

(11) *Número de Publicação:* **PT 765343 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C07K016/28 A C12N005/20 B
G01N033/577 B A61K039/395 B
A61K049/00 B

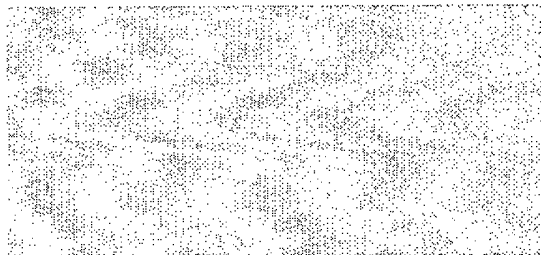
(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

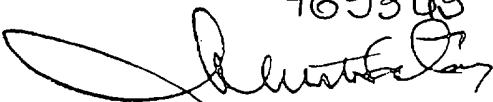
(22) Data de depósito: 1995.06.02	(73) Titular(es): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH BINGER STRASSE 173 55218 INGELHEIM AM RHEIN DE
(30) Prioridade: 1994.06.08 DE 4419913 1994.09.02 DE 4431297	FORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE GMBH POSTFACH 3640 76133 KARLSRUHE DE
(43) Data de publicação do pedido: 1997.04.02	(72) Inventor(es): GUNTHER R. ADOLF AT ERIK PATZELT AT
(45) Data e BPI da concessão: 2000.11.15	(74) Mandatário(s): JOSÉ LUÍS FAZENDA ARNAUT DUARTE RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT

(54) Epígrafe: ANTICORPOS MONOCLONAIIS CONTRA CD44V6

(57) Resumo:

ANTICORPOS MONOCLONAIIS CONTRA CD44V6



765343


DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA CD44v6"

A invenção refere-se a um anticorpo monoclonal contra um epítopo, que é codificado por uma variante do exão v6 do gene CD44, a moléculas de anticorpo suas derivadas, bem como à utilização do anticorpo ou molécula de anticorpo, em métodos de diagnóstico e terapia.

Foi recentemente demonstrado que a expressão de variantes das glicoproteínas de superfície CD44 é necessária e suficiente para desencadear o designado comportamento metastático espontâneo, quer numa linha celular de rato de adenocarcinoma do pâncreas sem metástases do rato, quer numa linha celular de fibrosarcoma do rato sem metástases (Günthert *et al.*, 1991). Enquanto que a isoforma de CD44 mais pequena, a forma padrão do CD44 (ou CD44std), é expressa de forma ubiquitária numa série de tecidos diferentes, entre as células epiteliais, determinadas variantes de "splicing" de CD44 (CD44v, CD44var), apenas são expressas num subgrupo de células epiteliais. As variantes de CD44 são produzidas por meio de "splicing" alternativo, de forma que as sequências de 10 exões (v1-v10) no CD44s são completamente cindidas, podendo no entanto surgir em diferentes combinações nas variantes maiores (Screaton *et al.*, 1992; Tölg *et al.*, 1993; Hofmann *et al.*, 1991). As variantes diferem entre si, na medida em que estão inseridos diferentes sequências de aminoácidos em locais determinados nas porções extracelulares das proteínas. Estas variantes podem ser identificadas em diferentes células de tumor humanas e em tecidos de tumor humanos. Assim, foi



recentemente analisada a expressão de variantes de CD44 no desenvolvimento da carcinogénese colorectal (Heider et al., 1993a). A expressão de variantes de CD44 está ausente no epitélio do colon humano normal e apenas se consegue identificar uma fraca expressão nas células das criptas em proliferação. Em estados mais avançados da progressão do tumor, por exemplo em adenocarcinomas, todas as degenerações malignas expressam variantes de CD44. Foi também possível observar uma expressão tecidular de variantes de CD44 de nível elevado, em linfomas não-Hodgkin agressivos (Koopman et al., 1993).

O exão v6 parece desempenhar um papel especial, particularmente na propagação de metástases (Rudy et al., 1993). Em modelos animais, os anticorpos contra epítomos específicos de v6 conseguiram impedir o crescimento de colónias de células metastáticas e o crescimento de metástases (Seiter et al., 1993). No carcinoma do colon, a expressão do v6 está correlacionada com a progressão do tumor (Wielenga et al., 1993). No carcinoma do estômago, a expressão de v6 é um marcador de diagnóstico importante para a diferenciação entre tumores do tipo intestinal e do tipo difuso (Heider et al., 1993b). A expressão de v6 nos últimos trabalhos conhecidos foi medida com o auxílio de anticorpos contra epítomos específicos de v6.

Os anticorpos monoclonais contra epítomos codificados pelo exão v6, são conhecidos no estado da técnica (Hofmann et al., 1991; Wielenga et al., 1993). Para uma maior utilização potencial que estes anticorpos poderão ter no diagnóstico e terapia, há a necessidade de anticorpos com propriedades melhoradas.



Salmi *et al.* (J. Cell Biol. 122:431-442, 1993, bem como 8th Congress of Immunol., Budapeste, 23-28 Agosto, 1992, Springer Verlag, Budapeste, Hungria) descrevem a produção do anticorpo específico de v6, Var3.1, que se liga ao péptido STTEETATQKEQWFGN. Jackson *et al.* (Int. J. Cancer Supplement 8: 110-15, 1994) descrevem experiências com os anticorpos específicos de v6, 2F10 e 8G5, sem indicar os seus epítomos.

O objectivo da presente invenção é proporcionar um anticorpo que apresente propriedades melhoradas em relação aos anticorpos específicos de v6 conhecidos.

Este objectivo, pode ser alcançado por meio da presente invenção. A invenção refere-se a um anticorpo com a designação VFF-18. A invenção refere-se além disso, a uma linha celular de hibridoma, que contém estes anticorpos e que foi depositada com o número de depósito DSM ACC2174 na "DSM-Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH", Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemanha.

Daqui para a frente, o termo anticorpo ou molécula de anticorpo não inclui apenas imunoglobulinas completas, mas também engloba substâncias equivalentes sob o ponto de vista de especificidade de ligação e afinidade, tal como os derivados de anticorpo e moléculas de anticorpo recombinantes.

O anticorpo VFF-18 de acordo com a invenção foi produzido por meio de um processo de acordo com o exemplo 1. O anticorpo pode além disso ser obtido a partir das linhas celulares de hibridoma depositadas. É do conhecimento do especialista no domínio a preparação de derivados do anticorpo de acordo com a invenção, ou a produção de moléculas de anticorpo recombinantes com o mesmo idiótipo, a partir de uma análise de



sequência deste anticorpo e/ou da utilização de linhas celulares de hibridoma, isto é, moléculas de anticorpo que apresentam a mesma sequência de aminoácidos que o anticorpo VFF-18, na região de ligação ao antígeno (*complementarity-determining regions*, CDR). Estes derivados e moléculas de anticorpo recombinantes estão assim expressamente incluídos na invenção.

A partir da imunoglobulina completa do anticorpo VFF-18 podem-se produzir, por exemplo, fragmentos Fab ou F(ab')₂, ou outros fragmentos (Kreitman et al., 1993). Para processos de diagnóstico, as moléculas de anticorpo VFF-18, fragmentos seus derivados ou moléculas de anticorpo recombinantes com o mesmo idiótipo, podem ser ligadas, por exemplo, com isótopos radioactivos, como ¹³¹I, ¹¹¹In, ^{99m}Tc ou compostos radioactivos (Larson et al., 1991; Thomas et al., 1989, Srivastasa, 1988), enzimas como a peroxidase ou a fosfatase alcalina (Catty et Raykundalia, 1989), com material corante fluorescente (Johnson, 1989) ou moléculas de biotina (Guesdon et al., 1979). Para utilização terapêutica, pode-se ligar a molécula de anticorpo VFF-18 ou derivada de VFF-18 com toxinas (Vitetta et al., 1991; Vitetta et Thorpe, 1991; Kreitman et al., 1993; Theuer et al., 1993), citoestáticos (Schrappe et al., 1992), pró-medicamentos (Wang et al., 1992; Senter et al., 1989) ou substâncias radioactivas. Os anticorpos podem, além disso, ser ligadas com uma citóquina ou um outro polipéptido imunomodulador, por exemplo com o factor de necrose de tumor ou interleucina-2.

