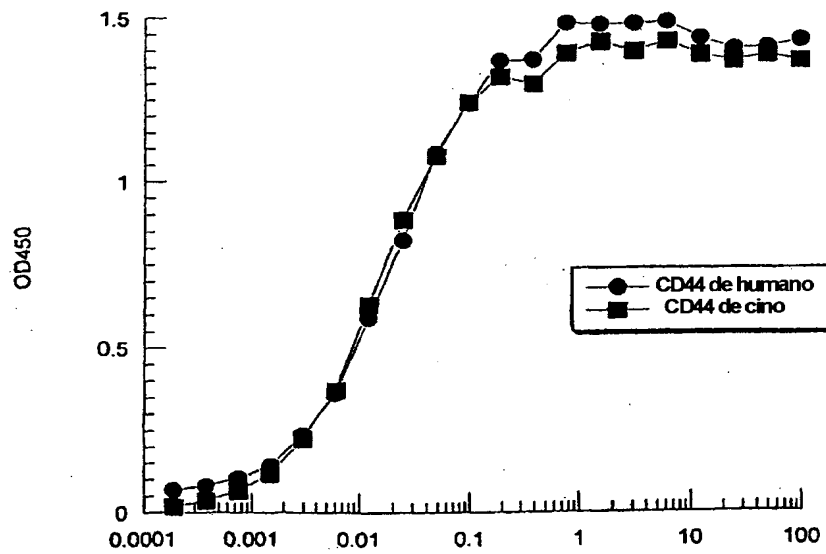


FIG. 6

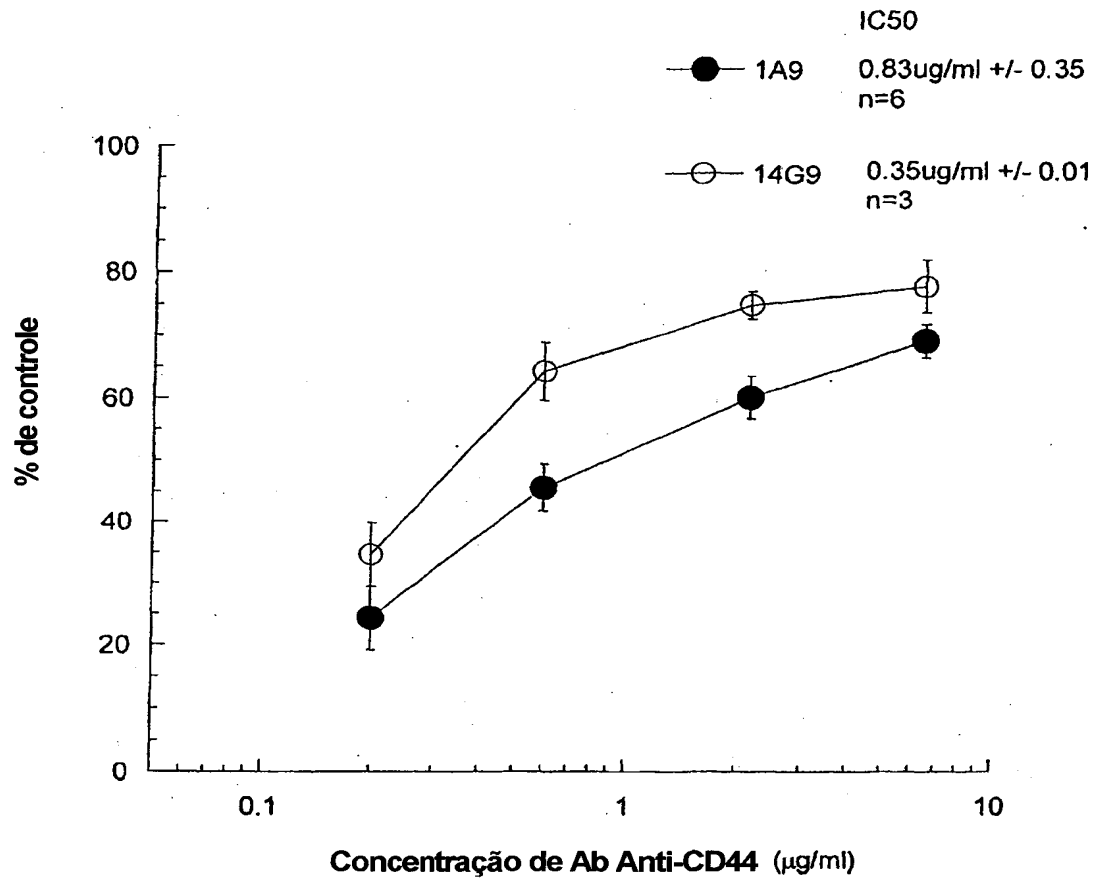


