

(11) Número de Publicação: **PT 1390389 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 39/395 (2007.10) **C07K 16/00** (2007.10)
C07K 16/18 (2007.10) **C07K 16/30** (2007.10)
C07K 16/46 (2007.10)

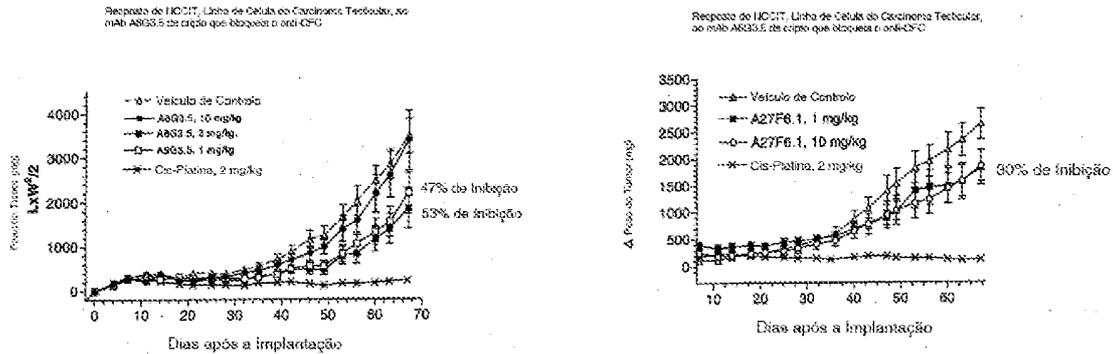
(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2002.04.17	(73) Titular(es): BIOGEN IDEC MA INC. 14 CAMBRIDGE CENTER CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02142 US
(30) Prioridade(s): 2001.04.26 US 286782 P 2001.05.17 US 293020 P 2001.06.26 US 301091 P 2002.03.22 US 367002 P	(72) Inventor(es): MICHELE SANICOLA-NADEL US KEVIN WILLIAMS US SUSAN SCHIFFER US PAUL RAYHORN US
(43) Data de publicação do pedido: 2004.02.25	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2009.01.14 066/2009	

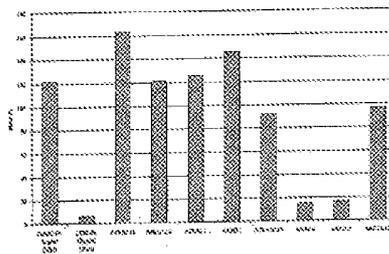
(54) Epígrafe: **ANTICORPOS QUE BLOQUEIAM O CRIPTO E AS UTILIZAÇÕES DOS MESMOS**

(57) Resumo:

RESUMO

"ANTICORPOS QUE BLOQUEIAM O CRIPTO E AS UTILIZAÇÕES DOS MESMOS"

FACS: Células 293/ALK4 que ligam o CR-Fc



A invenção fornece anticorpos que bloqueiam o cripto, ou os seus fragmentos biologicamente funcionais, e as suas utilizações. Os anticorpos que se ligam ao cripto e que modulam a sinalização de cripto são fornecidos. Os anticorpos que se ligam ao cripto e que bloqueiam a interacção entre o cripto e ALK4 são fornecidos. Os anticorpos que se ligam ao cripto e modulam o crescimento tumoral também são fornecidos. Os anticorpos que se ligam ao cripto, que modulam a sinalização e modulam o crescimento tumoral também são fornecidos. Os anticorpos que se ligam ao cripto, que modulam a sinalização e modulam o crescimento tumoral também são fornecidos. Os anticorpos que se ligam ao cripto, bloqueiam a interacção entre o cripto e ALK4 e modulam o crescimento tumoral são fornecidos. A invenção também fornece métodos de utilização desses anticorpos em aplicações terapêuticas, de diagnóstico, e de investigação.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS QUE BLOQUEIAM O CRIPTO E AS UTILIZAÇÕES DOS MESMOS"

Aplicações Relacionadas

Esta é uma continuação do documento USSN 60/367,002, depositado a 22 de Março de 2002, o qual é uma continuação em parte do documento USSN 60/301,091, depositado a 26 de Junho de 2001, o qual é uma continuação em parte do documento USSN 60/293,020, depositado a 17 de Maio de 2001, o qual é uma continuação em parte do documento USSN 60/286,782, depositado a 26 de Abril de 2001.

Campo Técnico da Invenção

A presente invenção diz respeito à genericamente aos campos da biologia genética e celular e molecular. Mais particularmente, a invenção diz respeito a anticorpos que se ligam e que modulam a sinalização de cripto, aos conjuntos que compreendem tais anticorpos, e os métodos que utilizam os anticorpos.

Antecedentes da Invenção

O cripto é uma proteína da superfície celular de 188 resíduos de aminoácidos, acidentalmente descoberto, isolado em uma trama de ADNc de uma biblioteca de carcinomas embrionários humanos (Ciccodicola *et al.*, 1989, *EMBO J.*, volume **8**, no. 7, páginas 1987-1991). A proteína de cripto tem pelo menos dois domínios notáveis: um domínio rico em cisteína e um domínio primeiramente caracterizado como semelhante ao domínio encontrado na família do factor de crescimento epidérmico (EGF). O cripto foi inicialmente

classificado como um membro da família EGF (Ciccodicola *et al.*, supra); no entanto, análises posteriores mostraram que o cripto não ligou qualquer dos receptores de EGF conhecidos e o seu domínio semelhante a EGF foi realmente divergente da família de EGF (Bianco *et al.*, 1999, *J. Biol. Chem.*, **274**:8624-8629).

O caminho de sinalização do cripto manteve-se evasivo, apesar de investigação continuada, com a literatura apoiando a activação de diferentes caminhos, incluindo um caminho de quinase de MAP (DeSantis *et al.*, 1997, *Cell Growth Differ.*, **8**:1257-1266; Kannan *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.*, **272**:3330-3335), o caminho de TGF- β (Gritsman *et al.*, 1999, *Development*, **127**:921-932; Schier *et al.*, 2000, *Nature*, **403**:385-389), as interacções possíveis com o caminho Wnt (Salomon *et al.* *Endocr Relat Cancer*. Dezembro de 2000; **7**(4):199-226 e diafonia com o caminho de EGF (Bianco *et al.*, 1999, *J. Biol. Chem.*, **274**:8624-8629).

A patente norte-americana 5.256.643 e dois pedidos divisionários relacionadas a ela (as patentes norte-americanas 5.654.140 e 5.792.616), divulgam um gene de cripto humano, uma proteína de cripto, e anticorpos para cripto.

A patente norte-americana 5.264.557 e três pedidos divisionários relacionadas a ela (as patentes norte-americanas 5.620.866, 5.650.285 e, 5.854.399), divulgam um gene e uma proteína relacionados com o cripto humano. Também divulgados são anticorpos que se ligam à proteína relacionada com o cripto, mas não reagem cruzadamente através da ligação à própria proteína de cripto.

O excesso de expressão da proteína de cripto está associada a muitos tipos de tumor (incluindo mas não limitados a mama, testículos, cólon, pulmão, ovário, bexiga, útero, cervical,

pâncreas e estômago), como demonstrado pelo imunomanchamento de tecido humano com anticorpos policlonais de coelho destacados contra pequenos péptidos de cripto. Panico *et al.*, 1996, *Int. J. Cancer*, **65**:51-56; Byrne *et al.*, 1998, *J Pathology*, **185**:108-111; De Angelis *et al.*, 1999, *Int J Oncology*, **14**:437-440. A técnica está, portanto, na necessidade de meios de controlar, restringir e/ou prevenir tal superexpressão, modulando a sinalização de cripto, e modulando as consequências da expressão de cripto (ou seja, a promoção e/ou manutenção de transformação de células).

Sumário da Invenção

A presente invenção fornece novos anticorpos que se ligam especificamente a cripto, e métodos de fabricar e utilizar tais anticorpos. A invenção também fornece anticorpos que se ligam a cripto e modulam a sinalização de cripto ou a interacção de proteínas, por exemplo, um anticorpo que se liga a cripto tal que o sinal resultante de uma interacção de proteína com o cripto é modulada por defeito. A invenção também fornece anticorpos que se ligam a cripto e bloqueiam a interacção entre o cripto e ALK4. A invenção também fornece anticorpos que se ligam a cripto e modulam o crescimento tumoral. A invenção também fornece anticorpos que se ligam a cripto, modulam a sinalização de cripto e modulam o crescimento tumoral. A invenção também fornece anticorpos que se ligam a cripto, bloqueiam a interacção entre o cripto e ALK4 e modulam o crescimento tumoral.

Em um aspecto da invenção, o anticorpo da presente invenção liga-se especificamente a um epítopo seleccionado a partir do grupo de epítopos ao qual os anticorpos A10B2.18 (ADESÃO ATCC NO. PTA-3311) ou B3F6.17 (ADESÃO ATCC NO. PTA-3319) se ligam.

Em um outro aspecto da invenção, o anticorpo da presente invenção liga-se especificamente a um epítopo no domínio de ligação ligante/receptor de cripto. O cripto pode ser selecionado a partir de CR-1 (SEQ ID NO: 1) ou RC-3 (SEQ ID NO: 2).

Em uma outra forma de realização o epítopo ao qual os anticorpos da presente invenção se ligam está no domínio gerador dos resíduos 46-62 de aminoácidos de cripto. Os anticorpos que especificamente se ligam ao epítopo no domínio gerador dos resíduos 46-62 de aminoácidos de cripto incluem mas não estão limitados a A10B2.18 (ADESÃO ATCC NO. PTA-3311) e B3F6.17 (ADESÃO ATCC NO. PTA-3319).

A presente invenção também contempla anticorpos que se ligam especificamente a cripto e bloqueiam a interacção entre o cripto e ALK4.

Em um outro aspecto, a presente invenção contempla anticorpos que se ligam especificamente a cripto e são capazes de modular o crescimento tumoral.

Em ainda um outro aspecto, a presente invenção contempla anticorpos que se ligam especificamente a cripto, os quais são capazes de modular a sinalização de cripto, e que são capazes de modular o crescimento tumoral.

Em ainda um outro aspecto, a presente invenção contempla anticorpos que se ligam especificamente a cripto, os quais são capazes de bloquear a interacção entre o cripto e ALK4, e que são capazes de modular o crescimento tumoral.

Em uma outra forma de realização, a presente invenção fornece um anticorpo produzido por um hibridoma seleccionado a partir do grupo constituído por B3F6.17 (Adesão ATCC No. PTA-3319).

Os anticorpos da presente invenção incluem mas não estão limitados a anticorpos monoclonais, policlonais, humanizados, quiméricos e humanos.

A presente invenção também fornece uma composição para a administração a um sujeito que tem um tumor que expressa o cripto compreendendo pelo menos um dos anticorpos descritos acima. Em uma forma de realização mais particular, o sujeito é um ser humano. A composição pode incluir um excipiente farmacologicamente aceitável. Os anticorpos descritos acima podem ser conjugados com um agente quimioterápico ou ser fornecidos em combinação com um quimioterápico não conjugado.

Contemplados em um outro aspecto da invenção são métodos de modular o crescimento de células tumorais in vitro em uma amostra que compreende a etapa de adicionar à amostra as composições acima descritas.