O perito na arte pode, além disso, preparar moléculas de anticorpo recombinantes com o mesmo idiótipo que o VFF-18, após análise da sequência de aminoácidos do anticorpo VFF-18,



e/ou utilizando a linha celular de hibridoma que produz este anticorpo, em particular a informação genética nela contida. Os processos correspondentes fazem parte do estado da técnica. Estas moléculas de anticorpo recombinantes podem ser, por exemplo, anticorpos humanizados (Shin et al., 1989; Güssow et Seeman, 1991), anticorpos bi-específicos (Weiner et al., 1993; Goodwin, 1989), anticorpos *single-chain* (scFv, Johnson et Bird, 1991), imunoglobulinas completas ou fragmentadas (Coloma et al., 1992; Nesbit et al., 1992; Barbas et al., 1992), ou anticorpos produzidos por *chain shuffling* (Winter et al., 1994). Os anticorpos humanizados podem ser produzidos, por exemplo, por enxerto de CDR (EP 0239400). As regiões de "framework" (sequência) podem também ser modificadas (EP 0519596). Para a humanização de anticorpos podem-se hoje utilizar métodos como a PCR (veja-se por exemplo, EP 0368684; EP 0438310; WO 9207075), ou modelação por computador (veja-se, por exemplo, WO 9222653). Também se podem produzir proteínas de fusão anticorpo, por exemplo, *single-chain/toxina* (Chaudhary et al., 1990; Friedman et al., 1993). Estas moléculas de anticorpo estão igualmente inseridas na invenção.

É também do conhecimento do especialista no domínio, o modo de pesquisar o epítipo exacto de VFF-18 e com esse conhecimento preparar anticorpos equivalentes com a mesma especificidade de ligação. Isto pode ser conseguido, por exemplo por estudos de ligação de péptidos, como no exemplo 2, de certo modo por variação dos péptidos Hul. Estes anticorpos estão inseridos também no âmbito da invenção.

Um outro aspecto da invenção é a utilização de moléculas de anticorpo VFF-18, ou derivadas de VFF-18, ou equivalentes para diagnóstico e terapia.



Os processos de diagnóstico podem ser processos já de si conhecidos, com utilização das moléculas de anticorpo de acordo com a invenção, por exemplo, imunoensaios ligados a enzimas (ELISA, Caty et Raykundalia, 1989), radioimunoensaios (Catty et Murphy, 1989), processos imunohistoquímicos (Heider et al., 1993b) ou "Westernblots". Estes processos podem ser realizados, de forma conveniente, com amostras de tecidos retiradas do corpo ou fluidos corporais, recorrendo por exemplo a biópsias. As análises podem ser realizadas de forma qualitativa, semi-quantitativa ou quantitativa. O anticorpo ou as moléculas de anticorpo podem ser utilizadas como está descrito no estado da técnica, por exemplo para outros anticorpos específicos de v6 (WO 9500851), em que as propriedades vantajosas do anticorpo de acordo com a invenção ou das moléculas de anticorpo de acordo com a invenção, trazem uma melhoria significativa a estes processos.

Além do diagnóstico *in vitro*, as moléculas de anticorpo de acordo com a invenção são também adequadas para diagnóstico *in vivo*, em especial de tumores. Quando a molécula transporta um marcador detectável, pode-se efectuar uma detecção do marcador para fins de diagnóstico, por exemplo visualização de tumores *in vivo* (Imagiologia), ou por exemplo para cirurgia radio-auxiliada (*radioguided surgery*). Para utilização de anticorpos conjugados com isótopos radioactivos para imunocintigrafia (Imagiologia), existe, por exemplo, uma série de protocolos, cujos fundamentos o perito poderá executar (Siccardi et al., 1989; Keenan et al., 1987; Perkins et Pimm, 1992; Colcher et al., 1987; Thompson et al., 1984).

Uma aplicação terapêutica pode ser efectuada, por exemplo, de forma análoga à utilização dos anticorpos 1.1ASML (Seiter et al., 1993). A aplicação pode ser por administração



sistêmica ou tópica, por exemplo, por injeção/infusão intravenosa (por bolo ou infusão contínua), intraperitoneal, intramuscular, subcutânea ou outras. Também se podem perfusar órgãos ou estruturas individuais. Os protocolos para a preparação de anticorpos conjugados, ou não conjugados (sejam eles imunoglobulinas completas, fragmentos, moléculas quiméricas recombinantes ou semelhantes) fazem parte do estado da técnica (Mulshine et al., 1991; Larson et al., 1991; Vitetta et Thorpe, 1991; Vitetta et al., 1991; Breitz et al., 1992; Press et al., 1989; Weiner et al., 1989; Chatal et al., 1989; Sears et al., 1982).

Os exemplos 2 a 4 mostram as propriedades superiores de VFF-18, em relação a outros anticorpos anti-CD44v6.

Figuras

Figura 1: Representação esquemática da proteína de fusão GST-CD44(v3-v10). GST = glutathione-S-transferase de *Schistosoma japonicum*. v3-v10 = inserção variante de queratinócitos-CD44. A seta assinala um local de corte de trombina.

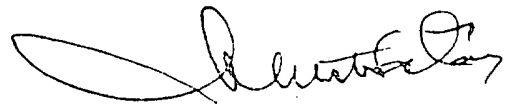
Figura 2: Comparação de sequências do exão v6 do gene CD44 entre humanos e ratos. A sequência do péptido Ral e Hul, a que os anticorpos 1.1ASML (CD44v6 anti-rato) e VFF-18 (CD44v6 anti-humano) se ligam estão identificadas com caracteres a bold. Os aminoácidos idênticos são assinalados com um asterisco.

Figura 3: Ligação de anticorpos específicos de CD44v6 a péptidos sintéticos. A ligação do anticorpo no péptido é determinada por ELISA, em que os péptidos são imobilizados e em seguida incubados com as soluções de anticorpo. Por meio de



passos de lavagem correspondentes, os anticorpos ligados são identificados com anticorpo-anti-IgG de ratinho conjugado com peroxidase. (A): Na primeira experiência, foi identificada a ligação do anticorpo 1.1ASML específico para CD44v6 de rato no péptido Ral (KWFEN EWQ GK NPPT). (B): Numa outra pesquisa, sintetizou-se um péptido homólogo a Ral, a partir da sequência CD44v6 humana. Diferentes sobrenadantes de hibridomas anti-CD44v6 humano ligam-se neste péptido Hul (QWFGN RWHEG YRQT). Demonstra-se assim, que o VFF-18 se liga ao péptido substancialmente melhor, do que os restantes anticorpos utilizados. (C): Para uma avaliação quantitativa, esta experiência é repetida para diferentes concentrações de anticorpos purificados. Também aqui se demonstra que o VFF-18 apresenta uma maior afinidade de ligação que os outros anticorpos.

Figura 4: Ligação de anticorpos marcados radioativamente a células de tumor. Os três anticorpos VFF-7 (anti-v6), VFF-8 (anti-v5) e VFF-18 (anti-v6) são marcados radioativamente com N-succinimil[2,3-³H]propionato e utilizados para testes de ligação a diferentes linhas celulares de tumor. Utilizaram-se as seguintes linhas celulares: CHO-CD44var: linha celular de Hamster recombinante (ovário de Hamster chinês), CD44 variante humana (exões v3-v10) expressa na superfície; HCT-116, CX-1, HT-29, CaCo, COLO 205: linha de carcinoma de colon humano; A431: linha de carcinoma de epitélio humano. É apresentada a ligação específica dos anticorpos às diferentes linhas celulares. Apesar de a ligação dos anticorpos específicos de v6, VFF-7 e VFF-18 à linha celular recombinante CHO-CD44var apresentar a mesma ordem de grandeza, os anticorpos apresentam um comportamento de ligação muito diferente nas linhas celulares de tumor. Nalguns casos observa-se apenas a ligação de VFF-18 e numa menor extensão de VFF-8 (HT-29, CaCo, COLO



205), nas outras linhas celulares o VFF-18 liga-se substancialmente melhor que o VFF-7.