FIG. 7

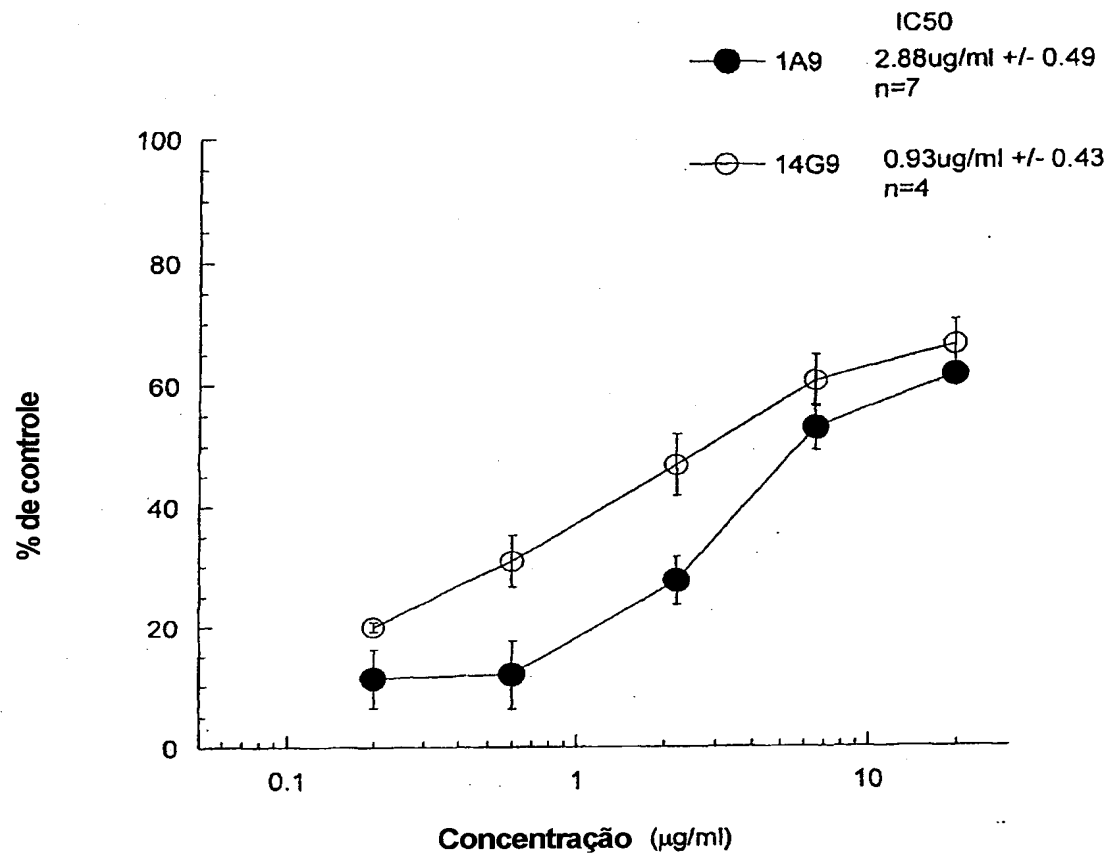


FIG. 8