Também contemplados são os métodos de modular o crescimento de células tumorais in vivo em um sujeito que compreende o passo de administrar ao sujeito uma quantidade efectiva das composições acima descritas. Em uma forma de realização particular o sujeito é um ser humano.

Um outro aspecto da invenção são métodos de tratamento de indivíduos com um tumor que sobre-expressam o cripto, compreendendo administrar ao sujeito as composições acima descritas em uma quantidade eficaz. As composições para administração podem incluir

excipientes farmacologicamente aceitáveis, anticorpos conjugados de agentes quimioterapêuticos e anticorpos administrados em combinação com agentes quimioterapêuticos não conjugados.

Os métodos da presente invenção são particularmente úteis na modulação do crescimento de células tumorais e/ou no tratamento de um sujeito (isto é, um ser humano), que tem um tumor em que as células do tumor são selecionadas a partir das células tumorais da mama, testículos, cólon, pulmão, ovário, bexiga, útero, cervical, pâncreas e estômago.

Em ainda uma outra forma de realização, a presente invenção contempla métodos para determinar se um tecido expressa o cripto, compreendendo a etapa de análise do tecido do sujeito em um imuno-ensaio utilizando qualquer um dos anticorpos acima descrito. Também são contempladas métodos para determinar se uma linha celular sobre-expressa o cripto, compreendendo a etapa de análise da linha celular em um imuno-ensaio utilizando qualquer um dos anticorpos acima descritos.

Estes e outros aspectos da invenção são estabelecidos em maior detalhe abaixo na Descrição Detalhada da invenção.

Descrição Detalhada da Invenção

Os anticorpos que se ligam especificamente ao cripto e as suas utilizações para modular a sinalização de cripto ou a interação de proteínas, e/ou bloquear a interação entre o cripto e ALK4, e/ou modular o crescimento das células tumorais foram descobertos. Várias classes de anticorpos que se ligam especificamente a cripto foram descobertos, incluindo, por exemplo, os anticorpos que especificamente se ligam a um epítipo no domínio de ligação ligando/receptor quer de uma proteína de cripto nativa ou de uma

forma desnaturada de cripto; anticorpos que ligam um domínio semelhante a um EGF, um domínio rico em cys, ou um péptido (por exemplo, de cerca de 3 a cerca de 20 aminoácidos) da região que compreende os resíduos de aminoácidos 46 a 150; anticorpos que se ligam a cripto e modulam a sinalização de cripto; anticorpos que se ligam a cripto e modulam o crescimento de células tumorais; e anticorpos que se ligam a cripto, modulam a sinalização de cripto, e modulam o crescimento de células tumorais. Estes anticorpos são seleccionados utilizando ensaios convencionais in vitro para seleccionar anticorpos que ligam o domínio de ligação ligando/receptor, modulam a sinalização de cripto, ou modulam o crescimento de células tumorais.

Os métodos desta invenção são úteis no tratamento de tumores malignos ou benignos de mamíferos, em que a taxa de crescimento do tumor (que é uma taxa anormal de tecido normal) é, pelo menos parcialmente dependente de cripto. A taxa de crescimento anormal é uma taxa de crescimento que é em excesso do que é exigido para a homeostase normal e em que está em excesso, para além dos tecidos normais da mesma origem.

Definições

Várias definições são feitas ao longo deste documento. A maioria das palavras tem o significado que seria atribuído a essas palavras por um especialista na matéria. As palavras especificamente definidas quer abaixo ou em qualquer outra parte do presente documento têm o significado fornecido no contexto da presente invenção como um todo e, são tipicamente entendidos pelos especialistas na matéria.

Conforme aqui utilizado, o termo "região" significa uma parte fisicamente contígua da estrutura primária de uma biomolécula. No

caso das proteínas, uma região é definida por uma porção contígua da sequência de aminoácidos dessas proteínas.

Conforme aqui utilizado, o termo "domínio" refere-se a uma parte estrutural de uma biomolécula que contribui para uma função conhecida ou suspeita da biomolécula. Os domínios podem ser co-extensivos com as regiões ou as partes dos mesmos; os domínios também podem incorporar uma porção de uma biomolécula que é distinta de uma região particular, para além de toda ou parte dessa região. Os exemplos de domínios de proteínas incluem, mas não estão limitados ao domínio extracelular (amplitudes de cerca do resíduo 31 a cerca do resíduo 188 de cripto, incluindo cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) e CR-3 (SEQ ID NO: 2)) e o domínio transmembranar (amplitudes de cerca do resíduo 169 a cerca do resíduo 188 de cripto, incluindo cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) e CR-3 (SEQ ID NO: 2)). Um domínio de ligação de ligando/receptor da proteína de cripto estende-se de cerca do resíduo 75 a cerca do resíduo 150 de cripto, incluindo cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) e CR-3 (SEQ ID NO: 2) e inclui o domínio semelhante a EGF de cripto, que se estende, por exemplo, de cerca do resíduo 75 a cerca do resíduo 112 de cripto, incluindo cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) e CR-3 (SEQ ID NO: 2) e o domínio rico em cisteína de cripto, que se estende, por exemplo, de cerca do resíduo 114 a cerca do resíduo 150 de cripto, incluindo cripto, CR-1 (SEQ ID NO: 1) e CR-3 (SEQ ID NO: 2). Por exemplo, muitos anticorpos monoclonais foram identificadas como ligando-se aos domínios semelhantes ao EGF ou ricos em cys. Adicionalmente o anticorpo monoclonal A10B2.18 (ADESÃO ATCC NO. PTA-3311), B3F6.17 (ADESÃO ATCC NO. PTA-3319) e A17A2.16 foram identificados como ligando-se a um epítipo formado em um domínio na região de amplitude dos resíduos de aminoácidos 46-62, a montante do domínio semelhante a EGF. Ver o Exemplo 3 abaixo. Um epítipo no domínio de ligação de ligando/receptor é um epítipo, se formado na proteína de

cripto nativa conformacional, ou a proteína de cripto desnaturada, à qual os anticorpos se podem ligar.

Conforme aqui utilizado, o termo "anticorpo" destina-se a referir-se a anticorpos completos, intactos e Fab, Fab', F(ab)₂, e outros seus fragmentos. Os anticorpos completos, intactos incluem, mas não estão limitados a, anticorpos monoclonais tais como anticorpos monoclonais de murinos, anticorpos policlonais, anticorpos quiméricos, anticorpos humanos, e anticorpos humanizados. Várias formas de anticorpos podem ser produzidos utilizando técnicas de ADN recombinante padrão (Winter e Milstein, *Nature* **349**:293-99, 1991). Por exemplo, os anticorpos "quiméricos" podem ser construídos, nos quais o domínio de ligação do antigénio de um anticorpo de animal está ligado a um domínio constante humano (um anticorpo derivado inicialmente de um mamífero não humano em que a tecnologia do ADN recombinante foi utilizada para substituir a totalidade ou parte das regiões de articulação e constantes da cadeia pesada e/ou a região constante da cadeia leve, com as regiões correspondentes de uma cadeia leve ou de uma cadeia pesada de imunoglobulina humana) (ver, por exemplo, Cabilly *et al.*, patente norte-americana 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**:6851-55, 1984). Os anticorpos quiméricos reduzem as respostas imunogénicas produzidas pelos anticorpos de animais quando utilizados em tratamentos clínicos humanos.

Além disso, os anticorpos "humanizados" recombinantes podem ser sintetizados. Os anticorpos humanizados são anticorpos inicialmente provenientes de um mamífero não humano em que a tecnologia do ADN recombinante foi utilizada para substituir alguns ou todos os aminoácidos não necessários para a ligação do antigénio com aminoácidos das regiões correspondentes de uma cadeia leve ou pesada da imunoglobulina humana. Ou seja, são quimeras

compreendendo principalmente sequências de imunoglobulina humana nas quais as regiões responsáveis pela ligação ao antigénio específico foram inseridas (ver, por exemplo, o pedido de patente PCT WO 94/04679). Os animais são imunizados com o antigénio desejado, os anticorpos correspondentes são isolados e a parte das sequências da região variável responsáveis pela ligação do antigénio específico são removidos. As regiões de ligação de antigénio derivadas de animal são depois clonadas na posição adequada dos genes de anticorpo humano em que as regiões de ligação do antigénio foram eliminadas. Os anticorpos humanizados minimizam a utilização de sequências heterólogas (inter-espécies) em anticorpos para utilização em terapias humanas, e são menos susceptíveis de suscitar respostas imunes não desejadas. OS anticorpos primatizados podem ser produzidos similarmente.

Uma outra forma de realização da invenção inclui a utilização de anticorpos humanos, os quais podem ser produzidos em animais não humanos, tais como animais transgénicos portadores de um ou mais transgenes da imunoglobulina humana. Esses animais podem ser utilizados como uma fonte para que os esplenócitos produzam de hibridomas, tal como é descrito na patente norte-americana 5.569.825.

Os fragmentos de anticorpos e os anticorpos univalentes também podem ser utilizados nos métodos e composições desta invenção. Os anticorpos univalentes compreendem um dímero de cadeia pesada/cadeia leve ligado à região Fc (ou haste) de uma segunda cadeia pesada. A "região Fab" refere-se àquelas parcelas das cadeias, que são mais ou menos equivalentes, ou análogas, às sequências que compreendem as porções do ramo Y da cadeia pesada e à cadeia leve na sua totalidade, e que colectivamente (em agregados) mostraram apresentar actividade de anticorpos. Uma

proteína Fab inclui agregados de uma cadeia pesada e uma leve (vulgarmente conhecida como Fab'), bem como tetrâmeros que correspondem aos dois segmentos do ramo do anticorpo Y, (vulgarmente conhecido como F(ab)2), se qualquer dos acima foram covalentemente ou não covalentemente agregados, desde que a agregação seja capaz de reagir especificamente com um determinado antigénio ou família de antigénio.

Qualquer um dos anticorpos da invenção pode opcionalmente ser conjugado com um quimioterápico, como definido abaixo.

Conforme aqui utilizado, o termo "ligação", significa a interacção física ou química entre duas proteínas ou compostos ou proteínas associadas ou compostos ou as combinações dos mesmos, incluindo a interacção entre um anticorpo e uma proteína. A ligação inclui ligações iónicas, não-iónicas, de hidrogénio, de Van der Waals, interacções hidrofóbicas, etc. A interacção física, a ligação, podem ser quer directa ou indirecta, sendo a indirecta através ou devido aos efeitos de uma outra proteína ou composto. A ligação directa refere-se a interacções que não se realizam através ou devido ao efeito de uma outra proteína ou composto, mas em vez disso são sem outros intermediários químicos substanciais. A ligação pode ser detectada de muitas maneiras diferentes. Os métodos de detecção da ligação são bem conhecidos dos especialistas na técnica.

Conforme aqui utilizado, "um anticorpo capaz de internalizar o cripto" significa um anticorpo que entra na célula enquanto remove o cripto da superfície da célula. Pode-se filtrar anticorpos de cripto que são capazes de internalizar o cripto usando anticorpos monoclonais de cripto fluorescentes. A fim de determinar quais os anticorpos que internalizam nas células positivas de cripto, pode-

se ensaiar para a captação do sinal fluorescente dos anticorpos para as células, visualizando as células sob um microscópio fluorescente e/ou confocal. Esses anticorpos que se interiorizaram serão vistos como sinais fluorescentes nas vesículas citoplasmáticas e/ou celulares. Exemplos não limitativos de anticorpos de cripto capazes de internalizar o cripto incluem A27F6.1 e B3F6.17.

