

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

(21) **PI0609151-2 A2**



(22) Data de Depósito: 24/03/2006
(43) Data da Publicação: 17/02/2010
(RPI 2041)

(51) *Int.Cl.:*
C07K 16/22 (2010.01)
A61K 39/395 (2010.01)
C12N 15/13 (2010.01)
C12N 5/20 (2010.01)

(54) Título: **ANTICORPO ANTI-PLGF**

(30) Prioridade Unionista: 24/03/2005 US 60/664,768

(73) Titular(es): LIFE SCIENCES RESEARCH PARTNERS VZW,
THROMBOGENICS N.V., VLAAMS INTERUNIVERSITAIR INSTITUT
VOOR BIOTECHNOLOGIE VZW

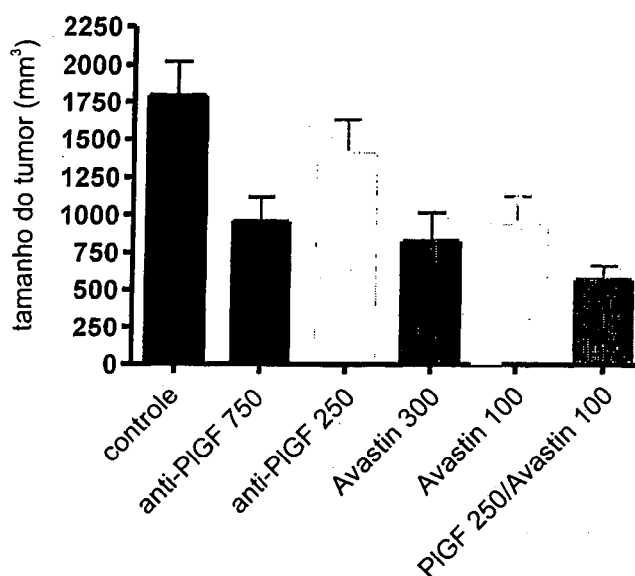
(72) Inventor(es): DÉSIRÉ COLLEN, JEAN-MARIE STASSEN,
PETER CARMELIET

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemens, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT BE2006000023 de 24/03/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/099698 de 28/09/2006

(57) Resumo: ANTICORPO ANTI-PLGF. A presente invenção refere-se a novos anticorpos monoclonais direcionados para PIGF e fragmentos e derivados dos mesmos, mais particularmente a anticorpos humanizados e fragmentos desses para uso no tratamento e/ou prevenção de angiogênese patológica.





PI0609151-2

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ANTICORPO
ANTI-PLGF**".

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a novos anticorpos e fragmentos
5 e derivados desses particularmente adequados para a inibição de angiogê-
nese em condições patológicas. A invenção também se refere a linhagens
celulares que produzem anticorpos específicos. A presente invenção fornece
composições farmacêuticas que compreendem anticorpos, fragmentos e/ou
derivados da invenção e fornece métodos de prevenir e tratar angiogênese
10 e/ou extravasamento vascular onde esses são indesejados tais como em
formação de tumor, doenças do olho, hipertensão pulmonar e distúrbios in-
flamatórios e métodos para prevenir e tratar distúrbios ósseos tal como oste-
oporose.

Antecedentes da Invenção

15 A formação anormal de vasos sangüíneos contribui para a pato-
gênese de várias doenças com alta morbidade e mortalidade. A elucidação
dos mecanismos que dão suporte ao crescimento vascular pode permitir o
desenvolvimento de estratégias terapêuticas para estimular o crescimento
vascular em tecidos isquêmicos ou para suprimir sua formação em tumores.
20 Estudos recentes direcionados a genes em embriões identificaram alguns
dos mecanismos envolvidos na formação inicial de canais endoteliais (angi-
ogênese) e sua maturação subsequente pelo revestimento com células
musculares lisas (arteriogênese). Surgiu a evidência de que mecanismos
moleculares distintos podem mediar o crescimento de vasos sangüíneos
25 durante condições patológicas, mas os fatores moleculares permanecem
amplamente indeterminados.

Foi estabelecido que o Fator de Crescimento Endotelial Vascular
(VEGF) está implicado no desenvolvimento e crescimento patológico da
vasculatura (Ferrara N. et al., 1999, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 237,
30 1-30). Além disso, também foi mostrado que o fator de crescimento Placen-
tário (PIGF), um homólogo de VEGF, é um modulador específico de VEGF
durante uma variedade de condições patológicas, tais como retinopatia

isquêmica, tumorigênese, distúrbios inflamatórios e edema. Foi mostrado que camundongos PIGF^{-/-} têm angiogênese e arteriogênese prejudicada na doença (Carmeliet P. et al., 2000, *J. Pathol.* 190, 387-405), enquanto a angiogênese fisiológica em saudáveis normais permanece não afetada. Assim, inibidores de PIGF têm um imenso potencial para o tratamento de doenças nas quais a angiogênese ou arteriogênese contribuem para a patogenicidade da doença.

