



INPI
INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0308585-6

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0308585-6

(22) Data do Depósito: 13/03/2003

(43) Data da Publicação do Pedido: 04/12/2003

(51) Classificação Internacional: C07K 16/28; C12N 5/12.

(30) Prioridade Unionista: US 60/364,991 de 13/03/2002; US 60/426,286 de 13/11/2002.

(54) Título: ANTICORPO ISOLADO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO QUE SE LIGA À ALFAVBETA6, COMPOSIÇÃO, MÉTODO DE DETECÇÃO IN VITRO DE ALFAVBETA6 E CONSTRUÇÃO DE DNA

(73) Titular: THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA. Endereço: 1111 Franklin Street, 12th Floor Oakland - CA 94607-5200, ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA(US), Norte Americana; BIOGEN MA INC.. Endereço: 250 Binney Street Cambridge MA 02142, ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA(US)

(72) Inventor: SHELIA M. VIOLETTE; PAUL H. WEINREB; KENNETH J. SIMON; DEAN SHEPPARD; DIANE R. LEONE.

Código de Controle: A56D5AAB7639AF97 E8655405489BAC55

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 15/10/2019, observadas as condições legais

Expedida em: 15/10/2019

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "ANTICORPO ISOLADO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO QUE SE LIGA À ALFA_vBETA₆, COMPOSIÇÃO, MÉTODO DE DETECÇÃO IN VITRO DE ALFA_vBETA₆ E CONSTRUÇÃO DE DNA".

5 CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção relaciona-se, de um modo geral, ao campo da biologia molecular e especificamente aos anticorpos para $\alpha_v\beta_6$ integrinas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 As integrinas são uma superfamília de receptores da superfície celular que medeiam a adesão de célula-célula e célula-matriz. Estas proteínas são conhecidas por proporcionar ancoragem, bem como sinais para o crescimento, a migração e a diferenciação celulares durante o desenvolvimento e a restauração do tecido. As integrinas também têm estado implicadas na desdiferenciação e na invasão das células, notavelmente onde
15 as células perdem a sua forma especializada e tornam-se células cancerígenas que metastatizam.

As integrinas são proteínas heterodiméricas compostas de duas subunidades não-covalentemente ligadas, α e β . A especificidade de ligação das integrinas é ditada pela combinação de algumas 18 cadeias α diferentes
20 com algumas 8 cadeias β diferentes. A $\alpha_v\beta_6$ integrina pode ligar-se a diversos ligantes, incluindo a fibronectina, a tenascina, a vitronectina, e o peptídeo associado à latência recentemente identificado "LAP", um peptídeo de aminoácidos sintetizado como parte da proteína TGF- α precursora (Munger e outros, *Cell* 96(3):319-328 (1999)). O LAP é clivado da forma madura do TGF-
25 β como um peptídeo N-terminal durante a secreção, porém permanece não-covalentemente associado com o TGF- β para manter o seu estado latente. Este complexo não pode ligar-se ao receptor de TGF- β e, portanto, não é biologicamente ativo. A $\alpha_v\beta_6$ integrina pode ligar-se diretamente a um motivo de RGD contido no LAP, resultando na liberação de LAP e na ativação do
30 TGF- β . Visto que a ligação da $\alpha_v\beta_6$ ao LAP pode ser importante na conversão de TGF- β para o seu estado ativo, o bloqueio da ligação pode resultar na inibição da ativação do TGF- β mediada pela $\alpha_v\beta_6$ e na patologia

Esta invenção é baseada na descoberta e na caracterização de anticorpos de alta afinidade contra a $\alpha_v\beta_6$, incluindo a identificação e a análise de resíduos de aminoácidos-chave nas regiões determinantes complementares (CDRs) de tais anticorpos.

5 Esta invenção inclui um anticorpo monoclonal que (a) especificamente se liga à $\alpha_v\beta_6$; (b) inibe a ligação da $\alpha_v\beta_6$ ao seu ligante, tal como o LAP, a fibronectina, a vitronectina, e a tenascina, com um valor de IC_{50} menor do que aquele de 10D5 (Publicação de Pedido de Patente Internacional WO 99/07405); (c) bloqueia a ativação do TGF- β ; (d) contém certas seqüências
10 de aminoácidos nas CDRs (p.ex., aquelas mostradas nas Figs. 7A e 7B) que proporcionam especificidade de ligação para a $\alpha_v\beta_6$; (e) especificamente se liga à subunidade β_6 ; e/ou (f) reconhece a $\alpha_v\beta_6$ em procedimentos de imunocoloração, tais como a imunocoloração de tecidos incrustados em parafina.

15 Foi descoberto que os anticorpos que se ligam à $\alpha_v\beta_6$ podem ser agrupados em classes e subclasses biofisicamente distintas. Uma classe de anticorpos exibe a capacidade de bloquear a ligação de um ligante (p.ex., o LAP) à $\alpha_v\beta_6$ (bloqueadores). Esta classe de anticorpos pode ser adicionalmente dividida em subclasses de bloqueadores dependentes de cátions e
20 bloqueadores independentes de cátions. Alguns dos bloqueadores dependentes de cátions contêm uma seqüência peptídica de arginina-glicina-aspartato (RGD), enquanto que os bloqueadores independentes de cátions não contêm uma seqüência de RGD. Uma outra classe de anticorpos exibe a capacidade de ligar-se à $\alpha_v\beta_6$ e no entanto não bloqueia a ligação da $\alpha_v\beta_6$
25 a um ligante (não-bloqueadores).

Desse modo, em algumas modalidades desta invenção, alguns anticorpos desta invenção são dependentes de cátions divalentes para a ligação à $\alpha_v\beta_6$, enquanto outros são independentes de cátions divalentes. Os cátions ilustrativos são o Ca^{2+} , o Mg^{2+} e o Mn^{2+} .

30 Em algumas modalidades, o anticorpo compreende as mesmas seqüências polipeptídicas das cadeias pesadas e leves que um anticorpo produzido pelo hibridoma 6.1A8, 6.3G9, 6.8G6, 6.2B1, 6.2B10, 6.2A1, 6.2E5,

7.1G10, 7.7G5, ou 7.1C5.

Em algumas modalidades, os anticorpos compreendem uma cadeia pesada cujas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) 1, 2 e 3 consistem essencialmente (i.e., com a exceção de algumas variações conservativas) nas seqüências de SEQ ID Nos:1, 4 e 7, respectivamente, e/ou uma cadeia leve cujas CDRs 1, 2 e 3 consistem essencialmente nas seqüências de SEQ ID NOs:10, 13 e 15, respectivamente.

Em algumas modalidades, os anticorpos compreendem uma cadeia pesada cujas CDRs 1, 2 e 3 consistem essencialmente nas seqüências de SEQ ID NOs:3, 5 e 8, respectivamente, e/ou uma cadeia leve cujas CDRs 1, 2 e 3 consistem essencialmente nas seqüências de SEQ ID NOs:11, 14 e 17, respectivamente.

Em algumas modalidades, os anticorpos compreendem uma cadeia pesada cujas CDRs 1, 2 e 3 consistem essencialmente nas seqüências de SEQ ID NOs:3, 6 e 9, respectivamente, e/ou uma cadeia leve cujas CDRs 1, 2 e 3 consistem essencialmente nas seqüências de SEQ ID NOs:12, 14 e 18, respectivamente.

Em algumas modalidades, os anticorpos compreendem uma cadeia pesada cujas CDRs 1, 2 e 3 consistem essencialmente nas seqüências de SEQ ID NOs:2, 46 e 47, respectivamente, e/ou uma cadeia leve cujas CDRs 1, 2 e 3 consistem essencialmente nas seqüências de SEQ ID NOs:48, 13 e 16, respectivamente.

Em algumas modalidades, os anticorpos compreendem uma cadeia pesada cujas CDRs 1, 2 e 3 consistem essencialmente nas seqüências de SEQ ID NOs:49, 51 e 53, respectivamente, e/ou uma cadeia leve cujas CDRs 1, 2 e 3 consistem essencialmente nas seqüências de SEQ ID NOs:55, 57 e 59, respectivamente.

Em algumas modalidades, os anticorpos compreendem uma cadeia pesada cujas CDRs 1, 2 e 3 consistem essencialmente nas seqüências de SEQ ID NOs:50, 52 e 54, respectivamente, e/ou uma cadeia leve cujas CDRs 1, 2 e 3 consistem essencialmente nas seqüências de SEQ ID NOs:56, 58 e 60, respectivamente.

Em algumas modalidades, os anticorpos compreendem uma sequência do domínio variável da cadeia pesada de qualquer uma de SEQ ID NOs:19-36 e 61-62.

5 Em algumas modalidades, os anticorpos compreendem seqüências dos domínios variáveis das cadeias pesadas e leves de

- (1) SEQ ID NOs:19 e 37;
- (2) SEQ ID NO:20 ou 21, e SEQ ID NO:38;
- (3) SEQ ID NOs:22 e 43;
- (4) SEQ ID NOs:23 e 44;
- 10 (5) SEQ ID NOs:24 e 45;
- (6) SEQ ID NO:25 ou 26 e SEQ ID NO:42;
- (7) SEQ ID NO:27, 28, ou 29, e SEQ ID NO:39;
- (8) SEQ ID NO:34 ou 35, e SEQ ID NO:40;
- (9) SEQ ID NOs:36 e 41;
- 15 (10) SEQ ID NOs:61 e 63; ou
- (11) SEQ ID NOs:62 e 64,

respectivamente.

Em algumas modalidades, os anticorpos especificamente se ligam à $\alpha_v\beta_6$, porém não inibem a ligação da $\alpha_v\beta_6$ ao peptídeo associado à latência (LAP). Pelo menos alguns destes anticorpos são capazes de ligarem-se à $\alpha_v\beta_6$ em seções de tecidos incrustadas em parafina e, portanto, podem ser usados para propósitos diagnósticos. Os anticorpos ilustrativos incluem o 6.2A1 e o 6.2E5.

25 Esta invenção também inclui os anticorpos que se ligam ao mesmo epítipo que quaisquer dos anticorpos acima descritos.

Esta invenção também inclui as composições compreendendo um ou mais anticorpos desta invenção, e um carreador farmacologicamente aceitável. Em algumas destas composições, os anticorpos estão conjugados a um agente citotóxico (i.e., um agente que prejudica a viabilidade e/ou as 30 funções de uma célula), tal como uma toxina ou um radionuclídeo. Os anticorpos nestas composições podem ser anticorpos dependentes de cátions. As composições podem ser administradas a um paciente (p.ex., um mamífe-

ro, tal como um ser humano) tendo, ou correndo o risco de ter, uma doença mediada pela $\alpha_v\beta_6$, de modo a tratar a (p.ex., aliviar, mitigar, reduzir, prevenir, adiar o início da) doença. Os exemplos de tais doenças incluem, porém não estão limitadas à: fibrose (p.ex., esclerodermia, cicatriz, fibrose do fígado, fibrose do pulmão, e fibrose do rim); psoríase; câncer (p.ex., câncer epitelial; câncer oral, da pele, cervical, ovariano, faríngeo, laríngeo, esofágico, do pulmão, da mama, do rim, ou colorretal); Síndrome de Alport; lesões agudas e crônicas do pulmão, fígado, rim e outros órgãos internos; e esclerose do pulmão, fígado, rim e outros órgãos internos. Os riscos de ter tais doenças podem resultar de predisposição genética; certos estilos de vida, tais como fumar e o alcoolismo; exposição a poluentes ambientais, tais como o amianto; condições fisiológicas, tais como diabetes, infecção viral de hepatite (p.ex., a infecção viral de hepatite C), doenças auto-imunes; e tratamentos médicos, tais como a terapia de radiação.

Esta invenção também inclui os métodos de detectar a $\alpha_v\beta_6$ em uma amostra de tecido de um mamífero (p.ex., um ser humano), compreendendo contatar a amostra de tecido com o anticorpo da invenção, tal como o 6.2A1 e o 6.2E5.

Esta invenção também inclui as células de hibridomas 6.1A8, 6.2B10, 6.3G9, 6.8G6, 6.2B1, 6.2A1, 6.2E5, 7.1G10, 7.7G5, e 7.1C5; os ácidos nucléicos compreendendo uma seqüência de codificação para qualquer uma de SEQ ID NOs:19-45 e 61-64; os polipeptídeos isolados compreendendo uma seqüência de aminoácidos de qualquer uma de SEQ ID NOs:19-45 e 61-64.

O anticorpo desta invenção refere-se a um anticorpo inteiro, p.ex., um anticorpo compreendendo duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, ou a um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo inteiro, tal como um fragmento Fab, um fragmento Fab', um fragmento $F(ab')_2$ ou um fragmento F(v). Um anticorpo desta invenção pode ser um anticorpo de murino ou um homólogo deste, ou um anticorpo inteiramente humano. Um anticorpo desta invenção também pode ser um anticorpo humanizado, um anticorpo quimérico ou um anticorpo de cadeia individual. Um anticorpo desta

ou avidéz, e dependência ou independência da ligação ao ligante por cátions, do que os anticorpos para $\alpha_v\beta_6$ anteriormente conhecidos.

Além das aplicações terapêuticas dos anticorpos da invenção, especialmente os bloqueadores, a classe de anticorpos não-bloqueadores
5 pode ser usada para propósitos diagnósticos, tais como em ensaios de captura de antígeno, ensaios imunológicos por ligação com enzima (ELISAs), imunistoquímica, e similares.

As outras características e vantagens da invenção serão aparentes a partir da descrição detalhada, dos desenhos, e das reivindicações
10 que se seguem.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As Figs. 1A e 1B são gráficos de barras mostrando os resultados de um ensaio de captura de células que determinou a capacidade de diversos anticorpos monoclonais ("mAb") anti- $\alpha_v\beta_6$ de ligarem as células FDC-P1
15 transfectadas com β_6 (células não-transfectadas como controle).

A Fig. 2A é um gráfico mostrando os resultados dos ensaios ELISA que determinaram a capacidade de diversos anticorpos monoclonais de "Fusão 6" anti- $\alpha_v\beta_6$ purificados de ligarem a $\alpha_v\beta_6$ humana recombinante solúvel ("hs $\alpha_v\beta_6$ "). Estes anticorpos foram gerados por imunização de camundongos $\beta_6^{-/-}$ com a $\alpha_v\beta_6$ truncada humana solúvel. Os números da legenda indicam os números dos clones. Quanto aos nomes dos clones correspondentes, ver a Tabela 2.
20

A Fig. 2B é um gráfico mostrando os resultados dos ensaios ELISA que determinaram a capacidade de diversos anticorpos monoclonais de "Fusão 7" anti- $\alpha_v\beta_6$ purificados de ligarem a hs $\alpha_v\beta_6$ recombinante solúvel. Estes anticorpos foram gerados por imunização de camundongos $\beta_6^{-/-}$ com células NIH 3T3 transfectadas com β_6 (Fusão n^o 7)
25

As Figs. 3A-F são gráficos mostrando a dependência diferencial por cátions da ligação de diversos anticorpos monoclonais anti- $\alpha_v\beta_6$ à hs $\alpha_v\beta_6$.
30

As Figs. 4A e 4B são gráficos mostrando que os anticorpos monoclonais de Fusão n^o 6 e Fusão n^o 7, respectivamente, inibem a ligação da

biotina-hs $\alpha_v\beta_6$ ao LAP.

As Figs. 5A-E são gráficos mostrando que os anticorpos monoclonais ilustrativos da invenção inibem a ligação das células FDC-P1 transfectadas com β_6 ao LAP. As Figs. 5A e 5B mostram os resultados a partir dos anticorpos de Fusão nº 6. As Figs. 5C-E mostram os resultados a partir dos anticorpos de Fusão nº 7.

As Figs. 6A e 6B são gráficos mostrando que os anticorpos de Fusão nº 6 e Fusão nº 7, respectivamente, inibem a ativação do TGF- β mediada pela $\alpha_v\beta_6$, usando um ensaio de gene relator de luciferase, PAI-1 para monitorar a ativação do TGF- β .

A Fig. 7A representa as seqüências de aminoácidos dos domínios variáveis das cadeias pesadas dos anticorpos monoclonais para $\alpha_v\beta_6$ 6.1A8, 6.8G6 (subclones A e B), 7.7G5, 6.2B1, 6.3G9, 6.2B10 (subclones A e B), 6.2G2, 6.2A1, 6.4B4 (subclones A, B e C), 7.10H2, 7.9H5, 7.4A3 (subclones A e B), 7.1C5 (subclones A e B) e 7.1G10. Os anticorpos 6.1A8, 6.8G6 e 7.7G5 são dependentes de cátions na ligação à $\alpha_v\beta_6$, enquanto que os anticorpos 6.2B1, 6.2A1, 6.3G9, 6.2B10, 6.4B4, 7.1C5 e 7.1G10 são independentes de cátions (*infra*). Os números nos parênteses significam as posições dos resíduos de aminoácidos. As CDRs estão nas caixas grandes, enquanto que as caixas pequenas contendo aminoácidos em *itálico* representam o polimorfismo em diferentes clones de um anticorpo particular.

A Fig. 7B representa as seqüências de aminoácidos dos domínios variáveis das cadeias leves dos anticorpos monoclonais para $\alpha_v\beta_6$ 6.1A8, 6.8G6, 6.4B4, 6.2A1, 7.1C5, 7.1G10, 6.2B10, 7.7G5, 6.2B1 e 6.3G9.

A Fig. 8 é um gráfico de espalhamento mostrando a expressão da $\alpha_v\beta_6$ em seções de tecidos com câncer de mama humano e carcinoma escamoso humano. Os tecidos humanos normais mostram somente níveis de expressão da $\alpha_v\beta_6$ insignificantes.

As Figs. 9A e 9B são gráficos de curvas quadráticas representando as afinidades de ligação em solução de dois anticorpos anti- $\alpha_v\beta_6$, 6.8G6 e 6.3G9, respectivamente, para a $\alpha_v\beta_6$ solúvel.

As Figs. 10A e 10B são gráficos de barras demonstrando a ca-

pacidade dos anticorpos monoclonais purificados de competir com o 6.3G9 biotinilado e o 6.8G6 biotinilado, respectivamente, pela ligação à $\alpha_v\beta_6$.

5 A Fig. 11 é um gráfico de barras mostrando a porcentagem de coloração da actina do liso nos rins de animais UOU tratados com o tratamento de mAb anti- $\alpha_v\beta_6$.

A Fig. 12 mostra a expressão da $\alpha_v\beta_6$ em linhagens de células de tumor através de análise por FACS (lado direito da figura) e a inibição da ligação das linhagens de células de tumor ao ligante LAP pelos mAbs 6.3G9 e 6.4B4 (lado esquerdo da figura).

10 A Fig. 13 é um gráfico de barras demonstrando a inibição da ligação de três linhagens de células de tumor ao ligante LAP pelos mAbs anti- $\alpha_v\beta_6$ 6.3G9, 6.8G6 e 6.4B4. A ligação do mAb foi comparada à ligação total sem a adição de mAbs de teste (TB) e à ligação não-específica ao controle de BSA sozinho (NSB).

15 As Figs. 14A e 14B são gráficos mostrando os efeitos dos mAbs anti- $\alpha_v\beta_6$ 6.3G9 e 6.4B4, respectivamente, durante um período de estudo de 33 dias, sobre os tumores que surgem de células Detroit 562 implantadas de forma subcutânea.

20 As Figs. 15A-C são gráficos mostrando os efeitos do mAb anti- $\alpha_v\beta_6$ sobre a fibrose de pulmão induzida por bleomicina. (A) O tratamento com anticorpo usando o mAb 6.3G9 foi iniciado no dia 0 na hora da administração da bleomicina e foi monitorado durante um período de 30 dias; (B) O tratamento com anticorpo usando o mAb 6.3G9 foi iniciado 15 dias após o tratamento com bleomicina e foi monitorado durante um período de 30 dias;

25 (C) O tratamento com anticorpo usando os mAbs 6.3G9, 6.8G6 e 6.4B4 foi iniciado 15 dias após o tratamento com bleomicina e foi monitorado durante um período prolongado de 60 dias. Em ambas as Figs. 15A e 15B, os gráficos de barras à esquerda representam μg de hidroxiprolina/pulmão, enquanto que os gráficos de barras à direita mostram a porcentagem de aumento em hidroxiprolina sobre camundongos tratados com salina (sem bleomicina). Na Fig. 15C, o gráfico mostra o teor de hidroxiprolina por pulmão.

30

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Esta invenção caracteriza classes e subclasses de anticorpos que são específicos para a integrina $\alpha_v\beta_6$. Pelo menos uma classe dos anticorpos (bloqueadores) é capaz de bloquear a ligação da $\alpha_v\beta_6$ ao LAP ou impedir a ativação do TGF- β .

5 O que segue descreve os diversos métodos de preparar os anticorpos desta invenção. Os métodos que são conhecidos na técnica, porém não especificamente descritos aqui, estão também dentro do escopo desta invenção. Por exemplo, os anticorpos desta invenção podem também ser identificados usando as bibliotecas de anticorpos de fagos expostos, tais
10 como aquelas descritas em Smith, *Science* 228:1315-7 (1985); Patentes U.S. 5.565.332, 5.733.743, 6.291.650, e 6.303.313. Os anticorpos adicionais desta invenção podem ser feitos acoplando as cadeias pesadas identificadas aqui com uma cadeia leve não-cognata, p.ex., uma cadeia leve identificada pela tecnologia de exposição de fagos.

15 Anticorpos de Hibridomas Não-Humanos

Os anticorpos monoclonais desta invenção podem ser gerados pela tecnologia de hibridoma bastante conhecida. Para assim fazer, os animais $\beta_6^{-/-}$ (p.ex., os camundongos, os ratos ou os coelhos) são imunizados com preparações de $\alpha_v\beta_6$ purificadas ou brutas, células transfectadas com
20 construções de cDNA codificando α_v , β_6 ou ambos os antígenos, células que expressam de modo constitutivo a $\alpha_v\beta_6$, e similares. O antígeno pode ser distribuído como proteína purificada, proteína expressa sobre células, fragmento de proteína ou seu peptídeo, ou como DNA simples ou vetores virais codificando a proteína, o fragmento de proteína, ou o peptídeo. Os soros dos
25 animais imunizados são então testados quanto à presença de anticorpos anti- $\alpha_v\beta_6$. As células B são isoladas dos animais que testam positivo, e os hibridomas são feitos com estas células B.

Os anticorpos secretados pelos hibridomas são examinados quanto à sua capacidade de ligar-se especificamente à $\alpha_v\beta_6$ (p.ex., a ligação
30 às células transfectadas com β_6 e não às células de origem não-transfectadas) e quanto a quaisquer outras características desejadas, p.ex., tendo as seqüências de consenso da CDR desejadas, inibindo (ou não ini-

bindo no caso de não-bloqueadores) a ligação entre o LAP e a $\alpha_v\beta_6$ com um valor de IC_{50} menor do que aquele do anticorpo anti- $\alpha_v\beta_6$ conhecido 10D5, ou inibindo a ativação do TGF- β .

5 As células dos hibridomas que testam positivo nos ensaios de exame são cultivadas em um meio nutriente, sob condições que permitam que as células secretem os anticorpos monoclonais no meio de cultura. O sobrenadante da cultura de hibridoma condicionado é então coletado e os anticorpos contidos no sobrenadante são purificados. Alternativamente, o anticorpo desejado pode ser produzido injetando as células dos hibridomas
10 na cavidade peritoneal de um animal não-imunizado (p.ex., um camundongo). As células dos hibridomas proliferam-se na cavidade peritoneal, secretando o anticorpo que se acumula como fluido de ascite. O anticorpo pode então ser coletado removendo o fluido de ascite da cavidade peritoneal com uma seringa.