Conforme aqui utilizado, o termo "composto", significa qualquer químico ou molécula identificáveis, incluindo, mas não limitado a, iões, átomos, moléculas pequenas, péptidos, proteínas, açúcares, nucleótidos, ou ácido nucleico, e tal composto pode ser natural ou sintético.

Conforme aqui utilizado, os termos "modula" ou "modifica" significam um aumento ou diminuição na quantidade, qualidade, ou efeito de uma determinada actividade ou proteína.

Conforme aqui utilizado, o termo "modular a sinalização de cripto" significa um aumento ou diminuição na quantidade, qualidade ou efeito da actividade de cripto, em cerca de 5%, preferivelmente 10%, mais preferivelmente 20%, mais preferivelmente 30%, mais preferivelmente 40%, mais preferivelmente 50%, mais preferivelmente 60%, mais preferivelmente 70%, mais preferivelmente 80%, mais preferivelmente 90%, e mais preferivelmente 100%. A actividade pode ser medida por ensaios conhecidos na técnica, tal como o ensaio de célula nula mostrado no Exemplo 3. Em uma outra forma de realização, a interacção da proteína entre o cripto e uma outra proteína é semelhantemente modulada de forma descendente através da ligação dos anticorpos da invenção.

Conforme aqui utilizado, o termo "bloqueio da interacção entre o cripto e ALK4" significa um aumento ou diminuição na interacção, isto é a ligação, entre cripto e ALK4, por cerca de 5%, preferivelmente 10%, mais preferivelmente 20%, mais preferivelmente 30%, mais preferivelmente 40%, mais preferivelmente 50%, mais preferivelmente 60%, mais preferivelmente 70%, mais preferivelmente 80%, mais preferivelmente 90%, e mais preferivelmente 100%. A actividade pode ser medida por ensaios conhecidos na técnica, tais como o ensaio de ligação mostrado no Exemplo 8.

Conforme aqui utilizado, o termo "modular o crescimento de células tumorais in vitro" significa um aumento ou diminuição do número de células tumorais in vitro, por cerca de 5%, preferivelmente 10%, mais preferivelmente 20%, mais preferivelmente 30%, mais preferivelmente 40%, mais preferivelmente 50%, mais preferivelmente 60%, mais preferivelmente 70%, mais preferivelmente 80%, mais preferivelmente 90%, e mais preferivelmente 100%. A modulação in vitro do crescimento das células tumorais pode ser medida por ensaios conhecidos na técnica, tal como o ensaio de ágar indicativo de células GEO mostrado no Exemplo 4.

Conforme aqui utilizado, o termo "modular o crescimento de células tumorais in vivo" significa um aumento ou diminuição do número de células tumorais, in vivo, por cerca de 5%, preferivelmente 10%, mais preferivelmente 20%, mais preferivelmente 30%, mais preferivelmente 40%, mais preferivelmente 50%, mais preferivelmente 60%, mais preferivelmente 70%, mais preferivelmente 80%, mais preferivelmente 90%, e mais preferivelmente 100%. A modulação in vivo do crescimento de células tumorais pode ser medida por ensaios conhecidos na técnica, tais como aquele mostrado no Exemplo 5.

O termo "prevenção" refere-se a diminuir a probabilidade de um organismo contrair ou desenvolver uma condição anormal.

O termo "tratamento" refere-se a ter um efeito terapêutico e, pelo menos, parcialmente atenuar ou revogar uma condição anormal no organismo. Tratar inclui a manutenção do crescimento tumoral inibido, e a indução da remissão.

O termo "efeito terapêutico" refere-se à inibição de uma condição anormal. Um efeito terapêutico alivia, de certa forma um ou mais dos sintomas da condição anormal. No que se refere ao tratamento de condições anormais, um efeito terapêutico pode referir-se a um ou mais dos seguintes: (a) um aumento ou uma diminuição na proliferação, crescimento, e/ou diferenciação das células, (b) inibição (ou seja, abrandamento ou paragem) ou a promoção da morte celular; (c) inibição da degeneração; (d) alívio de certa forma de um ou mais dos sintomas associados com a condição anormal; e (e) reforçar a função de uma população de células. Os compostos que demonstram eficácia contra condições anormais, podem ser identificados como descrito a seguir.

O termo "administração" refere-se a um método de incorporação de um composto em células ou tecidos de um organismo. A condição anormal pode ser prevenida ou tratada quando as células ou tecidos do organismo existem dentro do organismo ou fora do organismo. As células existentes fora do organismo podem ser mantidas ou cultivadas em pratos de cultura celular, ou em um outro organismo. Para as células hospedadas dentro do organismo, existem várias técnicas na arte para administrar compostos, incluindo (mas não limitado a) aplicações por via oral, parentérica, dérmica, injeção, e aerossóis. Para as células fora do organismo, existem várias técnicas na arte para administrar os compostos, incluindo

(mas não limitado a) técnicas de micro-injecção de células, técnicas de transformação e técnicas de transporte. A administração pode ser realizada pelos muitos modos conhecidos na técnica, por exemplo, por via oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, e semelhantes. Quando se utiliza na terapia in vivo, os anticorpos da presente invenção são administrados a um paciente em quantidades eficazes. Conforme aqui utilizado uma "quantidade eficaz" é uma quantidade suficiente para efectuar resultados clínicos benéficos ou desejados (ou seja, quantidades que eliminam ou reduzem a carga tumoral do paciente). Uma quantidade eficaz pode ser administrada em uma ou mais administrações. Para efeitos da presente invenção, uma quantidade de anticorpos da presente invenção é uma quantidade dos anticorpos que é suficiente para melhorar, estabilizar ou retardar o desenvolvimento do estado da doença associada ao cripto, particularmente os tumores associados ao cripto. A detecção e medição destes indicadores de eficácia são discutidos abaixo. Um exemplo de um regime tratamento típico inclui a administração por infusão intravenosa aos anticorpos do sujeito da invenção em um calendário semanal, com uma dose de cerca de 2-5 mg/kg. Os anticorpos são administrados em uma unidade de quimio-infusão ambulatoria, a menos que o paciente necessite de hospitalização. Outros regimes de administração conhecidos na técnica também estão contempladas.

A condição anormal também pode ser prevenida ou tratada pela administração de um anticorpo da invenção a um grupo de células com uma aberração em um caminho de transdução de sinal para um organismo. O efeito de administrar um composto na função do organismo pode depois ser monitorado. O organismo é preferivelmente um ser humano.

O "excesso de expressão de cripto" é entendido como significando a expressão de cripto por um tecido, cuja expressão é maior do que a expressão de cripto de tecidos normais adjacentes em uma quantidade estatisticamente significativa.

"Quimioterápicos" refere-se a quaisquer agentes identificados na técnica como tendo efeito terapêutico sobre a inibição do crescimento tumoral, na manutenção do crescimento tumoral inibido e/ou a indução da remissão, tal como compostos naturais, compostos sintéticos, proteínas, proteínas modificadas, e compostos radioactivos. Os agentes quimioterapêuticos contemplados agora incluem agentes que podem ser conjugados com os anticorpos da presente invenção ou alternativamente, agentes que podem ser usados em combinação com os anticorpos da presente invenção sem serem conjugados com o anticorpo. Os quimioterápicos exemplificativos que podem ser conjugados com os anticorpos da presente invenção incluem, mas não estão limitados aos radioconjugados (^{90}Y , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{186}Rh , *et al.*), fármacos activafos pelo tumor (maitansinóides, análogos de CC-1065, derivados da cliquamicina, antraciclinas, alcalóides de vinca, *et al.*), rícino, toxina da difteria, exotoxina das pseudomonas.

Os agentes quimioterápicos que podem ser utilizados em combinação com os anticorpos da invenção, em vez de serem conjugados com eles (ou seja, quimioterápicos não conjugados), incluem, mas não estão limitados ao seguinte: platinas (isto é, cis platina), antraciclinas, análogos de nucleósidos (purina e pirimidina), taxanos, camptotecinas, epipodofilotoxinas, agentes alquilantes de ADN, antagonistas de folato, alcalóides de vinca, inibidores da redutase do ribonucleótido, inibidores do estrogénio, inibidores da progesterona, inibidores do androgénio, inibidores da aromatase, interferões, interleucinas, anticorpos monoclonais, taxol,

camptosar, adriamicina (dox), 5-FU e gemcitabina. Tais quimioterápicos podem ser utilizados na prática da invenção em combinação com os anticorpos da invenção por co-administração do anticorpo e do quimioterápico não conjugado.

"Excipiente ou portador farmacologicamente aceitável" refere-se a compostos biologicamente inertes conhecidos na técnica e empregues na administração dos anticorpos da invenção. Os portadoras aceitáveis são bem conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences, edições Gennaro, Mack Publishing Co., 1990. Os portadoras aceitáveis podem incluir sais biocompatíveis, inertes ou bioabsorvíveis, agentes tamponizantes, oligo ou polissacáridos, polímeros, compostos viscoelásticos tais como o ácido hialurónico, agentes que promovem a viscosidade, conservantes, e semelhantes.

Um "sujeito" se refere aos vertebrados, particularmente os membros de uma espécie de mamíferos, e inclui, mas não se limita aos animais domésticos, animais para desporto e primatas, incluindo os seres humanos.

Anticorpos da invenção

Os anticorpos da invenção ligam-se especificamente ao cripto: Conforme aqui utilizado, o cripto inclui a proteína de cripto CR-1, a proteína de cripto CR-3, e os seus fragmentos. Esses fragmentos podem ser domínios inteiros, tais como os domínios extracelulares ou intracelulares, o domínio semelhante a EGF, o domínio rico em cys, o domínio de ligação ao receptor, e semelhantes. Esses fragmentos podem também incluir epítomos contíguos e não contíguos em qualquer domínio da proteína de cripto.

A sequência de 188 aminoácidos para CR-1 é a seguinte [SEQ ID NO:1]:

```
MDCRKMARFSYSVIWIMAIKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDS  
IWPQEEPAIRPRSSQRVPPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPS  
FYGRNCEHDVRKENCGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCD  
GLVMDEHLVASRTPPELPPSARTTTFMLVGICLSIQSYY
```

A sequência de 188 aminoácidos para CR-3 é a seguinte [SEQ ID NO:2]:

```
MDCRKMVRFSYSVIWIMAIKAFELGLVAGLGHQEFARPSRGDLAFRDDS  
IWPQEEPAIRPRSSQRVLP MGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLESFCACPPSF  
YGRNCEHDVRKENCGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCDGL  
VMDEHLVASRTPPELPPSARTTTFMLAGICLSIQSYY
```

O domínio semelhante a EGF estende-se desde cerca do resíduo de aminoácido 75 a cerca do resíduo de aminoácido 112 da proteína madura de cripto. Os epítomos no domínio semelhante a EGF podem compreender extensões lineares ou não lineares de resíduos de aminoácidos. O exemplo de epítomos lineares contemplados incluem mas não estão limitadas a cerca dos resíduos 75-85, 80-90, 85-95, 90-100, 95-105, 100-110 ou 105-112.

O domínio rico em cys estende-se de cerca do resíduo de aminoácido 114 a cerca do resíduo de aminoácido 150 da proteína madura de cripto. Os epítomos no domínio rico em cys podem compreender extensões lineares ou não lineares de resíduos de aminoácidos. O exemplo de epítomos lineares contemplados incluem mas não estão limitados a cerca dos resíduos 114-125, 120-130, 125-135, 130-140, 135-145 ou 140-150.