Inibidores de PIGF são conhecidos na técnica, tal como um anticorpo policlonal de cabra contra PIGF humano (R&D Pharmaceuticals, Abingdon, UK) e um anticorpo policlonal de galinha (Gassmann et al., 1990, *Faseb J.* 4, 2528). Esses anticorpos são usados para estudos de *Western blotting*, histoquímica e de imunoprecipitação. WO01/85796 descreve o uso de inibidores de PIGF, incluindo os anticorpos monoclonais anti-PIGF, para o tratamento ou prevenção de doenças, tais como formação tumoral. Mais especificamente, a preparação de anticorpos monoclonais de murino que inibem-completamente a ligação de PIGF-2 de murino ao seu receptor Flt-1, está descrita, através da qual o anticorpo Mab-PL5D11, é selecionado como tendo a atividade inibitória mais eficiente. O uso de anticorpo em modelos animais de angiogênese patológica está descrito.

Anticorpos gerados em animais têm características que podem limitar severamente seu uso na terapia humana. Como proteínas estranhas, eles podem fazer surgir uma resposta antiimunoglobulina (que para anticorpos de camundongo é referida como anticorpo humano anticamundongo ou HAMA) que reduz ou destrói sua eficácia terapêutica e/ou provoca reações alérgicas ou de hipersensibilidade em pacientes, como mostrado por Jaffers et al., 1986 (*Transplantation* 1986 41:572). Embora o uso de anticorpos monoclonais humanos possa lidar com essa limitação, foi provado ser difícil gerar grandes quantidades de anticorpos humanos anti-humano pela tecnologia de hibridoma convencional. A tecnologia recombinante tem, portanto, sido usada na técnica para construir anticorpos "humanizados" que mantêm a alta afinidade de ligação do animal, tal como anticorpos monoclonais de murino mas que exibem imunogenicidade reduzida em seres humanos. Em

particular, foram sugeridos anticorpos quiméricos nos quais a região variável (V) de um anticorpo não humano é combinada com a região constante (C) de um anticorpo humano. Métodos de obter tais imunoglobulinas quiméricas estão descritos em detalhes na Patente U.S. 5.770.198. Em outras tentativas de reduzir a imunogenicidade de anticorpos de murino, apenas a região de determinação de complementaridade (CDR), isto é regiões de hipervariabilidade nas regiões V, ao invés do domínio V completo, são transplantadas para um anticorpo humano. Tais anticorpos humanizados são conhecidos como anticorpos de CDR enxertada. A construção de anticorpos de CDR enxertada que reconhecem mais antígenos complexos tem resultado em anticorpos que tem atividade de ligação significativamente menor do que os anticorpos não humanizados nativos. Em vários casos foi demonstrado que a mera introdução de CDRs não humanas em uma cadeia principal de anticorpo humano é suficiente para manter a atividade de ligação total. Apesar de um modelo computadorizado refinado do anticorpo de murino de interesse ser necessário a fim de identificar os aminoácidos críticos a serem considerados no esboço de um anticorpo humanizado, e regras teóricas gerais terem sido propostas para tal esboço, em todos os casos o procedimento deve ser detalhado e otimizado para o anticorpo não humano em particular de interesse.

Subseqüentemente, permanece uma necessidade por anticorpos (monoclonais) que inibam otimamente a ligação de PIGF humana ao seu receptor. Além disso, tais anticorpos também precisam ser não imunogênicos, já que eles não podem fazer surgir HAMA (ou ter uma baixa tendência de fazê-lo).

Sumário da Invenção

A presente invenção se refere a novos anticorpos monoclonais e derivados desses direcionados para PIGF e capazes de inibir a ligação de PIGF ao seu receptor. Os presentes ligantes são os primeiros a demonstrar a inibição de PIGF humano em uma condição patológica *in vivo*. Mais especificamente, os anticorpos e derivados desses de acordo com a presente invenção são capazes de reduzir o tamanho do tumor e a vascularização de

tecido tumoral humano *in vivo*. Os anticorpos da presente invenção fornecem uma alternativa para terapias antiangiogênicas que atingem VEGF atualmente usadas, com a importante vantagem de que os efeitos colaterais causados pela inibição da angiogênese patológica associada com essas terapias são significativamente reduzidos.

A presente invenção se refere a moléculas de ligação a antígeno, particularmente anticorpos monoclonais, fragmentos ou derivados desses, incluindo anticorpos humanizados e fragmentos de anticorpo, que se ligam ao mesmo epitopo de PIGF como o anticorpo referido aqui como 16D3.