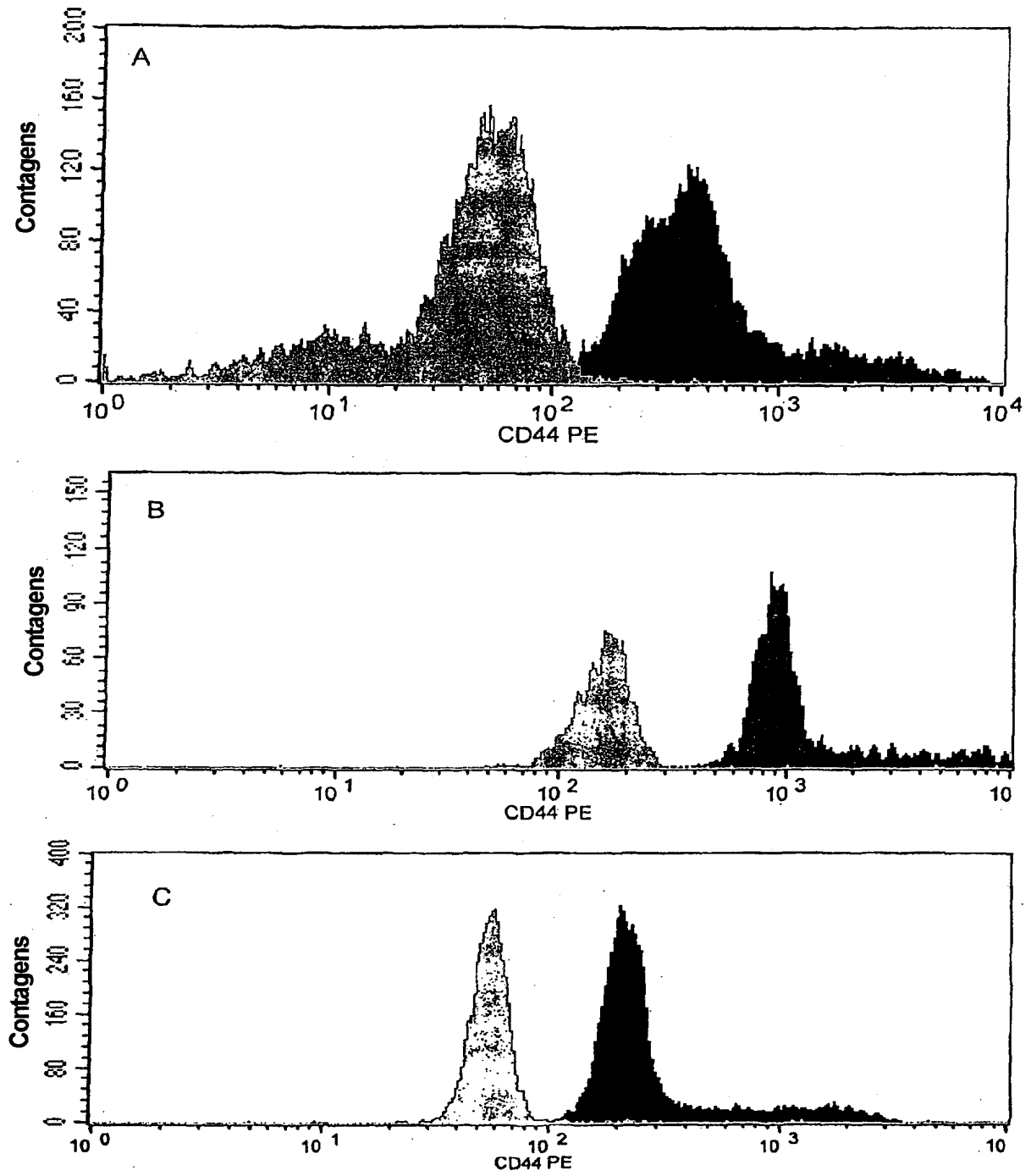
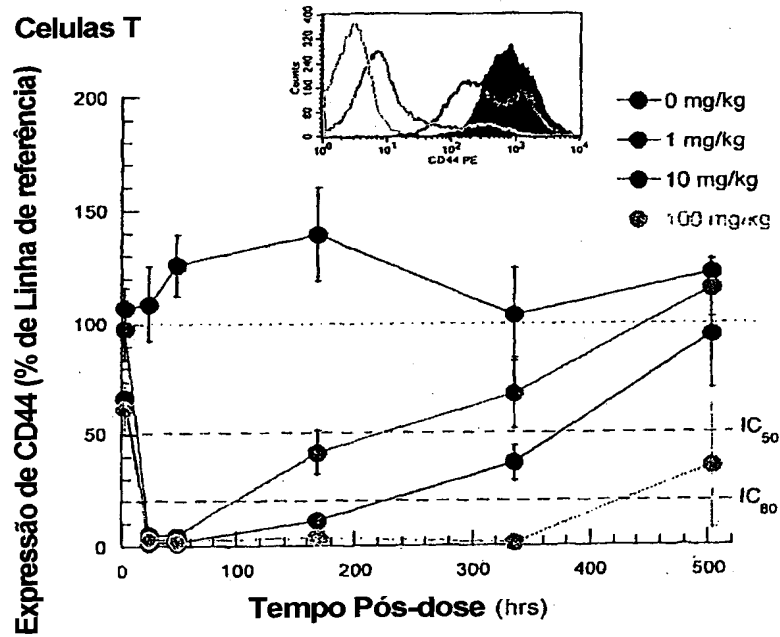