Logo que os anticorpos são gerados, a ligação dos anticorpos para o cripto podem ser analisados usando as técnicas padrão conhecidas na técnica, tal como o teste de ELISA, enquanto a presença de cripto sobre uma superfície celular pode ser analisada usando a citometria de fluxo (FACS), conforme mostrado no Exemplo 2. Quaisquer outras técnicas de medição tais como a ligação podem, em alternativa, ser utilizadas.

A presente invenção fornece anticorpos (por exemplo, anticorpos monoclonais e policlonais, anticorpos de cadeia singular, anticorpos quiméricos, anticorpos bifuncionais/bi-específicos, anticorpos humanizados, anticorpos humanos, e anticorpos enxertados por (CDR), que complementarmente determinam a região, incluindo compostos que incluem sequências de CDR que especificamente reconhecem um polipéptido da invenção) específicos para o cripto ou os seus fragmentos. Os fragmentos de anticorpos, incluindo Fab, Fab', F(ab')₂, e F_v, também são fornecidos pela invenção. Os termos "específico" e "selectivo", quando utilizados para descrever a ligação dos anticorpos da invenção, indicam que as regiões variáveis dos anticorpos da invenção reconhecem e ligam os polipéptidos de cripto. Será entendido que os anticorpos específicos da invenção também podem interagir com outras proteínas (por exemplo, a proteína A S. Aureus ou outros anticorpos em técnicas de ELISA) através de interações com sequências fora da região variável dos anticorpos e, em particular, na região constante da molécula. Os testes de rastreio para determinar a especificidade de ligação de um anticorpo da invenção (ou seja, anticorpos que especificamente se ligam a um epítipo do domínio de ligação do ligante/receptor e o domínio que abarca os resíduos de aminoácidos 46-62) são bem conhecidos e rotineiramente praticado na técnica. Para uma discussão exaustiva de tais ensaios, ver Harlow *et al.* (Editores), *Antibodies A Laboratory Manual*; Cold Spring

Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988), capítulo 6. Os anticorpos que reconhecem e ligam os fragmentos da proteína de cripto também são contemplados, uma vez que os anticorpos são específicos para os polipéptidos de cripto. Os anticorpos da invenção podem ser produzidos utilizando qualquer método conhecido e praticado rotineiramente na técnica.

A especificidade anticorpo é descrita em maior detalhe abaixo. No entanto, deve ser ressaltado que os anticorpos que podem ser gerados a partir de outros polipéptidos que foram previamente descritos na literatura e que são capazes de reagir transversalmente fortuitamente com o cripto (por exemplo, devido à existência fortuita de um epítopo semelhante em ambos os polipéptidos) são considerados como anticorpos de "reação transversal". Esses anticorpos de reação transversal não são anticorpos que são "específicos" para o cripto. A determinação de um anticorpo se liga especificamente a um epítopo de cripto é feita usando qualquer um dos vários ensaios, tais como os ensaios de mancheamento de Western, que são bem conhecidos na técnica. Para identificar células que expressam o cripto e também de modular a actividade de ligação do cripto ligante/receptor, os anticorpos que especificamente se ligam a um epítopo extracelular da proteína de cripto (ou seja, porções da proteína de cripto encontrada fora da célula) são particularmente úteis.

Em uma forma de realização, a invenção fornece uma composição livre de célula que compreende anticorpos policlonais, em que pelo menos um dos anticorpos é um anticorpo da invenção específico para o cripto. Os antisoros isolados de um animal é uma composição exemplificativa, uma vez que é uma composição que compreende uma fracção de anticorpo de um antisoro que foi ressuspenso em água ou em outro solvente, excipiente, ou portador.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único local antigénico. Além disso, em contraste com as preparações policlonais que tipicamente incluem diferentes anticorpos dirigidos contra diferentes epítomos, cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um determinante singular no antigénio. Os anticorpos monoclonais são úteis para melhorar a selectividade e a especificidade dos métodos de diagnóstico e de ensaios analíticos utilizando uma ligação de antigénio-anticorpo. Uma outra vantagem dos anticorpos monoclonais é que são sintetizados por uma cultura de hibridoma, não contaminados por outras imunoglobulinas. Os hibridomas que produzem este tipo de anticorpos também são entendidos como aspectos da invenção.

Ainda em uma outra forma de realização relacionada, a invenção fornece um anticorpo anti-idiotípico específico para um anticorpo que é específico para o cripto. Para uma discussão mais detalhada de anticorpos anti-idiotípicos, ver, por exemplo, as patentes norte-americanas 6.063.379 e 5.780.029.

É bem sabido que os anticorpos contêm domínios de ligação do antigénio relativamente pequenos que podem ser isolados quimicamente ou por técnicas recombinantes. Tais domínios são úteis para as próprias moléculas de ligação de cripto, e também podem ser reintroduzidos em anticorpos humanos, ou fundidos com um quimioterápico ou polipéptido. Assim, ainda em uma outra forma de realização, a invenção fornece um polipéptido que compreende um fragmento de um anticorpo específico de cripto, em que o fragmento e a molécula associada, se houver, se ligam ao cripto. A título de exemplo, não limitativo, a invenção fornece polipéptidos que são anticorpos de cadeia singular e anticorpos enxertados com CDR. Para

uma discussão mais detalhada dos anticorpos enxertados com CDR, ver, por exemplo, a patente norte-americana 5.859.205.

Em uma outra forma de realização, os anticorpos não humanos podem ser humanizados por qualquer dos métodos conhecidos na técnica. Os anticorpos humanizados são úteis para aplicações terapêuticas in vivo. Além disso, os anticorpos "humanizados" recombinantes podem ser sintetizados. Os anticorpos humanizados são anticorpos inicialmente provenientes de um mamífero não humano em que a tecnologia de ADN recombinante foi utilizada para substituir alguns ou todos os aminoácidos não necessários para a ligação do antigénio com aminoácidos das regiões correspondentes de uma imunoglobulina humana de cadeia leve ou pesado. Ou seja, são quimeras que compreendem principalmente sequências de imunoglobulina humana nas quais as regiões responsáveis pela ligação específica do antigénio foram inseridas (ver, por exemplo, o pedido de patente PCT WHO 94/04679). Os animais são imunizados com o antigénio desejado, os anticorpos correspondentes são isolados e a parte das sequências de região variável responsáveis pela ligação específica do antigénio são removidas. As regiões de ligação do antigénio derivado de animal são depois clonadas na posição apropriada dos genes do anticorpo humano em que as regiões de ligação do antigénio foram eliminadas. Os anticorpos humanizados minimizam a utilização de sequências (inter-espécies) heterólogas em anticorpos para utilização em terapias humanas, e são menos susceptíveis de suscitar respostas imunológicas indesejadas. Os anticorpos rimatizados podem ser produzidos similarmente utilizando genes de anticorpos de primatas (por exemplo, rhesus, babuíno e chimpanzé). Outras alterações podem depois ser introduzidas na estrutura do anticorpo para modular a afinidade ou a imunogenicidade. Ver, por exemplo, as patentes norte-americanas 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 e, 6.180.370.

Uma outra forma de realização da invenção inclui a utilização de anticorpos humanos, que podem ser produzidos em animais não humanos, tais como animais transgênicos portadores de um ou mais transgenes da imunoglobulina humana. Esses animais podem ser utilizados como uma fonte para que os esplenocitos produzam hibridomas, tal como é descrito nas patentes norte-americanas 5.569.825, WO00076310, WO00058499 e WO00037504.

Modulação de Sinal

Em uma outra forma de realização, os anticorpos da invenção ligam-se a cripto e modulam a sinalização de cripto ou as interações da proteína de cripto. A actividade de sobre-expressão de cripto, pode levar a um estado diferenciado que promove as células mesenquimais características, a proliferação aumentada e a fenótipos de migração celular (Salomon *et al.* *BioEssays* **21**:61-70, 1999; Ciardiello *et al.* *Oncogene* **9**:291-298, 1994; e Baldassarre *et al.* *Int. J. Cancer* **66**:538-543, 1996), associados com a transformação de células vista na neoplásica.

Um método de ensaio da actividade de anticorpos anti-cripto e a sua capacidade de modular a sinalização de cripto é com uma linha celular (KO) de extracção de F9 de cripto (Minchiotti *et al.*, *Mech. Dev.* **90**:133-142, 2000). O cripto estimula a fosforilação de smad2 e o factor de transcrição de FAST em embriões de xenopus, e a actividade do factor de transcrição de FAST pode ser controlada através da medição da actividade de luciferase de um gene repórter de luciferase de um elemento regulador de FAST (Saijoh *et al.*, *Mol. Cell* **5**:35-47, 2000). As células KO de F9 de cripto são eliminadas por um gene de cripto e são, portanto, nulas para o cripto e para a sinalização dependente de cripto (Minchiotti *et al.*, *Mech. Dev.* **90**:133-142, 2000). A sinalização ripto pode ser apreciada nas

células KO de F9 de cripto por se transfectar em cripto, FAST, e o constructo do gene da luciferase do elemento regulador de FAST. Nenhuma actividade da luciferase de FAST dependente de cripto será vista nestas linhas celulares a menos que o ADNc de cripto, e o ADNc de FAST seja transfectado neles. Os anticorpos capazes de bloquear a sinalização nodal dependente de cripto são anticorpos que bloqueiam a função de sinalização de cripto.

Outros ensaios capazes de medir a actividade de cripto podem ser utilizados pelos especialistas nas técnica, tal como um crescimento em ensaio de ágar leve (ver o Exemplo 4 abaixo). A capacidade das células para crescerem em ágar leve está associada com a transformação celular e o ensaio é um clássico ensaio *in vitro* para medir a inibição do crescimento de células tumorais. Outros ensaios úteis para determinar a inibição da actividade incluem ensaios *in vitro*, em plástico, e semelhantes.

Utilizações Terapêuticas

Os anticorpos da invenção também são úteis para fins terapêuticos, tais como a modulação do crescimento de células tumorais, de diagnóstico para detectar ou quantificar o cripto, e a purificação de cripto.

Em uma forma de realização da invenção, são fornecidos anticorpos os quais são capazes de se ligarem especificamente a cripto e que modulam o crescimento de células tumorais em um paciente. Em uma forma de realização, as células tumorais são células tumorais do testículo, mama, cólon, pulmão, ovário, bexiga, útero, cervical, pâncreas, e estômago.

Em outra forma de realização, são fornecidos anticorpos os quais são capazes de se ligarem especificamente a cripto e que modulam o crescimento de células tumorais que expressam em excesso o cripto. Em uma forma de realização, as células tumorais são linhas celulares que expressam em excesso o cripto, tais como linhas celulares derivadas do câncer da mama, testículos, cólon, pulmão, ovário, bexiga, útero, cervical, pâncreas, e estômago.

Os anticorpos anti-cripto podem ser rastreados para a actividade in vivo como potenciais agentes anticancerígenos seguindo protocolos padrão utilizados pelos especialistas na técnica, tal como ilustrado no Exemplo 4 abaixo. Os exemplos de tais protocolos são definidos pelo National Cancer Institute (NCI) nos seus protocolos "in vivo câncer models screening", publicação NIH número 84-2635 (Fevereiro de 1984).