Um primeiro objetivo da presente invenção é o fornecimento de novos anticorpos monoclonais capazes de se ligar a PIGF e que tem a capacidade de inibir o funcionamento de PIGF, mais especificamente anticorpos caracterizados em que sua região variável de cadeia pesada compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 2 ou uma seqüência que tem pelo menos 80%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente 95% de identidade de seqüência com essa dentro das regiões de CDR e/ou em que sua região variável de cadeia leve compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 4 ou uma seqüência que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de seqüência com essa dentro das regiões de CDR, tal como o anticorpo 16D3 ou derivados desse. Adicional ou alternativamente, em uma modalidade adicional, as moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção têm uma identidade de seqüência dentro das regiões variáveis da cadeia pesada e/ou leve fora das regiões de CDR que é de pelo menos 70%, particularmente pelo menos 80%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% idêntica às seqüências de SEQ ID Nº: 2 e SEQ ID Nº: 4 respectivamente.

De acordo com uma modalidade particular da invenção, o anticorpo é um anticorpo humanizado, mais particularmente um anticorpo híbrido, o mais particularmente um anticorpo híbrido de camundongo/humano, mais particularmente um híbrido de 16D3 de camundongo/IgG1^K ou IgG4^K

humano. Alternativamente, o anticorpo humanizado é um que compreende as regiões de CDR do anticorpo 16D3 de camundongo da presente invenção capazes de se ligar a PIGF, enxertada na cadeia principal de um anticorpo humano.

5 Uma modalidade adicional da presente invenção se refere a fragmentos de ligação a antígeno do anticorpo 16D3 de camundongo ou um derivado dos mesmos, tal como um anticorpo humanizado desse, tal como mas não limitado a um Fab, Fab' ou F(ab')₂, uma combinação de pelo menos duas regiões de determinação de complementaridade (CDRs), uma região
10 variável de cadeia única ancorada na membrana ou solúvel ou um domínio variável único. Modalidades particulares de tais fragmentos de ligação ao antígeno incluem fragmentos que compreendem pelo menos duas CDRs de 16D3 ou derivados desse ou mais particularmente pelo menos duas CDRs selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID N°: 17
15 (GYTFTDYY), SEQ ID N°: 18 (IYPGSGNT), SEQ ID N°: 19 (VRDSPFFDY), SEQ ID N°: 20 (QSLNSGMRKSF), SEQ ID N°: 21 (WAS) e SEQ ID N°: 22 (KQSYHLFT) ou que compreendem pelo menos duas seqüências que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de
20 seqüência com elas. Uma modalidade particular da invenção se refere ao fornecimento de fragmentos variáveis de cadeia única (scFvs) do anticorpo 16D3 de camundongo e scFvs humanizadas que são capazes de inibir a atividade de PIGF. O mais particularmente, a presente invenção fornece scFvs que compreendem a seqüência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24 ou
25 SEQ ID N°: 26 ou uma seqüência que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de seqüência com essas dentro das CDRs capazes de se ligar a PIGF.

30 Ainda um objetivo adicional da presente invenção é o fornecimento de linhagens celulares que produzem os anticorpos monoclonais da presente invenção, mais particularmente a linhagem celular 16D3 que produz o anticorpo 16D3, mas também outras linhagens celulares que são ca-

pazes de produzir as moléculas de ligação ao antígeno derivado de 16D3 ou fragmentos desse, por exemplo como um resultado de tecnologia recombinante.

Ainda um objetivo adicional da presente invenção é o fornecimento de uma composição farmacêutica para a prevenção ou tratamento de angiogênese (indesejada) em condições patológicas ou distúrbios em mamíferos ou para prevenção ou tratamento de reabsorção óssea, que compreende um anticorpo contra PIGF que é 16D3 ou um fragmento ou um derivado, mais particularmente uma versão humanizada de 16D3 ou um fragmento de ligação ao antígeno desse em mistura com um veículo farmacêuticamente aceitável. Uma modalidade específica da invenção é uma composição farmacêutica que compreende um fragmento de ligação ao antígeno de 16D3 ou um derivado desse, que é selecionado a partir do grupo que consiste em um Fab, Fab' ou F(ab')₂, uma parte variável de cadeia única ancorada à membrana ou solúvel ou um domínio variável único. As modalidades mais particulares da presente invenção se referem a composições farmacêuticas que compreendem um fragmento de ligação ao antígeno que compreende pelo menos duas CDRs selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 17 (GYTFTDYY), SEQ ID Nº: 18 (IYPGSGNT), SEQ ID Nº: 19 (VRDSPFFDY), SEQ ID Nº: 20 (QSLNSGMRKSF), SEQ ID Nº: 21 (WAS) e SEQ ID Nº: 22 (KQSYHLFT) ou menos duas que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de sequência com duas sequências diferentes selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 17 a 22. Uma modalidade particular da mesma se refere a composições farmacêuticas que compreendem um scFv do anticorpo 16D3 da invenção, mais particularmente que compreendem um scFv que compreende pelo menos duas CDRs selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 17 (GYTFTDYY), SEQ ID Nº: 18 (IYPGSGNT), SEQ ID Nº: 19 (VRDSPFFDY), SEQ ID Nº: 20 (QSLNSGMRKSF), SEQ ID Nº: 21 (WAS) e SEQ ID Nº: 22 (KQSYHLFT) ou pelo menos duas sequências que têm pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo

menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de sequência com duas seqüências diferentes selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 17 a 22, tal como um scFv que compreende a SEQ ID Nº: 24. Mais particularmente, a composição farmacêutica compreende um