Figura 5: Identificação de variantes de CD44 solúveis, que contêm o exão v6, no soro normal humano. Utilizaram-se os três anticorpos específicos de v6, VFF-4, VFF-7 ou VFF-18 num ELISA-sanduiche, como anticorpos de revestimento. Em todos os três casos, utilizou-se como anticorpo de controlo um anticorpo específico de CD44std ,conjugado com peroxidase (BU-52, std = standard). É apresentado o sinal de dois soros normais humanos diferentes nestes testes ((A) e (B)), a diferentes diluições. Em ambos os casos, observa-se um sinal substancialmente mais forte com o VFF-18, do que com os outros dois anticorpos.

Figura 6: Nível sérico de variantes de CD44 contendo v6. Por meio de dois ELISAs diferentes determinou-se o conteúdo em CD44var solúvel no soro de 6 dadores saudáveis. Num dos testes utilizou-se VFF-7, noutros VFF-18, como anticorpo de revestimento; ambos os anticorpos reconhecem o exão 6. Como preparado para comparação é adequado, em ambos os casos, uma variante de CD44 solúvel (exão v3-v10) recombinante, preparada em células-CHO. O ELISA de VFF-18 apresenta em média um valor 3,5 vezes maior do que o ELISA de VFF-7. Isto significa que o CD44var solúvel existente no soro é melhor reconhecido pelo VFF-18, do que pelo VFF-7.

Exemplos

Exemplo 1; Preparação do anticorpo monoclonal VFF-18

Clonagem de proteínas de fusão-pGEX



A região variante completa do tipo HPKII de CD44v (Hofmann et al., 1991) é amplificada em ADNc de queranócitos humanos, por reacção em cadeia com polimerase (PCR). Ambos os iniciadores de síntese de PCR, 5'CAGGCTGGGAGCCAAATGAAGAAAAATG-3', posições 25-52 e 5'-TGATAAGGAACGATTGACATTAGAGTTGGA-3', posições 1013-984 da região variante LCLC97, como descrito em Hofmann et al., continham um local de reconhecimento de *EcoRI*, que foi utilizado para clonar o produto de PCR directamente no vector pGEX-2T (Smith et al., 1988). A construção resultante (pGEX CD44v HPKII, v3-v10) codifica para uma proteína de fusão de ~70 kD, que consiste na glutathione-S-transferase de *Schistosoma japonicum* e nos exões v3-v10 de CD44 humano (Fig. 1; Heider et al., 1993a). A proteína de fusão é expressa em *E. coli* e em seguida purificada por afinidade em glutathione-agarose (Smith et al., 1988).

Imunização e pesquisa

Imunizaram-se ratinhos Balb/c fêmea intraperitonealmente, com a proteína de fusão purificada por afinidade, de acordo com o seguinte esquema:

- 1ª imunização: 90 µg de proteína de fusão em adjuvante de Freund completo
- 2ª e 3ª imunizações: 50 µg de proteína de fusão em adjuvante de Freund completo

As imunizações foram realizadas a intervalos de 4 semanas. 14 dias após a última imunização os animais foram ainda imunizados, cada, em três dias consecutivos com 10 µg de proteína de fusão em PBS. No dia seguinte, fundiram-se esplenócitos de um animal com um título de anticorpo elevado,



com células de mieloma de rato P3.X63-Ag8.653, com o auxílio de polietilenoglicol 4000. As células de hibridoma foram então selecionadas em placas de microtítulo em meio HAT (Köhler et Milstein, 1975; Kearney et al., 1979).

A determinação do título de anticorpo no soro ou a pesquisa do sobrenadante do hibridoma foi realizada com o auxílio de um teste ELISA. Neste teste, em primeiro lugar revestiram-se placas de microtítulo com proteína de fusão (GST-CD44v3-10) ou apenas com glutathione-S-transferase. Em seguida, incubaram-se com diluições em série de amostras de soro, ou sobrenadantes de hibridomas e determinaram-se os anticorpos específicos com anticorpos contra imunoglobulina de ratinho, conjugados com peroxidase. Os hibridomas que apenas reagiram com a glutathione-S-transferase foram desprezados. Os anticorpos remanescentes foram primeiro caracterizados num ELISA com proteínas de fusão específicas de domínio (exão v3, exão v5 + v6, exão v6 + v7, exão v8-v10) (Koopman et al., 1993). A sua reactividade imunoquímica foi testada em cortes de pele humanos. O anticorpo VFF-18 foi então identificado por ligação ao péptido sintético Hul (QWFGN RWHEG YRQT). A sequência de Hul é um fragmento do exão v6 de CD44 humano.

Exemplo 2: Ligação de anticorpos específicos de CD44v6 a péptidos sintéticos

A ligação de anticorpos específicos de CD44v6 a péptidos sintéticos foi determinada por ELISA.

Soluções:

Tampão de revestimento: carbonato de sódio 0,05 M pH 9,6

Tampão de teste: PBS (solução salina tamponada com fosfato)

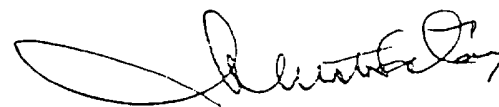


BSA a 0,05% (albumina de bovino)

Tween 20 a 0,05%

Solução de substrato: Fa. Kierkegaard Perry Laboratories,
Gaithersburg MD, USA; substrato de
peroxidase TMB : Solução de peroxidase
B (H_2O_2) 1:1

Os péptidos (50 μ /ml em tampão de revestimento) são imobilizados em imunoplasacas Maxisorp da NUNC (1,1 ASML) ou placas Acti-A da Fa. Bio Products (anticorpos-VFF), a 4 °C, durante a noite. O péptido é ligado de forma covalente à placa, nas placas Acti-A. Em seguida lava-se com PBS/Tween a 0,05% bloqueiam-se os locais de adsorção livres à superfície da placa com tampão de teste (1 hora à temperatura ambiente) e lava-se mais uma vez com PBS/Tween 20 a 0,05%. As placas Acti-A, após o bloqueamento com borohidreto de sódio 10 mM, são reduzidas em hidrogenocarbonato de sódio 20 mM, pH 9,0 (1 hora à temperatura ambiente) e em seguida lavadas três vezes com PBS/Tween 20 a 0,05%. Em seguida, adiciona-se sobrenadante do hibridoma ou solução de anticorpo em tampão teste, em concentrações entre 0,02 e 10,0 μ g/ml no recipiente e incuba-se durante duas horas à temperatura ambiente num agitador de placas. Em seguida fazem-se três passos sequenciais de lavagem com PBS/Tween 20 a 0,05%. Em seguida, adicionam-se 100 μ l/Napf com anticorpo-anti-IgG de ratinho conjugado com peroxidase de rábano numa diluição adequada em tampão de teste. Após uma incubação de duas horas à temperatura ambiente no agitador de placas, lava-se três vezes com PBS/Tween 20 a 0,05% e cora-se com solução de substrato. Após 10-15 min de desenvolvimento para-se com ácido sulfúrico 2M e mede-se a absorvância a 450 nm (referência 690 nm) num fotómetro.



Numa primeira experiência, determinou-se a ligação dos anticorpos específicos para CD44v6 de ratos 1.1ASML no péptido Ra1 (KWFEN EWQ GK NPPT) (Tabela 1, Figura 3 (A)).

Tabela 1

1.1 ASML μ /ml	Absorção
10,00	1,652
5,00	1,702
2,50	1,658
1,25	1,595
0,63	1,502
0,31	1,211
0,16	0,971
0,08	0,686
0,04	0,458
0,02	0,270

Numa outra pesquisa, sintetizou-se um péptido homólogo a Ra1, a partir da sequência de CD44v6 humana (Hu1, QWFGN RHWEG YRQT). Diferentes anticorpos anti-CD44v6 humano foram ligados a Hu1. Assim, demonstra-se que o VFF-18 apresenta uma afinidade de ligação surpreendentemente maior do que os outros anticorpos utilizados (Tabela 2, figura 3 (B))

Tabela 2

Anticorpos	Absorvância
VFF-2	0,067
VFF-4	1,333
VFF-7	0,199
VFF-18	2,384



Para uma avaliação quantitativa ligam-se, além disso, diferentes anticorpos anti-CD44v6 humano purificados ao péptido Hul, em diferentes concentrações. Também aqui se demonstra uma afinidade de ligação significativamente maior em comparação com os outros anticorpos (Tabela 3, figura 3 (C)).