15 Os anticorpos monoclonais também podem ser gerados isolando os cDNAs que codificam o anticorpo dos hibridomas desejados, transfectando as células hospedeiras mamíferas (p.ex., as células CHO ou NSO) com os cDNAs, cultivando as células hospedeiras transfectadas, e recuperando o anticorpo do meio de cultura.

20 Anticorpos Quiméricos

Os anticorpos monoclonais desta invenção também podem ser gerados engenheirando um anticorpo de hibridoma cognato (p.ex., murino, rato ou coelho). Por exemplo, um anticorpo cognato pode ser alterado por tecnologia de DNA recombinante, de modo tal que parte ou todas as regiões
25 de articulação e/ou constantes das cadeias pesadas e/ou leves sejam substituídas pelos componentes correspondentes de um anticorpo de uma outra espécie (p.ex., o ser humano). Geralmente, os domínios variáveis do anticorpo engenheirado permanecem idênticos, ou substancialmente desse modo, aos domínios variáveis do anticorpo cognato. Um tal anticorpo engenheirado é chamado um anticorpo quimérico e é menos antigênico do que o
30 anticorpo cognato quando administrado a um indivíduo da espécie a partir da qual a região de articulação e/ou constante é derivada (p.ex., um ser huma-

no). Os métodos de preparar os anticorpos quiméricos são bastante conhecidos na técnica.

Os anticorpos quiméricos incluídos nesta invenção podem conter um domínio variável da cadeia pesada tendo uma seqüência idêntica (ou substancialmente desse modo) a qualquer uma de SEQ ID NOs:19-36 e/ou
5 um domínio variável da cadeia leve tendo uma seqüência idêntica (ou substancialmente assim) a qualquer uma de SEQ ID NOs:37-45.

As regiões constantes humanas preferidas incluem aquelas derivadas de IgG1 e IgG4.

10 Anticorpos Inteiramente Humanos

Os anticorpos monoclonais desta invenção também incluem os anticorpos inteiramente humanos. Eles podem ser preparados usando esplenócitos humanos sensibilizados *in vitro*, conforme descrito por Boerner e col., *J. Immunol.* 147:86-95 (1991), ou usando as bibliotecas de anticorpos
15 de fagos expostos, como descrito, p.ex., na Patente U.S. 6.300.064.

Alguns outros métodos para produzir anticorpos inteiramente humanos envolvem o uso de animais não-humanos que têm lugares de Ig endógenos não-ativados e são transgênicos para os genes da cadeia pesada e da cadeia leve de anticorpos humanos não-rearranjados. Tais animais
20 transgênicos podem ser imunizados com a $\alpha_v\beta_6$ e os hibridomas são então preparados a partir das células B derivadas destes. Estes métodos são descritos, p.ex., nas diversas publicações/patentes da GenPharm/Medarex (Palo Alto, CA) que dizem respeito a camundongos transgênicos contendo minilugares de Ig humana (p.ex., a Patente U.S. 5.789.650 de Lonberg); nas diversas
25 publicações/patentes da Abgenix (Femont, CA) com relação ao XENOMICE (p.ex., as Patentes U.S. 6.075.181, 6.150.584 e 6.162.963 de Kucheralapati; Green e col., *Nature Genetics* 7:13-21 (1994); e Mendez e col., 15(2):146-56 (1997)); e nas diversas publicações/patentes da Kirin (Japão) dizendo respeito aos camundongos "transômicos" (p.ex., a EP 843 961, e
30 Tomizuka e col., *Nature Genetics* 16:133-14443 (1997)).

Anticorpos Humanizados

Os anticorpos monoclonais desta invenção também incluem as

versões humanizadas de anticorpos anti- $\alpha_v\beta_6$ cognatos derivados de outras espécies. Um anticorpo humanizado é um anticorpo produzido por tecnologia de DNA recombinante, na qual alguns ou todos os aminoácidos de uma cadeia leve ou pesada da imunoglobulina humana, que não são requeridos para a ligação ao antígeno (p.ex., as regiões constantes e as regiões de estrutura dos domínios variáveis), são usados para substituir os aminoácidos correspondentes a partir da cadeia leve ou pesada do anticorpo não-humano, cognato. Como forma de exemplo, uma versão humanizada de um anticorpo de murino para um dado antígeno tem sobre ambas as suas cadeias pesadas e leves (1) regiões constantes de um anticorpo humano; (2) regiões de estrutura a partir dos domínios variáveis de um anticorpo humano; e (3) CDRs do anticorpo de murino. Quando necessário, um ou mais resíduos nas regiões de estrutura humanas podem ser modificados para resíduos nas posições correspondentes no anticorpo de murino de modo a preservar a afinidade de ligação do anticorpo humanizado ao antígeno. Esta modificação é algumas vezes chamada "mutação retrógrada". Os anticorpos humanizados geralmente são menos prováveis de fazerem surgir uma resposta imune em humanos em comparação com os anticorpos humanos quiméricos, porque os primeiros contêm consideravelmente menos componentes não-humanos.

Os métodos para preparar os anticorpos humanizados são descritos, p.ex., em EP 239 400 de Winter; Jones e col., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann e col., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen e col., *Science* 239: 1534-1536 (1988); Queen e col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:10029 (1989); Patente U.S. 6.180.370; e Orlandi e col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833 (1989). Geralmente, a transplantação das CDRs de murino (ou outro não-humano) em um anticorpo humano é obtida como se segue. Os cDNAs codificando os domínios variáveis das cadeias pesadas e leves são isolados de um hibridoma. As seqüências de DNA dos domínios variáveis, incluindo as CDRs, são determinadas por seqüenciamento. Os DNAs codificando as CDRs são transferidos para as regiões correspondentes de uma seqüência de codificação do domínio variável de cadeia pesada

ou leve de anticorpo humano por mutagênese dirigida para o sítio. Então, os segmentos de genes da região constante humana de um isótipo desejado (p.ex., $\gamma 1$ para CH e k para CL) são adicionados. Os genes das cadeias pesadas e leves humanizados são co-expressos em células hospedeiras mamíferas (p.ex., as células CHO ou NSO) para produzir anticorpo humanizado solúvel. Para facilitar a produção em grande escala dos anticorpos, é com freqüência desejado produzir tais anticorpos humanizados em biorreatores contendo as células expressando o anticorpo, ou produzir mamíferos transgênicos (p.ex., cabras, vacas, ou ovelhas) que expressam o anticorpo no leite (ver, p.ex., a Patente U.S. 5.827.690).

Às vezes, a transferência direta das CDRs para uma estrutura humana resulta em uma perda de afinidade de ligação ao antígeno do anticorpo resultante. Isto é porque em alguns anticorpos cognatos, certos aminoácidos dentro das regiões de estrutura interagem com as CDRs e, assim, influenciam a afinidade de ligação ao antígeno global do anticorpo. Em tais casos, seria crítico introduzir as "mutações retrógradadas" (*supra*) nas regiões de estrutura do anticorpo receptor a fim de conservar a atividade de ligação ao antígeno do anticorpo cognato.

A abordagem geral de preparar as mutações retrógradadas é conhecida na técnica. Por exemplo, Queen e col. (*supra*), Co e col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:2869-2873 (1991), e WO 90/07861 (Protein Design Labs Inc.) descrevem uma abordagem que envolve duas etapas-chave. Primeiro, as regiões de estrutura V humanas são escolhidas através de análise por computador quanto à homologia de seqüência de proteína ótima com a estrutura da região V do anticorpo de murino cognato. Então, a estrutura terciária da região V de murino é modelada por computador, a fim de visualizar os resíduos de aminoácidos da estrutura que são prováveis de interagir com as CDRs de murino, e estes resíduos de aminoácidos de murino são então sobrepostos sobre a estrutura humana homóloga.

Sob esta abordagem de duas etapas, existem diversos critérios para projetar os anticorpos humanizados. O primeiro critério é usar como o receptor humano a estrutura a partir de uma imunoglobulina humana parti-

cular que seja normalmente homóloga com a imunoglobulina doadora não-humana, ou usar uma estrutura de consenso a partir de muitos anticorpos humanos. O segundo critério é usar o aminoácido doador em vez do receptor se o resíduo receptor humano for incomum e o resíduo doador for típico para as seqüências humanas em um resíduo específico da estrutura. O terceiro critério é usar o resíduo de aminoácido doador da estrutura em vez do receptor em posições imediatamente adjacentes às CDRs.

Pode-se também usar uma abordagem diferente, como descrita, p.ex., em Tempest, *Biotechnology* 9: 266-271 (1991). Sob esta abordagem, as estruturas das regiões V derivadas das cadeias pesadas e leves NEWM e REI, respectivamente, são usadas para o enxerto de CDR sem introdução radical de resíduos do camundongo. Uma vantagem de usar esta abordagem é que as estruturas tridimensionais das regiões variáveis de NEWM e REI são conhecidas da cristalografia por raios X e, assim, as interações específicas entre as CDRs e os resíduos das estruturas das regiões V podem ser prontamente modeladas.

Outras Porções

Os anticorpos monoclonais desta invenção podem adicionalmente compreender outras porções para efetuar as funções desejadas. Por exemplo, os anticorpos podem incluir uma porção de toxina (p.ex., toxóide de tétano ou ricina) ou um radionuclídeo (p.ex., ^{111}In ou ^{90}Y) para matar as células visadas pelos anticorpos (ver, p.ex., a Patente U.S. 6.307.026). Os anticorpos podem compreender uma porção (p.ex., biotina, porções fluorescentes, porções radioativas, marcas de histidina ou outras marcas peptídicas) para o isolamento ou a detecção fácil. Os anticorpos podem também compreender uma porção que possa prolongar a sua vida de prateleira em soro, por exemplo, uma porção de polietileno glicol (PEG).

Condições de Doença e Modelos de Animais

Os anticorpos da invenção são úteis no tratamento, incluindo a prevenção, de doenças mediadas pela $\alpha_v\beta_6$. Por exemplo, estes anticorpos podem ser usados para tratar a fibrose (p.ex., a fibrose do pulmão, a lesão do pulmão aguda, a fibrose do rim, a fibrose do fígado, a Síndrome de Al-

port, e a esclerodermia) por bloqueio da ativação do TGF- β ou bloqueio da ligação da $\alpha_v\beta_6$ a quaisquer outros ligantes, tais como a fibronectina, a vitronectina, e a tenascina. A novidade desta abordagem inclui: (1) ela bloqueia a ativação do TGF- β em vez da ligação do TGF- β ao seu receptor, (2) ela
5 pode inibir o TGF- β localmente (i.e., em sítios da supra-regulação) em vez de sistemicamente, e (3) ela inibe a ligação da $\alpha_v\beta_6$ a um ligante. Diferentemente das doenças ou das condições fibróticas, os anticorpos da invenção são úteis no tratamento de câncer ou metástase do câncer (incluindo o crescimento e a invasão do tumor), particularmente os cânceres epiteliais. Um
10 subgrupo de cânceres epiteliais é o carcinoma de célula escamosa, p.ex., os cânceres de cabeça e pescoço, orais, da mama, do pulmão, da próstata, cervicais, faríngeos, do cólon, pancreáticos e ovarianos. Nossos estudos usando os novos anticorpos monoclonais para $\alpha_v\beta_6$ demonstraram que a $\alpha_v\beta_6$ é altamente expressada em muitos cânceres epiteliais, especialmente
15 na borda dianteira dos tumores. Os novos anticorpos também podem ser usados para quaisquer outras doenças mediadas pela $\alpha_v\beta_6$, incluindo a psoríase.

Os tratamentos desta invenção são efetivos sobre pacientes tanto humanos quanto animais sofrendo com estas condições. Os pacientes
20 animais ao quais a invenção é aplicável estendem-se tanto aos animais domésticos quanto aos animais de criação, criados como animais de estimação ou para propósitos comerciais. Os exemplos são os cachorros, os gatos, o gado, os cavalos, as ovelhas, os porcos e as cabras.

A eficácia dos anticorpos da invenção pode ser testada em diversos modelos de animais. Os modelos de camundongos para a fibrose do pulmão incluem a fibrose do pulmão capaz de indução pela bleomicina (Pittet e col., *J. Clin. Invest.* 107(12):1537-1544 (2001); e Munger e col., *supra*) e pela irradiação (Franko e col., *Rad. Res.* 140:347-355 (1994)). Nos camundongos tratados com a bleomicina, a expressão da $\alpha_v\beta_6$ aumenta nas
25 células alveolares epiteliais dos pulmões. Porém os camundongos nocautes de β_6 estão protegidos da lesão e da fibrose induzida pela bleomicina.

Os modelos de camundongos para a fibrose do rim incluem os

camundongos COL4A4 $-/-$ (ver, p.ex., Gosgrove e col., *Amer. J. Path.* 157:1649-1659 (2000)), os camundongos com lesão induzida por adriamicina (Wang e col., *Kidney International* 58: 1797-1804 (2000); Deman e col., *Nephrol Dial Transplant* 16: 147-150 (2001)), os camundongos db/db (Ziyadeh e col., *PNAS USA* 97:8015-8020 (2000)), e os camundongos com obstrução ureteral unilateral (Fogo e col., *Lab Investigation* 81: 189A (2001); e Fogo e col., *Journal of the American Society of Nephrology* 12:819A (2001)). Em todos estes modelos, os camundongos desenvolvem lesão e fibrose do rim que podem progredir até a insuficiência renal. A $\alpha_v\beta_6$ é supra-regulada no revestimento epitelial dos túbulos ascendentes e descendentes dos rins dos camundongos COL4A3 $-/-$, dos camundongos tratados com adriamicina, e dos camundongos que sofrem obstrução ureteral unilateral. É provável que a expressão da $\alpha_v\beta_6$ também aumente em uma variedade de modelos de lesão dos rins.

Os anticorpos monoclonais anti- $\alpha_v\beta_6$ também podem ser testados quanto à sua capacidade de inibir o crescimento, a progressão, e a metástase do tumor em tais modelos de animais como os modelos padrões de crescimento e metástase do tumor *in vivo*. Ver, p.ex., Rockwell e col., *J. Natl. Cancer Inst.* 49:735 (1972); Guy e col., *Mol. Cell Biol.* 12:954 (1992); Wyckoff e col., *Cancer Res.* 60:2504 (2000); e Oft e col., *Curr. Biol.* 8:1243 (1998). Os ligantes da $\alpha_v\beta_6$ importantes podem incluir o TGF- β , que está envolvido na metástase (quanto a uma revisão, ver Akhurst e col., *Trends in Cell Biology* 11:S44-S51 (2001)), a fibronectina e a vitronectina.

A eficácia dos tratamentos desta invenção pode ser medida por diversas ferramentas diagnósticas disponíveis, incluindo o exame físico, os testes de sangue, as medições de proteinúria, os níveis de creatinina e a depuração de creatinina, os testes de função pulmonar, os níveis de nitrogênio da uréia do sangue (BUN) em plasma, a observação e a classificação de cicatriz ou lesões fibróticas, a deposição de matriz extracelular, tal como o colágeno, a actina do músculo liso e a fibronectina, os testes da função dos rins, o ultra-som, a imagem de ressonância magnética (IRM), e a varredura de CT.

Composições Farmacêuticas

As composições farmacêuticas desta invenção compreendem um ou mais anticorpos da presente invenção, ou seus derivados farmacêuticamente aceitáveis, opcionalmente com qualquer carreador farmacêuticamente aceitável. O termo "carreador", como usado aqui, inclui os adjuvantes e os veículos aceitáveis conhecidos.

De acordo com esta invenção, as composições farmacêuticas podem estar na forma de uma preparação injetável estéril, por exemplo uma suspensão aquosa ou oleaginosa injetável estéril. Esta suspensão pode ser formulada de acordo com práticas conhecidas na técnica, usando agentes dispersantes, molhantes, e de suspensão adequados.

As composições farmacêuticas desta invenção podem ser dadas de modo oral, tópico, intravenoso, subcutâneo, intraperitoneal, intramuscular, intramedular, intra-articular, intra-sinovial, intra-esternal, intratecal, intra-hepático, ou intracraniano, conforme desejado, ou somente localmente em locais de inflamação ou crescimento do tumor. As composições farmacêuticas desta invenção também podem ser administradas por inalação através do uso de, p.ex., um nebulizador, um inalador de pó seco ou um inalador de dose medida.

A taxa de dosagem e de dose dos anticorpos desta invenção, efetiva para produzir os efeitos desejados, dependerá de uma variedade de fatores, tais como a natureza da doença a ser tratada, o tamanho do paciente, o objetivo do tratamento, a composição farmacêutica específica usada, e o julgamento do médico que trata. São úteis os níveis de dosagem de entre cerca de 0,001 e cerca de 100 mg/kg de peso do corpo por dia, por exemplo entre cerca de 0,1 e cerca de 50 mg/kg de peso do corpo por dia, do composto de ingrediente ativo. Por exemplo, um anticorpo da invenção será administrado em uma dose variando entre cerca de 0,01 mg/kg de peso do corpo/dia e cerca de 20 mg/kg de peso do corpo/dia, p.ex., variando entre cerca de 0,1 mg/kg de peso do corpo/dia e cerca de 10 mg/kg de peso do corpo/dia, e em intervalos de um em um dia até de quatorze em quatorze dias. Em uma outra modalidade, o anticorpo é administrado em uma dose de

cerca de 0,3 a 1 mg/kg de peso do corpo, quando administrado de forma intraperitoneal. Em mais uma outra modalidade, o anticorpo é administrado em uma dose de cerca de 5 a 12,5 mg/kg de peso do corpo, quando administrado de modo intravenoso. Em uma modalidade, uma composição de anticorpo é administrada em uma quantidade efetiva para proporcionar um nível de anticorpo no plasma de pelo menos 1 mg/ml.

Métodos Diagnósticos

Os anticorpos desta invenção podem ser usados para diagnosticar condições de doenças associadas com os níveis alterados de expressão da $\alpha_v\beta_6$. Uma amostra de tecido de um paciente, tal como uma biópsia de tecido, amostra de fluido corpóreo ou lavagem (p.ex., a lavagem alveolar), pode ser testada em um ensaio de captura de antígeno, um ELISA, um ensaio de imunistoquímica, e similares, usando os anticorpos. Uma amostra de tecido de um indivíduo normal é usada como controle.

A prática da presente invenção empregará, a não ser que de outro modo indicado, as técnicas convencionais de biologia celular, cultura de células, biologia molecular, microbiologia, DNA recombinante, química da proteína, e imunologia, que estão dentro da habilidade da técnica. Tais técnicas estão descritas na literatura. Ver, por exemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edição (Sambrook e col., Eds.), 1989; *Oligonucleotide Synthesis*, (M.J. Gait, Ed.), 1984; Patente U.S. 4.683.195 para Mullis e col.; *Nucleic Acid Hybridization*, (B.D. Hames e S.J. Higgins), 1984; *Transcription and Translation*, (B.D. Hames e S.J. Higgins), 1984; *Culture of Animal Cells* (R.I. Freshney, Ed.), 1987; *Immobilized Cells and Enzymes*, IRL Press, 1986; *A Practical Guide to Molecular Cloning* (B. Perbal), 1984; *Methods in Enzymology*, Volumes 154 e 155 (Wu e col., Eds.), Academic Press, Nova York; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.H. Miller e M.P. Calos, Eds.), 1987; *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Mayer e Walker, Eds.), 1987; *Handbook of Experiment Immunology*, Volumes I-IV (D.M. Weir e C.C. Blackwell, Eds.), 1986; *Manipulating the Mouse Embryo*, 1986.

A não ser que de outro modo definido, todos os termos técnicos

e científicos usados aqui têm o mesmo significado como comumente entendido por alguém de habilidade comum na técnica à qual esta invenção diz respeito. Os métodos e os materiais ilustrativos são descritos abaixo, embora métodos e materiais similares ou equivalentes a estes descritos aqui também possam ser usados na prática da presente invenção. Todas as publicações e outras referências mencionadas aqui são incorporadas por referência em sua totalidade. Em caso de conflito, dominará o presente relatório descritivo, incluindo as definições. Os materiais, os métodos, e os exemplos são somente ilustrativos e não pretendidos serem limitativos. Por todo este relatório descritivo, a palavra "compreendem", ou as variações tais como "compreende" ou "compreendendo", será entendida implicar a inclusão de um inteiro estabelecido ou grupo de inteiros, porém não a exclusão de qualquer outro inteiro ou grupo de inteiros.

Exemplos

Os exemplos que se seguem são pretendidos para ilustrar os métodos e os materiais da presente invenção. As modificações e as adaptações adequadas das condições e dos parâmetros descritos normalmente encontrados na técnica de anticorpos, que são óbvias para aqueles versados na técnica, estão dentro do espírito e do escopo da presente invenção.

Nos exemplos seguintes, os camundongos β_6 -/- foram gerados conforme descrito em Huang e col., *J. Cell Biol.* 133:921 (1996). O LAP humano recombinante foi adquirido da R & D Systems (Minneapolis, MN). O anticorpo 10D5 foi adquirido da Chemicon (Temecula, CA). O hibridoma L230 foi adquirido da ATCC e o anticorpo secretado foi purificado do sobrenadante de culturas saturadas através de cromatografia por afinidade sobre proteína A imobilizada. A isotipagem dos anticorpos foi efetuada usando o kit ISOSTRIP (Roche Diagnostics) de acordo com as instruções do fabricante. A linhagem celular SW480 transfectada com β_6 foi preparada conforme descrito em Weinacker e col., *J. Biol. Chem.* 269:6940-6948 (1994).

Exemplo 1: Geração de linhagens celulares estáveis transfectadas com β_6

As células NIH 3T3 e FDC-P1 transfectadas com β_6 foram geradas por eletroporação de linhagens celulares de origem com uma construção

de DNA contendo o cDNA de β_6 de murino de tamanho natural e um marcador selecionável de neomicina. As células estavelmente transfectadas foram selecionadas por passagem das células em meio de cultura contendo G418 por 14 dias, seguida por classificação das células ativadas fluorescentes (FACS) para isolar as células expressando o maior nível de β_6 de superfície. As células FDC-P1 transfectadas foram cultivadas em DMEM suplementado com L-glutamina a 4 mM, ajustado para conter 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 4,5 g/l de glicose, e piruvato de sódio a 1,0 mM, 10% de FBS, 2,5% de suplemento de cultura de IL-3 de camundongo, e 1,5 mg/ml de G418 ativo. As células NIH 3T3 transfectadas foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de FBS, L-glutamina a 2 mM, penicilina/estreptomicina, e 1 mg/ml de G418 ativo.

Exemplo 2: Purificação da $\alpha_v\beta_6$ solúvel humana

A proteína $\alpha_v\beta_6$ foi purificada essencialmente como descrito em Weinacker, *supra*. Uma linhagem de células CHO expressando a $hs\alpha_v\beta_6$ foi cultivada, e o sobrenadante resultante coletado por centrifugação. A integrina foi purificada através de cromatografia por afinidade usando o anticorpo anti- α_v L230. O L230 purificado foi reticulado à Sepharose 4B ativada com CNBr (Sigma) em uma razão de 4,8 mg de anticorpo/ml de resina. O sobrenadante de $\alpha_v\beta_6$ foi carregado a 0,5 mg de anticorpo/ml de resina para a coluna de afinidade com L230, e a coluna foi lavada com 10 volumes de coluna de cada um de (1) Tris-Cl a 50 mM, pH 7,5, NaCl a 1 M, $MgCl_2$ a 1 mM; (2) Tris-Cl a 50 mM, pH 7,5, NaCl a 50 mM, $MgCl_2$ a 1 mM; e (3) Na_3PO_4 a 10 mM, pH 7,0. A $hs\alpha_v\beta_6$ foi eluída com glicina a 100 mM, pH 2,5 em volume a 1:10 de Na_3PO_4 a 1 M, pH 8,0. A proteína foi dialisada com diversas trocas contra a salina tamponada com fosfato (PBS) e armazenada a $-20^\circ C$.