5 scFv humanizado de 16D3, tal como mas não limitado a scFv humanizado que compreende SEQ ID Nº: 26 ou uma seqüência que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de seqüência com essa dentro das CDRs capazes de se ligar a PIGF.

10 Em ainda outra modalidade particular da composição farmacêutica de acordo com a invenção, uma quantidade terapeuticamente eficaz de outro agente antiangiogênico está incluída além da molécula de ligação ao antígeno capaz de se ligar a PIGF da invenção. O mais particularmente em relação a isso, agentes antiangiogênicos tais como inibidores de VEGF- e

15 bFGF-, são considerados, o mais particularmente anticorpos anti-VEGF.

Outro objetivo da presente invenção é fornecer seqüências de nucleotídeos que codificam os fragmentos de ligação ao antígeno dos anticorpos que se ligam a PIGF descritos aqui, mais particularmente seqüências de nucleotídeos que codificam as regiões variáveis de cadeia pesada e leve

20 de 16D3 produzido pela linhagem celular 16D3. O mais especificamente a seqüência de nucleotídeo que codifica as regiões variáveis de SEQ ID Nº: 2 e SEQ ID Nº: 4 é considerada. Adicionalmente, seqüências de polinucleotídeo que codificam fragmentos de ligação ao antígeno que compreendem pelo menos duas CDRs de 16D3, mais especificamente, polinucleotídeos

25 que codificam pelo menos duas das CDRs selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 17 (GYTFTDYY), SEQ ID Nº: 18 (IYPGSGNT), SEQ ID Nº: 19 (VRDSPFFDY), SEQ ID Nº: 20 (QSLNSGMRKSF), SEQ ID Nº: 21 (WAS) e SEQ ID Nº: 22 (KQSYHLFT) ou que codificam seqüências que compreendem pelo menos duas CDRs que tem pelo menos 80%, parti-

30 cularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de seqüência com SEQ ID Nº: 17 a 22. Modalidades específicas das seqüências de nucleotídeos da

presente invenção são fornecidas nas SEQ ID N^os: 1, 3, 5 e 6. Modalidades específicas adicionais incluem as seqüências de nucleotídeos que codificam o scFv de 16D3 e versões humanizadas desse, mais particularmente a seqüência de SEQ ID N^o: 23 e SEQ ID N^o: 25 e as seqüências que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de seqüência com essas, o mais particularmente dentro de regiões que codificam as regiões de CDR do scFv. Entretanto, será observado que existe uma variedade de seqüências de nucleotídeos que caem dentro do escopo da presente invenção como um resultado da redundância no código genético.

Outro objetivo da presente invenção é fornecer um método de tratamento e/ou prevenção de angiogênese indesejada (ou patológica) em uma condição patológica em um mamífero, cujo método compreende administrar a um mamífero que necessite de tal tratamento ou prevenção de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um princípio ativo que é o anticorpo 16D3 da presente invenção ou um fragmento de ligação de antígeno ou derivado desse, o mais particularmente um scFv como aqui descrito. Particularmente adequados para os métodos da presente invenção são os anticorpos humanizados e fragmentos de anticorpo, tal como scFv de 16D3 ou derivados do mesmo. Uma modalidade particular do método da invenção se refere ao tratamento e/ou prevenção de condições patológicas tais como, mas não limitadas a câncer, inflamação, doenças do olho, hipertensão pulmonar e extravasamento vascular. Um objetivo particular da presente invenção é fornecer uma terapia eficaz e segura (isto é, sem efeitos colaterais) para a angiogênese patológica, mais em particular para crescimento tumoral, inflamação, doenças do olho ou extravasamento vascular, em mamíferos, mais particularmente em seres humanos. O mais particularmente, o método da presente invenção é adequado para o tratamento e/ou prevenção de tumores sólidos, mais particularmente, para o tratamento e/ou prevenção de câncer de cólon, câncer de mama, câncer pancreático e melanomas.

Usos adicionais dos anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno da presente invenção se referem a detecção imunológica de PIGF em

amostras humanas, como porções marcadas em métodos de diagnóstico e para o rastreamento de compostos com um efeito aditivo para inibição de PIGF no tratamento de câncer.