Tabela 3

Anticorpos µg/ml	VFF-4	VFF-7	VFF-18
10,000	1,225	0,247	2,320
3,333	1,404	0,226	2,550
1,111	0,853	0,094	2,483
0,370	0,336	0,054	2,426
0,123	0,163	0,028	1,354
0,041	0,086	0,025	0,615
0,014	0,048	0,021	0,266
0,005	0,036	0,031	0,095
0,002	0,021	0,021	0,061

Exemplo 3: Ligação de anticorpo específico de CD44v6 marcado radioactivamente em linhas celulares de tumor

Marcação radioactiva do anticorpo

Evapora-se quase até à secura 1 mCi de N-succinimidil-[2,3-³H]-propionato ([³H]-NSP, Amersham 1 mCi/ml) num tubo de ensaio siliconizado, a 0 °C sob vácuo por trompa de água. Adicionam-se 15 µg de anticorpo (1 mg/ml em PBA, pH 7,4) e incuba-se durante 48 horas a 4°C. Em seguida, o excesso de [³H]-NSP é removido por reacção com 30 µl de Glicina 1 M em PBS (20 min à temperatura ambiente). A separação dos anticorpos



marcados da [^3H]-Glicina é realizada numa coluna de Sephadex-G-25-M (volume de coluna de 15 ml), em que se utiliza PBS/BSA a 0,5% como tampão de corrida. O anticorpo marcado com [^3H] surge no volume excluído. A quantidade de anticorpos é determinada num ELISA para detecção de imunoglobulina de ratinho e a actividade específica calculada.

Ligação dos anticorpos marcados radioativamente a células de tumor

Os três anticorpo VFF-7 (anti-v6), VFF-8 (anti-v5) e VFF-18 (anti-v6) são marcados radioativamente com N-succinimidil-[2,3- ^3H]propionato e utilizados em testes de ligação em diferentes linhas celulares de tumor. Utilizaram-se as seguintes linhas celulares: CHO-CD44var: linha celular de Hamster recombinante (ovário de Hamster Chinês), as variantes CD44 humanas (exões v3-v10) expressos à superfície; HCT-116, CX-1, HT-29, CaCo, COLO 205: linha de carcinoma de colon humano; A431: linha de epitélio humano.

As células são adicionadas a placas de cultura de tecidos de 12 poços, incubadas durante a noite a 37 °C numa estufa de CO₂, em seguida lavadas uma vez com PBS e fixadas com etanol (1 min à temperatura ambiente). Em seguida lava-se uma vez com meio de cultura (RPMI 1640/soro fetal de vitela a 10%) e liga-se o anticorpo radioactivo (250 000 dpm/Napf em meio de cultura). Após uma incubação de 25 horas à temperatura ambiente, num agitador de placas, lava-se três vezes com PBS/BSA a 0,5%, solubilizam-se as células com NaOH 0,1M /Triton X-100 a 1% e determina-se a radioactividade num contador de cintilações. A ligação não específica é determinada na presença de um excesso de 100 vezes de anticorpo não marcado. A ligação referia-se a um número único



de células (400 000 células). Após determinação da actividade específica do anticorpo, pode-se expressar a quantidade de anticorpo ligado em fmol.

A tabela 4 e a Figura 4 mostram a ligação específica dos anticorpos nas diferentes linhas celulares. Apesar de a ligação dos anticorpos específicos de v6, VFF-7 e VFF-18 na linha celular recombinante CHO-CD44var ser muito semelhante, os anticorpos apresentam um comportamento de ligação muito diferente. Nalguns casos, observa-se apenas a ligação de VFF-18 e numa menor extensão de VFF-8 (HT-29 CaCo, COLO 205), nas outras linhas celulares, o VFF-18 liga-se muito melhor que o VFF-7.

Tabela 4

Linhas celulares	VFF-7 fmol	VFF-8 fmol	VFF-18 fmol
CHO CD44var	33,50	68,42	46,52
HCT-16	1,44	11,08	20,22
CX-1	0,19	2,20	9,48
HT-29	0,00	2,60	26,07
CaCo	0,03	2,81	12,57
COLO205	0,00	0,32	2,88
A431	8,19	42,32	38,73

Exemplo 4: ELISA para a determinação de CD44v6 solúvel no soro

Soluções:

tampão de revestimento: carbonato de sódio pH 9,6

Tampão de teste: PBS (solução salina tamponada com
fosfato)
BSA a 0,05% (albumina de soro de
bovino)



Tween 20 a 0,05%

Diluyente de amostras Bender MedSystems, Viena, Áustria

Solução de substrato: Kierkegaard & Perry Laboratories,
Gaithersburg Md, USA; substrato de
peroxidase TMB: Peroxidase-solução B
(H₂O₂) 1:1

Revestem-se as placas de microtítulo (Imunoplaça MaxiSorp F96 da NUNC) com 5 µg/ml de um anticorpo específico de CD44v6 (incubação a 4 °C durante a noite). Em seguida, lava-se com PBS/Tween a 0,05%, bloqueia-se os locais de adsorção livres à superfície das placas com tampão de teste (1 hora à temperatura ambiente) e lava-se mais uma vez com PBS/Tween 20 a 0,05%. As amostras de soro são pré-diluídas pelo menos 1:5 em diluyente de amostra e diluídas 1:2 em série nas placas em diluyente de amostra. Em seguida, adicionam-se 50 µl/Napf de anticorpo anti-CD44std conjugado com peroxidase de rábano (Clone BU-52, The Binding site, Birmingham) numa diluição adequada (1:3000 - 1:10 000) em tampão de teste. Após uma incubação de três horas, à temperatura ambiente, num agitador de placas, lava-se três vezes com PBS/Tween 20 a 0,05% e cora-se com solução de substrato. Após 10-15 min de revelação, para-se com ácido sulfúrico 2 M e mede-se a absorvância a 450 nm (Referência 690 nm) num fotómetro.

Para a quantificação, coloca-se uma diluição em série em tampão de teste, de um preparado padrão de CD44 solúvel, paralelamente à amostra de soro. Este preparado é purificado num sobrenadante de células de Hamster chinês recombinante (CHO), que expressam o CD44v3 solúvel. O CD44v3-v10 consiste numa variante de CD44 humana que contém sequências de péptidos codificadas pelos exões v3 a v10.



A tabela 5 e a figura 5 mostram a determinação de variantes de CD44 solúveis, que contêm o exão v6, no soro normal humano. Num ELISA sanduíche utilizaram-se os três anticorpos específicos de v6, VFF-4, VFF-7 ou VFF-18, como anticorpo de revestimento. Em todos os três casos, utilizou-se como anticorpo de controlo um anticorpo específico de CD44std (BU-52, std = standard) conjugado com peroxidase. É apresentado o sinal de dois soros normais humanos diferentes em diluições distintas nestes testes. Em ambos os caso ((A) e (B)) observa-se um sinal substancialmente mais forte com VFF-18, do que com os outros anticorpos.

Tabela 5 A

Soro 1

Diluição	VFF-4	VFF-7	VFF-18
1:5	0,406	0,417	3,143
1:10	0,378	0,289	3,055
1:20	0,296	0,179	2,630
1:40	0,207	0,072	1,778
1:80	0,109	0,062	1,084
1:160	0,050	0,030	0,594
1:320	0,026	0,008	0,318
1:640	0,012	0,007	0,159



Tabela 5 B

Soro 2

Diluição	VFF-4	VFF-7	VFF-18
1:5	1,690	1,280	3,290
1:10	1,756	1,185	3,321
1:20	1,564	0,857	3,163
1:40	1,213	0,468	3,050
1:80	0,699	0,208	2,537
1:160	0,336	0,061	1,666
1:320	0,138	0,014	0,988
1:640	0,054	0,018	0,546

A tabela 6 e a figura 6 mostram o valor sérico de variantes de CD44 que contêm v6. Por meio de dois ELISA diferentes, determinou-se o teor de CD44var solúvel no soro de 6 dadores saudáveis. Num teste, utilizou-se VFF-7, noutros VFF-18, como anticorpo de revestimento; ambos os anticorpos reconhecem o exão 6. Como preparado de comparação utilizou-se em ambos os casos uma variante de CD44 solúvel (exão v3-v10), recombinante, produzida em células CHO. O teste ELISA de VFF-18 mostrou em média um valor cerca de 3,5 vezes maior do que o ELISA de VFF-7. Isto significa, que o CD44var solúvel existente no soro, é, comparativamente, melhor reconhecido com proteínas recombinantes de VFF-18, do que de VFF-7.