Exemplo 3: Imunização dos camundongos $\beta_6^{-/-}$

Os camundongos $\beta_6^{-/-}$ foram imunizados por injeção intraperitoneal (IP) com 25 μg de $\alpha_v\beta_6$ humana recombinante purificada, emulsificada em Adjuvante de Freund completo (CFA), em uma razão de volume de 1:1, em um volume total de 200 μl . Alternativamente, os camundongos $\beta_6^{-/-}$ foram imunizados via injeção IP com 4×10^6 células NIH 3T3 transfectadas

com β_6 suspensas novamente em 100 μ l de PBS suplementada com 1 mg/ml de CaCl_2 e 1 mg/ml de MgCl_2 , e os mesmos camundongos foram injetados em um local adjacente com 100 μ l de CFA. Duas semanas e quatro semanas após a imunização inicial, os camundongos foram reforçados similarmente com os mesmos reagentes, com a exceção que o adjuvante de Freund incompleto foi usado no lugar do CFA. Os camundongos foram sangrados 7 dias após o reforço final e os títulos anti- β_6 foram determinados por ligação do soro à $\alpha_v\beta_6$ humana recombinante purificada ou às células transfectadas com β_6 . No caso dos camundongos imunizados com a $\alpha_v\beta_6$ humana recombinante purificada, os camundongos foram deixados sossegados por 3 meses e imunizados novamente com o mesmo antígeno misturado com ImmunEasy (Qiagen). Três dias antes de isolar os baços para as fusões de hibridomas, os camundongos foram imunizados com 12,5 μ g de proteína $\alpha_v\beta_6$ humana recombinante purificada, por injeção tanto IP quanto intravenosa. No dia da fusão, os animais foram sacrificados, e os seus baços foram removidos e rompidos em suspensões celulares individuais. Os esplenócitos foram imortalizados por fusão a um par de fusão de células selecionáveis para droga.

Exemplo 4: Exame dos hibridomas

Dois grupos de anticorpos foram gerados através da imunização dos camundongos $\beta_6^{-/-}$. Um grupo de anticorpos foi gerado através da imunização com a $\alpha_v\beta_6$ truncada humana solúvel (Fusão nº 6). O outro grupo de anticorpos foi gerado através de imunização com as células NIH 3T3 transfectadas com β_6 de murino (Fusão nº 7). O exame para os anticorpos anti- $\alpha_v\beta_6$ foi realizado usando os ensaios de ligação e funcionais tanto à base de células quanto sem células, conforme descritos abaixo. A seleção inicial de clones positivos foi baseada na ligação à $\text{hs}\alpha_v\beta_6$ purificada e células humanas e de murino transfectadas com β_6 (células não-transfectadas como controle). Os clones selecionados foram expandidos e as culturas terminais foram reavaliadas quanto à ligação às células tanto transfectadas com β_6 quanto não-transfectadas em ensaios de captura de células (Exemplo 5b, *infra*) (exemplos representativos nas Figs. 1A e 1B, onde os prefixos "6." ou

"7." dos nomes dos mAbs, que significam Fusão 6 e Fusão 7, respectivamente, estão omitidos; ver também a Tabela 2 abaixo). Alguns anticorpos ligaram-se preferencialmente às células transfectadas com β_6 , enquanto outros se ligaram às células tanto transfectadas quanto não-transfectadas, indicando que somente um subgrupo dos anticorpos tinha uma preferência por β_6 (Figs. 1A e 1B). A seleção adicional foi baseada na capacidade dos anticorpos de bloquear a ligação tanto da $hs\alpha_v\beta_6$ biotinilada quanto das células de murino transfectadas com β_6 ao LAP. Os clones escolhidos foram subclonados usando FACS e armazenados congelados até o uso.

Os anticorpos monoclonais foram examinados quanto à especificidade de ligação à $\alpha_v\beta_6$ com base em sua capacidade de ligar as células transfectadas com β_6 e de não ligar as células de origem não-transfectadas. Os anticorpos monoclonais foram adicionalmente confirmados como ligantes específicos de $\alpha_v\beta_6$ e não de outras integrinas α_v ou integrinas não-específicas (i.e., integrinas não- α_v que se ligam aos ligantes contendo RGD) com base em sua deficiência de ligação às linhagens de células expressando $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$ ou $\alpha_5\beta_1$. Estas incluíram as células estavelmente transfectadas, bem como as linhagens de células JY, K562, SW480, NIH3T3, e FDCP1 não-transfectadas.

Alguns dos anticorpos que foram depositados com a ATCC são listados abaixo, na Tabela 1.

Tabela 1 - Hibridomas Depositados

Clones dos hibridomas	ATCC Nº	Data de Depósito
6.1A8	PTA-3647	16 de agosto de 2001
6.2B10	PTA-3648	16 de agosto de 2001
6.3G9	PTA-3649	16 de agosto de 2001
6.8G6	PTA-3645	16 de agosto de 2001
6.2B1	PTA-3646	16 de agosto de 2001
6.2A1	PTA-3896	5 de dezembro de 2001
6.2E5	PTA-3897	5 de dezembro de 2001
7.1G10	PTA-3898	5 de dezembro de 2001
7.7G5	PTA-3899	5 de dezembro de 2001
7.1C5	PTA-3900	5 de dezembro de 2001

Exemplo 5: Ensaios para exame e caracterização

a. ELISA de $\alpha_v\beta_6$

Uma placa de microtítulo com 96 poços (COSTAR EASY-WASH da Corning) foi revestida com 50 μl /poço de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de $\text{hs}\alpha_v\beta_6$ a 4°C, durante a noite. A placa foi lavada com tampão de lavagem (0,1% de TWEEN-20 em PBS) quatro vezes em um lavador de placas automatizado. Então, 180 μl /poço de 3% de BSA em TBS foram adicionados e incubados por 1 h a 25°C para bloquear a ligação não-específica. A placa foi lavada como acima descrito, e as diluições do sobrenadante de hibridoma (para os ensaios de exame) ou do anticorpo purificado (para a caracterização) em TBS contendo 1 mg/ml de BSA, CaCl_2 a 1 mM, e MgCl_2 a 1 mM foram adicionadas (50 μl /poço). A placa foi incubada por 1 h a 25°C, lavada, e então incubada por 1 h com 50 μl /poço de anticorpo anti-IgG+A+M de camundongo em cabra conjugado ao peróxido (Cappel). O anticorpo ligado foi detectado usando a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). A ligação foi indicada pela absorvência medida a 450 nm.

b. Ensaio de captura de células

Uma placa de microtítulo com 96 poços foi revestida com 50 μl /poço de anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo em asno (Jackson Immunoresearch); 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ diluídos em bicarbonato de sódio a 50 mM, pH 9,2) a 4°C, durante a noite. As placas foram lavadas duas vezes com 100 μl /poço de tampão de ensaio (RPMI + 2% de BSA) e então bloqueadas com 100 μl /poço do tampão de ensaio a 37°C por 1 h. Para as células FDC-P1 e as células FDC-P1 transfectadas com β_6 , as placas foram bloqueadas com anti-Ig de camundongo (Jackson ImmunoResearch; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 10 min na temperatura ambiente, para diminuir a ligação não-específica ao receptor de Fc pelo anticorpo secundário (omitido para os outros tipos de células). Enquanto as placas estavam sendo bloqueadas, as células eram marcadas com corante fluorescente a 2 μM (Calceína-AM, Molecular Probes) no tampão de ensaio a 5×10^6 células/ml. As células foram incubadas com o corante no tampão de ensaio, com agitação suave, em um banho de água a 37°C por 15 min, coletadas por centrifugação, e suspensas novamente em

tampão de ensaio até 5×10^6 células/ml. Seguindo a etapa de bloqueio, o tampão foi descartado sacudindo a placa, e 25 μ l/poço de sobrenadante ou anticorpo purificado foram adicionados à placa. Seguindo uma incubação por 15 min a 37°C, 25 μ l/poço de células marcadas foram adicionados, e a placa foi incubada por 1 h a 37°C. A placa foi lavada 3-5 vezes com o tampão de ensaio (100 μ l/poço) e a fluorescência emitida pelas células capturadas sobre a placa foi registrada. A porcentagem de ligação foi determinada comparando a fluorescência antes da etapa de lavagem final (i.e., células totais adicionadas) com aquela após a lavagem (i.e., células ligadas).

10 c. FACS

As células foram coletadas por tripsinização, lavadas uma vez em PBS, e então suspensas novamente em tampão de FACS (1X PBS, 2% de FBS, 0,1% de NaN_3 , CaCl_2 a 1 mM, e MgCl_2 a 1 mM). $0,2 \times 10^5$ células foram então incubadas sobre gelo por 1 h em tampão de FACS contendo sobrenadante de hibridoma em um volume total de 100 μ l. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com tampão de FACS gelado, suspensas novamente em 100 μ l de tampão de FACS contendo 5 μ g/ml de anti-Ig de camundongo em asno PE (Jackson ImmunoResearch), e incubadas sobre gelo por 30 min. As células foram então lavadas duas vezes com tampão de FACS gelado e suspensas novamente em 200 μ l de tampão de FACS. A ligação do anticorpo secundário marcado com PE foi monitorada por citometria de fluxo.

20 d. Ligação de biotina-hs $\alpha_v\beta_6$ ao LAP

As placas de microtítulo com 96 poços (COSTAR EASY-WASH da Corning) foram revestidas com 0,3 μ g/ml de LAP humano recombinante (R&D Systems, Cat. nº 246-LP) diluído em PBS (50 μ l/poço) a 4°C durante a noite. Após a solução de revestimento ser removida, as placas foram bloqueadas com 180 μ l/poço de 3% de BSA/TBS a 25°C por 1 h. Em uma placa de fundo redondo com 96 poços separada, foram combinados 60 μ l/poço de um estoque de 2X (0,5 μ g/ml (1,25 nM) de biotina- $\alpha_v\beta_6$, CaCl_2 a 2 mM, e MgCl_2 a 2 mM em TBS contendo 1 mg/ml de BSA) com 60 μ l/poço de um estoque de 2X de um sobrenadante de hibridoma (para o exame) ou de um

anticorpo purificado (também em TBS contendo 1 mg/ml de BSA) e incubados a 25°C por 1 h. Após a lavagem da placa revestida com LAP com tampão de lavagem (0,1% de TWEEN-20 em PBS) 4 vezes em um lavador de placas automatizado, 100 µl do mistura de anticorpo- $\alpha_v\beta_6$ foram transferidos para a placa, e incubados por 1 h a 25°C. A placa foi lavada como acima descrito e incubada com 50 µl/poço de uma diluição a 1:1000 de conjugado de extravidina-peroxidase da raiz forte (Sigma) em TBS (1 mg/ml de BSA) por 1 h a 25°C. A proteína ligada foi detectada usando o substrato de TMB.

e. Adesão das células β_6 -FDC-P1 ao LAP

10 Uma placa de microtítulo com 96 poços foi revestida com 50 µl/poço de 0,5 µg/ml de LAP humano recombinante (R&D Systems) diluído em bicarbonato de sódio a 50 mM, pH 9,2 a 4°C durante a noite. A placa foi lavada duas vezes com PBS (100 µl/poço) e bloqueada com 1% de BSA em PBS (100 µl/poço) por 1 h a 25°C. A placa foi lavada duas vezes com 100
15 µl/poço de tampão de ensaio (TBS completo mais CaCl_2 a 1 mM e MgCl_2 a 1 mM). A seguir, foram adicionados 25 µl de um sobrenadante de hibridoma (ou um anticorpo purificado) e 25 µl de células β_6 -FDC-P1 (5×10^6 células/ml, marcadas com Calceína AM, como descrito acima) aos poços individuais da placa. A placa foi incubada a 25°C por 1 h, e então lavada 4-6
20 vezes com o tampão de ensaio (100 µl/poço). A fluorescência emitida das células capturadas sobre a placa foi registrada. A porcentagem de ligação foi determinada comparando o sinal de fluorescência antes da etapa final de lavagem (i.e., as células totais adicionadas) àquele após a lavagem (i.e., as células ligadas).

25 f. Bioensaio para o TGF- β

O bioensaio para o TGF- β usado aqui foi uma variação do ensaio de co-cultura de luciferase, PAI-1, células epiteliais do pulmão do visão (MLEC), descrito em Abe e col., *Anal. Biochem.* 216:276-284 (1994), em que as células transfectadas com β_6 foram co-cultivadas com as células relatoras para monitorar a ativação do TGF- β pela $\alpha_v\beta_6$ (Munger, *supra*). Ele é um bioensaio quantitativo para o TGF- β baseado em sua capacidade de induzir a expressão do inibidor de ativador de plasminogênio 1 (PAI-1). Neste ensaio,

as células MLEC) são estavelmente transfectadas com uma construção de expressão contendo um promotor de PAI-1 truncado fundido ao gene relator da luciferase do vaga-lume. A exposição das células MLEC transfectadas ao TGF- β ativo (0,2 a > 30 pM) resulta em um aumento dependente da dose na atividade da luciferase nos lisados celulares.

Para conduzir este ensaio, as células TMLC (linhagem de células epiteliais do pulmão do visão Mv 1 Lu) foram transfectadas com a construção de PAI-1-luciferase. As células transfectadas foram desenvolvidas em DMEM + 10% de FBS com L-Gln, Pen/Estrep e 200 μ g/ml de G418. As células SW480 transfectadas com uma construção de integrina β_6 (células " β_6 -SW480" ou "SW480 β_6 ") foram desenvolvidas em DMEM + 10% de FBS com L-Gln e Pen/Estrep. As células foram retiradas dos frascos com PBS + EDTA a 5 mM, lavadas em PBS + 0,5% de BSA, contadas por hemocítmetro e preparadas em placas com 96 poços. As células SW480- β_6 foram preparadas em placas a 4×10^4 células/poço no tampão de lavagem. Os anticorpos monoclonais foram diluídos em DMEM (sem soro), adicionados às células SW480- β_6 e pré-incubados por 20 min na temperatura ambiente. As células TMLC foram então adicionadas a 2×10^4 células/poço até um volume final de 100 μ l. As placas foram incubadas por 20 h em uma incubadora enriquecida com CO₂, umidificada. O sobrenadante das placas foi descartado e substituído por 100 μ l de PBS + Ca²⁺ a 1 mM e Mg²⁺ a 1 mM. As células nas placas foram então lisadas, e o nível de atividade da luciferase foi detectado com o kit LUCLITE da Packard de reação do tipo brilho (nº 6016911) e o luminômetro de microplacas TROPIX.

25 Exemplo 6: Purificação do anticorpo

Oito clones de hibridomas da Fusão nº 6 (indicados pelo prefixo "6.") e quatorze clones de hibridomas da Fusão nº 7 (indicados pelo prefixo "7.") foram selecionados para escalonamento de processo e caracterização adicionais (Tabela 2).

30 Uma cultura em pequena escala (150 ml) de cada hibridoma foi preparada, e o sobrenadante foi coletado por centrifugação. Os anticorpos foram purificados a partir destes sobrenadantes usando a cromatografia por

afinidade sobre Proteína A. Para os anticorpos dos isótipos de IgG_{2a}, o sobrenadante foi diretamente carregado para a Protein A Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, AB, Uppsala, Suécia) (1 ml de volume de leito decantado). A coluna foi lavada com PBS, e a fração de IgG foi eluída usando o ácido fosfórico a 25 mM, o NaCl a 100 mM, pH 2,8 em volume de 1:20 de Na₃PO₄ a 0,5 M, pH 8,6. Para os anticorpos de IgG₁ de murino, o sobrenadante foi ajustado para 1,5 M de glicina, 3 M de NaCl, pH 8,9 antes da carga, e a coluna foi lavada com Na₃PO₄ a 25 mM, NaCl a 3 M, pH 8,6 antes da eluição. Estas preparações foram usadas para a caracterização bioquímica *in vitro* descrita aqui.

Tabela 2 - Caracterização dos Clones de Hibridomas

Nome do Clone	Nº do Clone	Isótipo	Bloqueador*
6.1A8	2	IgG2a	S
6.2B10	10	IgG2a	S
6.3G9	25	IgG1	S
6.4B4	30	IgG1	N
6.6B5	46	IgG1	N
6.8B4	55	IgG1	N
6.8G6	56	IgG1	S
6.2B1	85	IgG1	S
7.1C5	2	IgG2a	S
7.1G10	5	IgG2a	S
7.2A1	6	IgG2a	S
7.2F5	11	IgG2a	S
7.2H2	12	IgG2a	S
7.4A3	17	IgG2a	S
7.7G5	32	IgG1	S
7.8H12	39	IgG2a	S
7.9D4	40	IgG2a	N
7.9G8	41	IgG2a	S
7.9H5	43	IgG2a	S
7.10D7	44	IgG2a	S
7.10H2	46	IgG2a	S

*: Um bloqueador é definido como um anticorpo que bloqueia a ligação da

$\alpha_v\beta_6$ ao LAP, conforme determinado por bloqueio da ligação do ligante à $hs\alpha_v\beta_6$ purificada ou às células que expressam β_6 .

Para uso em modelos de animais, os clones dos hibridomas foram escalonados até 2 L de meio e desenvolvidos por 4 semanas em Sacos de Cultura Lifecell PL732 (Nexell, Nº do Cat. R4R2113). Os anticorpos dos hibridomas foram purificados primeiramente através de cromatografia por afinidade sobre Proteína A, como descrito acima, seguida por uma etapa de troca de íons em Q Sepharose (Amersham Pharmacia). O eluato da etapa cromatográfica em Proteína A foi ajustado para pH 8,6 usando a base de Tris a 2 M, diluído 10 vezes com água, e carregado para uma coluna Q Sepharose (20 mg de proteína/ml de resina) que tinha sido equilibrada em Na_3PO_4 a 10 mM, NaCl a 25 mM, pH 8,6. A coluna foi lavada com 5 volumes de coluna de tampão de equilíbrio, e a proteína ligada foi eluída usando Na_3PO_4 a 25 mM, NaCl a 150 mM, pH 7,2. As proteínas eluídas foram filtradas estéreis (0,45 μ m) e armazenadas a $-70^\circ C$ até o uso.

Exemplo 7: Caracterização dos anticorpos purificados

Os anticorpos purificados (Tabela 2, *supra*) foram caracterizados quantitativamente com relação à sua capacidade de (1) ligar a $hs\alpha_v\beta_6$, (2) ligar as células SW480 e FDC-P1 transfectadas com β_6 , (3) inibir a ligação de biotina- $\alpha_v\beta_6$ ao LAP, (4) inibir a ligação das células FDC-P1 transfectadas com β_6 ao LAP, e (5) bloquear a ativação do TGF- β mediada por $\alpha_v\beta_6$ no ensaio de MLEC (*supra*). A potência relativa em cada um destes ensaios foi comparada àquela do anticorpo para $\alpha_v\beta_6$ conhecido 10D5 (Huang e col., *J. Cell Sci.* 111:2189 (1998)) e, em alguns casos, do anticorpo anti- α_v L230. Para a caracterização dos anticorpos de Fusão nº 7, o anticorpo de Fusão nº 6 6.8G6 foi também usado como um controle positivo.

Uma experiência de ligação inicial (Exemplo 5a, *supra*), realizada na presença de Ca^{2+} a 1 mM e Mg^{2+} a 1 mM, indicou que a maior parte dos anticorpos purificados ligou-se à $hs\alpha_v\beta_6$ (Figs. 2A e 2B). Inesperadamente, entretanto, nenhuma ligação foi observada para o 10D5 e os clones 7.2F5 e 7.10D7. Uma experiência subsequente estabeleceu que a ligação de 10D5 (Fig. 3E), 7.2F5, e 7.10D7 era suportada somente fracamente por

$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, porém muito mais fortemente por MnCl_2 a 1 mM. Entre os novos clones, três (6.1A8 (Fig. 3A), 7.7G5, e 6.8G6 (Fig. 3C)) mostraram uma exigência por cátions divalentes, embora nenhuma diferença entre o estado de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ e o estado de Mn^{2+} ligado fosse observada.

5 Os clones restantes não mostraram nenhuma exigência por cátions divalentes, i.e., puderam ligar-se ao antígeno na presença de EDTA a 10 mM (Figs. 3B, 3D e 3F). A análise por FACS da ligação do anticorpo às células NIH 3T3 ou SW480 transfectadas com β_6 revelou um padrão similar, com a exceção que o 10D5, neste contexto, ligou-se equivalentemente nos
10 estados de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ e Mn^{2+} . As exigências por ligação à $\alpha_v\beta_6$ solúvel podem diferir daquelas para a ligação à $\alpha_v\beta_6$ expressa na superfície celular, devido a uma diferença na conformação da proteína ou nos efeitos de avidéz.

Estes resultados sugerem que existem pelo menos 3 classes
15 diferentes de anticorpos bloqueadores de β_6 neste grupo. Uma das classes (10D5) faz distinção entre as condições de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ e Mn^{2+} . Uma outra classe (incluindo o 6.1A8, o 7.7G5, e o 6.8G6) requer o cátion, porém não faz distinção entre $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ e Mn^{2+} . A última classe (incluindo o anticorpo anti- α_v L230, o 6.2B10, o 6.3G9 (Fig. 3B), e o 6.2B1 (Fig. 3D), o 7.1C5, e o
20 7.1G10) é independente de cátion.

Os anticorpos purificados foram a seguir avaliados quanto à sua capacidade de inibir a interação entre $\alpha_v\beta_6$ -LAP. No ensaio sem células do Exemplo 5d, *supra*, os anticorpos 6.1A8, 6.2B1, 6.3G9, e 6.8G6 mostraram valores de IC_{50} menores do que aquele do 10D5 (Fig. 4A; Tabela 3). O
25 6.2B10 mostrou uma IC_{50} maior, porém ainda proporcionou uma inibição completa (Fig. 4A). O 6.4B4 mostrou somente inibição parcial, enquanto que o 6.6B5 e o 6.8B4 não mostraram nenhuma inibição (Fig. 4A). Usando o mesmo sistema de ensaio, os anticorpos 7.1C5, 7.1G10, 7.2A1, 7.4A3, 7.7G5, 7.9G8, 7.9H5, e 7.10H2 mostraram valores de IC_{50} menores do que
30 aquele do 10D5 (Fig. 4B; Tabela 3). Os anticorpos 7.2F5, 7.2H2 e 7.8H12 mostraram valores de IC_{50} quase idênticos ou maiores e, não obstante, ainda proporcionaram uma inibição completa (Fig. 4B).

No ensaio celular descrito no Exemplo 5e, *supra*, uma tendência similar foi observada, com as exceções de 6.1A8, 6.2B10 e 7.9D4, que eram muito menos potentes sobre as células do que sobre a proteína purificada (Figs. 5A-E; Tabela 3).

5 Coletivamente, estes resultados indicam que nós geramos com êxito anticorpos que especificamente inibem a interação da $\alpha_v\beta_6$ tanto humana quanto de murino com o LAP. Alguns destes anticorpos ligaram-se à $\alpha_v\beta_6$ com alta afinidade (Kd's aparentes $\geq 0,3$ nM, como determinadas por citometria de fluxo), inibiram a ligação das células transfectadas com β_6 ao
 10 LAP com uma IC_{50} de $\geq 0,05$ nM (8 ng/mL), e impediram a ativação do TGF- β mediada pela $\alpha_v\beta_6$ com uma IC_{50} de $\geq 0,58$ nM (87 ng/mL).