5 A presente invenção se baseia na determinação surpreendente de novos ligantes, denominados novos anticorpos monoclonais de murino e humanizados e fragmentos, derivados e homólogos desses que inibem PIGF muito eficientemente. O mais particularmente, a presente invenção demonstra ligantes capazes de reduzir o crescimento tumoral, o mais particularmente capazes de reduzir o tamanho de um tumor entre 20% e 50%.

10 Breve Descrição das Figuras

A seguinte descrição, não pretendida para limitar a invenção às modalidades específicas aqui descritas, pode ser entendida em conjunto com as figuras que a acompanham, incorporadas aqui como referência, nas quais:

15 **Figura 1:** Ligação de anticorpo 16D3 (A) ou anticorpo 16D3 humanizado (hu 16D3) (B) a PIGF-2 humano (produzido em Pichia) com um teste ELISA de acordo com uma modalidade da presente invenção.

Figura 2: Inibição da ligação de PIGF-2 ao receptor Flt-1 humano pelo anticorpo 16D3 (quadrados) ou pelo anticorpo 16D3 humani-
20 zado (triângulos) com um teste ELISA de acordo com uma modalidade da presente invenção.

Figura 3: Resultados dos experimentos Biacore em que rhuPIGF-2 está imobilizado sobre um chip CM5 a fim de investigar o potencial de inibição do anticorpo 16D3 e seu fragmento Fab teste de acordo com
25 uma modalidade da presente invenção.

Figura 4: O anticorpo monoclonal 16D3 inibe o crescimento do tumor em um modelo de xenoenxerto de tumor pancreático humano DanG subcutâneo. Tratamento de camundongos nu/nu com tumores de aproximadamente 60 mm³ com anti-tPA ('IgG de controle') (1C8; 50 mg/kg de peso corporal; n=10), 16D3 anti-hPIGF ('anti-hPIGF') (50 mg/kg de peso corporal; n=10), anti-mPIGF (PL5D11D4 (obtido como descrito em WO
30 01/85796); 50 mg/kg de peso corporal; n=10), uma combinação de 16D3

anti-hPIGF e PL5D11D4 anti-mPIGF ('anti-hPIGF/anti-mPIGF') (25 mg/kg de peso corporal de cada; n=10) e 'veículo' (n=10) de acordo com uma modalidade da presente invenção. (A) Tamanho do tumor (B) Peso do tumor 18 dias após a inoculação do tumor.

5 Figura 5: O anticorpo monoclonal 16D3 inibe o crescimento do tumor em um modelo de xenoenxerto de tumor pancreático humano subcutâneo DanG de uma maneira dependente da dose. Tratamento de camundongos nu/nu com tumores de aproximadamente 60 mm³ com 16D3 anti-hPIGF (50 mg/kg = '1000µg'/'C', 37,5 mg/kg = '750 µg'/'D', 25 mg/kg = '500 µg'/'E', 12,5 mg/kg = '250 µg'/'F'; n=10 para cada concentração), IgG de controle ('1C8'/'B'; 50 mg/kg) e 'veículo'/'A' (n=10) de acordo com uma modalidade da presente invenção. A: evolução do tamanho médio do tumor após a inoculação de célula tumoral; B: média do tamanho médio do tumor no dia 20.

15 Figura 6: O anticorpo monoclonal 16D3 inibe o crescimento do tumor em um modelo de xenoenxerto de tumor de mama humano subcutâneo MDA-MB. Tratamento de camundongos nu/nu com tumores de aproximadamente 60 mm³ com 16D3 anti-hPIGF (50 mg/kg de peso corporal; n=10) ou veículo três vezes por semana de acordo com uma modalidade da presente invenção. A: peso do tumor e B: volume do tumor como determinado 32 dias após a inoculação.

25 Figura 7: O anticorpo monoclonal 16D3 inibe o crescimento do tumor em um modelo de xenoenxerto de tumor de cólon humano subcutâneo LOVO. Tratamento de camundongos nu/nu com tumores de aproximadamente 60 mm³ com 16D3 anti-hPIGF (50 mg/kg de peso corporal; n=10) ou veículo três vezes por semana de acordo com uma modalidade da presente invenção. A: peso do tumor e B: volume do tumor como determinado 30 dias após a inoculação.

30 Figura 8: O anticorpo monoclonal 16D3 inibe o crescimento do tumor em um modelo de xenoenxerto de tumor de melanoma humano subcutâneo Mel2a. Tratamento de camundongos nu/nu com tumores de aproximadamente 60 mm³ com 16D3 anti-hPIGF (50 mg/kg de peso corporal;

n=10) ou veículo três vezes por semana de acordo com uma modalidade da presente invenção. Peso do tumor como determinado 53 dias após a inoculação.