Tabela 6

Dador	VFF-7 ng/ml	VFF-18 ng/ml	VFF-18/VFF-7
1	18,2	75,9	4,17
2	32,1	85,5	2,66
3	22,4	87,6	3,91
4	27,7	91,6	3,31
5	26,8	98,3	3,67
6	95,4	332	3,48
valor médio			3,53
DP			0,52
CV%			14,9%

Literatura

Barbas C F Björling E, Chiodi F, Dunlop N, Cababa D, Jones T M, Zebedee S L, Persson M A A, Nara P L, Norrby E, Burton D R Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus *in vitro*. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 89:9339-9343 (1992).

Breitz H B, Weiden P L, Vanderheyden J-L, Appelbaum J W, Bjorn M J, Fer M F, Wolf S B, Ratcliff B A, Seiler C A, Foisie D C, Fisher D R, Schroff R W, Fritzberg A R, Abrams P G. Clinical experience with rhenium-186-labeled monoclonal antibodies for radioimmunotherapy: results of phase I trials. *J. Nucl. Med.* 33:1099-1112 (1992)

Catty, D., Raykundalia, C. ELISA and related immunoassays. In: Catty, D (Hrsg.). *Antibodies Vol. II* IRL Press Oxford (1989), 97-152, pg 105-109



Catty D., Murphy G. Immunoassays using radiolabels. In: Catty, D (Hrsg.) *Antibodies Vol. II* IRL Press Oxford (1989), 77-96.

Chatal J-F, Saccavini J-C, Gestin J-F, Thédrez P, Curtet C, Kremer M, Guerreau D, Nolibé D, Fumoleau P, Guillard Y. Biodistribution of indium-111-labeled OC 125 monoclonal antibody intraperitoneally injected into patients operated on for ovarian carcinomas. *Cancer Res.* 49:3087-3094 (1989).

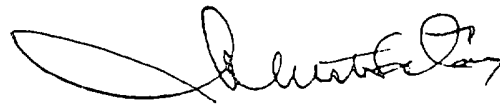
Chaudhary V K, Batra J K, Galdo M G, Willingham M C, Fitzgerald D J, Pastan I. A rapid method of cloning functional variable-region antibody genes in *Escherichia coli* as single chain immunotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1066 (1990).

Colcher D, Esteban J, Carrasquillo J A, Sugarbaker P, Reynolds J C, Bryant G, Larson S M, Scholm J. Complementation of intracavity and intravenous administration of a monoclonal antibody (B72.3) in patients with carcinoma. *Cancer Res.* 47:4218-4224 (1987).

Coloma M J, Hastings A, Wims L A, Morrison S L. Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction. *J. Immunol. Methods* 152:89-104 (1992)

Friedmann P N, McAndrew S J, Gawlak S L, Chace D, Trail P A, Brown J P, Siegall C B. BR96 sFv-PE40, a potent single-chain immunotoxin that selectively kills carcinoma cells. *Cancer Res.* 53:334-339 (1993)

Goodwin D A. A new approach to the problem of targeting specific monoclonal antibodies to human tumors using anti-hapten chimeric antibodies *J. Nucl. Med. Biol.* 16:645 (1989)



Günthert, U., Hofmann, M. Rudy, W. Reber, S., Zöller, M. Haußmann, I., Matzku, S. Wenzel, A., Ponta, H. and Herrlich, P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potencial to rat carcinoma cells. *Cell* 65:13-24 (1991)

Guedson, J.I. Ternynck, T. Avrameas, S. J. *Histochem. Cytochem.* 27:1131 (1979)

Güssow D, Seemann G. Humanization of monoclonal antibodies. *Methods Enzymol.* 203:99-121 (1991)

Heider, K-H., Hofmann, M. Horst, E. van den Berg, F. Ponta, H., Herrlich, P. and Pals, S.T. A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J. Cell Biol.* 120:227-233 (1993a).

Heider, K-H., Dämmrich J., Skroch-Angel, P., Müller-Hermelink, H-K., Vollmers, H-P., Herrlich, P. and Ponta, H. Differential expresion of CD44 splice variants in intestinal and diffuse type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer Res.* 53:4197-4203 (1993b).

Hofmann, M., Rudy, W. Zöller, M. Tölg, C., Ponta H, Herrlich P. and Günthert, U. CD44 splice variants confer metastatic behaviour in rats:homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res.* 51:5292-5297 (1991).

Johnson, G.D. Immunofluorescence. In: Catty, D (Hrsg.) *Antibodies Vol. II.* IRL Press Oxford (1989) 179-200 veja-se pág 180-189.



Johnson S., Bird R.E. Construction of single-chain derivatives of monoclonal antibodies and their production in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 203:88-98 (1991)

Kearney, J.F., Radbruch A., Liesegang B., Rajewski K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. immunol.* 123:1548 (1979)

Keenan A M, Weinstein J N, Carrasquillo J A, Bunn P A Reynolds J C Foon K A et al. Immunolymphoscintigraphy and the dose dependence of ¹¹¹In-labeled T101 monoclonal antibody in patients with cutaneous T-cell Lymphoma. *Cancer Res.* 47:6093-6099 (1987)

Köhler, G. Milstein, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 265:495 (1975)

Koopman, G. Heider, K-H., Horts, E. Adolf, G.R., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., Pals, S. T. Activated human lymphocytes and aggressive Non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. *J. Exp Med.* 177:897-904 (1993).

Kreitman R J Hansen H J, Jones A L, Fitzgerald D J P Goldenberg D M, Pastan I. *Pseudomonas* exotoxin-based immunotoxins containing the antibody LL2 ou LL2-Fab' induce regression of subcutaneous human B-cell lymphoma in mice. *Cancer Res* 53:819-825 (1993).

Larson S M, Cheung N-K V, Leibel S A. Radioisotope Conjugates In: De Vita V T, Hellman S, Rosenberg S A (Hrsg.). *Biologic*



therapy of cancer. J.B. Lippincott Comp., Philadelphia, 496-511 (1991).

Mulshine J L, Magnani J L, Linnoila R I: Applications of monoclonal antibodies in the treatment of solid tumors. In:Devita V T, Hellman S, Rosenberg s A (Hrsg.). Biologic therapy of cancer. J.B. Lippincott Comp., Philadelphia, 563-588 (1991).

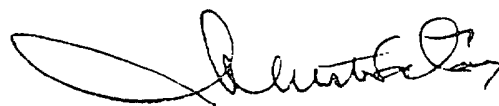
Nesbit M, Fu Z F, McDonald-Smith J, Steplewski Z, Curtis P J. Production of a functional monoclonal antibody recognizing human colorectal carcinoma cells from a baculovirus expression system *J. Immunol Methods* 151: 201-208 (1992)

Perkins A C, Pimm M V A role for gamma scintigraphy in cancer immunology and immunotherapy *Eur. J. Nucl. Med.* 19:1054-1063 (1992)

Press O W, Eary J F, Badger C C, Martin P J, Appelbaum F R, Levy R, Miller R, Brown S, Nelp W B, Krohn K A, Fisher D, DeSantes K, Porter B, Kidd P, Thomas E D, Bernstein I D Treatment of refractory Non-Hodgkin's lymphoma with radiolabeled MB-1 (anti-CD37) antibody. *J. Clin. Oncol.* 7:1027-1038 (1989).

Rudy W., Hofmann, M. Schwartz-Albiez, R., Zöller, M. Heider, K-H, Ponta, H., Herrlich, P. The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants: Each one individually suffices to confer metastatic behaviour. *Cancer Res.* 53:1262-1268 (1993)

Schrappe M, Bumol T F, Apelgren L D, Briggs S L, Koppel G A, Markowitz D D, Mueller B M, Reisfeld R A. Long-term growth



suppression of human glioma xenografts by chemoimmunoconjugates of 4-desacetylvinblastine-3-carboxyhydrazide and monoclonal antibody 9.2.27 *Cancer Res.* 52:3838-3844 (1992)

Screaton G R., Bell, M.V., Jackson D.G. Cornelis, F.B. Gerth, U. and Bell J I. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:12160-12164 (1992)

Sears H F, Mattis J, Herlyn D, Häyry P, Atkinson B, Ernst C, Stepkowski Z, Koprowski H., Phase-I clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumours. *Lancet* 1982 (I):762-765 (1982)

Seiter, S., Arch, R., Reber, S. Komitowski, D., Hofmann, M., Ponta, H., Herrlich P., Matzku, S. Zöller, M. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J. Exp Med* 177:443-455 (1993)

Senter P D, Schreiber G J, Hirschberg D L, Ashe S A, Hellström K E, Hellström I. Enhancement of the *in vitro* and *in vivo* antitumor activities of phosphorylated mitomycin C and etoposide derivatives by monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugates. *Cancer Res.* 49:5789-5792 (1989).