Finalmente, os anticorpos purificados foram avaliados quanto à sua capacidade de bloquear a ativação do TGF- β mediada pela $\alpha_v\beta_6$ no ensaio de PAI-1/gene relator de luciferase (Exemplo 5f, *supra*). Mais uma vez,
 15 o 6.3G9, o 6.8G6, o 6.2B1, o 7.1G10, e o 7.7G5 foram capazes de inibir a ativação do TGF- β mediada pela $\alpha_v\beta_6$ com valores de IC_{50} menores do que o 10D5, enquanto que os anticorpos restantes pareceram ser significativamente menos potentes neste ensaio (Figs. 6A e 6B; Tabela 3). Assim, a capacidade de bloquear a interação da $\alpha_v\beta_6$ com o LAP correlaciona-se com a
 20 capacidade de inibir a ativação do TGF- β *in vitro*.

Tabela 3 - Caracterização dos clones de hibridomas

Nome do clone	Nº do clone	ELISA para ligação da $\alpha_v\beta_6$ EC50 (ng/ml)	Bloqueio de $\alpha_v\beta_6$ -LAP IC50 (ng/ml)	Bloqueio de FDCP1-LAP IC50 (ng/ml)	PAI-1 luciferase IC50 (ng/ml)
6.2B1	85	34.7	225	8	87
6.3G9	25	76.7	271	17	375
6.8G6	56	17.5	169	23	312
10D5	-	-	605	50	2070
6.1A8	2	3.7	179	2520	~40,000
6.2B10	10	78.9	1950	>30,000	>40,000
6.4B4	30	25.4	>50,000	>30,000	>40,000
6.6B5	46	17.1	>50,000	>30,000	>40,000
6.8B4	55	94.4	>50,000	>30,000	>40,000
L230	-	27.1	229	n.t.**	n.t.
7.1G10	5	4.2	113	30	250

Continuação

Nome do clone	Nº do clone	ELISA para ligação da $\alpha_v\beta_6$ EC50 (ng/ml)	Bloqueio de $\alpha_v\beta_6$ -LAP IC50 (ng/ml)	Bloqueio de FDCP1-LAP IC50 (ng/ml)	PAI-1 luciferase IC50 (ng/ml)
7.7G5	32	13.0	155	51	700
7.1C5	2	2.5*	80*	83	n.t.
7.2A1	6	5*	300*	101	n.t.
10D5	-	43*	377	n.t.	2,000
7.4A3	17	5.7	204	67	3,500
7.10H2	46	6.6	254	63	3,500
7.2H2	12	9.3	370	106	5,500
7.9H5	43	7.3	230	55	7,000
7.9G8	41	6.2	264	284	>20,000
7.8H12	39	46.0	1140	969	>20,000
7.2F5	11	>5000	529	1490	>20,000
7.9D4	40	1.7	incompleto	>10,000	>20,000
7.10D7	44	>5000	3000*	1120	n.t.

*: Dados obtidos de experiências separadas.

** : Não testado.

***: Todas as experiências resumidas na Tabela 3 foram conduzidas na presença de Ca^{2+} a 1 mM e Mg^{2+} a 1 mM.

****: Os anticorpos em negrito são os anticorpos da técnica anterior 10D5 e L230, e os novos anticorpos de potência inibitória alta particular para a $\alpha_v\beta_6$.

A seguir, as afinidades em solução do 6.3G9 e do 6.8G6 pela $\alpha_v\beta_6$ solúvel foram determinadas usando um ensaio de exclusão cinética (KinExA). Uma série de diluições da integrina solúvel (1×10^{-8} M até $2,4 \times 10^{-12}$ M) foi incubada com 1×10^{-10} M do anticorpo por 3 h. Estas amostras foram então passadas através de glóbulos de polimetacrilato de metila revestidos com a integrina usando um instrumento de KinExA (Sapidyne Instruments, Inc., Boise, Idaho). No caso do 6.8G6, o CaCl_2 a 1 mM e o MgCl_2 a 1 mM foram incluídos nos tampões de incubação e de ensaio. As quantidades de anticorpo ligado e livre foram determinadas usando um anticorpo secundário anti-camundongo marcado com Cy5. A adaptação da curva quadrática foi efetuada usando o software KinExA para obter uma constante de dissociação (K_d) para cada interação. As K_d 's determinadas usando este método foram 15,6 pM para o 6.3G9 e 22,8 pM para o 6.8G6 (Figs. 9A e 9B).

Assim, ambos estes anticorpos tinham afinidades muito altas pela $\alpha_v\beta_6$.

Nós adicionalmente identificamos classes de anticorpos anti- $\alpha_v\beta_6$ que reconheciam os estados "ativados" da integrina. Existem dois estados de ativação potenciais da $\alpha_v\beta_6$. No primeiro estado, a integrina ativada é definida como tendo uma atividade maior pelo seu ligante. Os anticorpos específicos para este estado ativado mostraram ligação aumentada à integrina na presença de cátions ativadores, tais como o $MnCl_2$ a 1 mM. Uma comparação do grau de ligação em $MnCl_2$ a 1 mM e $MgCl_2$ a 1 mM (cátion não-ativador) por citometria de fluxo indicou que alguns dos anticorpos para $\alpha_v\beta_6$ descritos aqui, incluindo o 6.1A8 e o 6.6B5, mostraram ligação significativamente aumentada na presença de $MnCl_2$.

Em um segundo estado ativado da $\alpha_v\beta_6$, a integrina pode ativar o TGF- β latente, conforme descrito acima. Foi preparada uma linhagem celular expressando a $\alpha_v\beta_6$ truncada (SW480(β_6 -770T)). A linhagem celular era capaz de ligar o LAP, porém não pôde ativar o TGF- β no ensaio de TMLC luciferase (Munger e col., *supra*). Os anticorpos que se ligam às células SW480 transfectadas com β_6 de tamanho natural, porém não às células transfectadas truncadas 770T, eram assim específicos para a forma de $\alpha_v\beta_6$ que é capaz de ativar o TGF- β . Os anticorpos 7.8B3 e 7.8C9 atenderam este critério.

Exemplo 8: Mapeamento do epítopo por competição do anticorpo

Os anticorpos monoclonais purificados foram também testados quanto à sua capacidade de competir com o 6.8G6 pela ligação à $\alpha_v\beta_6$ biotinizada em um formato de ELISA. Neste ensaio, o 6.8G6 foi revestido sobre uma placa de ELISA, e uma mistura do anticorpo que compete e a $\alpha_v\beta_6$ biotinizada foi adicionada em um tampão contendo 1 mM cada de Ca^{2+} e Mg^{2+} . A integrina ligada foi detectada usando o conjugado de extravidina-HRP, e os anticorpos que competem foram classificados quanto à sua capacidade de bloquear a ligação. Todos os bloqueadores de consenso (Tabela 2), exceto o 6.2B10 (um bloqueador fraco), foram mostrados serem capazes de competir com o 6.8G6 até vários graus (Tabela 4). Estes dados confirmam que estes bloqueadores de consenso se ligam ao mesmo epítopo ou a um

epitopo de sobreposição que o 6.8G6.

Tabela 4 - Mapeamento do Epítipo por Competição do Anticorpo

Clone	Bloqueador de Consenso?	Competição com o 6.8G6
6.2A1	N	-
6.4B4	N	-
6.6B5	N	-
6.8B4	N	-
7.9D4	S/N	-
10D5	S	++
L230	S	++
6.1A8	S	++
6.2B10	S (fraco)	-
6.3G9	S	+
6.8G6	S	++
6.2B1	S	++
7.1C5	S	+++
7.1G10	S	+++
7.2A1	S	++
7.2F5	S	++
7.2H2	S	++
7.4A3	S	++
7.7G5	S	++
7.8H12	S	++
7.9G8	S	++
7.9H5	S	++
7.10D7	S	+
7.10H2	S	++

Os anticorpos monoclonais purificados foram testados quanto à sua capacidade de competir com o 6.3G9 biotinilado ou o 6.8G6 biotinilado pela ligação à $\alpha_v\beta_6$ em ELISA. Neste ensaio, a $\alpha_v\beta_6$ não-marcada foi revestida sobre uma placa de ELISA, e uma mistura do anticorpo que compete e o anticorpo biotinilado foi adicionada em um tampão contendo 1 mM cada de Ca^{2+} e Mg^{2+} . O anticorpo ligado biotinilado foi detectado usando o conjugado de neutravidina-HRP. Os dados mostraram que os anticorpos bloqueadores

mais potentes (p.ex., o 6.2B1, o 7.1C5, e o 7.1G10) competiram tanto com o 6.3G9 quanto com o 6.8G6 pela ligação à $\alpha_v\beta_6$ (Tabela 4.1, e Figs. 10A e 10B). Os anticorpos 6.1A8 e 7.7G5 mostraram menos competição, provavelmente devido a sua menor afinidade pela $\alpha_v\beta_6$. Nenhum dos anticorpos não-bloqueadores ou o anticorpo anti- α_v L230 mostrou qualquer competição com o 6.3G9 ou o 6.8G6 neste ensaio. Estes resultados indicam que os anticorpos bloqueadores específicos para a $\alpha_v\beta_6$ se ligam aos mesmos epítomos ou a epítomos de sobreposição sobre a $\alpha_v\beta_6$.

Tabela 4.1 - Mapeamento do Epítopo por Competição do Anticorpo

Clone	Bloqueador de Con-senso?	Competição com o 6.8G6 biotinilado	Competição com o 6.3G9 biotinilado
6.3G9	S	+++	+++
6.2B1	S	+++	+++
6.8G6	S	+++	++
7.1C5	S	+++	+++
7.1G10	S	+++	+++
7.7G5	S	++	+
6.1A8	S	++	+
6.2A1	N	-	-
6.2E5	N	-	-
6.2G2	N	-	-
6.4B4	N	-	-
7.8B3	N	-	-
7.8C9	N	-	-
L230	S	-	-

10 Exemplo 9: Seqüências das CDRs

Os cDNAs para alguns dos anticorpos monoclonais purificados foram isolados e seqüenciados usando técnicas padrões, como descritas em Coligan e col. (eds.), *Current Protocols in Immunology*, Wiley, Media, PA (2001). As seqüências de aminoácidos deduzidas são mostradas nas Figs.

15 7A e 7B.

As seqüências de aminoácidos das CDRs das cadeias pesadas dos ligantes de alta afinidade 6.8G6, 6.1A8, 6.2B1, 6.3G9 e 6.2A1 e do

6.2G2 não-bloqueador são comparadas como se segue (os traços indicam lacunas).

CDR1

	6.8G6	SYTFTDYAMH (SEQ ID NO:1)
5	6.1A8	SYTFTDYTMH (SEQ ID NO:2)
	6.2B1	GFTFSRYVMS (SEQ ID NO:3)
	6.3G9	GFTFSRYVMS (SEQ ID NO:3)
	6.2A1	GYDFNNDLIE (SEQ ID NO:49)
	6.2G2	GYAFTNYLIE (SEQ ID NO:50)
10		<u>CDR2</u>
	6.8G6	VISTYYGNTNYNQKFKG (SEQ ID NO:4)
	6.1A8	VIDTYYGKTNYNQKFEG (SEQ ID NO:46)
	6.2B1	SISSG-GSTYYPDSVKG (SEQ ID NO:5)
	6.3G9	SISSG-GRMYYPDTVKG (SEQ ID NO:6)
15	6.2A1	VINPGSGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:51)
	6.2G2	VISPGSGIINYNEKFKG (SEQ ID NO:52)

CDR3

	6.8G6	GGLRRGDRPSLRyamdy (SEQ ID NO:7)
	6.1A8	GGFRRGDRPSLRyamds (SEQ ID NO:47)
20	6.2B1	GAIYDG----YYVFAY (SEQ ID NO:8)
	6.3G9	GSiYDG----YYVFPY (SEQ ID NO:9)
	6.2A1	IYYGPH----SYAMDY (SEQ ID NO:53)
	6.2G2	ID-YSG----PYAVDD (SEQ ID NO:54)

Na SEQ ID NO:7, o "R" em negrito (o décimo segundo resíduo) indica que ele está sujeito ao polimorfismo e pode ser, por exemplo, um Q.

As seqüências de aminoácidos das CDRs das cadeias leves destes quatro ligantes de alta afinidade e do 6.2G2 não-bloqueador são comparadas como se segue.

CDR1

30	6.8G6	RASQSVSTSS-YSYMY (SEQ ID NO:10)
	6.1A8	RASQSVSIST-YSYIH (SEQ ID NO:48)
	6.2B1	SASSSVSSS----YLY (SEQ ID NO:11)

	6.3G9	SANSSVSSS----YLY (SEQ ID NO:12)
	6.2A1	KASLDVRTAVA (SEQ ID NO:55)
	6.2G2	KASQAVNTAVA (SEQ ID NO:56)
		<u>CDR2</u>
5	6.8G6	YASNLES (SEQ ID NO:13)
	6.1A8	YASNLES (SEQ ID NO:13)
	6.2B1	STSNLAS (SEQ ID NO:14)
	6.3G9	STSNLAS (SEQ ID NO:14)
	6.2A1	SASYRYT (SEQ ID NO:57)
10	6.2G2	SASYQYT (SEQ ID NO:58)
		<u>CDR3</u>
	6.8G6	QHNWEIPFT (SEQ ID NO:15)
	6.1A8	QHSWEIPYT (SEQ ID NO:16)
	6.2B1	HQWSSYPPT (SEQ ID NO:17)
15	6.3G9	HQWSTYPPT (SEQ ID NO:18)
	6.2A1	QQHYGIPWT (SEQ ID NO:59)
	6.2G2	QHHYGVPWT (SEQ ID NO:60)

Conforme mostrado nas Figs. 7A e 7B, os mAbs que incidem na classe de dependentes de cátions divalentes (p.ex., o 6.1A8 e o 6.8G6) parecem conter seqüências de aminoácidos muito similares dentro das CDRs, enquanto que os mAbs independentes de cátions divalentes (p.ex., o 6.2B1 e o 6.3G9) contêm um outro grupo de motivos em suas CDRs.

A potência e a especificidade dos anticorpos monoclonais anti- $\alpha_v\beta_6$ podem ser governadas por resíduos de aminoácidos sutilmente diferentes. No caso do 6.1A8 e do 6.8G6, as seqüências de aminoácidos dos domínios variáveis são muito similares, contendo 10 diferenças de aminoácidos na cadeia pesada, três das quais são conservativas, e 11 diferenças de aminoácidos na cadeia leve. Entretanto, estes anticorpos têm uma diferença de aproximadamente 100 vezes na atividade em ensaios *in vitro*. As diferenças de aminoácidos estão dispersas por todos os domínios variáveis das cadeias polipeptídicas e estes resíduos podem funcionar sozinhos ou de modo sinérgico com os resíduos sobre a mesma cadeia ou a cadeia do par

para afetar a potência dos anticorpos. Na cadeia pesada, sete resíduos estão localizados de modo tal que eles são prováveis de estarem em proximidade precisa à, ou desempenham uma função ativa na ligação à, $\alpha_v\beta_6$.

Um motivo de RGD é encontrado em diversas proteínas que se ligam à integrina (ligantes). Este motivo tem sido mostrado mediar a sua interação com as integrinas contatando diretamente a cavidade de ligação sobre a integrina. Porque o RGD ele próprio é razoavelmente comum entre as proteínas que se ligam à integrina, os resíduos de flanco fora do motivo devem desempenhar uma função em conferir especificidade de ligação à interação integrina-ligante. No 6.1A8 e no 6.8G6, um tal resíduo de flanco está na posição 101 na cadeia pesada, dentro da CDR3. Este resíduo de aminoácido flanqueia o motivo de RGD e pode estar localizado no sítio de reconhecimento de antígeno, contribuindo para a potência e a especificidade de ligação.

Os outros resíduos diferentes dentro das mesmas CDRs da cadeia pesada de 6.1A8 e 6.8G6 incluem aqueles nas posições 33 (CDR1); posições 52, 57, e 65 (CDR2); e posição 115 (CDR3). Uma outra diferença na cadeia pesada situa-se na posição 4 na estrutura 1, que é próxima à extremidade de N. Este resíduo é predito por modelos cristalográficos duplicar-se próximo às CDRs do anticorpo e pode desempenhar uma função importante na ligação da $\alpha_v\beta_6$. As três diferenças restantes entre o 6.1A8 e o 6.8G6 são as diferenças conservativas nas posições 20 (estrutura 1), 44 (estrutura 2) e 82 (estrutura 3).

As seqüências de aminoácidos dos anticorpos independentes de cátions são também altamente homólogas. Elas podem ser divididas em duas classes: aquelas que competem com o anticorpo contendo RGD 6.8G6 (i.e., 6.2B1, 6.3G9, 7.10H2, 7.9H5, 7.1C5, 7.1G10, e 7.4A3); e aquelas que não (i.e., 6.2A1, 6.2B10 e 6.4B4). A classe que compete com o 6.8G6 contém um motivo de FXY na CDR3 da cadeia pesada, enquanto que a classe que não compete não. Esta diferença sugere que o motivo de FXY é importante para mediar a ligação independente de cátions à $\alpha_v\beta_6$. Adicionalmente, esta classe de anticorpos contendo FXY provavelmente se liga a um epítipo

sobre a $\alpha_v\beta_6$ que está sobrepondo-se com a, e no entanto é distinto da, cavidade de ligação ao RGD. Os anticorpos 6.2B10 e 6.4B4 não contêm um motivo de FXY e são bloqueadores insatisfatórios da $\alpha_v\beta_6$. Eles foram mostrados ligarem-se à porção semelhante ao domínio I da $\alpha_v\beta_6$ e definirão, contudo, um outro epítipo ao qual os anticorpos anti- $\alpha_v\beta_6$ se ligam. De modo interessante, o anticorpo monoclonal 6.2A1 pertence à classe independente de cátions, porém não contém a seqüência de RGD, como com os outros mAbs independentes de cátions.

O anticorpo monoclonal 7.7G5 pertence à classe dependente de cátions. Entretanto, a seqüência da cadeia leve do 7.7G5 é altamente homóloga ao anticorpo de ligação ao domínio I, independente de cátions, 6.2B10. A cadeia pesada do 7.7G5 é também similar aos anticorpos independentes de cátions na CDR1. Não obstante, as suas CDR2 e CDR3 são mais similares àqueles da classe dependente de cátions. Esta observação sugere que CDRs específicas conferem especificidade a um anticorpo. Isto é particularmente verdadeiro para a CDR3 da cadeia pesada, presumivelmente devido ao alto grau de variabilidade dentro desta parte do anticorpo. Na realidade, dois de três anticorpos dependentes de cátions e sete de nove independentes de cátions contêm seqüências da CDR da cadeia pesada que são prováveis de desempenhar uma função importante no reconhecimento da $\alpha_v\beta_6$. De atenção, o 7.7G5 não tem um motivo de RGD, porém contém um motivo de XGD em sua CDR2 da cadeia pesada. Este motivo de XGD pode funcionar em um modo similar ao RGD e conferir afinidade/especificidade de ligação ao 7.7G5.

As observações sobre as seqüências acima e as inferências feitas a partir destas proporcionam uma base para o projeto racional de seqüências de aminoácidos de regiões variáveis específicas que conferem propriedades de ligação específicas.

Exemplo 10: Anticorpos Diagnósticos

Os anticorpos que podem detectar a expressão da $\alpha_v\beta_6$ em seções de tecidos incrustadas em parafina ou em outras amostras de tecidos podem ser úteis como diagnósticos. Estas ferramentas diagnósticas podem

ser usadas para, p.ex., detectar a $\alpha_v\beta_6$ supra-regulada em seções de tecidos para tais indicações como o câncer ou a fibrose.

A fim de identificar os anticorpos que detectam a $\alpha_v\beta_6$ em tecidos incrustados em parafina, nós primeiramente examinamos um painel de anti-
 5 corpos quanto à ligação à subunidade β_6 purificada por HPLC. Os anticorpos que ligam esta subunidade são prováveis de reconhecer os epítomos de peptídeos lineares, e eram, portanto, esperados terem uma probabilidade maior de sucesso nos tecidos incrustados em parafina. A ligação à subuni-
 10 dade β_6 purificada foi realizada usando um formato de ELISA idêntico àquele descrito para medir a ligação da $\alpha_v\beta_6$ (*supra*), exceto com a β_6 integrina purificada, em vez da proteína $\alpha_v\beta_6$, imobilizada sobre a placa. Usando este método, foram identificados diversos anticorpos de Fusão 6 capazes de liga-
 rem tanto a proteína $\alpha_v\beta_6$ purificada quanto a subunidade β_6 purificada. Ver a Tabela 5, *infra*, onde está omitido o prefixo "6." nos nomes dos clones.

15 Tabela 5 - Ligação do Anticorpo à $\alpha_v\beta_6$ Purificada ou à Subunidade β_6 Purificada

Nome do clone	Ligação à $\alpha_v\beta_6$	Ligação à subunidade β_6 purificada por HPLC
1A1	+	6
1A8	+	-
1A11	+	+
1E1	+	+
1E6	+	+
1H10	+/-	-
2A1	+	+
2A10	-	-
2B8	-	-
2B10	+	-
2C4	+	+
2C7	+	+
2E5	+	+
2G3	+	-
3A6	+	-
3B1	+	-

Continuação

Nome do clone	Ligação à $\alpha v \beta 6$	Ligação à subunidade $\beta 6$ purificada por HPLC
3B2	+	+
3B11	+	+
3C2	+	+
3D5	+	-
3D10	+	+
3F1	+	-
3G3	-	-
3G5	+	-
3G9	+	-
3H2	+	-
3H11	+	-
4A4	+/-	+
4B2	+	-
4B4	+	-
4B10	+	-
4D2	+	-
4E4	+	+
4G3	+	-
4G4	+	+
4H4	+	+
4H12	+	-
5A2	+	-
5B6	+	+
5D6	+	+
5D8	-	-
5G9	+	+
5G10	+	+
5H3	+	+
6B1	+	+
6B5	+	+
6C4	+	-
6D12	+	+
6E6	+	-

Continuação

Nome do clone	Ligação à $\alpha\upsilon\beta 6$	Ligação à subunidade $\beta 6$ purificada por HPLC
6E10	+	-
6G3	+/-	-
7C7	+	+
7E5	+	-
7F8	+	-
8B4	+	+
8G6	+	-
9B5	+	+
9B7	+	+
9B9	+	-
9B10	+	-
9D11	+	+
9E12	+	+
9F5	+	+
9F7	-	-
9G1	+	-
9H11	+	-
10A2	+	-
10A3	+/-	-
10A4	+	-
10A8	+	-
10A9	+	-
10B10	+	-
10D3	+	-
10D11	+	-
10E4	+	+
10F1	+	-
10F12	+	-
10G1	+	-
10G2	-	-
10H11	+	+
1A7	+	-
1D6	+	-

Continuação

Nome do clone	Ligação à $\alpha\beta 6$	Ligação à subunidade $\beta 6$ purificada por HPLC
1D9	+	-
1F6	+	-
2B1	+	-
2D9	+	+
2G2	+	+
3D9	+	+
3E5	+	-
4C12	+	-
4E6	+	+
4G5	+	-
5A3	+	-
5B3	+	-
5B8	+	+
5B9	+	-
5F7	+	-
6C10	+	+
6D8	+	-
6F4	+	-
6G9	+	-
6H8	+	+
6H9	+	-
7A5	+	+
7A11	+	-
7E6	+	+
7G9	-	+
7H3	+	-
9A2	-	-
9A3	+	+
9A4	-	-
9A9	+	-
9D2	-	-
9D3	-	-
9E4	-	-

Continuação

Nome do clone	Ligação à $\alpha_v\beta_6$	Ligação à subunidade β_6 purificada por HPLC
9F1	+	-
9F12	-	-
9G11	-	-
10B5	+	-
10B7	+	-
10B9	+/-	-
10C5	+/-	-
10C7	+/-	-
10D6	+/-	-
10E12	+/-	-
10F7	-	-

Conforme mostrado acima, alguns anticorpos ligaram-se à subunidade β_6 purificada. Eles terão uma alta probabilidade de ligarem-se à $\alpha_v\beta_6$ desnaturada e, assim, podem ser úteis na detecção da $\alpha_v\beta_6$ em seções de tecidos incrustadas em parafina. Os outros anticorpos ligaram-se à $\alpha_v\beta_6$ solúvel, porém não à subunidade β_6 . Ambos os tipos de anticorpos foram usados para colorir as células SW480 transfectadas com β_6 incrustadas em parafina, desnaturadas, e as células de origem não-transfectadas, e os dados são mostrados na Tabela 6.