Figura 9: Anticorpo monoclonal 16D3 evita perda de peso corporal em um modelo de xenoenxerto de tumor pancreático humano subcutâneo DanG. Tratamento de camundongos nu/nu com tumores de aproximadamente 60 mm³ com 16D3 anti-hPIGF (50 mg/kg de peso corporal; n=10), IgG de controle, uma combinação de anti-hPIGF e anti-PIGF (25 mg/kg de peso corporal de cada; n=10) e veículo (n=10) de acordo com uma modalidade da presente invenção. O peso do tumor foi subtraído do peso corporal antes do cálculo da porcentagem de perda de peso corporal. Barras abertas: peso corporal no primeiro dia de tratamento; barras preenchidas: peso corporal no último dia de tratamento.

Figura 10: Anticorpo monoclonal 16D3 e Avastin exercem efeito adicional sobre a inibição do crescimento do tumor em um DanG pancreático humano subcutâneo. Tratamento de camundongos nu/nu com tumores de aproximadamente 60mm³ com 16D3 anti-hPIGF (37,5 mg/kg, 25 mg/kg, 12,5 mg/kg de peso corporal; n=10 para cada concentração), IgG de controle (1C8; 50 mg/kg), Avastin (15 mg/kg e 5 mg/kg de peso corporal, i.p. duas vezes por semana, n=10 cada) e uma combinação de anti-hPIGF (12,5 mg/kg de peso corporal) e Avastin (5 mg/kg de peso corporal; n=10) de acordo com uma modalidade da presente invenção. Os camundongos foram sacrificados após 20 dias da inoculação do tumor e o volume do tumor foi determinado.

Figura 11: Seqüências de nucleotídeo e aminoácidos de partes variáveis de anticorpo murino 16D3 de acordo com a uma modalidade da presente invenção. A. Seqüência de nucleotídeo que codifica uma parte variável da cadeia pesada; B. Seqüência de nucleotídeo que codifica parte variável da cadeia leve; C. Seqüência de aminoácido da parte variável da cadeia pesada; D. Seqüência de aminoácido da parte variável da cadeia leve. Nucleotídeos ou aminoácidos que podem ser modificados para fins de humanização de acordo com uma modalidade da invenção estão sublinhados.

Figura 12: Seqüências de nucleotídeos e aminoácidos de partes variáveis humanizadas de 16D3 de acordo com uma modalidade da presente invenção. A. Seqüência de nucleotídeo que codifica a parte variável humanizada da cadeia pesada. B. Seqüência de nucleotídeo que codifica a parte variável humanizada da cadeia leve; C. Seqüência de aminoácido da parte variável humanizada da cadeia pesada; D. Seqüência de aminoácido da parte variável humanizada da cadeia leve. Nucleotídeos ou aminoácidos modificados para fins de humanização estão sublinhados.

Figura 13: Ilustração do vetor para expressão de scFv de 16D3 humanizado em células 293.

Figura 14: A. Ligação de scFv16D33 e scFv16D3 humanizado a PIGF; B. Inibição da ligação de huPIGF-2 ao seu receptor huFlt-1 por scFv16D3 e scFv16D3 humanizado (B).

Figura 15: A. Seqüência de aminoácido de scFv de anticorpo murino 16D3; B. Seqüência de aminoácido de scFv humanizado de anticorpo 16D3. Regiões fora das regiões variáveis de cadeia pesada e leve estão sublinhadas.

Figura 16: Ilustração do vetor para expressão de Fab de 16D3 humanizado em células 293 de acordo com uma modalidade da invenção.

Figura 17: Ligação de Fab de 16D3 humanizado a huPIHG com um teste de ELISA de acordo com uma modalidade da presente invenção; B. Inibição da ligação de huPIGF-2 ao seu receptor huFlt-1 por Fab16D3.

25 Definições

O termo "16D3" como usado aqui se refere ao anticorpo monoclonal contra PIGF produzido pela linhagem celular depositada com o BCCM/LMBP sob o número LMBP 6399CB.

O termo "fragmento de anticorpo" se refere a uma subparte de uma molécula de anticorpo que sozinha, ou em combinação com outros fragmentos é capaz de se ligar ao antígeno contra o qual o anticorpo correspondente foi criado. Fragmentos de anticorpo típicos são Fab, Fab', F(ab')₂,

Fv ou scFv, que freqüentemente retém uma afinidade pelo antígeno que é comparável ao anticorpo completo. Fragmentos menores incluem regiões de determinação de complementaridade ou CDRs tais como CRD1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada ou leve e/ou combinações de duas ou mais das mesmas.