Shin S-U, Morrison S.L. Production and properties of chimeric antibody molecules. *Methods Enzymol.* 178:459-476 (1989)

Siccardi A G, Buraggi G L, Callegaro L, Colella A C, DeFilippi P G et al. Immunoscintigraphy of adenocarcinomas by means of radiolabeled F(ab')₂ fragments of an anti-carcinoembryonic



antigen monoclonal antibody: a multicenter study. *Cancer Res.* 49:3095-3103 (1989)

Smith, D.B. Johnson, K.S. single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67:31-40 (1988)

Srivastava S C (Hrsg.). Radiolabeled monoclonal antibodies for imaging and therapy. *Life Sciences Series A 152*, Plenum New York (1988)

Tölg C., Hofmann, M. Herrlich, P. and Ponta, H. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids Res.* 21:1225-1229 (1993)

Theuer C P, Kreitman R J, Fitzgerald D J, Pastan I. Immunotoxins made with a recombinant form of *pseudomonas* exotoxin A that do not require proteolysis for activity. *Cancer Res.* 53:340-347 (1993).

Thomas G D, Dykes P W Bradwell A R. Antibodies for tumour immunodetection and methods for antibody radiolabeling. In: Catty D (Hrsg.) Antibodies. IRL Press Oxford, 223-244 (1989), 223-244

Thompson C H, Stacker S A, Salehi N, Lichtenstein M, Leyden M J, Andrews J T. Immunoscintigraphy for detection of lymph node metastases from breast cancer. *Lancet* 1984 (2):1245-1247 (1984)

Vitetta E S, Thorpe P E., Immunotoxins. In: De Vita V T, Hellman S, Rosenberg S A (Hrsg.). Biologic therapy of cancer. J. B. Lippincott Comp., Philadelphia, 482-495 (1991)

Vitetta E S, Stone M, Amlot P, Fay J, May R, Till M, Newman J, Clark P, Collins R, Cunningham D, Ghetie V., Uhr J W, Thorpe P E. Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma. *Cancer Res.* 51:4052-4058 (1991).

Wang S-M, Chern J-W, Yeh M-Y, Ng J C, Tung E, Roffler S R. Specific activation of glucoronide prodrugs by antibody-targeted enzyme conjugates for cancer therapy. *Cancer Res.* 52:4484-4491 (1992)

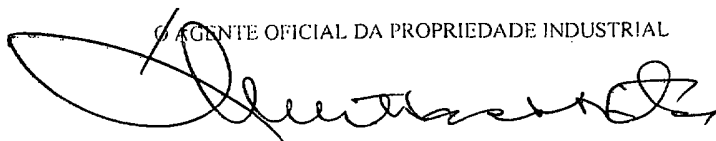
Weiner L M, O'Dwyer J, Kitson J, Comis R L, Frankel A E, Bauer R J, Kopnrad M S, Groves S. Phase I evaluation of an anti-breast carcinoma monoclonal antibody 260F9-recombinant ricin A chain immunoconjugate. *Cancer Res.* 49:4062-4067 (1989)

Wielenga, V.J.M, Heider K-H, Offerhaus, G.J.A., Adolf, G.R. van den Berg, F.M., Ponta, H. Herrlich, P., Pals, S.T. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res.* 53:4754-4756 (1993)

Winter, G. Griffith, A.D. Hawkins, R.E. Hoogenboom, H.R. Making antibodies by phage display technology. *Ann Rev. Immunol.* 12, 433-455 (1994).

Lisboa, 16 de Novembro de 2000

AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL





REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo contra um epítopo dentro da sequência de aminoácidos, que é codificada pelo exão v6 variável do gene de CD44, caracterizado por ser o anticorpo VFF-18, que é formado a partir da linha celular de hibridoma com o número de depósito da DSM ACC2174
2. Linha celular de hibridoma com o número de depósito da DSM ACC2174
3. Molécula de anticorpo, que se pode obter por modificação química ou enzimática de um anticorpo de acordo com a reivindicação 1.
4. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 3, caracterizada por ser um fragmento de um anticorpo de acordo com a reivindicação 1.
5. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por ser um fragmento Fab ou $F(ab')_2$.
6. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 3, caracterizada por o anticorpo estar ligado a uma outra molécula.
7. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por a outra molécula ser um polipeptídeo.
8. Molécula de anticorpo de acordo com uma das reivindicações 3 a 5, caracterizada por estar ligada a um isótopo radioactivo.

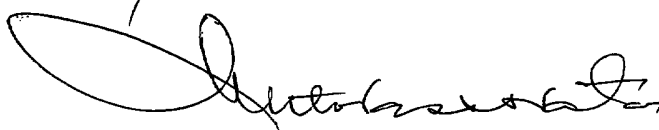


9. Molécula de anticorpo recombinante com o idiótipo de um anticorpo de acordo com a reivindicação 1.
10. Molécula de anticorpo recombinante de acordo com a reivindicação 9, caracterizada por ser uma molécula de anticorpo quimérica, humanizada, de cadeia simples ("single chain") ou produzida por "chain shuffling".
11. Molécula de anticorpo recombinante de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizada por estar ligada a uma outra molécula ou com um isótopo radioativo.
12. Molécula de anticorpo que reconhece o mesmo epítopo que o anticorpo de acordo com a reivindicação 1.
13. Utilização de um anticorpo ou molécula de anticorpo de acordo com uma das reivindicações 1 ou 3 até 12 para processos de diagnóstico fora do corpo humano ou de animais.
14. Utilização de acordo com a reivindicação 13, caracterizada por o processo ser um imunoensaio ligado a enzima ou um radioimunoensaio.
15. Utilização de acordo com a reivindicação 13, caracterizada por o processo ser um processo imunohistoquímico.
16. Anticorpo ou molécula de anticorpo de acordo com uma das reivindicações 1 ou 3 até 12, para utilização farmacêutica
17. Utilização de um anticorpo, ou molécula de anticorpo, de acordo com uma das reivindicações 1 ou 3 a 11, para a

preparação de um meio para o diagnóstico de tumores in vivo.

Lisboa, 16 de Novembro de 2000

AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Antonio Costa', written over a horizontal line.

[Handwritten signature]

1/7

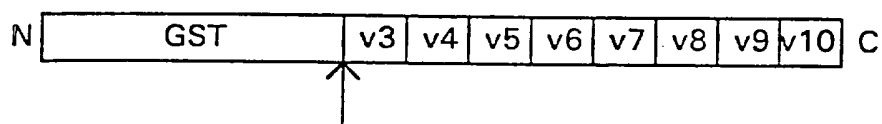


FIG. 1



2/7

 * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Rato: WADPNSTTEEAATQKEKWFENWQGKNPPTPSEDSHVTEGT T
Humano: QATPSSTTEETATQKEQWFGNRWHEGYRQTPREDSHSTTGTA