Em uma outra forma de realização da invenção, os anticorpos da invenção são usados para tratar um paciente que tem um tumor canceroso.

Os anticorpos da presente invenção podem ser combinados com um excipiente farmacologicamente aceitável e administrados em uma dose terapêuticamente eficaz ao paciente. Para uma discussão de métodos da inibição do crescimento de tumores, ver, por exemplo, a patente norte-americana 6.165.464.

Também são contemplados métodos para tratar um sujeito que sofre de uma doença associada com níveis anormais (ou seja elevados ou empobrecidos) de cripto em que o método compreende administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um anticorpo que especificamente se liga a um epítipo de cripto.

Também são contempladas métodos para tratar um sujeito que sofre de uma doença associada com níveis anormais (ou seja elevados ou empobrecidos) de cripto, em que o método compreende administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um anticorpo que especificamente forma um complexo com cripto e é direccionado para o epítopo ao qual um anticorpo selecionado a partir do grupo constituído por A10B2.18 (ADESÃO ATCC NO. PTA-3311) e B3F6.17 (ADESÃO ATCC NO. PTA-3319) é dirigido.

O diagnóstico através de detecção de cripto é facilmente realizado através de ensaios de ligação padrão utilizando os novos anticorpos da invenção, permitindo aos especialistas na técnica detectar a presença de cripto especificamente em uma ampla variedade de amostras, culturas, e semelhantes.

Conjuntos que compreendem um anticorpo da invenção para qualquer das finalidades descritas aqui também são compreendidas. Em geral, um conjunto da invenção também inclui um antigénio de controlo para o qual o anticorpo é imuno-específico. Formas de realização incluem conjuntos que compreendem todos os reagentes e as instruções para a sua utilização.

Outras características da invenção serão evidentes a partir dos seguintes exemplos ilustrativos.

Exemplos COMPARATIVOS

Exemplo 1: Expressão e purificação de cripto

Um plasmídeo de expressão designado pSGS480 foi construído por sub-clonagem de um ADNc que codifica os resíduos de aminoácidos de cripto humano 1 a 169, de cripto [aminoácidos 1-169 de SEQ ID NO:

1], fundido ao domínio Fc de IgG₁ humano (ou seja, "CR (del C)-Fc") no vector pEAG1100. Para uma descrição mais detalhada deste vector, o pedido de patente norte-americana co-pendente com o número de série 60/233148, depositado a 18 de Setembro de 2000. O vector pEAG1100 é um derivado do plasmídeo pCMV-Sport-betagal da firma GIBCO-BRL Life Technologies, cuja utilização em transfecções transitórias de CHO foi descrita por Schifferli *et al.*, 1999, *Focus* **21**:16. Foi feito através da remoção do gene repórter do fragmento NotI de beta-galactosidase do plasmídeo pCMV-Sport-Betagal (número de catálogo 10586-014) como se segue: O plasmídeo foi digerido com NotI e EcoRV, o fragmento de espinha dorsal do vector NotI 4,38 kb foi purificado por gel e ligado. O ADN ligado foi transformado em *E.Coli* DH5alfa competente. O pEAG1100 foi isolado como um plasmídeo contendo o recombinante desejado de uma colónia singular isolada. A sequência de pEAG1100 abrange o promotor, poli-ligante, e o sinal de terminação de transcrição foi confirmado.

O plasmídeo pSGS480 foi transitoriamente transfectado em células CHO, e as células foram cultivadas a 28 °C durante 7 dias. A presença da proteína CR (del C)-Fc nestas células e o meio condicionado foi examinado por análise de mancheamento de Western. Para a análise de mancheamento de Western, o meio condicionado e as células a partir de células transfectadas de cripto foram submetidos a SDS-PAGE em 4-20% de géis gradientes sob condições reduzidas, electroforeticamente transferidas para nitrocelulose, e a proteína de fusão de cripto foi detectada com um anti-soro policlonal de coelho levantado contra um péptido 17-mer de cripto (que compreende os resíduos 97-113 de SEQ ID NO: 1) conjugado de hemocianina retirado de molusco. Depois da centrifugação para remover as células, a análise de mancheamento de Western mostrou que a proteína CR (del C)-Fc foi eficientemente segregada no meio condicionado (sobrenadante). O sobrenadante foi aplicado a uma

proteína A-Sefarose (Pharmacia), e a proteína ligada foi eluída com 25 mM de fosfato de sódio, pH 2,8, 100 mM de NaCl. A proteína eluída foi neutralizada com 0,5 M de fosfato de sódio em pH 8,6, e analisada para o conteúdo de proteína total de medições de absorvância a 240-340 nm, e para a pureza por SDS-PAGE. A proteína eluída foi filtrada através de um filtro de 0,2 micrones, e armazenada a -70 °C.

Exemplo 2: Geração e Filtragem de Anticorpos

A proteína CR (del C)-Fc eluída é injectada em murganhos, e as técnicas de hibridomas padrão conhecidas dos especialistas na técnica são utilizadas para gerar os anticorpos monoclonais.

A. Geração de Anticorpos

Particularmente, os murganhos robertsonianos fêmeas (Jackson Labs) foram imunizados intraperitonealmente com 25 µg de CR del C-Fc purificada humana, emulsionada com adjuvante de Freund completo (GibcoBRL # 15721-012). Eles foram estimulados duas vezes intraperitonealmente com 25 µg de Cr del C-Fc emulsionada com adjuvante de Freund incompleto (GibcoBRL # 15720-014) e uma vez com gotas de proteína A. Os soros foram filtrados e 3 semanas depois do último impulso, o rato com a melhor titulação foi impulsionado intraperitonealmente com 50 µg de CR del C-Fc solúvel, três dias antes da fusão. O rato foi impulsionado por via intravenosa com 50 µg de CR del C-Fc no dia antes da fusão. As células do baço do rato foram fundidas com a célula de mieloma FL653 a uma proporção de 1 baço: 6 mielomas e foram plaqueadas em 100.000, 33.000 e 11.000 células por cavidade em placas de cultura de tecido de 96 cavidades em meio de selecção. As cavidades positivas para o crescimento

foram avaliadas por ensaio de ELISA e FACS uma semana mais tarde. Duas fusões foram realizadas.

B. Filtragem de Anticorpos

Os sobrenadantes resultantes da primeira ou da segunda fusão, foram filtrados primeiramente em placas de ELISA para o reconhecimento das proteínas de domínio de cripto del C e/ou semelhantes ao EGF de cripto. Uma proteína de controlo de fusão (LT-beta-receptor Fc) foi revestida em placas de ELISA para descartar os anticorpos monoclonais que reconheceram o epítopo Fc humano. O teste de ELISA foi realizado conforme descrito abaixo na secção C. Na primeira fusão, os sobrenadantes primários também foram seleccionados pela sua capacidade de reconhecerem a proteína de cripto de superfície celular sobre a linha celular do tumor testicular, NCCIT por FACS. No caso da segunda fusão, a capacidade dos sobrenadantes de reconhecerem o cripto em duas linhas de células tumorais, NCCIT e da linha do cancro da mama, DU4475 por PACs foi analisada. Filtragens secundárias incluíram testar a capacidade do sobrenadante do anticorpo monoclonal para reconhecer o cripto de superfície celular em um painel de linhas de células tumorais (ver as Tabelas 1 e 2 para os resultados), a capacidade dos anticorpos monoclonais para reconhecerem o cripto humano imuno-histoquimicamente em secções de tecido de tumores da mama e do cólon humano, a capacidade dos anticorpos monoclonais para bloquearem no ensaio de sinalização de cripto-Nodal, a capacidade de bloquearem o crescimento de linhas de células tumorais em ensaios de ágar leve ou plástico, e a capacidade de internalização do cripto de superfície celular.

C. ELISA

Os ensaios de ELISA foram realizados como se segue:

Materiais:

Placas: placas de 96 cavidades de lavagem fácil de elevada ligação Costar (07-200-642).

Anticorpo 2: Pierce Gt IgG anti-Ms (H+L)- HRP (P131430)

Substrato: Conjunto de substrato TMB Pierce (34021)

Solução de Paragem: 1N de H₂SO₄

Tampões:

Tampão de ligação: 0,1 M de NaHPO₄, pH 9,0

Tampão de bloqueio: PBS + 10% de Soro de Bovino Dador

Tampão de Lavagem: PBS + 0,1% de Tween-20

Os antigénios CR-del-C-Fc e CR-EGF-fc, a proteína de fusão IgG1 humana de controlo foram diluídos em tampão de ligação para 500ng/ml. Foram adicionados 100 µl por cavidade e incubados durante 1 hora a 37 °C e durante a noite a 4 °C. O líquido foi decantado e a placa invertida e manchada até secar. 250 µl/cavidade de tampão de bloqueio foi depois adicionado, seguido pela incubação durante 30 minutos a 37 °C. Novamente, o líquido foi decantado e a placa invertida e manchada até secar. Os sobrenadantes foram diluídos 1:50 em tampão de lavagem, e plaqueados em 50 µl/cavidade, seguido pela incubação durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3X vigorosamente com 250 µl/cavidade de tampão de lavagem. Em seguida, 100 µl/cavidade do anticorpo 2, diluído em tampão de lavagem a 1:10.000 foi adicionado, seguido por incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente. As placas foram depois lavadas 3X vigorosamente com 250 µl/cavidade de tampão de lavagem, em seguida, o substrato adicionado a 100 µl/cavidade. A cor foi deixada a desenvolver até suficientemente escura, em seguida,

100 µl/cavidade de solução de paragem foi adicionada e as placas lidas para a absorvância a 450 nm.

D. Citometria de Fluxo

As linhas celulares positivas para o cripto podem ser utilizadas para ensaiar os anticorpos monoclonais para a ligação ao cripto, utilizando coloração da superfície celular e citometria de fluxo como se segue:

Libertar as células de frascos T162 com 2 ml de PBS⁻ com 5 mM de EDTA, 10 minutos, 37 °C. Leva-se até 20 ml com meio com soro, pipetando para cima e para baixo várias vezes para desagrupar as células. Rotação a 1200 rpm durante 5 minutos. Lavar as células a 4 °C com 5-10 ml de PBS com 0,1% de BSA (tampão de lavagem). Rotação a 1200 rpm durante 5 minutos. Ressuspender a $4 \times 10^6 - 10^7$ /ml em tampão de lavagem. Conservar em gelo.

Preparar anticorpos para coloração. Os anticorpos purificados são diluídos a 1-10 µg/ml em tampão de lavagem. Adicionar 50 µl de células a uma placa de fundo em V de 96 cavidades Linbro, (ICN 7632105). Plaquear uma cavidade de células para cada controlo para que cada linha celular seja analisada, incluindo as células para nenhum anticorpo, somente o anticorpo 2, meio de hibridoma, sobrenadante de anticorpo de controlo positivo, se disponível, ou purificado, e um controlo de subclasse IgG (se utilizando anticorpos purificados).

Plaquear uma cavidade de células para cada amostra experimental por cada linhagem celular a ser analisada. Rotação da placa, 1200 rpm durante 5 minutos, utilizando uma centrífugadora de topo de tabela a 4 °C. Mover rapidamente para fora o tampão por se inverter a

placa e agitar até que o líquido seja substancialmente descartado. Adicionar 40-50 µl de anticorpos (ou tampão de lavagem para o não-anticorpo e o 2º anticorpo-somente cavidades de controlo) às cavidades. Incubar, no mínimo, 30 minutos - 1 hora a 4 °C. Rotação da placa, 1200 rpm durante 5 minutos. Mover rapidamente para fora as soluções de anticorpo. Lavar as cavidades duas vezes com 200 µl de tampão de lavagem por cavidade, girando após cada lavagem. Mover rapidamente para fora o tampão.