FIG. 9

A



B

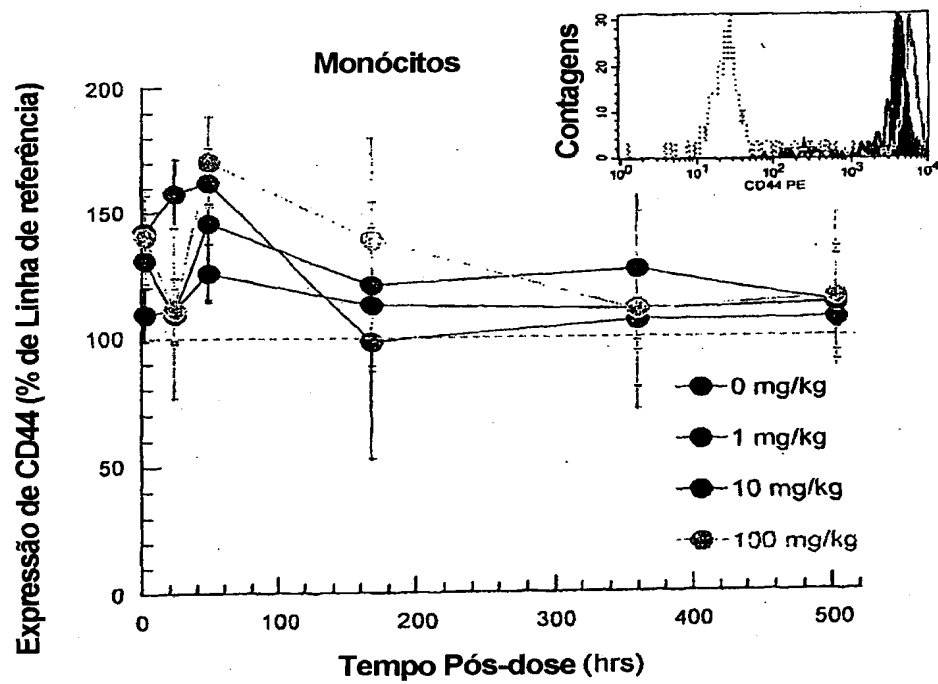
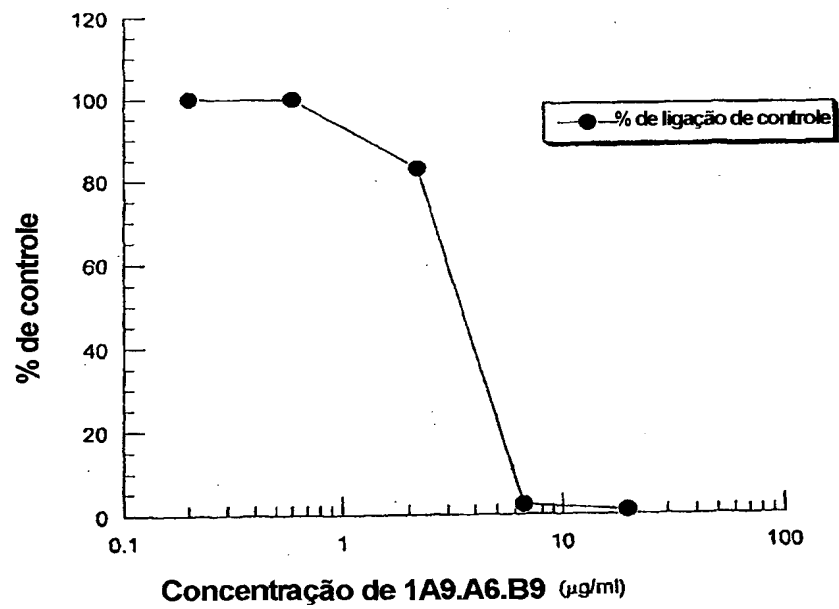
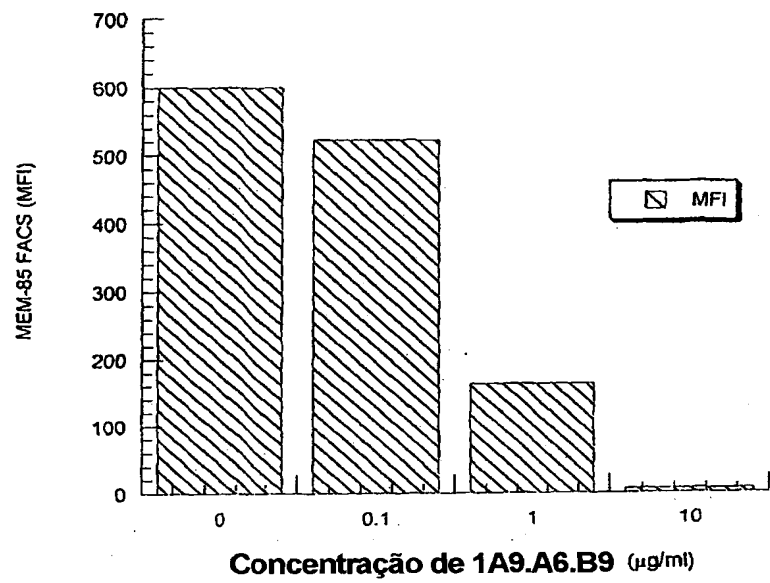