Para colorir os tecidos ou as células incrustadas em parafina, as lâminas de amostras foram primeiramente desparafinizadas por incubação nas seguintes soluções: (1) Xileno, 5 min, duas vezes; (2) etanol a 100%, 2 min, duas vezes; (3) etanol a 95%, 2 min, duas vezes; (4) etanol a 50%, 2 min, uma vez; e (5) água destilada, 2 min, uma vez. As lâminas foram então incubadas em uma solução consistindo em 200 ml de metanol e 3 ml de H_2O_2 a 30% por 15 min, para bloquear a peroxidase endógena. As lâminas foram enxaguadas duas vezes em PBS por 2 min cada vez. As seções de parafina sobre as lâminas foram então desmascaradas com pepsina (Zymed 00-3009) por 5 min, a 37°C. As lâminas foram enxaguadas novamente duas vezes em PBS por 2 min cada vez. A seguir, as lâminas foram bloqueadas com avidina e então biotina (Vector SP-2001; Vector Laboratories, Burling-

me, CA), 10 min cada, na temperatura ambiente, com lavagem entre cada incubação, como descrito acima. Após a solução de bloqueio ser drenada das lâminas, o anticorpo primário (sobrenadante da cultura de hibridoma), diluído em PBS/0,1% de BSA, foi aplicado às lâminas e incubado durante a

5 noite, a 4°C.

No dia seguinte, as lâminas foram enxaguadas em PBS, como descrito acima. Neste meio-tempo, a solução de complexo de avidina-biotina-peroxidase da raiz forte (reagente ABC) foi preparada como se segue: 1 ml de PBS foi misturado com 20 µl de solução A (1:50) e 20 µl de so-

10 lução B (1:50) do Kit da Vector PK-6102; e a mistura foi incubada por 30 min na temperatura ambiente, antes do uso. Durante este tempo, as lâminas foram incubadas por 30 min na temperatura ambiente com o anticorpo anti-camundongo biotilado (1:200) do Kit da Vector com 15 µl/ml de soro normal. As lâminas foram então enxaguadas duas vezes em PBS, 2 min cada

15 vez. Então, o reagente ABC acima descrito foi aplicado às lâminas e incubado por 30 min na temperatura ambiente. As lâminas foram enxaguadas novamente, como descrito acima. Então, o substrato (Vector SK-4100), 100 µl de DAB (3,3'-diaminobenzidina), foram aplicados às lâminas e incubados por

20 5 min na temperatura ambiente. A DAB foi preparada como se segue: a 5 ml de H₂O adicionar 2 gotas de Solução de Estoque de Tampão, misturar bem; então adicionar 4 gotas de solução de Estoque de DAB, misturar bem; e então adicionar 2 gotas de Solução de H₂O₂, misturar bem. Então, as lâminas foram enxaguadas em água corrente por 2 min. A seguir, o sinal da DAB foi intensificado para todas as lâminas como se segue: enxaguar as seções

25 de parafina em bicarbonato de sódio a 0,05 M, pH 9,6, por 10 min; secar com mata-borrão o tampão em excesso; aplicar a Solução Intensificadora de DAB 15 segundos; e então rapidamente enxaguar com água por 1 min para interromper a reação. As lâminas foram então coloridas em Hematoxilina de Mayer (um contracorante nuclear) por 1 min. As lâminas foram enxaguadas

30 em água corrente por 1 min, e então mergulhadas em PBS por 1 min de modo que a hematoxilina se tornasse azul. As lâminas foram então enxaguadas novamente em água corrente por 1 min e desidratadas e purificadas

como se segue: mergulhar em (1) etanol a 95% por 1 min, duas vezes; (2) etanol a 100% por 1 min, duas vezes; e (3) Xileno por 2 min, duas vezes. As laminulas foram então aplicadas às lâminas usando permount.

Os resultados sugeriram que os anticorpos de Fusão 6 1A1, 2C4, 3B2, 3B11, 5D6, 5G9, 5H3, 6D12, 7C7, 9B5, 9B7, 9D11, 9F5, 10E4, 10H11, 6H8, 7A5, 7G9, 9A3, 2A1, 2E5, 4E4, 4H4, 8B4, 2G2, e 4E6, todos os quais puderam ligar-se à subunidade β_6 purificada (Tabela 5), de fato coloriram fortemente as células SW480 transfectadas com β_6 incrustadas em parafina, embora não colorindo as células de origem não-transfectadas (Tabela 6).

Tabela 6 - Ligação do Anticorpo às Células SW480 Incrustadas em Parafina

ID nº	Nome do clone	Ligação à SW480/ β_6 +	Ligação à SW480
1	1A1	+++	-
2	1A8	+	+
3	1A11	++	-
4	1E1	+	-
5	1E6	++	+
7	2A1	+++	-
10	2B10	-	-
11	2C4	+++	-
12	2C7	-	-
13	2E5	+++	-
17	3B2	+++	-
18	3B11	++	-
25	3G9	-	-
30	4B4	+	+
33	4E4	+++	-
35	4G4	-	-
36	4H4	+++	-
39	5B6	+	-
40	5D6	+++	-
42	5G9	+++	-
43	5G10	-	-
44	5H3	+++	-
46	6B5	-	-

Continuação

ID nº	Nome do clone	Ligação à SW480/ β_6^+	Ligação à SW480
48	6D12	+++	-
52	7C7	++	-
54	7F8	-	-
55	8B4	+++	-
56	8G6	-	-
57	9B5	++	-
58	9B7	++	-
61	9D11	++	-
62	9E12	+	-
63	9F5	++	-
68	10A3	-	-
75	10E4	+++	-
80	10H11	++	-
85	2B1	+	+
87	2G2	+++	-
91	4E6	+++	-
95	5B8	-	-
98	6C10	+	-
102	6H8	++	-
104	7A5	+++	-
107	7G9	+++	-
110	9A3	+++	-

Exemplo 11: Diagnose de câncer

5 A $\alpha_v\beta_6$ é normalmente expressa em níveis insignificantes a baixos nos tecidos de adultos saudáveis. Entretanto, a expressão da $\alpha_v\beta_6$ é supra-regulada em lesão, fibrose, e câncer (ver, p.ex., Thomas e col., *J. Invest. Dermatology* 117:67-73 (2001); Brunton e col., *Neoplasia* 3: 215-226 (2001); Agrez e col., *Int. J. Cancer* 81:90-97 (1999); Breuss, *J. Cell Science* 108:2241-2251 (1995)). Assim, os anticorpos que se ligam especificamente

10 em técnicas-padrão de imunistoquímica para detectar a expressão da $\alpha_v\beta_6$ para a diagnose de fibrose, câncer e quaisquer outras doenças nas quais a $\alpha_v\beta_6$ esteja supra-regulada.

Conforme descrito acima, certos anticorpos da presente invenção se ligam à β_6 integrina purificada por HPLC e às células transfectadas com β_6 incrustadas em parafina e fixas. Estes anticorpos também foram mostrados ligarem-se a tecidos com câncer escamoso e da mama representativos na imunocoloração. Ver, p.ex., a Fig. 8, onde o anticorpo monoclonal 6.2A1 foi usado para mostrar a coloração relativa dos carcinomas de mama e escamosos incrustados em parafina. Assim, estes novos anticorpos são úteis como ferramentas diagnósticas.

Exemplo 12: Efeitos dos mAbs bloqueadores anti- $\alpha_v\beta_6$ em camundongos

10 Alport

Os camundongos nocaute (Alport) de colágeno 4A3 (COL4A3) foram estabelecidos como um modelo *in vivo* para a fibrose do rim e usados para testar os efeitos terapêuticos dos agentes farmacológicos (*supra*). Nós testamos o mAb 6.8G6 (dependente de cátions) e o 6.3G9 (independente de

15 cátions) nos camundongos Alport para determinar se eles inibiriam a fibrose normalmente observada nos camundongos Alport com sete semanas de idade. Conforme mostrado acima, estes dois anticorpos foram verificados inibirem a ligação da $\alpha_v\beta_6$ ao LAP e inibirem a ativação do TGF- β em um bioensaio. O anticorpo 1E6 foi usado como um controle negativo.

20 Os camundongos Alport com três semanas de idade receberam injeções intraperitoneais 3 vezes por semana com um dos seguintes anticorpos: (1) 6.8G6, 4 mg/kg (7 camundongos); (2) 6.3G9, 4 mg/kg (4 camundongos); e (3) 1E6, 1 mg/kg (6 camundongos). As injeções foram continuadas por 4 semanas. Os camundongos foram então sacrificados, e os seus rins resgatados.

25

As seções dos rins incrustadas em parafina foram preparadas como descrito acima, e então coloridas para detectar a actina do músculo liso, um marcador para mioblastos e deposição de matriz em fibrose de rim. Nós verificamos uma diminuição significativa na coloração da actina do músculo liso em ambas as regiões intersticial e glomerular do rim dos camundongos Alport tratados com o mAb 6.8G6 ou 6.3G9, em comparação com os

30 camundongos tratados com o 1E6.

As Figs. 11A e 11B mostram um gráfico de pontos da coloração da actina do músculo liso nas regiões glomerular e intersticial do rim do Alport. Houve uma coloração significativamente reduzida da actina do músculo liso nos rins dos camundongos Alport tratados com 6.8G6 e 6.3G9, em comparação com os camundongos tratados com o controle negativo 1E6.

Exemplo 13: Eficácia dos mAbs anti- $\alpha_v\beta_6$ na prevenção de nefrosclerose induzida por obstrução ureteral unilateral

Nós usamos um outro modelo de camundongo para a progressão fibrótica rena, para testar a eficácia antifibrótica do 6.8G6 e do 6.3G9. Neste modelo de camundongo, um ureter do animal é ligado, resultando na obstrução ureteral unilateral (UUO). A UUO causa a nefrosclerose progressiva sem a insuficiência renal de curta duração em camundongos, porque o rim não-obstruído pode manter uma função renal relativamente normal. Enquanto o rim obstruído sofre rápida fibrose global, o rim não-obstruído sofre hipertrofia adaptativa.

Este estudo quantificou de forma morfométrica o impacto do tratamento anti- $\alpha_v\beta_6$ sobre a fibrose renal induzida por UUO. Foram usados camundongos machos C57BL sem antígeno viral, com 8-12 semanas de idade, de $25,5 \pm 0,2$ g de peso (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Os camundongos foram deixados adaptarem-se por sete dias antes do início do estudo. Os camundongos tiveram acesso *ad libitum* à comida padrão para camundongos irradiada e à água estéril por todo o período de adaptação e experimental. O peso do corpo foi medido em intervalos como parte do monitoramento da saúde do animal. Os resultados mostraram que os camundongos não-operados com idades igualadas ganharam cerca de 10% de peso do corpo durante o período de estudo de duas semanas. Os camundongos com UUO perderam cerca de 9% do peso do corpo no dia 2, porém gradualmente ganharam novamente o peso do corpo perdido no dia 14. Este padrão de mudança no peso ocorreu independente do tratamento terapêutico.

Para induzir a fibrose renal, o ureter esquerdo foi assepticamente isolado via uma laparotomia à esquerda da linha do meio, sob anes-

tesia de cetamina:xilazina (100:10 mg/kg s.c.). Duas ligaduras de seda 6-0 oclusivas, firmes, foram colocadas sobre o ureter no nível do pólo inferior do rim, e o ureter cortado entre as ligaduras. A parede abdominal foi fechada com sutura Vicryl 4-0 e a pele fechada com náilon 4-0. Os animais foram deixados recuperarem-se sobre um tampão de aquecimento e receberam 0,05 mg/kg s.c. de buprenorfina duas vezes diariamente nos dias 0 e 1. O procedimento foi adaptado de Ma e col., *Kidney Int.* 53 (4):937-944 (1998).

Os camundongos foram então divididos nos seguintes grupos de estudo:

Grupo	Tratamento	Dose (mg/kg, i.p.)	n*
1	6.8G6 (mAb anti- $\alpha_v\beta_6$ dependente de cátions)	4	9
2	6.3G9 (mAb anti- $\alpha_v\beta_6$ independente de cátions)	4	8
3	1E6 (mAb de Controle negativo)	4	10
4	Controle de Veículo de PBS	(100 μ l)	8
5	Controle Não-Tratado, Não-Operado	--	8

10 *Número de animais.

Todos os animais, exceto aqueles no Grupo 5, foram dosados duas vezes semanalmente, começando no dia antes da cirurgia.

Os animais sofreram então eutanásia com dióxido de carbono no dia 10 após a ligação, e foram dissecados. Nos camundongos com UUO, a pelve renal e o ureter estavam marcadamente inchados e enchidos com fluido acima da ligadura de obstrução. O grau de inchaço e a proporção de massa de tecido renal restante variaram entre os grupos de tratamento. O Grupo 2 mostrou aproximadamente metade de inchaço tanto quanto os grupos de controle negativo. Os rins ligados eram de cor clara. Os rins contralaterais eram vermelhos brilhantes e aumentaram em aproximadamente um terço.

A seguir, ambos os rins (esquerdo ligado, direito não-ligado) dos animais foram removidos e divididos ao meio transversalmente através do centro da pelve renal. Uma metade de cada rim foi colocada em formalina tamponada neutra a 10% para a coloração do tecido fixo. A outra metade de

cada rim foi colocada em 15% de sacarose, seguida por 30% de sacarose, para a coloração imunoistoquímica.

As seções dos rins fixadas com formalina foram imunotíngidas para os miofibroblastos (actina do músculo liso), um marcador de fibrose. As
5 imagens foram capturadas usando condições padrões de iluminação e ajustes da exposição de câmera digital, corrigidos para o fundo, e calibrados para padrões de distância. As imagens dos campos contíguos cobrindo a seção inteira do rim esquerdo foram tomadas de cada animal para a quanti-
ficação.

10 A actina do músculo liso foi expressa como uma porcentagem de área total do tecido dentro dos campos medidos. Estes incluíram todo o tecido cortical e medular da seção, exceto a papila renal.

Em conclusão, os camundongos tratados com 6.3G9 e 6.8G6 mostram uma redução significativa na fibrose.

15 Exemplo 14: Eficácia dos mAbs bloqueadores anti- $\alpha_v\beta_6$ contra a fibrose do pulmão induzida por bleomicina em camundongos

A fibrose do pulmão induzida por bleomicina em camundongos foi estabelecida como um modelo *in vivo* para fibrose do pulmão e usada para testar os efeitos terapêuticos de agentes farmacológicos. A inflamação
20 é normalmente evidente 5-15 dias seguindo o tratamento com bleomicina. Nos camundongos da cepa 129, o grau de fibrose pulmonar progressivamente aumenta por até 60 dias após o tratamento com bleomicina. O acúmulo de matriz normalmente torna-se detectável em torno do dia 15. Neste exemplo, o mAb 6.3G9 foi injetado de forma intraperitoneal, em uma con-
25 centração de 4 mg/kg/dose, nos camundongos com fibrose do pulmão induzida por bleomicina, começando no dia 0 ou dia 15, três vezes semanalmente. A fibrose do pulmão foi induzida no dia 0 por administração de uma única dose intratraqueal de bleomicina em uma concentração de 0,03 unidade/kg em 50 μ l de salina estéril. Os animais foram sacrificados no dia 30 e o
30 grau de fibrose do pulmão foi avaliado. O anticorpo 1E6 foi usado como um controle negativo.

Os pulmões foram coletados de cada animal e o teor de hidróxi-

prolina foi medido como um índice de deposição de colágeno no pulmão, como descrito em Munger e col., *supra*. Conforme mostrado na Fig. 15A, o tratamento com o 6.3G9, começando no dia 0, significativamente inibiu o aumento induzido por bleomicina no teor de hidroxiprolina no pulmão. De maneira importante, o tratamento com o 6.3G9 foi no mínimo tão efetivo quando ele começou 15 dias após a administração da bleomicina, um tempo quando a deposição de colágeno já tinha começado.

Nós também examinamos os efeitos do 6.3G9, do 6.8G6 dependente de cátions, e do anticorpo não-bloqueador 6.4B4 na inibição de graus mais substanciais de fibrose do pulmão em um protocolo de fibrose induzida por bleomicina prolongado (durando 60 dias). Para efetuar isto, nós começamos os tratamentos com anticorpos 15 dias após a administração da bleomicina (dia 15). Os pulmões foram então coletados no dia 60 para determinar o teor de hidroxiprolina. Conforme mostrado pela Fig. 15C, o tratamento com o 6.8G6 inibiu significativamente a fibrose induzida por bleomicina (uma redução de mais do que 70% no teor de hidroxiprolina comparada aos animais tratados com bleomicina e salina). O tratamento com o 6.3G9 também mostrou uma tendência à proteção, porém estes resultados não atingiram um significado estatístico (Fig. 15C).

Em conclusão, ambos os mAbs bloqueadores anti- $\alpha_v\beta_6$ dependentes de cátions e independentes de cátions reduziram a fibrose do pulmão em camundongos tratados com a bleomicina. Além disso, esta intervenção foi efetiva, mesmo quando o tratamento com o anticorpo não foi iniciado até após o início da fibrose.

25 Exemplo 15: Supra-regulação da $\alpha_v\beta_6$ em lesões de psoríase humanas

A fim de determinar se a $\alpha_v\beta_6$ está envolvida na psoríase, a expressão da $\alpha_v\beta_6$ foi examinada sobre biópsias de peles com lesões e sem lesões a partir de cinco pacientes com psoríase e quatro indivíduos normais. Usando a imunocoloração com o mAb 6.2A1, nós verificamos um aumento significativo na expressão da $\alpha_v\beta_6$ em lesões psoriáticas, em comparação com a pele sem lesão de pacientes psoriáticos e controles normais. Assim, a supra-regulação da $\alpha_v\beta_6$ em lesões psoriáticas sugere uma implicação tanto

diagnóstica quanto terapêutica para o uso de anticorpos anti- $\alpha_v\beta_6$.

Exemplo 16: Supra-regulação da $\alpha_v\beta_6$ em fígado de camundongo e humano com doença do ducto biliar

Conforme anteriormente discutido, a expressão da $\alpha_v\beta_6$ tem estado implicada na lesão do tecido. Neste estudo, a expressão da $\alpha_v\beta_6$ foi investigada no fígado de camundongo e humano lesado por doença do ducto biliar.

A lesão hepática em camundongos foi induzida por ligação do ducto biliar. Ver, p.ex., George e col., *PNAS* 96:12719-24 (1999); George e col., *Am J Pathol* 156:115-24 (2000). Usando o mAb 6.2G2, nós verificamos que a expressão da $\alpha_v\beta_6$ foi significativamente elevada nos dias 9, 14 e 16 seguindo a ligação do ducto biliar.

Similarmente, as seções de fígado humanas de pacientes com doença do ducto biliar mostraram expressão supra-regulada da $\alpha_v\beta_6$, como determinada por imunistoquímica usando o mAb 6.2G2. A expressão elevada da $\alpha_v\beta_6$ foi observada, por exemplo, em amostras de fígado de um homem de 44 anos de idade com colestasia aguda, um homem de 59 anos de idade após transplante com obstrução aguda do ducto biliar, um homem de 22 anos de idade com atresia biliar, e um homem de 24 anos de idade com obstrução crônica do ducto biliar.

Em resumo, os novos anticorpos anti- $\alpha_v\beta_6$ são ferramentas diagnósticas e terapêuticas úteis para as doenças do fígado.

Exemplo 17: Supra-regulação da $\alpha_v\beta_6$ em diversos cânceres humanos

A integrina $\alpha_v\beta_6$ é normalmente expressa em níveis insignificantes a baixos em tecidos de adultos saudáveis. Uma variedade de tecidos humanos com tumor foi avaliada quanto à expressão da $\alpha_v\beta_6$ usando o anticorpo 6.2A1 e os métodos descritos de uma forma geral aqui. Os resultados mostraram que a expressão da integrina $\alpha_v\beta_6$ foi significativamente supra-regulada em diversos cânceres epiteliais humanos. Notavelmente, a imunohistologia mostrou que a $\alpha_v\beta_6$ foi expressa especial e proeminentemente sobre as bordas das ilhas de tumor em muitos dos cânceres epiteliais. Para um estudo adicional da expressão da $\alpha_v\beta_6$ em células de cânceres

epiteliais, as células Detroit 562 (carcinoma da faringe) e as células SCC-14 (carcinoma de células escamosas da língua), bem como as células SW480 β_6 (*supra*) foram coloridas com o 6.3G9 e o 6.4B4 e analisadas por citometria de fluxo.

5 O lado direito da Fig. 12 mostra a expressão da $\alpha_v\beta_6$ sobre as diferentes linhagens de células de tumor, como indicada pela ligação do 6.3G9 na classificação das células ativadas por fluorescência (FACS). O pico sólido representa a ligação do 6.3G9, enquanto que o pico aberto representa a ligação de segundo plano do mAb secundário sozinho. O gráfico
10 de linha sobre o lado esquerdo da Fig. 12 mostra a inibição da ligação das linhagens de células de tumor ao ligante de LAP por concentrações crescentes de 6.3G9 ou 6.4B4. O 6.4B4 era um inibidor significativamente menos potente da ligação da $\alpha_v\beta_6$ ao LAP, comparado ao 6.3G9 (IC_{50} 10 vezes > para Detroit 562, IC_{50} 30 vezes > para SW480 β_6 , e IC_{50} 100 vezes > para
15 SCC-14). Isto está consistente com os resultados *in vitro* anteriores indicando que o 6.3G9 é um mAb bloqueador potente e o 6.4B4 é um mAb bloqueador fraco. Este dado também está consistente com a atividade inibitória insignificante do 6.4B4 no modelo de xenoenxerto de Detroit (Fig. 14B). A Fig. 13 adicionalmente mostra a inibição relativa da ligação das linhagens de
20 células de tumor ao LAP por diversos mAbs anti- $\alpha_v\beta_6$. Tanto o 6.3G9 quanto o 6.8G6 mostraram atividade de ligação equivalente (consistente com todos os dados anteriores), enquanto que o 6.4B4 era um inibidor significativamente menos potente da ligação da $\alpha_v\beta_6$ ao LAP.

Exemplo 18: Efeitos dos mAbs bloqueadores anti- $\alpha_v\beta_6$ em um modelo de xenoenxerto de tumor humano
25

Os animais imunodeficientes (p.ex., os camundongos nus e os camundongos SCID), transplantados com xenoenxertos de tumores humanos, foram estabelecidos como um sistema de modelo *in vivo* útil para testar os efeitos terapêuticos dos agentes anticâncer (ver, p.ex., van Weerden e col., *Prostate* 43(4):263-71 (2000); Banker e col., *Front Biosci* 7:c44-62 (2002)). Assim, os anticorpos monoclonais bloqueadores anti- $\alpha_v\beta_6$ da presente invenção podem ser testados *in vivo* em um modelo de xenoenxerto
30

quanto à sua capacidade de inibir o crescimento do tumor. Nesta experiência, nós testamos a capacidade de alguns dos novos anticorpos para $\alpha_v\beta_6$ de inibir o crescimento do tumor em camundongos fêmeos nus, atímicos, transplantados com xenoinxerto faríngeo humano canceroso (linhagem de células Detroit 562).