Ressuspender as células em cada cavidade em 50 µl de 1:200 de diluição (em tampão de lavagem), de IgG de anti-rato de cabra marcado R-PE, Fc Específico (Jackson Immunoresearch Laboratories Cat. # 115-116-071). Incubar 20 minutos, 4 °C, no escuro. Adicionar 150 µl de tampão de lavagem às células em cada cavidade. Rotação da placa a 1200 rpm durante 5 minutos. Lavar uma vez com 200 µl de tampão de lavagem por cavidade. Ressuspender as células em 150 µl de 1% de PFA em PBS. Transferir os conteúdos de cada cavidade para tubos separados (tubo-352052 de 5 ml de fundo redondo de poliestireno Falcon). Revestir os tubos em folha de estanho.

Os conteúdos dos tubos são depois lidos por citometria de fluxo.

Os resultados de dois rastreios de anticorpos monoclonais produzidos por este método produziu os seguintes resultados, resumidos nas Tabelas 1 e 2 abaixo, em que a primeira coluna apresenta os nomes designados para os subclones de hibridomas, as duas colunas seguintes mostram os resultados de filtragens por ELISA, e as restantes colunas mostram os resultados da análise por citometria de fluxo em quatro linhagens celulares positivas para cripto. Os resultados são apresentados em unidades de meio de índice fluorescentes (MFI).

Tabela 1: Caracterização do Anticorpo Monoclonal de Anti-Cripto

Subclone de Hibridomas	ATCC depósito no.	Sups ELISA Cripto delC	Sups do domínio semelhante a EGF de Cripto por ELISA	DU4475 MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	HT3 MFI
Controlo- ELISA		0,06	0,07				
Controlo- Ig de Rato				14	9	37	18
A6C12.11		2,21	0,07	11	35	29	8
A6F8.6	PTA-3318	2,32	0,08	11	50	29	10
A7H1.19		2,14	0,09	14	34	27	12
A8F1.30		2,15	0,1	17	27	32	28
A8G3.5	PTA-3317	2,39	0,09	9	30	25	15
A8H3.1	PTA-3315	2,4	1,7	9	44	23	10
A8H3.2		2,54	0,07	13	13	16	14
A19A10.30		2,02	0,09	9	40	20	10
A10B2.18	PTA-3311	2,36	0,07	40	63	100	43
A27F6.1	PTA-3310	2,28	1,19	9	44	26	17
A40G12.8	PTA-3316	2,27	1,59	10	47	26	16

Tabela 2: Caracterização do Anticorpo Monoclonal de Anti-Cripto

Subclone de Hibridomas	ATCC depósito no.	ELISA Cripto delC	domínio semelhante a EGF de Cripto por ELISA	DU4475 MFI	NCCIT MFI	GEO MFI	HT3 MFI
Controlo-ELISA		0,05	0,05				
Controlo-Ig de Rato				10	6	4	6
A2D3.23		0,93	0,90	73	138	37	27
A7A10.29		1,37	0,07	75	83	33	83
A9G9.9		1,39	0,07	52	62	32	82
A15C12.10		1,42	0,06	46	55	25	93
A15E4.14		1,38	0,06	50	63	23	95
A17A2.16		1,40	0,06	76	97	41	81
A17C12.28		0,96	0,97	6	16	3	22
A17G12.1	PTA-3314	1,30	1,37	61	66	28	78
A17H6.1		1,38	0,05	35	30	5	28
A18B3.11	PTA-3312	1,36	1,38	50	42	33	65
A19E2.7		1,40	0,06	53	59	26	99

B3F6.17	PTA-3319	1,37	0,06	77	51	39	89
B6G7.10	PTA-3313	1,38	1,40	28	22	22	56
B11H8.4		1,41	0,06	59	101	39	107
B12C12.5		1,10	1,04	27	14	23	59
B15A2.6		1,40	0,06	36	44	22	59
C4A2.16		1,40	0,06	24	36	22	65

Exemplo 3: Ensaio de Célula Nula para a Inibição da Sinalização de Cripto

O seguinte descreve um ensaio de sinalização de célula nula de cripto F9 utilizado para avaliar a inibição da sinalização de Cripto.

Dia 0 Revestir 6 placas de cavidades com 0,1% de gelatina 2 ml/cavidade a 37 °C durante 15 minutos.

Disseminar as células a 6×10^5 células nulas de cripto F9 por cavidade.

Dia 1 transfecção:

Cada uma das seguintes amostras é adicionada a 300 µl de OptiMem 1 para produzir uma Solução A para cada amostra:

Exemplo 1: 0,5 µg de ADNc repórter de FAST da luciferase $(N_2)_7$ mais 1,5 µg de ADNc de vector vazio.

Exemplo 2: 0,5 µg de luciferase $(N_2)_7$, 0,5 µg de FAST, e 1 µg de ADNcs de vector vazio.

Exemplo 3: 0,5 µg de luciferase $(N_2)_7$, 0,5 µg de FAST 0.5 ADD de cripto, e 0,5 µg de ADNcs de vector vazio.

Amostra 4: 0,5 µg de luciferase $(N_2)_7$, 0,5 µg de cripto, FAST 0.5, e 0,5 µg de ADNcs de vector vazio.

Exemplo 5: 0,5 µg de luciferase (N₂)₇, 0,5 µg de cripto, FAST 0.5, e 0,5 µg de ADNcs de vector vazio.

Exemplo 6: 0,5 µg de luciferase (N₂)₇, 0,5 µg de cripto, FAST 0.5, e 0,5 µg de ADNcs de vector vazio.

Exemplo 7: 0,5 µg de luciferase (N₂)₇, 0,5 µg de cripto, FAST 0.5, e 0,5 µg de ADNcs de vector vazio.

Exemplo 8: 0,5 µg de luciferase (N₂)₇, 0,5 µg de cripto, FAST 0.5, e 0,5 µg de ADNcs de vector vazio.

Exemplo 9: 0,5 µg de luciferase (N₂)₇, 0,5 µg de cripto, FAST 0.5, e 0,5 µg de ADNcs de vector vazio.

A solução B compreende 30 µl de lipofectamina mais 270 µl de OptiMeml.

Para cada amostra, misturar a solução A e a solução B em conjunto. Incubar 45 minutos à temperatura ambiente. Enxaguar as cavidades com 2 ml/cavidade de OptiMeml. Aspirar pouco antes da próxima etapa.

Adicionar 2,4 ml de OptiMeml para cada mistura das soluções A+B, misturar, adicionar 1,5 ml/cavidade para duplicar as cavidades. Incubar 5 horas a 37 °C. Adicionar 1,5 ml/cavidade de DMEM + 20% de FCS, 2mM de Gln, P/S às cavidades que receberam as amostras 1-3. Adicionar anticorpos anti-cripto como se segue: Cavidades da amostra 4: A27F6.1, 10 µg/ml; Cavidades da amostra 5: A27F6.1, 2 µg/ml; Cavidades da amostra 6: A40G12.8; 10 µg/ml, Cavidades da amostra 7: A40G12.8, 2 µg/ml; Cavidades da amostra 8: A10B2.18, 10 µg/ml; Cavidades da amostra 9: A10B2.18, 2 µg/ml.

Dia 2 Remover o meio, lavar as células com PBS, 2 ml/cavidade. Adicionar DMEM + 0,5% de FCS, 2 mM de Gln, P/S, com as mesmas quantidades de anticorpos de cripto como no dia anterior, às mesmas cavidades.

Dia 3 Desenvolver o sinal da luciferase. Lavar as cavidades com PBS + Ca^{2+} e Mg^{2+} , 2 ml/cavidade. Utilizar o conjunto LucLite, Packard, número de catálogo 6016911. Trazer o tampão e o substrato à temperatura ambiente. Escurecer as luzes. Reconstituir o substrato com 10 ml de tampão. Diluir 1:1 com PBS + Ca^{2+} e Mg^{2+} . Aspirar as cavidades. Rapidamente adicionar 250 μl de substrato diluído por cavidade usando um e aparelho de pipetas de repetição. Girar a solução transferir 200 μl para as cavidades de uma placa de fundo opaco branco com 96 cavidades, Falcon 35-3296. Ler a placa no luminómetro utilizando Winglow, exportar os dados para o Excel.

Os resultados deste ensaio estão resumidos a seguir na Tabela 3.

Tabela 3: Ensaio de Sinalização de Cripto: Inibição com Anticorpos Monoclonais de Anti-Cripto

ADNCs transfectados	Anticorpo de Anti-Cripto	Unidades Luminescentes Relativas
(N ₂) ₇ luc	nenhum	123
(N ₂) ₇ luc, FAST	nenhum	259
(N ₂) ₇ luc, FAST,Cripto	nenhum	3091
(N ₂) ₇ luc, FAST,Cripto	A27F6.1 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1507
(N ₂) ₇ luc, FAST,Cripto	A27F6.1 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2297
(N ₂) ₇ luc, FAST,Cripto	A40G12.8 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1213
(N ₂) ₇ luc, FAST,Cripto	A40G12.8 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2626
(N ₂) ₇ luc, FAST,Cripto	A10B2.18 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3466
(N ₂) ₇ luc, FAST,Cripto	A10B2.18 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3103

Exemplo 4: Ensaio para a Inibição *In Vitro* do Crescimento de Células Tumorais

A inibição da Sinalização de Cripto também pode ser analisada, medindo-se o crescimento das células GEO em ágar leve. Ver, por exemplo, Ciardiello *et al.* *Oncogene*. Janeiro de 1994; **9**(1):291-8; Ciardiello *et al.*, *Cancer Res.* 1 de Fevereiro de 1991; **51** (3):1051-4.

Primeiro, derreter 3% de bactoágar. Manter a 42 °C em um banho de água. Em seguida, misturar 3% de solução de bactoágar com meio completo pré-aquecido para fazer uma solução de 0,6% de bactoágar, mantendo a 42 °C. Plaquear 4 ml de solução em um prato de 6 cm e deixar arrefecer durante pelo menos 30 minutos para formar a camada de ágar de fundo. Tripsinizar as células GEO e ressuspender a 10^5 células/ml em meio completo. Adicionar anticorpos a serem analisados, ou controlos, às suspensões de células, titulando os anticorpos de 20 µg a 1 µg. Misturar volumes iguais de suspensões de células GEO e de 0,6% de bactoágar e sobrepor 2 ml no topo da camada de ágar do fundo. Deixar arrefecer por pelo menos 1 hora. Incubar durante 14 dias a 37 °C em incubadora de CO₂. Contar as colónias visíveis sem a utilização de um microscópio. A ausência de colónias, em comparação com os controlos negativos, indica que os anticorpos testados inibem *in vitro* o crescimento de células tumorais.

Este ensaio foi utilizado para produzir os resultados apresentados na Tabela 4, para os anticorpos, A27F6.1 e B6G7.10, os quais demonstram a capacidade de diminuir o crescimento de colónias de células GEO.