Peptido Ra1 ou Hu1

FIG. 2

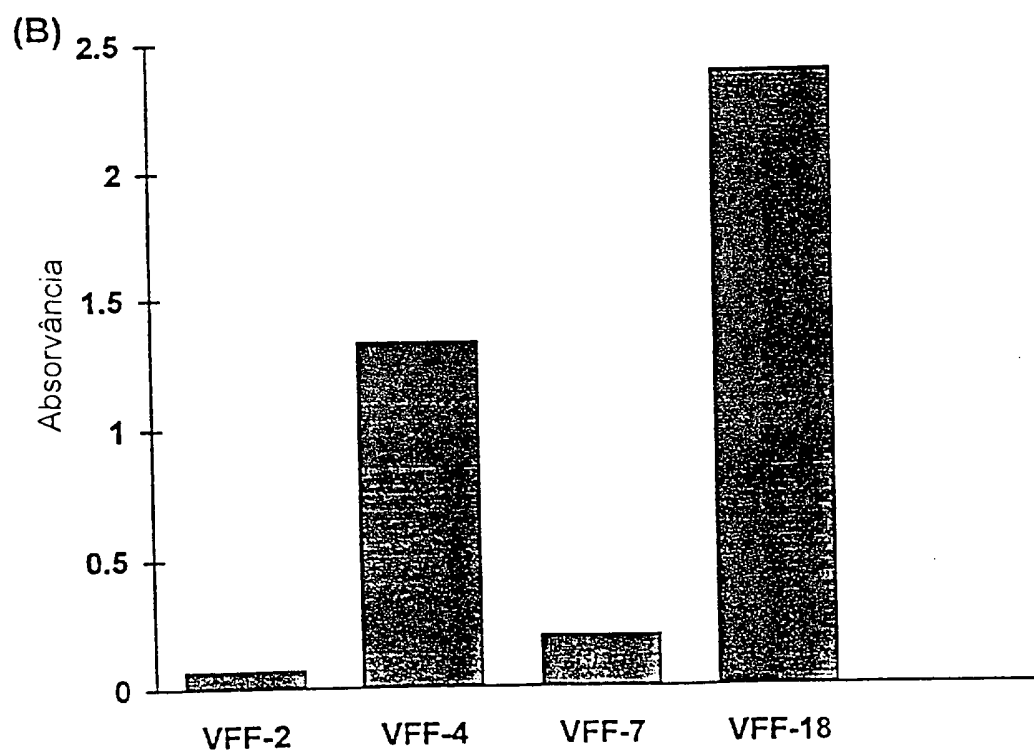
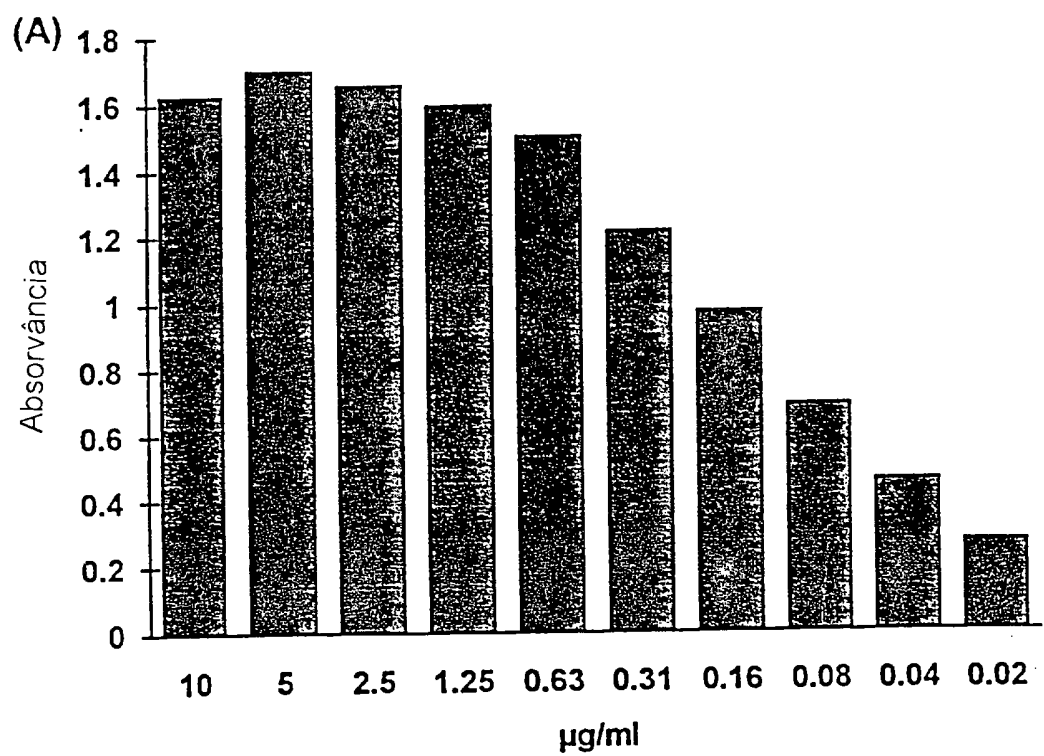
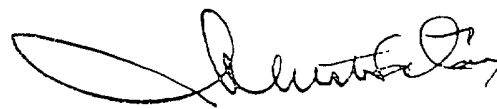


FIG. 3

Handwritten signature

4/7

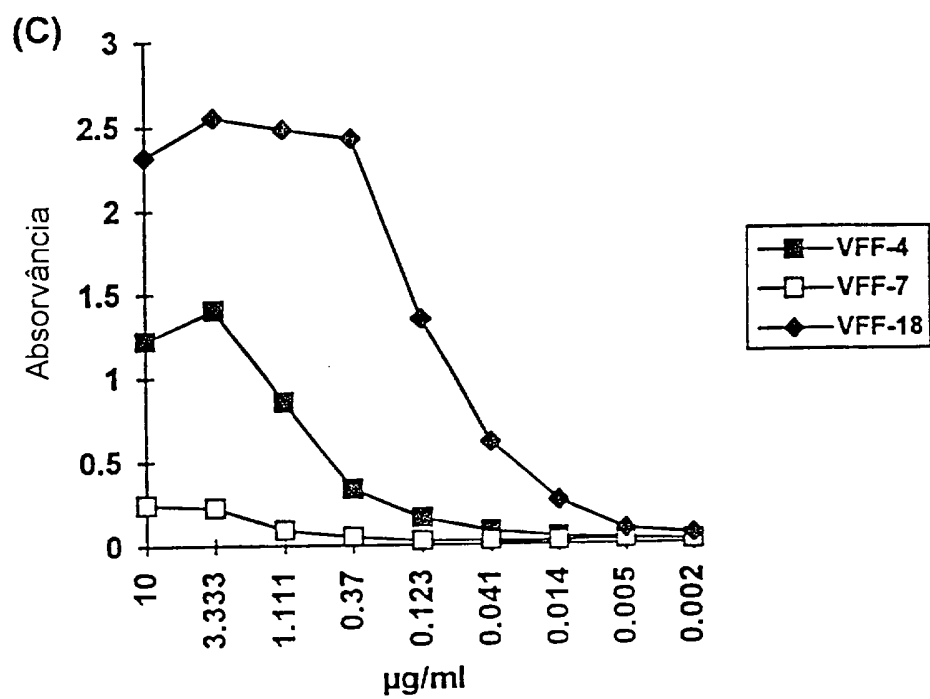


FIG. 3 (continuação)

[Handwritten signature]