Para efetuar isto, as células Detroit 562 (ATCC) foram passadas *in vitro* em Meio essencial mínimo (Eagle) com L-glutamina a 2 mM e BSS de Earle ajustado para conter 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, aminoácidos não-essenciais a 0,1 mM, e piruvato de sódio a 1,0 mM, e 10% de soro bovino fetal, sem antibióticos. Cerca de 5×10^6 células/0,2 ml de meio (sem soro) foram implantadas de forma subcutânea nos camundongos nus sobre o flanco direito. Três a quatro dias mais tarde, as medições dos tamanhos dos tumores foram iniciadas e continuaram até que os tumores fossem cerca de 5 mm (comprimento) por 5 mm (largura). Os camundongos foram aleatorizados e injetados de modo intraperitoneal com os anticorpos de teste ou as soluções de controle no dia 1, seguidos por três injeções semanais por um período de 33 dias. Os anticorpos de teste e as soluções de controle eram: (1) 6.3G9, 1 mg/kg, 10 camundongos; (2) 6.3G9, 4 mg/kg, 10 camundongos; (3) 6.3G9, 10 mg/kg, 10 camundongos; (4) 6.4B4, 1 mg/kg, 10 camundongos; (5) 6.4B4, 4 mg/kg, 10 camundongos; (6) 6.4B4, 10 mg/kg, 10 camundongos; e (7) controle de veículo (PBS), 0,2 ml/por camundongo, 30 camundongos. Além disso, a cis-platina foi injetada em 10 camundongos, de forma subcutânea, a 2 mg/kg, como um controle quimioterapêutico. As injeções de cis-platina foram efetuadas no dia 1 e então de 2 em 2 dias para um total de seis tratamentos. No final do período de 33 dias, os pesos e os tamanhos dos tumores dos animais foram medidos, a expressão da $\alpha_v\beta_6$ avaliada por imunohistologia, e os níveis de anti- $\alpha_v\beta_6$ no soro medidos.

A coloração imunohistológica mostrou que as células de tumores implantadas fortemente expressaram a $\alpha_v\beta_6$ *in vivo*. Os dados sobre os pesos dos tumores adicionalmente mostraram que o mAb bloqueador 6.3G9 efetivamente inibiu o crescimento do tumor em todas as três concentrações testadas (Fig. 14A). Em contraste, o mAb bloqueador fraco 6.4B4 não inibiu

o crescimento do tumor (Fig. 14B).

Em resumo, os anticorpos bloqueadores inibiram o crescimento do tumor em 40-50% nos camundongos tratados. Em contraste, o anticorpo bloqueador fraco anti- $\alpha_v\beta_6$ não inibiu o crescimento do tumor.

5 Exemplo 19: Internalização do anticorpo para $\alpha_v\beta_6$

Os anticorpos que são internalizados pelas células oferecem uma vantagem para certas indicações clínicas, tais como o câncer, porque os anticorpos podem, então, ser conjugados com as toxinas, os compostos radioativos ou outros agentes anticâncer para objetivar seletivamente e inibir
10 o crescimento das células cancerígenas. A capacidade dos anticorpos anti- $\alpha_v\beta_6$ de serem internalizados foi estudada nas células SW480 β_6 (*supra*) e SCC-14.

As células foram divididas a 1:5 e preparadas sobre lâminas de vidro com 4 câmaras para uma incubação durante a noite a 37°C, 5% de
15 CO₂. No dia seguinte, os mAbs 6.8G6, 6.1A8, 6.3G9, 7.1C5, 6.4B4, 10D5, e 8B3 foram diluídos até uma concentração final de 20 µg/ml. Os mAbs ou o meio sozinho foram adicionados aos poços apropriados. Um curso de tempo de internalização foi corrido de 0 h até 48 h. Os pontos de tempo incluídos foram 0, 5, 10 e 30 min, e 1, 4, 24 e 48 h. Um anticorpo secundário (anti-
20 Alexa 594 de murino) foi adicionado como um controle negativo. A internalização foi interrompida em cada ponto de tempo por remoção do anticorpo e lavagem da camada de células com tampão. O Alexa 488 de Aglutinina de Germe de Trigo foi adicionado por 20 min, a 18°C, para colorir a borda externa das células com fluorescência verde. Após as células serem lavadas, a
25 solução de Cytofix/Cytoperm foi adicionada por 20 min, a 18°C, para fixar e permeabilizar as células. As células foram lavadas novamente e o anti-Alexa 594 de camundongo secundário (fluorescência vermelha) foi adicionado por 20 min, a 18°C, para marcar o anticorpo para $\alpha_v\beta_6$ de murino ligado ou internalizado. As células foram então lavadas e fixadas por adição de 2% de paraformaldeído e examinadas por microscopia confocal. As imagens foram
30 então tomadas com uma objetiva Leitz Plan-Apochromatic 63x (abertura numérica 1.32, imersão "oil") (Leica) com um zoom digital de 2x. Cada qua-

dro representou uma única seção óptica a partir da seção do meio das células observadas quanto à internalização sob todas as condições. Não havia nenhuma coloração observada no núcleo.

5 A internalização foi observada para os mAbs dependentes de cátions (miméticos de ligantes contendo RGD), tais como o 6.8G6 e o 6.1A8. Nenhuma internalização foi observada para os mAbs independentes de cátions, tais como o 6.3G9, o 7.1C5, e o 6.4B4.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo que se liga à $\alpha_v\beta_6$, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende:

5 (a) regiões determinantes de complementaridade (CDRs) 1, 2 e 3 da cadeia pesada, em que a CDR1 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:3, a CDR2 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:6, e a CDR3 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 9; e

10 (b) CDRs 1, 2 e 3 da cadeia leve, em que a CDR1 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:12, a CDR2 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:14, e a CDR3 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 18.

2. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo que se liga à $\alpha_v\beta_6$, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende:

20 (a) CDRs 1, 2 e 3 da cadeia pesada, em que a CDR1 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:1, a CDR2 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:4, e a CDR3 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 7; e

25 (b) CDRs 1, 2 e 3 da cadeia leve, em que a CDR1 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:10, a CDR2 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:13, e a CDR3 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 15.

30 3. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo que se liga à $\alpha_v\beta_6$, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende:

(a) CDRs 1, 2 e 3 da cadeia pesada, em que a CDR1 da cadeia

pesada compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:2, a CDR2 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:46, e a CDR3 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 47; e

5 (b) CDRs 1, 2 e 3 da cadeia leve, em que a CDR1 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:48, a CDR2 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:13, e a CDR3 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 16.

10 4. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que (i) especificamente se liga à $\alpha\nu\beta_6$; (ii) compete com 6.8G6 (número de acesso da ATCC PTA-3645) para ligação à $\alpha\nu\beta_6$; e (iii) contém um motivo de FXY na CDR3 da cadeia pesada, em que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo inibe a ligação de
15 $\alpha\nu\beta_6$ ao peptídeo associado à latência (LAP) com um valor de IC50 menor do que aquele do 10D5.

5. Anticorpo que especificamente se liga à $\alpha\nu\beta_6$, caracterizado pelo fato de que o anticorpo

(i) é uma forma humanizada de um anticorpo produzido por um
20 hibridoma selecionado do grupo consistindo em hibridoma 6.1A8 com número de acesso da ATCC PTA-3647, hibridoma 6.3G9 com número de acesso da ATCC PTA-3649, hibridoma 6.8G6 com número de acesso da ATCC PTA-3645, hibridoma 6.2B1 com número de acesso da ATCC PTA-3646, hibridoma 7.1G10 com número de acesso da ATCC PTA-3898, hibridoma 7.7G5 com
25 número de acesso da ATCC PTA-3899 e hibridoma 7.1C5 com número de acesso da ATCC PTA-3900, e

(ii) contém uma mutação em um resíduo de aminoácido que é um sítio para glicosilação no anticorpo produzido por um hibridoma selecionado do grupo consistindo em hibridoma 6.1A8, hibridoma 6.3G9, hibridoma 6.8G6,
30 hibridoma 6.2B1, hibridoma 7.1G10, hibridoma 7.7G5, e hibridoma 7.1C5, de modo tal que o sítio para glicosilação seja eliminado.

6. Anticorpo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo

fato de que o anticorpo

(i) é uma forma humanizada de um anticorpo produzido pelo hibridoma 6.3G9 com número de acesso da ATCC PTA-3649, e

(ii) contém uma mutação em um resíduo de aminoácido que é um
5 sítio para glicosilação no anticorpo produzido por hibridoma 6.3G9, de modo tal que o sítio para glicosilação seja eliminado.

7. Anticorpos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizados pelo fato de que o anticorpo é conjugado a um agente citotóxico, um composto radioativo ou um agente anti-câncer.

10 8. Anticorpos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizados pelo fato de que o anticorpo é conjugado a polietileno glicol.

9. Anticorpos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizados pelo fato de que o anticorpo é conjugado a uma porção
15 fluorescente.

10. Composição para prevenir ou tratar uma doença mediada pela $\alpha_v\beta_6$ em um ser humano, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1-8, e um veículo farmacologicamente aceitável.

20 11. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a doença é fibrose.

12. Composição de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que a fibrose é fibrose do pulmão.

25 13. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a doença é lesão aguda do pulmão.

14. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a doença é câncer.

30 15. Composição de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que o câncer é câncer oral, da pele, cervical, ovariano, faríngeo, laríngeo, esofágico, do pulmão, da mama, do rim, ou colorretal.

16. Método de detecção *in vitro* de $\alpha_v\beta_6$ em uma amostra de tecido de um ser humano, caracterizado pelo fato de que compreende contatar a

amostra de tecido com o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9.

5 17. Construção de DNA, caracterizada pelo fato de que codifica uma cadeia pesada de um anticorpo anti- $\alpha_v\beta_6$ ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, a cadeia pesada humanizada compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo regiões determinantes de complementaridade (CDRs) 1, 2 e 3 consistindo nas sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID Nos.: 3, 6 e 9, respectivamente.

10 18. Construção de DNA, caracterizada pelo fato de que codifica uma cadeia leve de um anticorpo anti- $\alpha_v\beta_6$ ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, a cadeia leve compreendendo uma região variável de cadeia leve compreendendo regiões determinantes de complementaridade (CDRs) 1, 2 e 3 consistindo nas sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID Nos.: 12, 14 e 18, respectivamente.

1/25

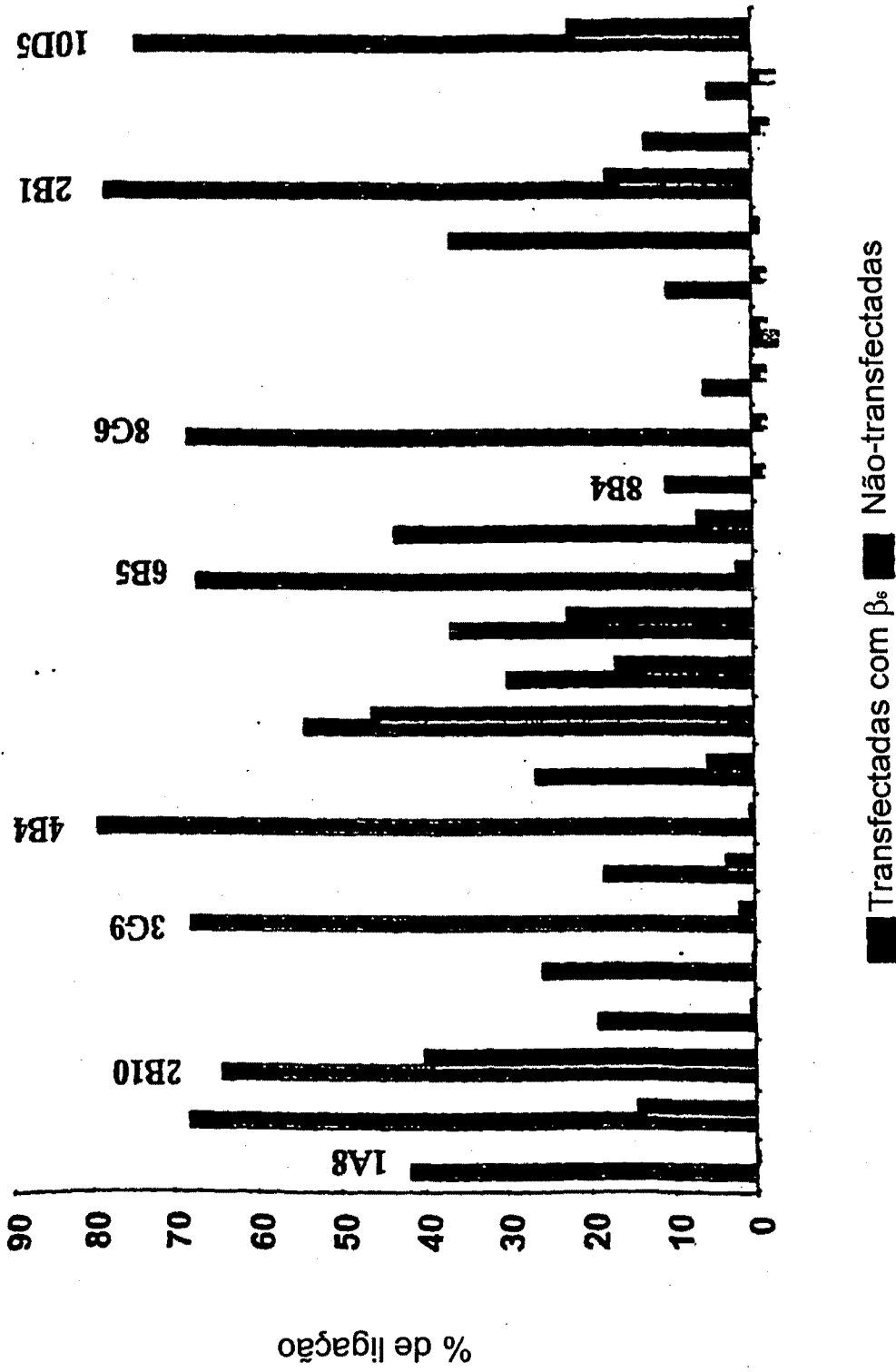


FIG. 1A

Ligação dos mAbs de fusão
as células

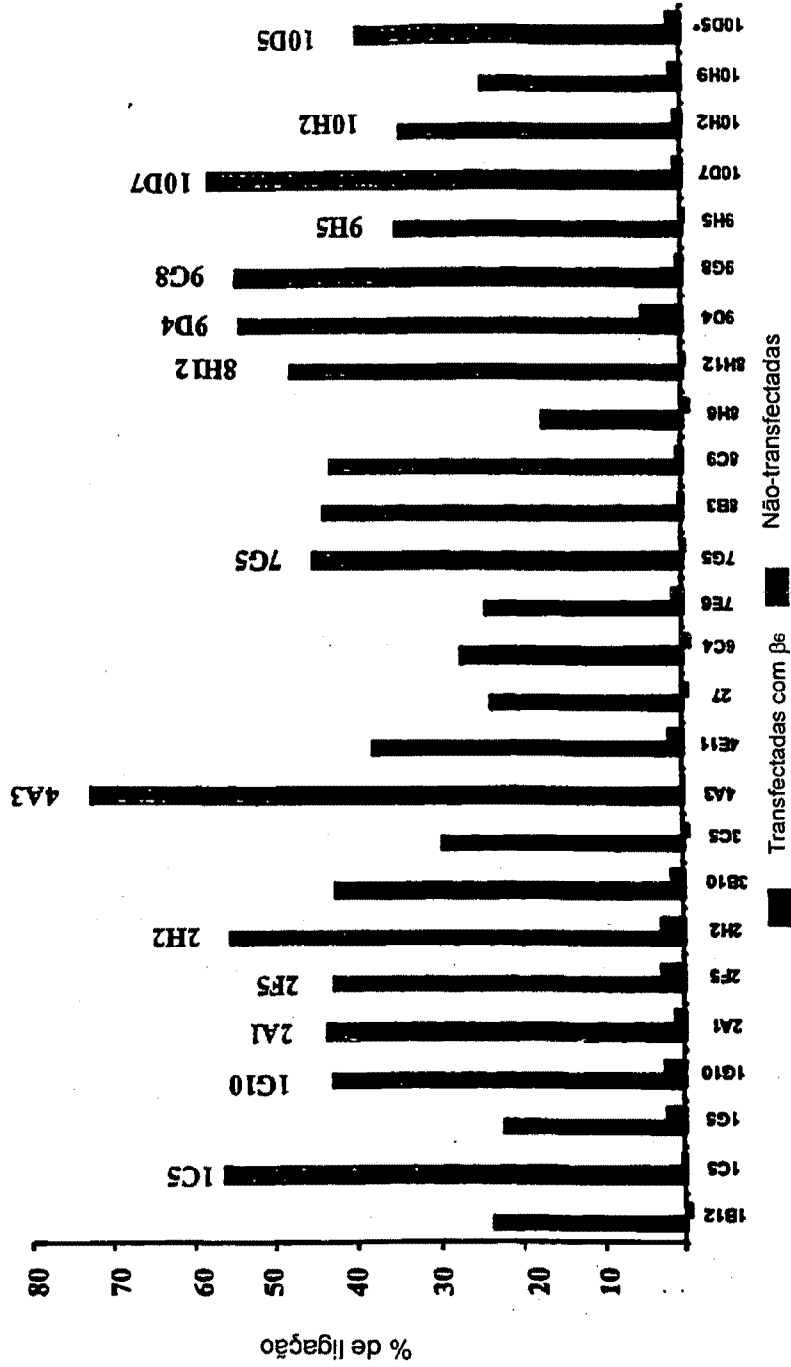
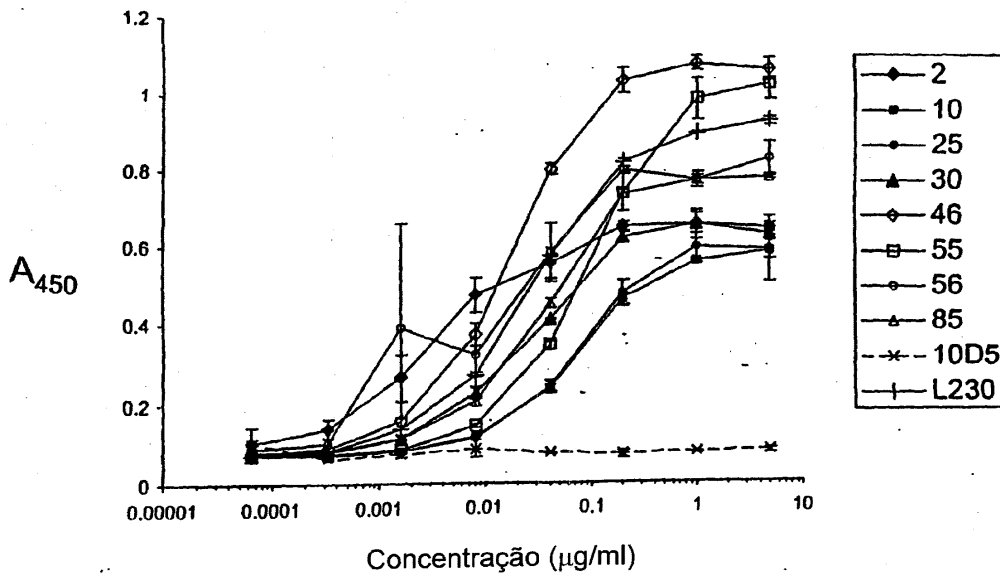


FIG. 1B

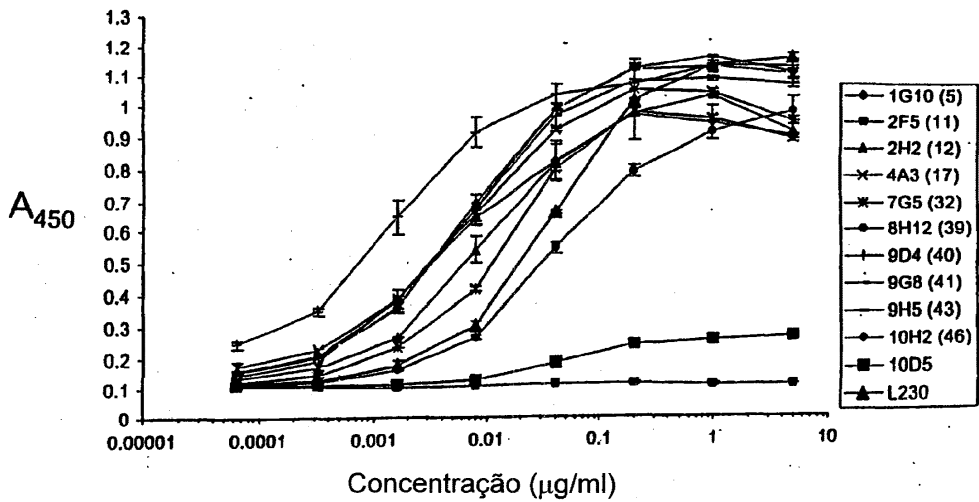
Afinidade de ligação para a $\alpha v \beta 6$ (elisa) - mAbs de fusão n°6