Tabela 4: Resultados do crescimento em ensaio de ágar leve

Anticorpo	Número médio de colónias
nenhum	109,0
nenhum	104,3
A27.F6 20µg/ml	82,0
A27F6.1 10µg/ml	78,3
A27F6.1 5µg/ml	79,0
A27F6.1 1µg/ml	108,7
B6G7.10 20µg ml	102,3
B6G7.10 10µg/ml	71,7

Exemplo 5: Ensaio para a Inibição *In Vivo* do Crescimento de Células Tumorais

Para avaliar a inibição do crescimento de células tumorais, uma linha celular tumoral humana é implantada por via subcutânea em murganhos nús atímicos e os efeitos dos anticorpos da invenção são observados, com e sem tratamentos quimioterápicos adicionais que podem proporcionar efeitos aditivos ou sinérgicos sobre a inibição do tumor.

Este ensaio pode ser realizado alternativamente utilizando diferentes linhagens de células tumorais, tal como, por exemplo, GEO (uma linha de células *in vitro* do cancro do cólon humano bem diferenciada, é obtida a partir da American Type Tissue Collection (ATCC)), DU-4475 (uma linha de células *in vitro* do cancro da mama obtida a partir de ATCC), NCCIT (uma linha de células do tumor testicular obtida a partir de ATCC), ou outras conhecidas na técnica. Um exemplo deste tipo de ensaios é o seguinte:

Os animais são marcados individualmente por perfurações na orelha. A linha de células GEO é passada na *in vitro* ou *in vivo* para 1/4 passagens. Os animais são implantados com células GEO subcutaneamente na área do flanco direito. Os seguintes grupos de animais podem ser utilizados:

Grupo #	Tratamento	# de Ratos
1.	Salina de controle, 0,2 ml/murganho, i.p. três vezes por semana (M, W, F)	20
2.	mAb, dose baixa, i.p.	10
3.	mAb, meia dose, i.p.	10
4.	mAb, dose elevada, i.p.	10
5.	5-FU, 30 mg/kg/inj., i.p., 3 Rx/semana (M, W, F)	10
6.	Cisplatina, 2 mg/kg/inj., s.c., 3 Rx/semana (M, W, F)	10

7.	Adriamicina, 1,6 mg/kg/inj., i.p., 3 Rx/semana (M, W, F)	10
8.	Irinotecano, 10 mg/kg/inj., i.p., 5 Rx/semana (M-F)	10
9.	mAb, dose baixa, i.p.+ 5-FU (dose intermédia)	10
10.	mAb, meia dose, i.p.+ 5-FU (dose intermédia)	10
11.	mAb, dose elevada, i.p.+ 5-FU (dose intermédia)	10
12.	mAb, dose baixa, i.p.+ cisplatina (dose intermédia)	10
13.	mAb, meia dose, i.p.+ cisplatina (dose intermédia)	10
14.	mAb, dose elevada, i.p.+ cisplatina (dose intermédia)	10
15.	mAb, dose baixa, i.p.+ adriamicina (dose intermédia)	10
16.	mAb, meia dose, i.p.+ adriamicina (dose intermédia)	10
17.	mAb, dose elevada, i.p.+ adriamicina (dose intermédia)	10
18.	mAb, dose baixa, i.p.+ irinotecano (dose intermédia)	10
19.	mAb, meia dose, i.p.+ irinotecano (dose intermédia)	10
20.	mAb, dose elevada, i.p.+ irinotecano (dose intermédia)	10

Dia 0: Implante do tumor, registo do peso corporal inicial dos animais.

Dia 1: Iniciar os tratamentos, como indicado acima.

Dia 5: Começar as medições do tamanho do tumor e do peso corporal, e continuar duas vezes por semana até ao final da experiência.

O peso corporal inicial, as medições do tamanho do tumor e do peso corporal, a histologia em sacrifício, e a análise imuno-histoquímica nos tumores são examinados, analisando para a expressão de cripto, o crescimento tumoral, e a sua inibição.

Exemplo 6: Modelo de Tumor de Xenoenxerto *In Vivo* - Anticorpo de anti-Cripto de Bloqueio Rico em Cys

Para avaliar a resposta de um NCCIT, uma linha celular de carcinoma testicular humano foi implantada por via subcutânea com um anticorpo que se liga a um domínio rico em cys de cripto.

Os métodos experimentais são listados abaixo. Os resultados são mostrados na Figura 1.

Métodos e Materiais

Animais: foram usados ratos nus atímicos machos. Os animais foram individualmente numerados por perfurações nas orelhas.

Tumor: NCCIT, linhas de células *in vitro* do carcinoma testicular humano da célula do germe misturado mediastinal obtidas originalmente a partir da American Tissue Type Collection. A linha celular foi passada *in vitro* para seis passagens em RPMI-1640/10% de FBS sem antibióticos. Os animais implantados por via subcutânea, com 5×10^6 células/0,2 ml de matrigel no flanco direito dos animais.

Grupo	Tratamento	# de Ratos
1	Veículo de Controlo, (25 mM de fosfato de sódio, 100 mM de cloreto de sódio, pH 7.2), 0,2 ml/rato, i.p., Tratamentos com Q14D começam no dia -1	20
2.	A8G3.5, 1 mg/kg/inj., i.p., Tratamentos com Q14D começam no dia -1	10
3.	A8G3.5, 3 mg/kg/inj., i.p., Tratamentos com Q14D começam no dia -1	10
4.	A8G3.5, 10 mg/kg/inj., i.p., Tratamentos com Q14D começam no dia -1	10
5.	Cis-platina, 2 mg/kg/inj., s.c., 3 x/semana (M,W,F) para 6 tratamentos	10

Os tratamentos começaram no dia 1

Calendário de Testes

Dia -1:

Ratos aleatórios em grupos de controlo e de tratamentos. Anotado o peso inicial dos animais. OS tratamentos primeiro administrados a grupos de anticorpos. Soluções de dose foram feitas. Os tratamentos foram cegos para os técnicos até o ensaio ter terminado.

Dia 0:

Tumor implantado. As culturas bacterianas dirigidas ao tumor implantadas em murganhos.

Dia 1:

O tratamento primeiro administrado ao grupo quimioterápico positivo.

Dia 4:

Anotadas as medições do tamanho do tumor inicial para uma linha de base do tumor em matrigel. Continuou-se a registar o tamanho do tumor e os pesos corporais em ratos 2x/semana. Monitorizado o estudo diariamente e feitas anotações de qualquer observação incomum nos animais.

Notas finais:

Peso corporal inicial, tamanho do tumor e medições de peso corporal

Exemplo 7: Modelo de Tumor de Xenoenxerto *In Vivo* - Anticorpo anti-Cripto que bloqueia o domínio semelhante a EGF

Para avaliar a resposta de um NCCIT, uma linha celular de carcinoma testicular humano foi implantada subcutaneamente com um anticorpo que se liga a um domínio semelhante a EGF de cripto. Os métodos

experimentais são listados abaixo. Os resultados são mostrados na Figura 2.

Métodos e Materiais:

Animais:

Foram usados ratos machos nús atímicos. Os animais foram individualmente numerados por perfurações nas orelhas.

NCCIT, linhas de células *in vitro* do carcinoma testicular humano da célula do germe misturado mediastinal obtidas originalmente a partir da American Tissue Type Collection. A linha celular foi passada *in vitro* para oito passagens em RPMI-1640/10% de FBS sem antibióticos. Os animais implantados por via subcutânea, com 5×10^6 células/0,2 ml de matrigel no flanco direito dos animais.

Grupo	Tratamento	# de Ratos
1.	Veículo de Controlo, (25 mM de fosfato de sódio, 100 mM de cloreto de sódio, pH 7.2), 0,2 ml/rato, i.p., Tratamentos com Q14D começam no dia -1	18
2.	A27F6.1, 1 mg/kg/inj., i.p., Tratamentos com Q14D começam no dia -1 com um carregamento de dose de 2,6 mg/kg/rato	10
3.	A27F6.1, 10 mg/kg/inj., i.p., Tratamentos com Q14D começam no dia -1 com um carregamento de dose de 21,2 mg/kg/rato	10
4.	Cis-platina, 2 mg/kg/inj., s.c., 3 x/semana (M,W,F) para 6 tratamentos	10

Os tratamentos começaram no dia 1.

Calendário de Testes

Dia -1:

Ratos aleatórios em grupos de controlo e de tratamentos. Anotado o peso inicial dos animais. Os tratamentos primeiro administrados a grupos de anticorpos. Soluções de dose foram feitas. Os tratamentos foram cegos para os técnicos até o ensaio ter terminado.

Dia 0:

Tumor implantado. As culturas bacterianas dirigidas ao tumor implantadas em murganhos. As culturas de bactérias foram negativas para contaminação às 24 e 48 horas após a amostragem.

Dia 1:

O tratamento primeiro administrado ao grupo quimioterápico positivo.

Dia 4:

Anotadas as medições do tamanho do tumor inicial para uma linha de base do tumor em matrigel. Continuou-se a registar o tamanho do tumor e os pesos corporais em ratos 2x/semana. Monitorizado o estudo diariamente e feitas anotações de qualquer observação incomum nos animais.

Notas finais:

Peso corporal inicial, tamanho do tumor e medições de peso corporal

Exemplo 8: mabs de cripto que bloqueiam a ligação de ALK4

A fim de avaliar se os anticorpos monoclonais específicos de cripto podem interferir com a capacidade de cripto se ligar a Alk4, o receptor da activina tipo I, utilizámos a análise de citometria de fluxo usando uma linhagem celular 293 que estavelmente expresse o

Alk4. Para gerar esta linha celular, as células 293 foram co-transfectadas com um plasmídeo que expressa o Alk4 marcado no terminal C com um epítipo HA e um plasmídeo que expressa o fármaco, puromicina, em uma proporção de 10:1. As células transfectadas foram, depois, seleccionadas na puromicina até se terem formado colónias. As colónias foram depois colhidas, expandidas e depois analisadas para a expressão Alk4 utilizando a análise de mancheamento de Western para HA. O clone 21 (293-Alk4-21) foi verificado expressar elevados níveis de Alk4 comparado ao controlo, as células 293 não transfectadas.

Para analisar a ligação de cripto-Alk4 por citometria de fluxo, uma forma purificada, solúvel de cripto humano (aa 1-169) fundida com a porção Fc de IgG humano (CrdelC-Fc) foi empregue. Aproximadamente 5 µg/ml de CrdelC-Fc ou a proteína Fc de controlo foi incubado com 3×10^5 células 293-Alk4-21 em gelo durante 30 minutos, em 50 µl de volume total de tampão de FACS (PBS com 0,1% de BSA). Para as amostras que contêm anticorpos anti-cripto, 5 µg/ml de CrdelC-Fc foi pré-incubado com 50 µg/ml de cada anticorpo de cripto (A10.B2.18, A40.G12.8, A27.F6.1, A8.H3.1, A19 . A10.30, A6.F8.6, A8.G3.5, A6.C12.11) em gelo antes da adição das células. As células foram depois lavadas em tampão de FACS e a proteína Fc ligada foi detectada por se incubarem as células com um IgG anti-humano de cabra conjugado de R-ficoeriterina (fragmento Fc específico) da firma Jackson Immunologics. As amostras foram depois lavadas novamente, fixadas em 1% de paraformaldeído em PBS, e analisadas usando procedimentos de citometria de fluxo padrão. Os resultados do ensaio de FACS são mostrados na Figura 3.