5/7

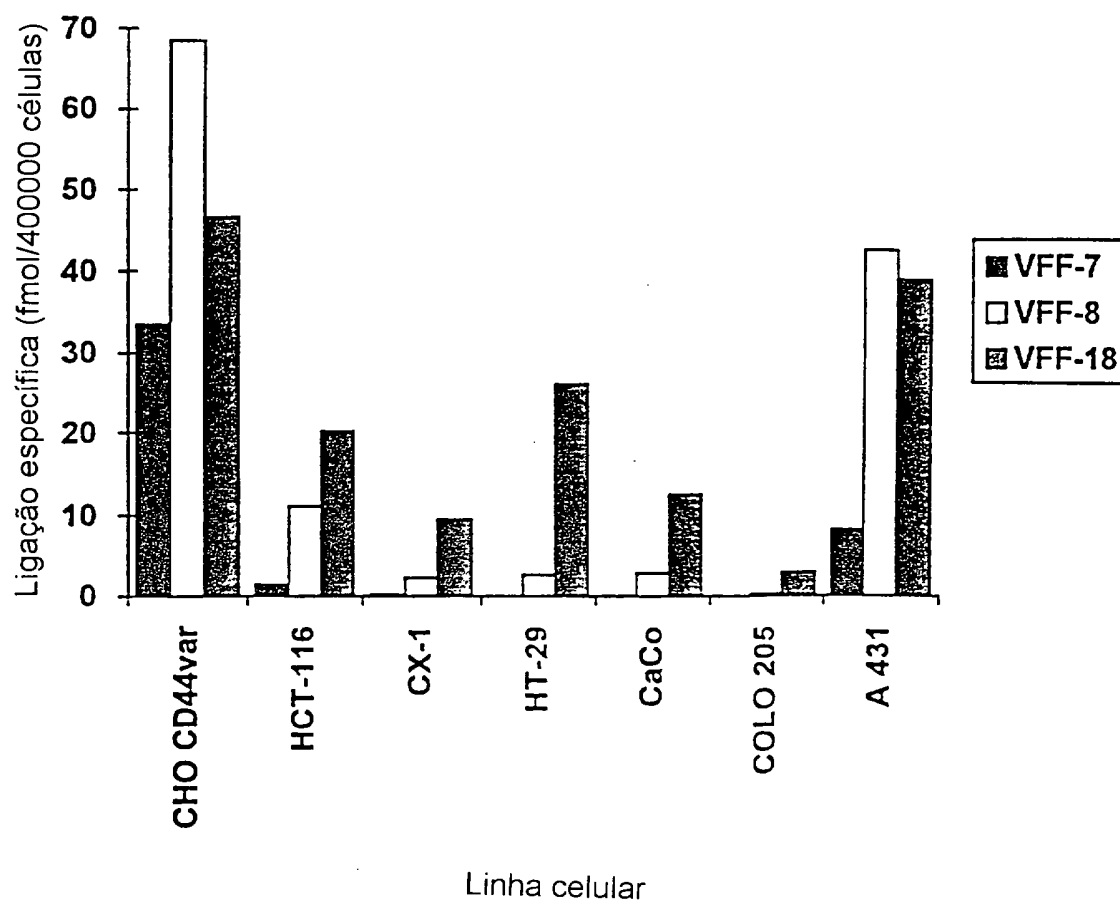


FIG. 4

6/7

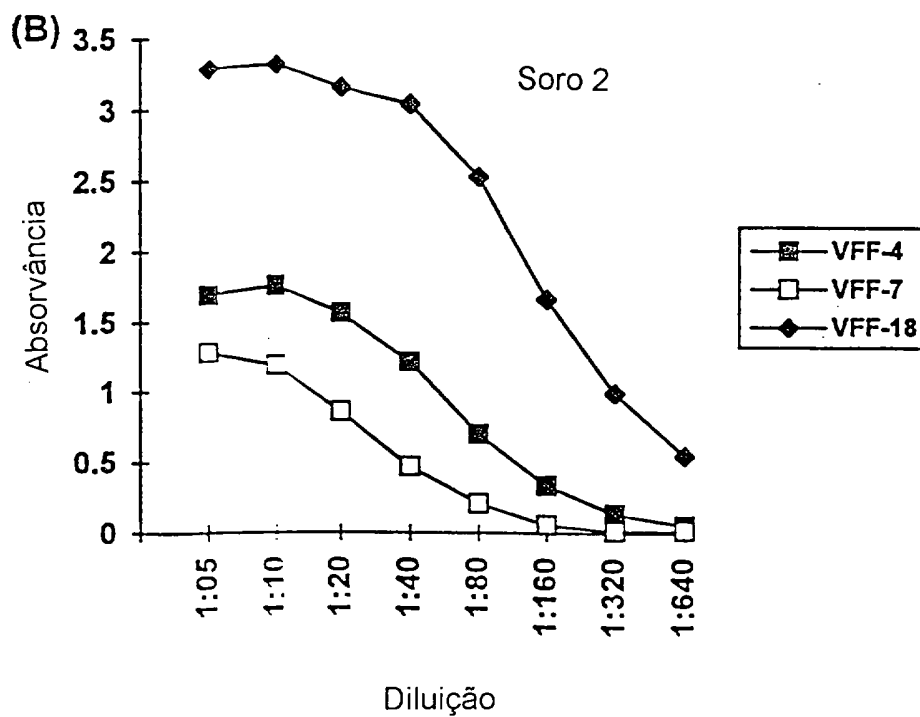
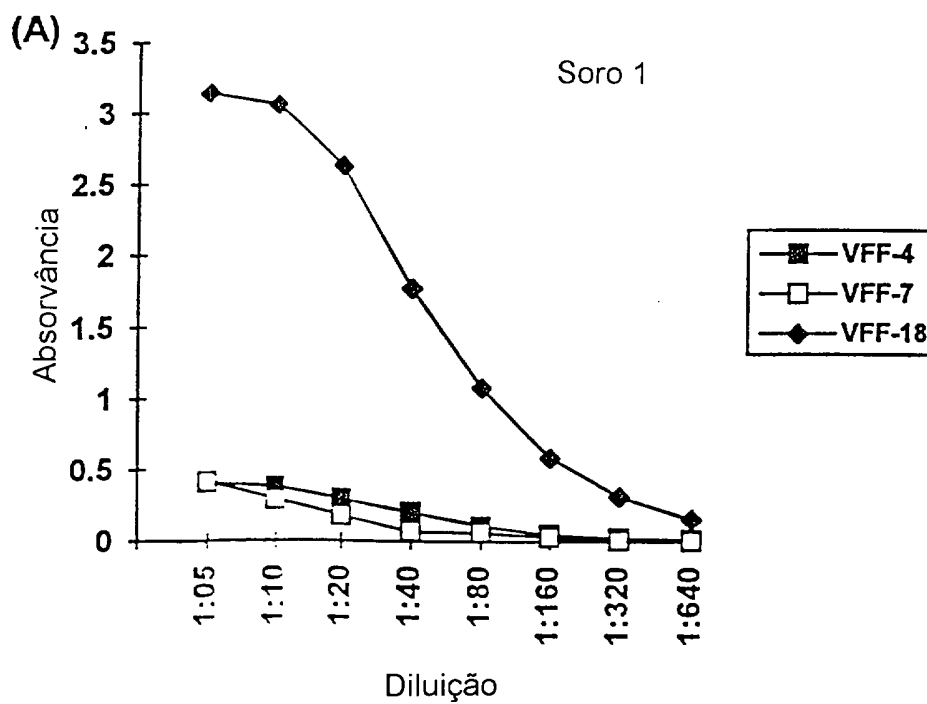


FIG. 5

[Handwritten signature]

7/7

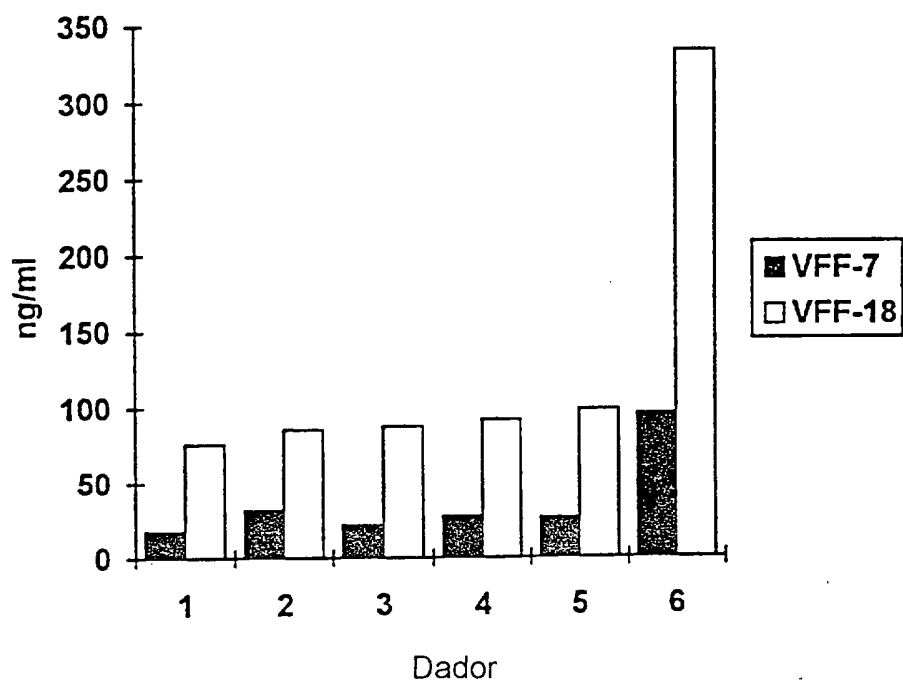


FIG. 6