O termo "derivado" é usado aqui para se referir a uma molécula de ligação ao antígeno que corresponde a uma modificação do anticorpo original (por exemplo como produzido por uma linhagem celular de híbrido-ma) ou fragmento dessa, sem afetar de forma significativa a ligação ao antígeno. Modificações típicas incluem modificações da seqüência de aminoácidos do anticorpo original ou modificações dos grupos funcionais presentes na seqüência de aminoácido, por exemplo no contexto de humanização, para a ligação do anticorpo ou fragmento de anticorpo desse a outras moléculas tais como marcadores ou contas, ou para a modificação de glicosilação. Dessa forma, derivados incluem mas não são limitados a anticorpos humanizados, anticorpos híbridos, anticorpos ou outras moléculas de ligação ao antígeno que tenham sido obtidas por enxerto ou introdução de uma ou mais das regiões variáveis e/ou CDRs do anticorpo original na cadeia principal de outro anticorpo ou fragmento da mesma espécie ou de uma diferente. Derivados de um anticorpo incluem estruturas alternativas de uma ou mais CDRs do anticorpo que resultam em uma molécula de ligação ao antígeno tal como um polipeptídeo sintético.

Um "anticorpo humanizado ou fragmento de anticorpo" como usado aqui, se refere a uma molécula de anticorpo, ou fragmento dessa na qual, em comparação ao anticorpo original, aminoácidos foram substituídos a fim de assemelhar-se mais intimamente a um anticorpo humano. A maioria dessas substituições serão na cadeia principal do anticorpo ou fragmento de anticorpo, isto é em regiões onde o antígeno não se liga. Entretanto, é contemplado que dentro das CDRs, aminoácidos que não participam na ligação ao antígeno também podem ser substituídos.

Um anticorpo ou fragmento de anticorpo "remodelado" ou um "anticorpo híbrido" como usado aqui, se refere a um anticorpo que compre-

ende partes de pelo menos dois anticorpos diferentes, que podem opcionalmente ser da mesma espécie ou de espécies diferentes. Tipicamente, um anticorpo híbrido humano pode ser uma região constante humana de um anticorpo ligado a uma região variável humanizada de outro anticorpo (que é
5 direcionado contra o antígeno de interesse) ou uma cadeia principal de anticorpo humano de um anticorpo no qual seqüências de aminoácidos nas regiões de ligação ao antígeno foram substituídas por seqüências de outro anticorpo por exemplo um anticorpo não humano direcionado contra um antígeno humano de interesse. Mais particularmente as regiões de ligação ao
10 antígeno de um anticorpo (geralmente não humano) que têm afinidade por um antígeno de interesse, tal como uma ou mais CDRs ou regiões variáveis ou partes dessas, são introduzidas na cadeia principal de outro anticorpo (geralmente humano) (por exemplo anticorpos de CDR enxertada).

O termo "homologia" ou "homólogo" como usado aqui com referência a duas ou mais moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção se refere a habilidade das moléculas de ligação ao antígeno se ligarem ao mesmo antígeno, mais particularmente ao mesmo epitopo. A habilidade de duas moléculas de ligação ao antígeno se ligarem ao mesmo epitopo pode ser avaliada determinando se as moléculas de ligação ao antígeno podem competir uma com a outra pela ligação ao mesmo antígeno, por exemplo em um ensaio de ligação competitiva. A ligação ao antígeno de moléculas de ligação ao antígeno homólogas deve ser de especificidade similar.
20

A "identidade de seqüência" de duas seqüências como usado aqui se refere ao número de posições com nucleotídeos ou aminoácidos idênticos dividido pelo número de nucleotídeos ou aminoácidos na menor das seqüências, quando as duas seqüências são alinhadas. Preferivelmente a dita identidade de seqüência é maior do que 70%-80%, preferivelmente 81-85%, mais preferivelmente 86-90%, especialmente preferivelmente 91-95%, o mais preferivelmente 96-100%, mais especificamente é 100%. Em
30 vista da contribuição geralmente limitada da cadeia principal das regiões variáveis para a ligação com o antígeno, identidade de seqüência é o mais comumente especificada aqui com relação a seqüência dentro das regiões de

determinação de complementaridade ou CDRs, isto é com relação às seqüências de nucleotídeos que codificam e as seqüências de aminoácidos que constituem as CDRs. Dessa forma, quando uma seqüência é especificada ter por exemplo uma identidade de seqüência de 80% por uma seqüência específica “dentro das CDRs” ela é pretendida para fornecer a identidade de seqüência entre as duas seqüências apenas com relação às seqüências que formam as CDRs.

O termo “PIGF” é usado aqui para se referir ao fator de crescimento placentário. Foi descoberto que PIGF ocorre principalmente em duas variantes de *splice* ou isoformas, PIGF-1 de 149 aminoácidos e PIGF-2 de 170 aminoácidos, que compreende um inserção de 21 aminoácidos na região carboxi-terminal, mas também outras isoformas foram descobertas.