FIG. 10

A



B

Figura 11a: Agregados por SE-HPLC para 1A9.A6.B9
Dados a 5 °C

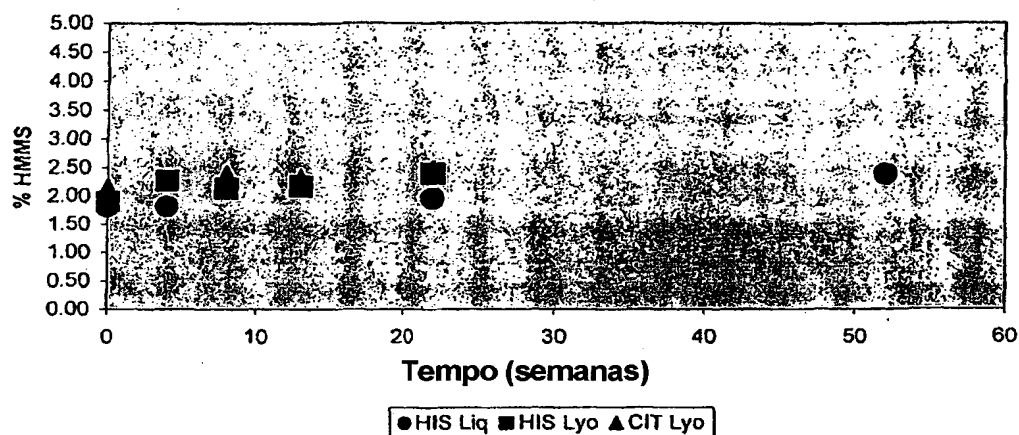


Figura 11b: Agregados por SE-HPLC para 1A9.A6.B9
Dados a 25 °C

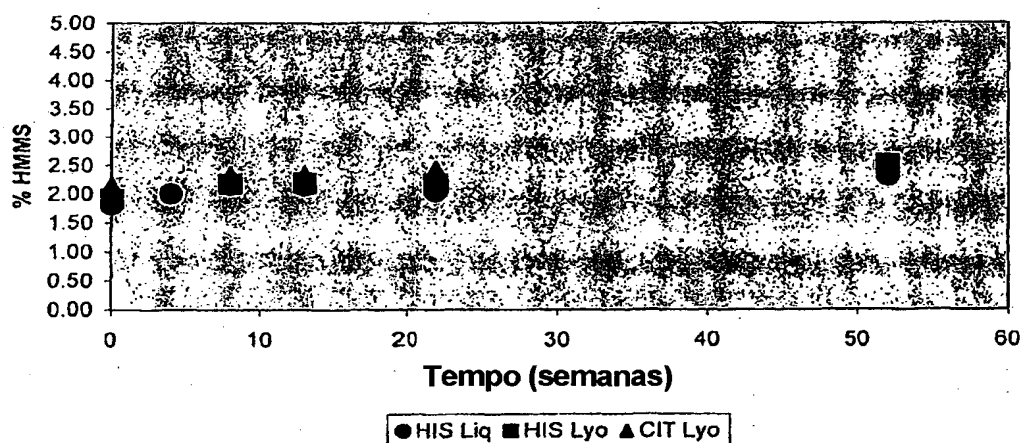


Figura 11C: Agregados por SE-HPLC para 1A9.A6.B9
Dados a 40°C

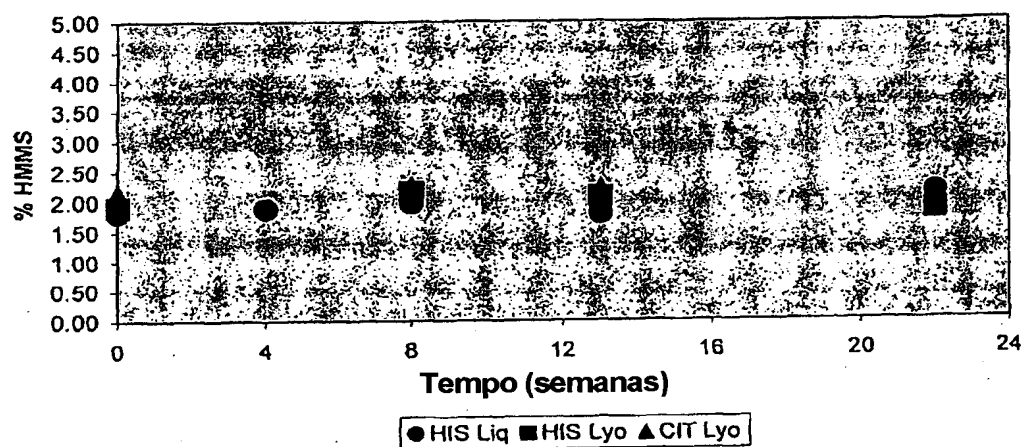


Figura 12a: Agregados por SE-HPLC para 1A9.A6.B9