Algumas das formas de realização da invenção descritas acima são descritas abaixo e incluem, mas não estão limitadas às seguintes formas de realização. Como estes especialistas na técnica irão

apreciar, inúmeras alterações e modificações podem ser feitas para as diversas formas de realização da invenção. Pretende-se que todas essas variações sejam abrangidas pelo âmbito da invenção.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Biogen, Inc.

Sanicola-Nadel, Michele

Williams, Kevin

Schiffer, Susan

Rayhorn, Paul

<120> Anticorpos que Bloqueiam o Cripto e as suas Utilizações

<130> A117 PCT

<140> ainda não atribuído

<141> 2002-04-16

<150> 60/286,782

<151> 2001-04-26

<150> 60/293,020

<151> 2001-05-17

<150> 60/301,091

<151> 2001-06-26

<150> 60/367,002

<151> 2002-03-22

<160> 2

<170> FastSEQ para Windows Versão 4.0

<210> 1
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 1

```

Met Asp Cys Arg Lys Met Ala Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp Ile
 1                5                10                15
Met Ala Ile Ser Lys Val Phe Glu Leu Gly Leu Val Ala Gly Leu Gly
                20                25                30
His Gln Glu Phe Ala Arg Pro Ser Arg Gly Tyr Leu Ala Phe Arg Asp
                35                40                45
Asp Ser Ile Trop Pro Gln Glu Glu Pro Ala Ile Arg Pro Arg Ser Ser
 50                55                60
Gln Arg Val Pro Pro Met GIy Ile Gln His Ser Lys Glu Leu Asn Arg
65                70                75                80
Thr Cys Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Met Leu Gly Ser Phe Cys Ala
                85                90                95

Cys Pro Pro Ser Phe Tyr Gly Arg Asn Cys Glu His Asp Val Arg Lys
                100                105                110
Glu Asn Cys Gly Ser Val Pro His Asp Thr Trp Leu Pro Lys Lys Cys
                115                120                125
Ser Leu Cys Lys Cys Trp His Gly Gln Leu Arg Cys Phe Pro Gln Ala
 130                135                140
Phe Leu Pro Gly Cys Asp Gly Leu Val Met Asp Glu His Leu Val Ala
145                150                155                160
Ser Arg Thr Pro Glu Leu Pro Pro Ser Ala Arg Thr Thr Thr Phe Met
                165                170                175
Leu Val Gly Ile Cys Leu Ser Ile Gln Ser Tyr Tyr
                180                185

```

<210> 2.

<211> 188

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 2

```

Met Asp Cys Arg Lys Met Val Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp Ile
1          5          10          15
Met Ala Ile Ser Lys Ala Phe Glu Leu Gly Leu Val Ala Gly Leu Gly
          20          25          30
His Gln Glu Phe Ala Arg Pro Ser Arg Gly Asp Leu Ala Phe Arg Asp
          35          40          45
Asp Ser Ile Trp Pro Gln Glu Glu Pro Ala Ile Arg Pro Arg Ser Ser
          50          55          60
Gln Arg Val Leu Pro Met Gly Ile Gln His Ser Lys Glu Leu Asn Arg
65          70          75          80
Thr Cys Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Met Leu Glu Ser Phe Cys Ala
          85          90          95
Cys Pro Pro Ser Phe Tyr Gly Arg Asn Cys Glu His Asp Val Arg Lys
          100          105          110
Glu Asn Cys Gly Ser Val Pro His Asp Thr Trp Leu Pro Lys Lys Cys
          115          120          125
Ser Leu Cys Lys Cys Trp His Gly Gln Leu Arg Cys Phe Pro Gln Ala
          130          135          140
Phe Leu Pro Gly Cys Asp Gly Leu Val Met Asp Glu His Leu Val Ala
145          150          155          160
Ser Arg Thr Pro Glu Leu Pro Pro Ser Ala Arg Thr Thr Thr Phe Met
          165          170          175
Leu Ala Gly Ile Cys Leu Ser Ile Gln Ser Tyr Tyr
          180          185

```

Lista de Sequências

A sequência de aminoácidos 188 para RC-1 é a seguinte [SEQ ID NO: 1]:

```
MDCRKMARFSYSVIWIMAIKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDS  
IWPQEEPAIRPRSSQRVPPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPS  
FYGRNCEHDVRKENCGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCD  
GLVMDEHLVASRTPELPPSARTTTFMLVIGICLSIQSYY
```

A sequência de 188 aminoácidos para CR-3 é a seguinte [SEQ ID NO:2]:

```
MDCRKMVRFSYSVIWIMAIKAFELGLVAGLGHQEFARPSRGDLAFRDDS  
IWPQEEPAIRPRSSQRVLP MGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLESFCACPPSF  
YGRNCEHDVRKENCGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCDGL  
VMDEHLVASRTPELPPSARTTTFMLAGICLSIQSYY
```

Lisboa, 26 de Março de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo que especificamente se liga a um epítopo de cripto compreendido no domínio de extensão dos resíduos de aminoácidos desde o aminoácido 46 até ao aminoácido 62 de SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2.
2. Anticorpo da reivindicação 1, em que o anticorpo liga um epítopo seleccionado a partir do grupo de epítopos ao qual os anticorpos produzidos por hibridomas seleccionados a partir do grupo constituído por A10B2.18 e B3F6.17 se liga.
3. Anticorpo da reivindicação 1 ou 2, em que o anticorpo é capaz de internalizar o cripto.
4. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 3 que é um fragmento de anticorpo seleccionado a partir do grupo constituído por um fragmento Fab, um Fab', e um F(ab)2.
5. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 3 que é um anticorpo de comprimento completo.
6. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, que é um anticorpo de cadeia singular.
7. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 6, que é conjugado com um quimioterápico.
8. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 6 para utilização em terapia em combinação com um quimioterápico não conjugado.

9. Anticorpo da reivindicação 7, em que o quimioterápico é seleccionado a partir do grupo que consiste de um fármaco que activou o tumor, um radionuclídeo e uma toxina seleccionados a partir do grupo constituído de rícino, da toxina da difteria e da exotoxina de pseudomonas.
10. Anticorpo da reivindicação 7 ou 9, em que o quimioterápico é um maitansinóide.
11. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 10, o qual é humano.
12. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 11, o qual é monoclonal.
13. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 12, o qual é humanizado.
14. Composição farmacêutica que compreende pelo menos um dos anticorpos de qualquer das reivindicações 1 a 7 e 9 a 13 e, opcionalmente, um portador.
15. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 14, que compreende adicionalmente um quimioterapêutico não conjugado.
16. Composição farmacêutica da reivindicação 14 ou 15, em que o anticorpo é o B3F6.17 humanizado.
17. Utilização de um anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 13 ou de uma composição de qualquer uma das reivindicações 14 a 16 para diminuir o crescimento tumoral *in vitro*.

18. Utilização de um anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 13 ou de uma composição de qualquer uma das reivindicações 14 a 16 para a preparação de uma composição farmacêutica para diminuir o crescimento tumoral *in vivo*.
19. Utilização de acordo com a reivindicação 17 ou 18, em que a célula tumoral é seleccionada a partir do grupo constituído de células tumorais da mama, testículos, cólon, pulmão, ovário, bexiga, útero, cervical, pâncreas, e estômago.
20. Utilização de um anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 13 ou de uma composição de qualquer uma das reivindicações 14 a 16 para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento da proliferação celular indesejada.
21. Método de modular o crescimento de células tumorais *in vitro* em uma amostra que compreende a etapa de adicionar à amostra, o anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 13 ou a composição de qualquer uma das reivindicações 14 a 16.

Lisboa, 26 de Março de 2009

FIGURA 1

Resposta do NCCIT, Linha de Célula do Carcinoma Testicular, ao mAb A8G3.5 de cripto que bloqueia o anti-CFC

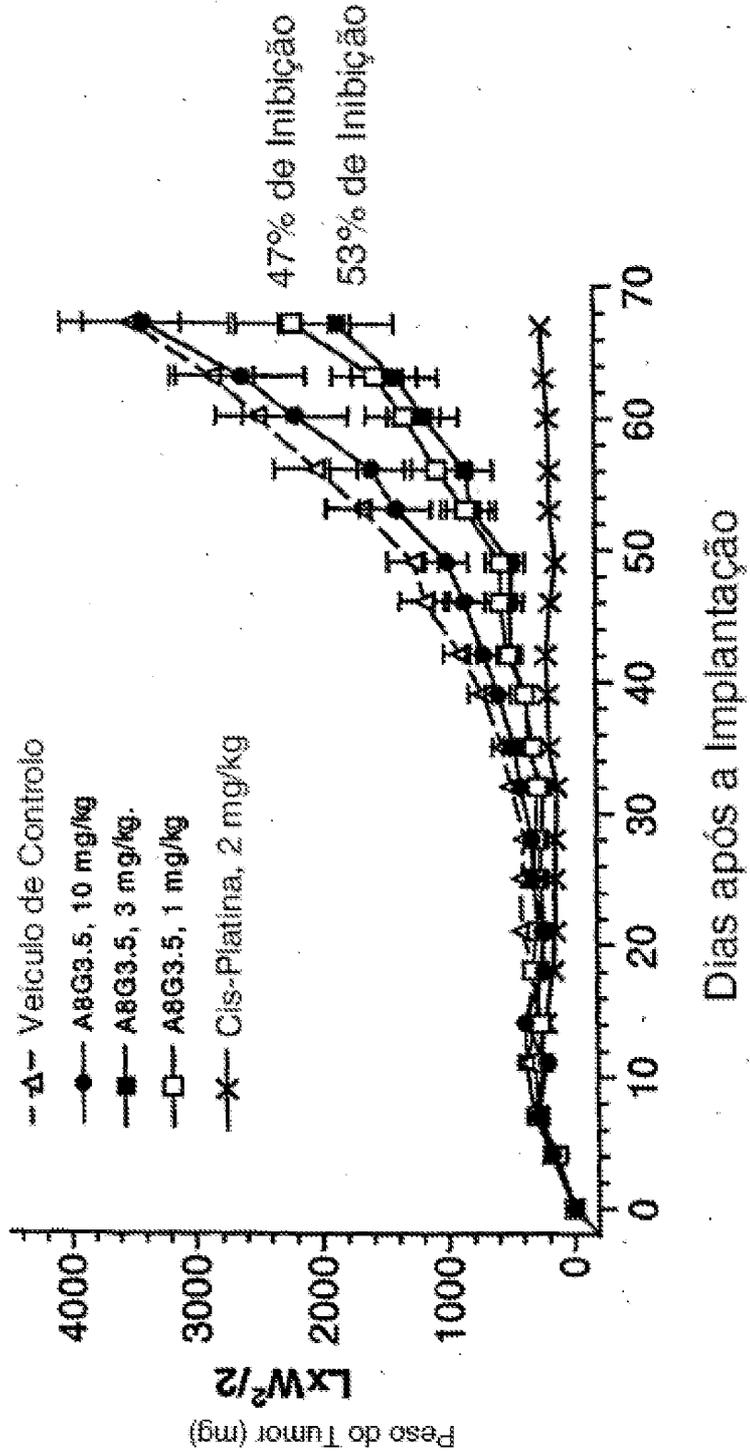


FIGURA 2

Resposta do NCCIT, Linha de Célula do Carcinoma Testicular, ao mAb A8G3.5 de cripto que bloqueia o anti-CFC