3/25

FIG. 2A

Afinidade de ligação para a $\alpha v \beta 6$ (elisa) - mAbs de fusão n°6

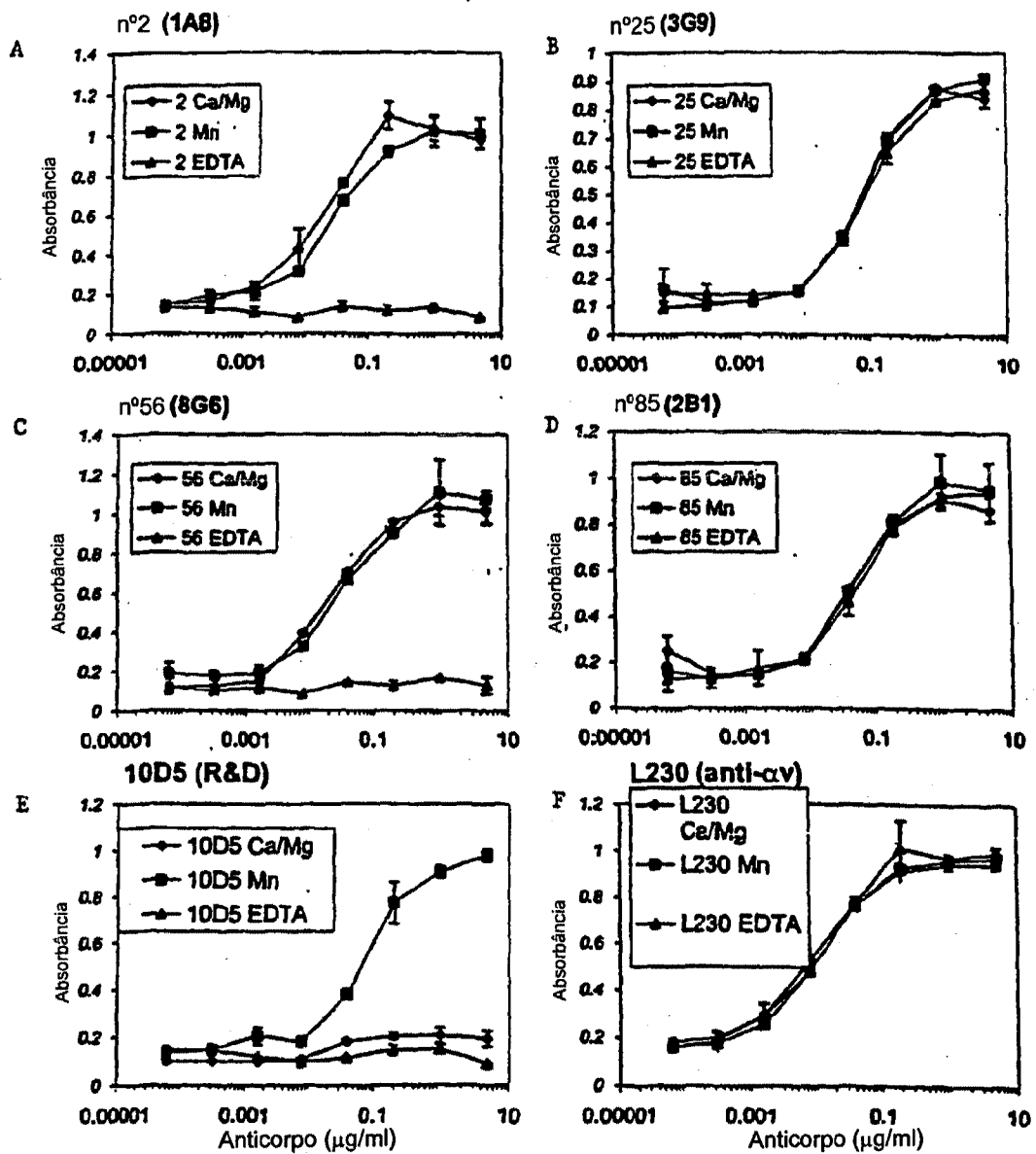


4/25

FIG. 2B

FIG. 3 A-F

Dependência por cátions da ligação á $\alpha v \beta 6$ solúvel



Inibição da biotina- $\alpha\beta 6$ /LAP - mAbs de fusão n°7

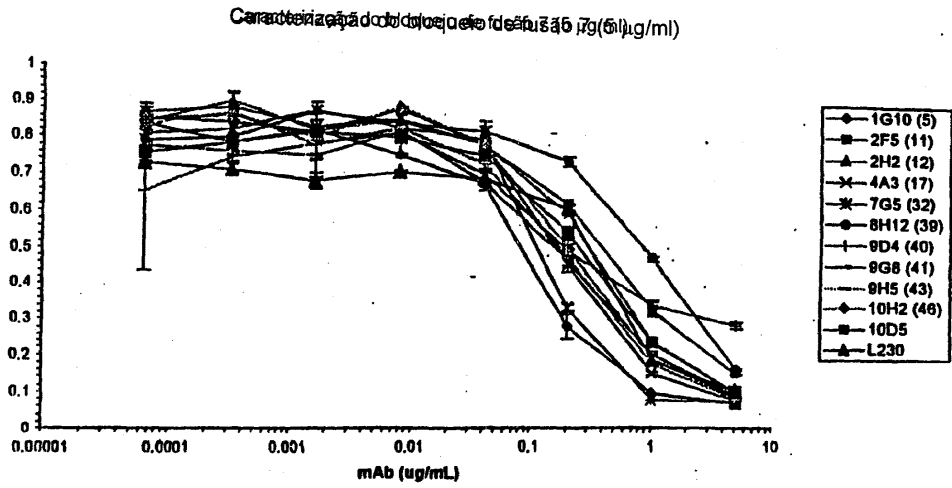


FIG. 4B

Adesão de $\beta 6$ (FDC-P1) ao LAP-mAbs de fusão n°6

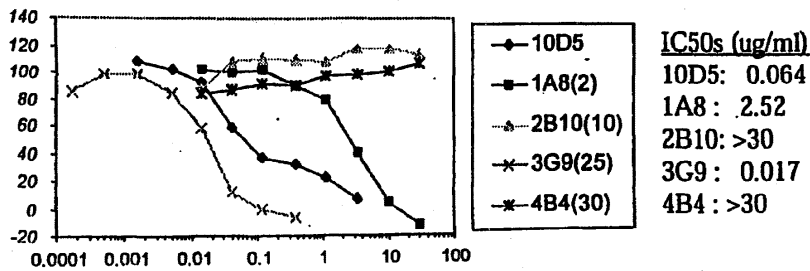


FIG. 5A

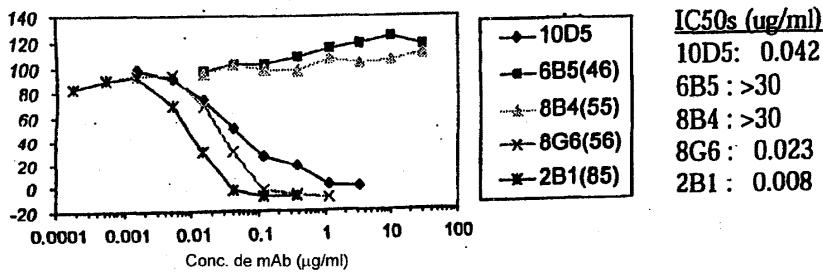
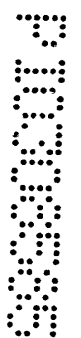


FIG. 5B



Adesão de $\beta 6$ (FDC-P1) ao LAP-mAbs de fusão n°6

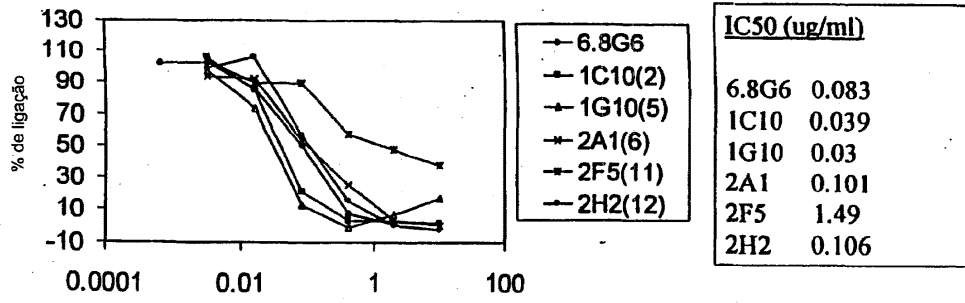


FIG. 5C

9/25

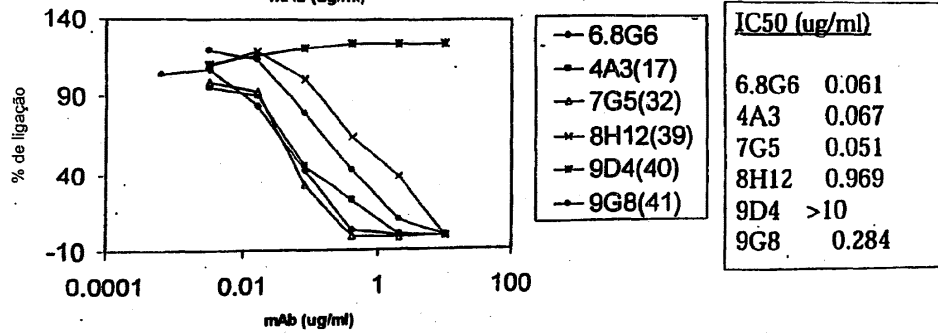


FIG. 5D

Adesão de $\beta 6$ (FDC-P1) ao LAP-mAbs de fusão n°6

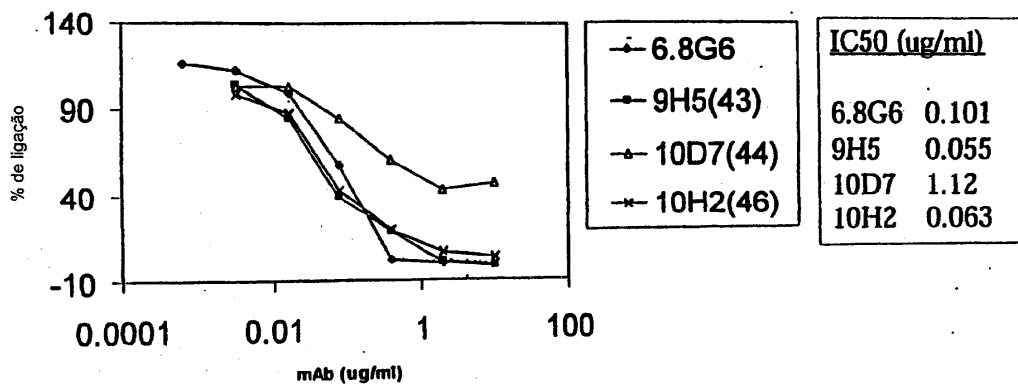
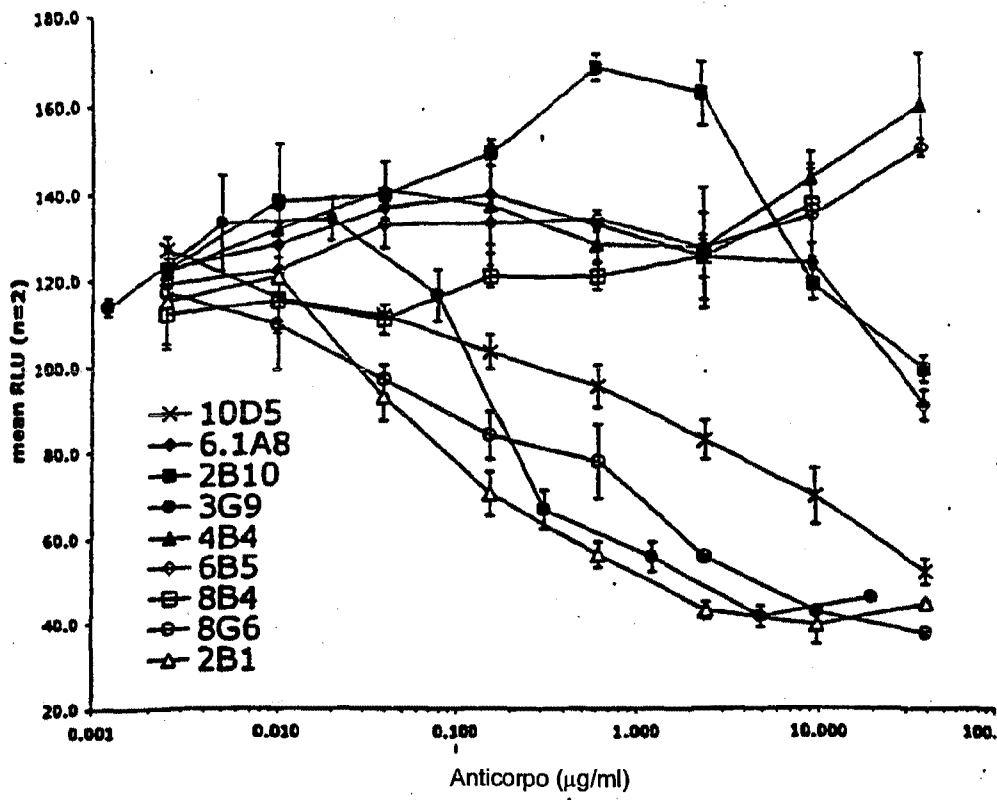


FIG. 5E

10/25

11/25

FIG. 6A



Inibição da ativação do TGF β pela α v β 6-mAbs de fusão n°7
(ensaio de co-cultura de luciferase, PAI-1)

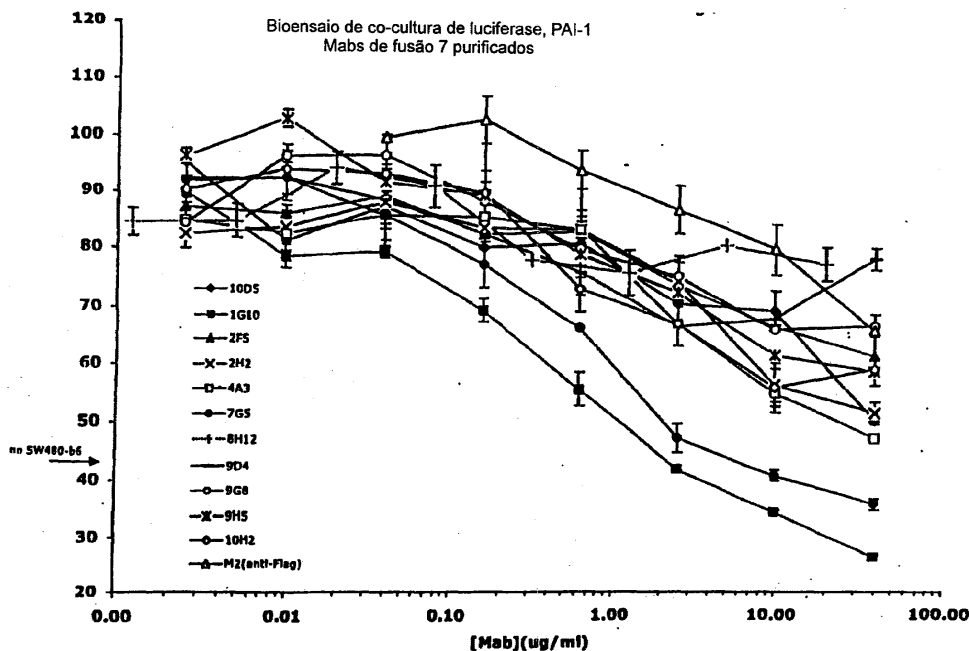


FIG. 6B

6.1A8 (1) QVQLQQSGPELV R P G V S V K L S C K G S S Y T F T D Y A M H W V K L S H A K T L E W I G V I D T Y Y G K T N Y N Q K F K G K A T M T V D K S S T A Y M E L A R L T S E D S A V

6.8G6-A (1) QVQLQQSGPELV R P G V S V K I S C K G S S Y T F T D Y A M H W V K L S H A K S L E W I G V I S T Y Y G N T N Y N Q K F K G K A T M T V D K S S T A Y M E L A R L T S E D S A V

6.8G6-B (1) QVQLQQSGPELV R P G V S V K I S C K G S S Y T F T D Y A M H W V K L S H A K S L E W I G V I S T Y Y G N T N Y N Q K F K G K A T M T V D K S S T A Y M E L A R L T S E D S A V

7.7G5 (1) E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K A S G Y S F T G Y F M N H W V M Q S H G K S L E W I G R I K P Y N G D N F Y N Q K F M G K A T L T V D K S S T A Y M E L R L S L A S E D S A V

6.2B1 (1) E V K L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S R Y V M S H W V R Q T P E K R L E W A S I S S G - G S T Y Y P D S V K G R F T I S R D S A R N I L Y L Q M S S L R S E D T A M

6.3G9 (1) E V M L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S R Y V M S H W V R Q T P E K R L E W A S I S S G - G R M Y Y P D T V K G R F T I S R D S A R N I L Y L Q M S S L R S E D T A M

6.2B10-A (1) QVQLQQSGPELV R P G T S V K L S C K A S G Y S F T S Y H M N H W V K Q R P Q Q L E W I G M I H P S I S E T R L N P K F K D K A T L T V D T S S S T V Y M Q L S S P T S E D S A V

6.2B10-B (1) QVQLQQSGPELV R P G T S V K L S C K A S G Y S F T S Y H M N H W V K Q R P Q Q L E W I G M I H P S I S E T R L N P K F K D K A T L T V D T S S S T V Y M Q L S S P T S E D S A V

6.2G2 (1) QVQLQQSGAEL R P G T S V K V S C K A S G Y A P T N Y L I E H W V K Q R P Q Q L E W I G V I S P G S G I I N Y N E K F K G K A T L T A D K S S T A Y M Q L S S L T S D D S A V

6.2A1 (1) QVQLQQSGAEL R P G T S V K V S C K A S G Y D F N N D L I E H W V K Q R P Q Q L E W I A V I N P G S G R T N Y N E K F K G K A T L T A D K S S T V Y M Q L S S L T S D D S A V

6.4B4-A (1) QVQLQQSGAVL M K P G A S V K I S C K A T G Y S F T N Y N I D H I K Q R P G H G L E W I G E N L P G - T R N N Y N E N F K G K A T F T A D P S S N T A Y I Q L N S L T S D D S A V

6.4B4-B (1) QVQLQQSGAVL M K P G A S V K I S C K A T G Y S F T N Y N I D H I K Q R P G H G L E W I G E N L P G - T R N N Y N E N F K G K A T F T A D P S S N T A Y I Q L N S L T S D D S A V

6.4B4-C (1) QVQLQQSGAVL M K P G A S V K I S C K A T G Y S F T N Y N I D H I K Q R P G H G L E W I G E N L P G - T R N N Y N E N F K G K A T F T A D P S S N T A Y I Q L N S L T S D D S A V

7.10H2 (1) QVQLQQSGPELV R P G A S V R I S C K A S G Y I F T S Y Y I H W V K Q R P Q Q L E W I G W I Y P G N V N T K Y N E K F K D K A T L T A D K S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V

7.9H5 (1) QVQLQQSGPELV R P G A S V R I S C K A S G Y I F T S Y Y I H W V K Q R P Q Q L E W I G W I Y P G N V N T K Y N E K F K D K A T L T A D K S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V

7.4A3-A (1) QVQLQQSRPELV R P G A S V R I S C K A S G Y I F T S Y Y L H W V K Q R P Q Q L E W I G W I Y P G N G N T K Y N E K F K D K A T L T S D K S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V

7.4A3-B (1) QVQLQQSRPELV R P G A S V R I S C K A S G Y I F T S Y Y L H W V K Q R P Q Q L E W I G W I Y P G N G N T K Y N E K F K D K A T L T S D K S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V

7.1C5-A (1) QVQLQQSGPELV R P G A S L R I S C K A S G Y T F K S Y Y I H W V R Q R P Q Q L E W I G W I Y P G N G N T K Y N E K F K G K A T L T A D K S S T V Y M Q L S S L T S E D S A V

7.1C5-B (1) QVQLQQSGPELV R P G A S L R I S C K A S G Y T F K S Y Y I H W V R Q R P Q Q L E W I G W I Y P G N G N T K Y N E K F K G K A T L T A D K S S T V Y M Q L S S L T S E D S A V

7.1G10 (1) QVQLQQSGPELV R P G A S V R I S C K A S G Y T F T S Y Y I H W V K Q R P Q Q L E W I G W L Y P O K I N T R Y N E K F K G K A T L I A D K S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V

6.1A8 (94) Y Y C A R G G F R R G D R P S L R Y A N D S W G Q G T S V T V S S SEQ ID NO:19

6.8G6-A (94) Y Y C A R G G L R R G D R P S L R Y A N D Y W G Q G T S V T V S S SEQ ID NO:20

6.8G6-B (94) Y Y C A R G G L R R G D R P S L R Y A N D Y W G Q G T S V T V S S SEQ ID NO:21

7.7G5 (94) Y Y C A R D R Y G - - - - - T - Y G M D Y W G Q G T S V T V S S SEQ ID NO:22

6.2B1 (93) Y Y C A R G A I Y D G - - - - - Y Y V F A Y W G Q Q T L V T V S A SEQ ID NO:23

6.3G9 (93) Y Y C A R G S I Y D G - - - - - Y Y V F P Y W G Q G T L V T V S A SEQ ID NO:24

6.2B10-A (94) Y Y C A R Y L G Y Y T Y - - - - - Y G S D C H W G Q G T S V T V S S SEQ ID NO:25

6.2B10-B (94) Y Y C A R Y L G Y Y T Y - - - - - Y G L D Y W G Q G T S V T V S S SEQ ID NO:26

6.2G2 (94) Y F C A A I D Y S G P - - - - - Y A V D D W G Q G T S V T V S S SEQ ID NO:61

6.2A1 (94) Y F C A M I Y Y - G P H S - - - - - Y A M D Y W G Q G T S V T V S S SEQ ID NO:62

6.4B4-A (93) Y Y C A R E A L G G D Y - - - - - G L D Y W G Q G T S L T V S S SEQ ID NO:27

6.4B4-B (93) Y Y C A R E A L G G D Y - - - - - V L D Y W G Q G T S L T V S S SEQ ID NO:28

6.4B4-C (93) Y Y C A R E A L G G D Y - - - - - G L D Y W G Q G T S L T V S S SEQ ID NO:29

7.10H2 (94) Y F C A R H V L S G N - - - - - F D Y W G Q Q T T L T V S S SEQ ID NO:30

7.9H5 (94) Y F C A R H V L S G N - - - - - F D Y W G Q G T T L T V S S SEQ ID NO:31

7.4A3-A (94) Y F C A R H V L S G N - - - - - F D Y W G Q Q T T L T V S S SEQ ID NO:32

7.4A3-B (94) Y F C A R H V L S G N - - - - - F D Y W G Q Q T T L T V S S SEQ ID NO:33

7.1C5-A (94) Y F C A R H E L N G N - - - - - F D Y W G Q Q T T L T V S S SEQ ID NO:34

7.1C5-B (94) Y F C A R H E L N G N - - - - - F D Y W G Q Q T T L T V S S SEQ ID NO:35

7.1G10 (94) Y F C A R H V L S G N - - - - - F D Y W G Q Q T T L T V S S SEQ ID NO:36

FIG. 7A

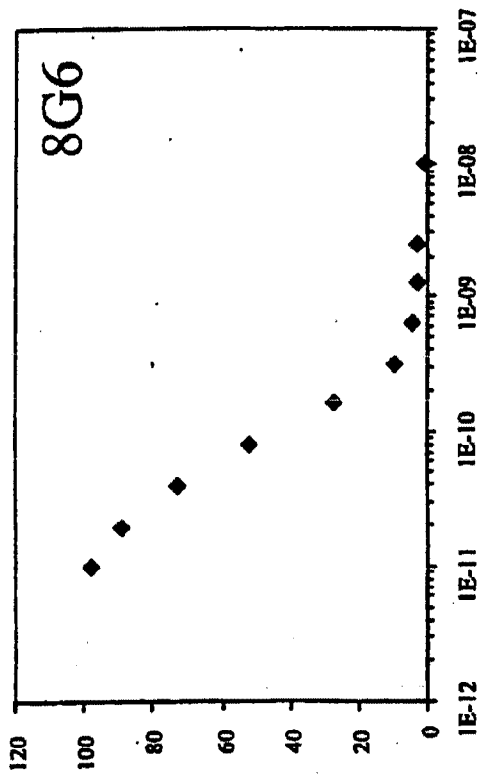
6.1A8 (1) DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSIST-YSYIHWYQQKPGQPPKLIKAYASNLESGVVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDTAIYYC
 6.8G6 (1) DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSS-YSYMYWYQQKPGQSPKLIKAYASNLESGVVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDTAIYYC
 6.4B4 (1) DVVMTQTPRSLPVSLGDQASMSCRBSQSLKHSNGDTYLHWYQQKPGQSPKLIKAYASNLESGVVPDRFSGSGSGTEFTFKISRVEAEDLGVYFC
 6.2A1 (1) DIVMTQSHKFMSTVVGDRVSTCKASLDVR-----TAVAWYQQKPGQSPKLIKAYASNYTGVVDRFSGSGSGTDFTLNIRSVQAEEDLAVYYC
 6.2G2 (1) DIVMTQSHKFMSTVVGDRVSTCKASQAVN-----TAVAWYQQKPGQSPKLIKAYASNYTGVVDRFSGSGSGTDFTLNIRSVQAEEDLAVYYC
 7.1C5 (1) DIQMTQSPSSLSASLGERVNLTCRASQEIISG-----YLSWLQQKPDGSIKRLIYAASLDGVPKRFGSGSGDYSLTISSELEDFADYYC
 7.1G10 (1) DIQMTQSPSSLSASLGERVNLTCRASQEIISG-----YLSWLQQKPDGSIKRLIYAASLDGVPKRFGSGSGDYSLTISSELEDFADYYC
 6.2B10 (1) QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCASSSVS-----YMHWYQQKSGTSPRRIYDTSKLAGVVPARFSGSGSGTYSYSLTISSEMEAVDAATYYC
 7.7G5 (1) QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCASSSVS-----YMHWYQQKSGTSPRRIYDTSKLAGVVPARFSGSGSGTYSYSLTISSEMEAVDAATYYC
 6.2B1 (1) QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCASSSVS-----YLYWYQQKPGQSPKLIKAYASNLAGVVPARFSGSGSGTYSYSLTISSEMEAVDAATYYC
 6.3G9 (1) QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCASSSVS-----YLYWYQQKPGQSPKLIKAYASNLAGVVPARFSGSGSGTYSYSLTISSEMEAVDAATYYC