Datos a 5 °C

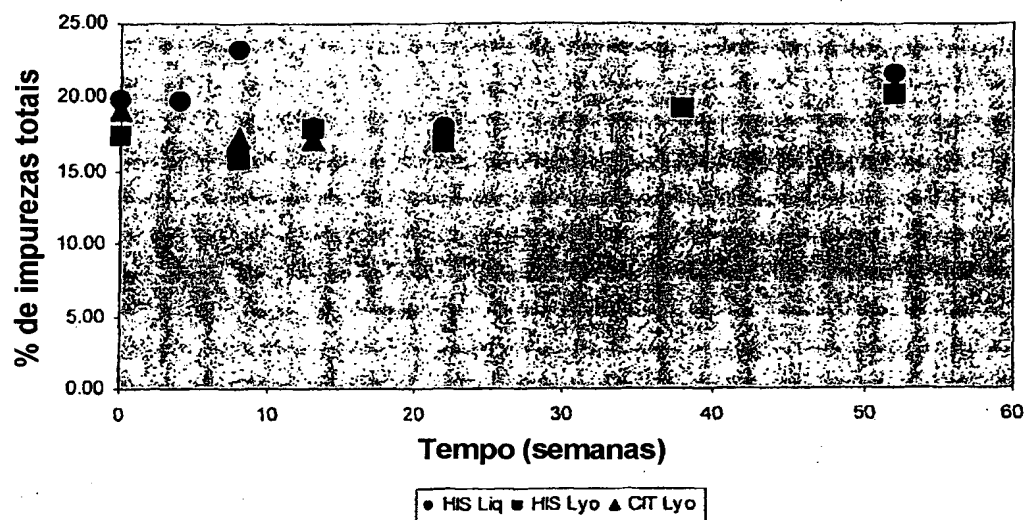
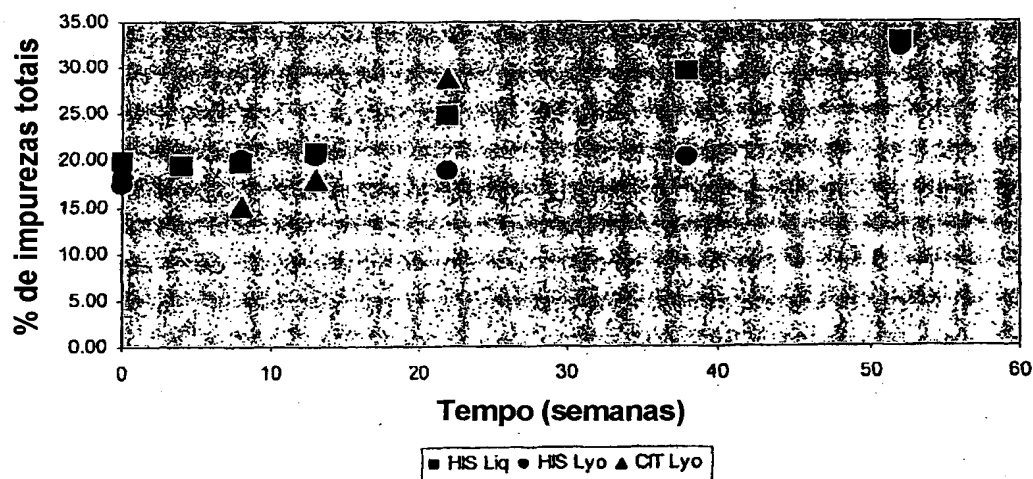
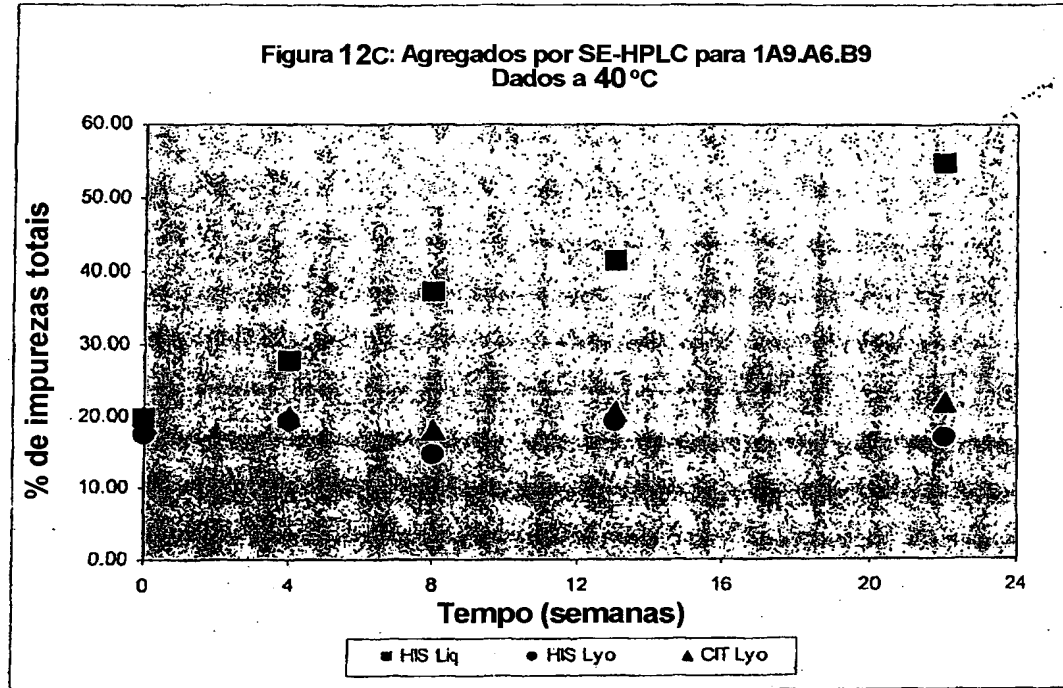


Figura 12 b: Agregados por SE-HPLC para 1A9.A6.B9
Datos a 25 °C





RESUMO

“ANTICORPOS DE CD44”

A presente invenção se refere a anticorpos incluindo anticorpos humanos e porções de ligação de antígeno dos mesmos que ligam-se a CD44, e que funcionam para inibir CD44. A invenção se refere às imunoglobulinas de cadeia leve e pesada derivadas de anticorpos de CD44 humanos e moléculas de ácido nucléico codificando tais imunoglobulinas. A presente invenção da mesma forma refer-se a métodos de preparar anticorpos de CD44, composições compreendendo estes anticorpos e métodos de usar os anticorpos e composições ou medicamentos para tratamento.