6.1A8	(93)	QHSWEIPYTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:37
6.8G6	(93)	QHNWEIPYTFGGGTKLEIK	SEQ ID NO:38
6.4B4	(94)	SQSTHVPYTFGGGTRLEIK	SEQ ID NO:39
6.2A1	(89)	QHHYGIPTTFGGGTKLEIK	SEQ ID NO:63
6.2G2	(89)	QHHYGVPTTFGGGTKLEIK	SEQ ID NO:64
7.1C5	(89)	LQYASYPYTFGGGAKLEIK	SEQ ID NO:40
7.1G10	(89)	LQYATYPYTFGGGTKLEIK	SEQ ID NO:41
6.2B10	(88)	QQWTSNPYTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO:42
7.7G5	(88)	QQWSSHPYTFGAGTKLEIK	SEQ ID NO:43
6.2B1	(90)	HQWSSYPYTFGGGTKLEIK	SEQ ID NO:44
6.3G9	(90)	HQWSTYRPTFGGGTKLEIK	SEQ ID NO:45

FIG. 7B

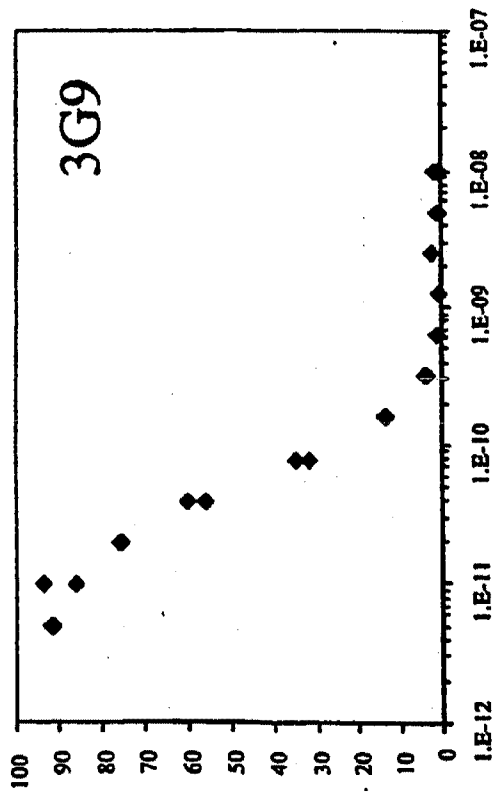


FIG. 9A



% de anticorpo livre

FIG. 9B



% de anticorpo livre

Concentração de integrina (M)

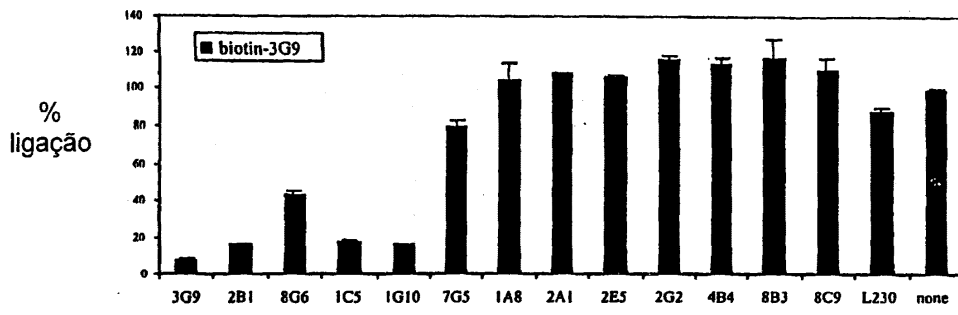


FIG. 10A

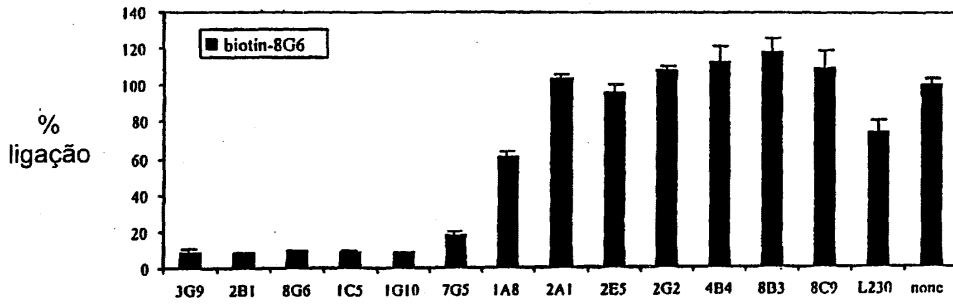


FIG. 10B

Competidor não-marcado



Efeito dos mAbs para $\alpha v\beta 6$ sobre a caloria da actina do músculo biso em UUO

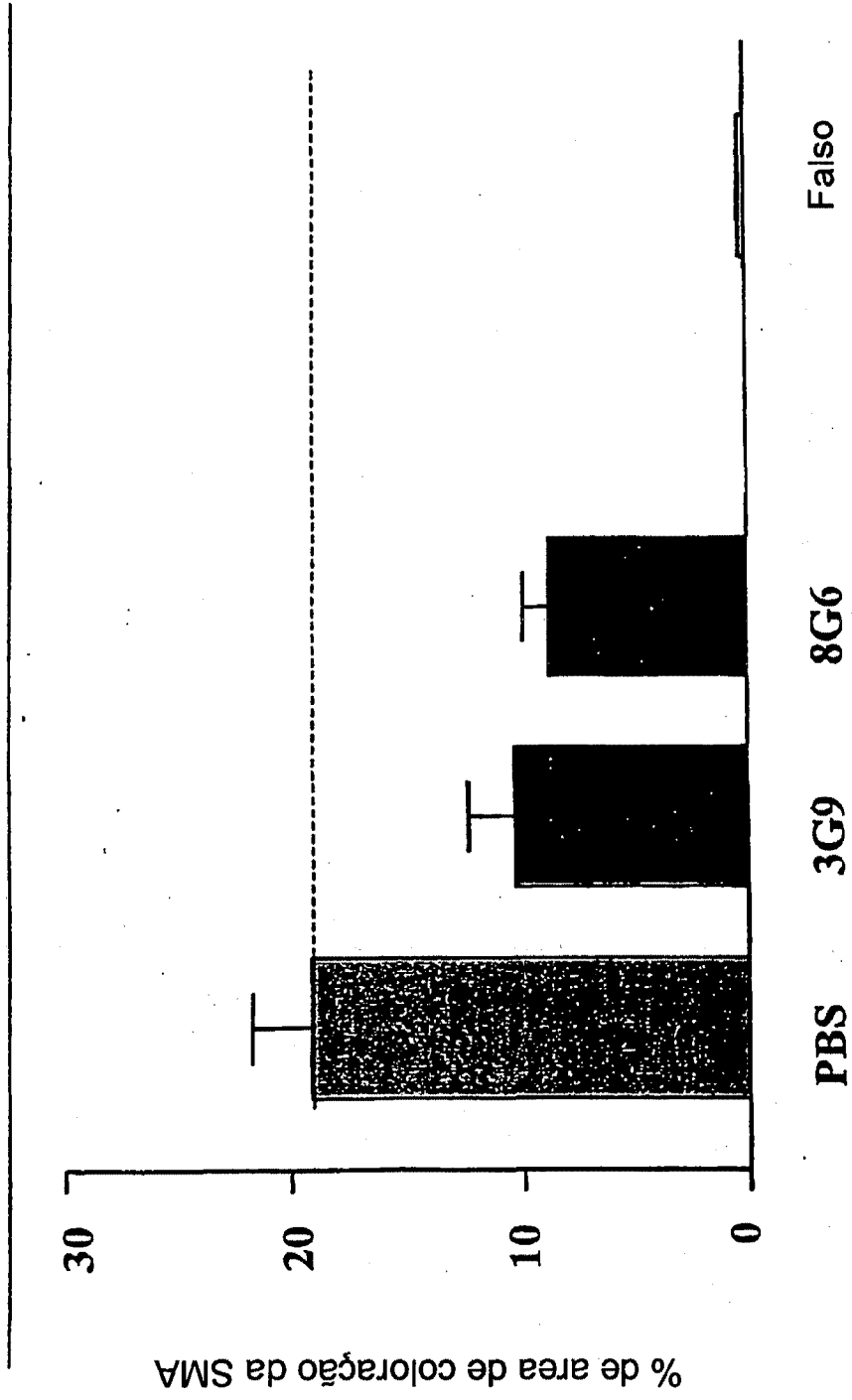


FIG. 11

FIG. 12

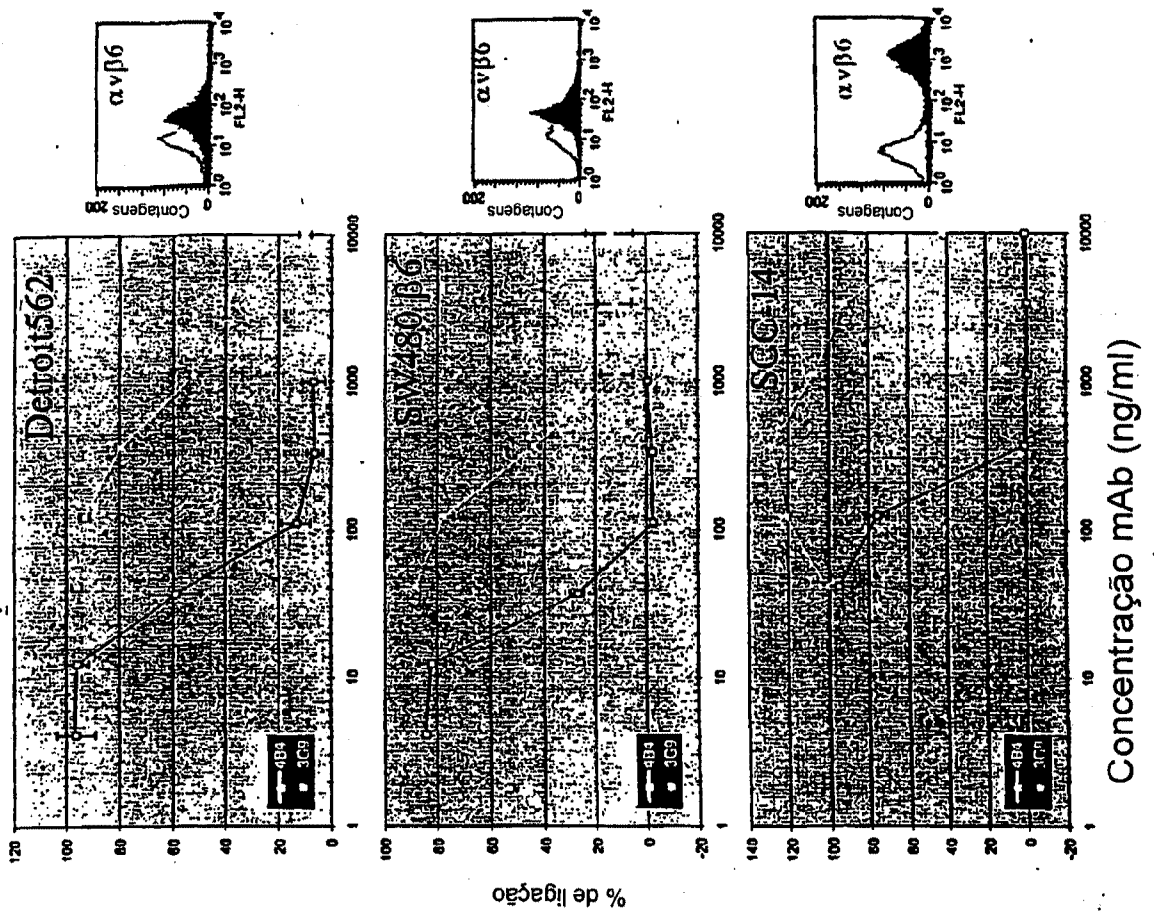
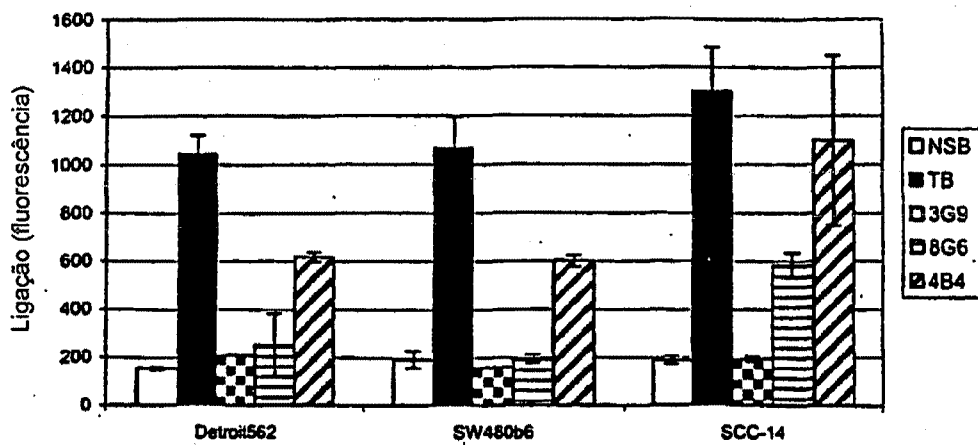


FIG. 13



Respostas da linhagem de células de carcinoma da faringe humana, detroit562, implantada de forma subcutânea, à terapia de mAb para $\alpha v \beta 6$ com 369

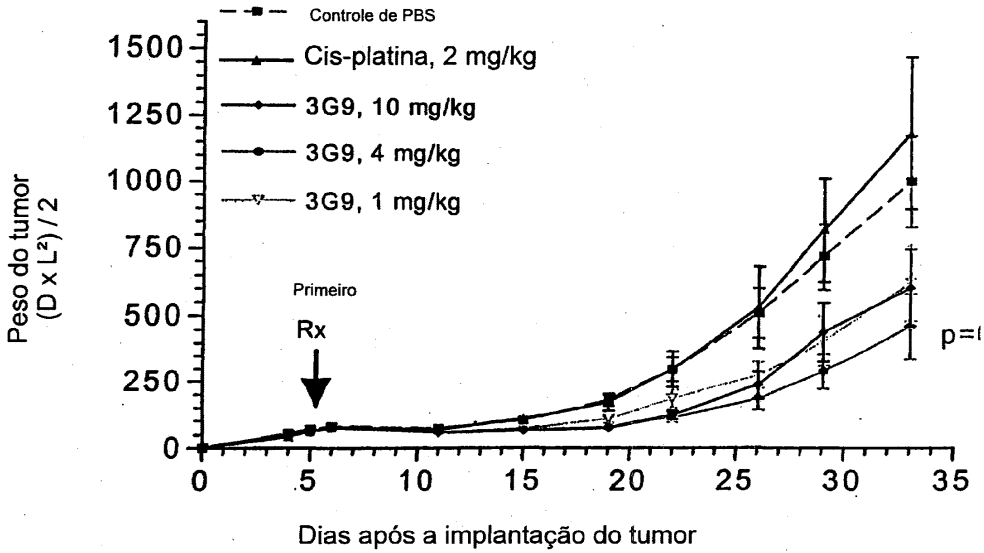


FIG. 14A

21/25

Respostas da linhagem de células de carcinoma da faringe humana, detroit562, implantada de forma subcutânea, à terapia de mAb para $\alpha v \beta 6$ com 369

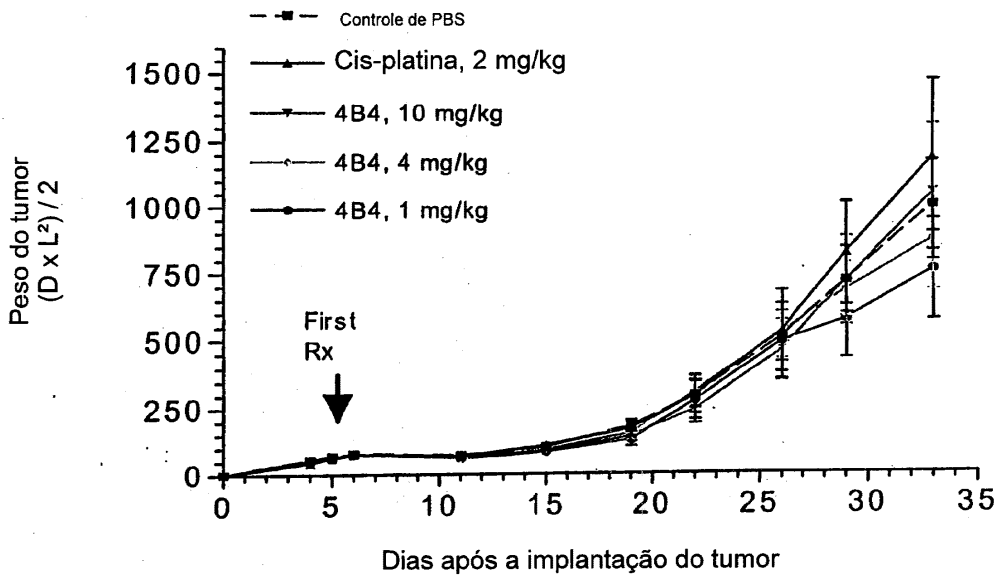


FIG. 14B

22/25

Experiências de fibrose do pulmão com bleomicina

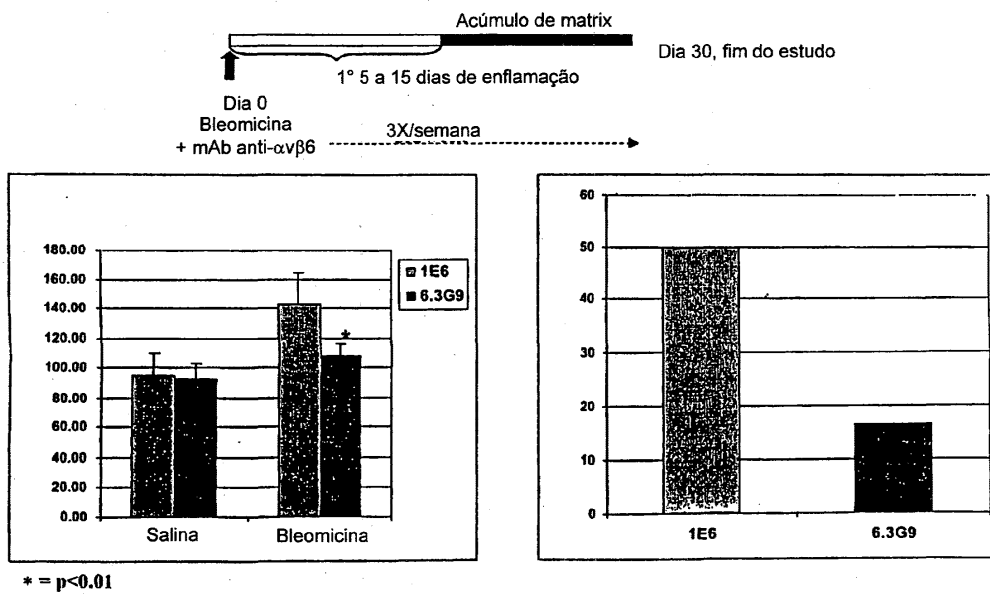


FIG. 15A

23/25

Experiências de fibrose do pulmão com bleomicina

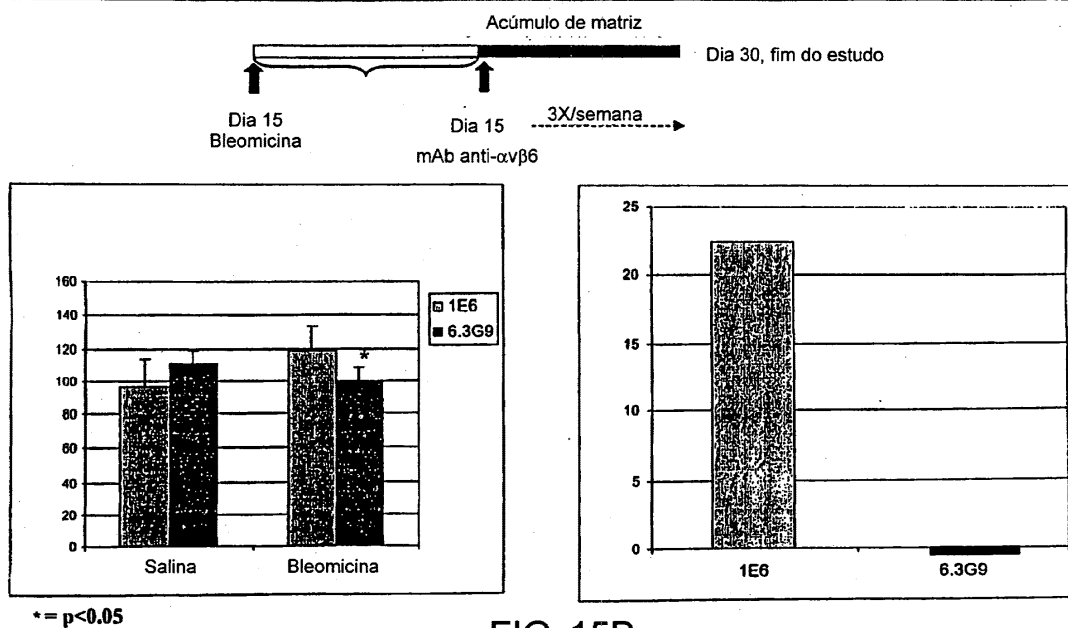


FIG. 15B

24/25

Efeitos do Ab beta6 sobre o nível de hidroxiplolina

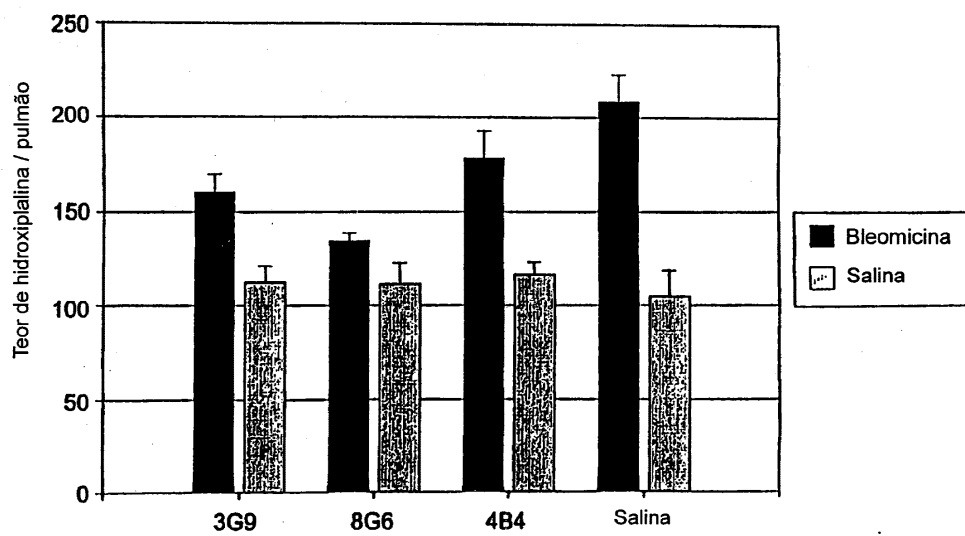


FIG. 15C