O termo “inibitório” quando se referindo a um anticorpo para PIGF ou fragmento ou derivado desse é usado para indicar que o anticorpo, fragmento ou derivado é capaz de inibir a ligação de PIGF ao seu receptor Flt-1.

Descrição Detalhada

A presente invenção será descrita com referência a certas modalidades e a certas figuras mas a presente invenção não está limitada a elas mas apenas pelas reivindicações.

A presente invenção se refere a moléculas de ligação ao antígeno, particularmente anticorpos monoclonais, fragmentos ou derivados desses, que se ligam ao mesmo epitopo de PIGF que o anticorpo referido aqui como anticorpo 16D3. “Anticorpo 16D3”, produzido pela linhagem celular LMBP 6399CB, foi criado contra PIGF de origem humana, e se liga a PIGF humano (ambas as isoformas PIGF-1 e PIGF-2). O anticorpo 16D3 inibe a ligação de PIGF humano ao seu receptor Flt-1, inibindo a atividade de PIGF. O anticorpo 16D3 em si e fragmentos ou derivados desses, assim como seqüências de nucleotídeos que codificam o anticorpo, fragmentos ou derivados, podem assim ser usados para a inibição de PIGF tanto em um contexto terapêutico como em um modelo animal para fins de teste ou rastreamento. Alternativamente, o anticorpo pode ser usado para detecção e/ou quantifica-

ção de PIGF *in vivo*, *ex vivo*, ou *in vitro*. Dessa forma, a presente invenção fornece diferentes aplicações das moléculas de ligação ao antígeno da invenção e as seqüências de nucleotídeos que as codificam. A invenção ainda se refere a métodos de produzir as moléculas de ligação ao antígeno da invenção, e a linhagens celulares capazes de produzir essas moléculas de ligação ao antígeno.

Um primeiro aspecto da presente invenção se refere a linhagens celulares que produzem as moléculas de ligação ao antígeno da invenção, mais particularmente linhagens celulares que produzem anticorpos monoclonais capazes de se ligar ao mesmo antígeno que 16D3 ou fragmentos ou derivados desses. Uma modalidade particular desse aspecto da invenção é a linhagem celular de hibridoma também referida como "linhagem celular 16D3" que produz o anticorpo monoclonal 16D3 e que foi depositada com o BCCM/LMBP (*Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms/Plasmid Collection Laboratorium voor Moleculaire Biologie*, Universidade de Ghent K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Ghent, BE por Thromb-X em 29 de março de 2005 como o número de depósito LMBP 6399CB. A presente invenção ainda fornece linhagens celulares que produzem anticorpos monoclonais derivados do anticorpo monoclonal 16D3. Tais linhagens celulares podem ser obtidas pela modificação da seqüência codificante para o anticorpo monoclonal 16D3, o mais particularmente a seqüência codificante que codifica as regiões que não se ligam ao antígeno de 16D3. Métodos de determinar a natureza das modificações a serem feitas, e exemplos de modificações adequadas estão descritos aqui.

Um segundo aspecto da invenção se refere a moléculas de ligação ao antígeno capazes de se ligar ao mesmo antígeno que o anticorpo 16D3. Mais particularmente, a invenção se refere ao anticorpo chamado 16D3 produzido pela linhagem celular 16D3 descrita acima e homólogos, fragmentos de derivados desse capazes de se ligar a PIGF e inibir a atividade de PIGF.

Dessa forma uma modalidade particular da presente invenção fornece o anticorpo monoclonal anti-PIGF humano 16D3 produzido pela li-

nhagem celular LMBP 6399CB, e fragmentos desse anticorpo. O anticorpo monoclonal 16D3 é caracterizado pela seqüência de aminoácido das regiões variáveis de suas cadeias pesada e leve como descrito em SEQ ID Nº: 2 e SEQ ID Nº: 4, respectivamente.

- 5 De acordo com uma modalidade específica, a presente invenção se refere a fragmentos, mais particularmente fragmentos de ligação ao antígeno do anticorpo 16D3. Tais fragmentos incluem, mas não estão limitados a Fab, Fab', F(ab')₂, CDR's, peptídeos com uma seqüência de uma parte do anticorpo ou suas CDRs, domínios variáveis únicos e combinações desses.
- 10 Fragmentos Fab, Fab' e F(ab')₂, podem ser gerados por digestão proteolítica de anticorpos monoclonais usando métodos bem-conhecidos na técnica, tal como descrito por Stanworth et al, *Handbook of Experimental Immunology* (1978), vol. I capítulo 8 (Blackwell Scientific Publications). Tais fragmentos, que retêm a habilidade de se ligar ao antígeno, perderam várias propriedades
- 15 des do anticorpo de origem, tais como ativação do complemento ou capacidade de se ligar a receptores Fc gama. Mais especificamente a presente invenção fornece fragmentos que compreendem as regiões variáveis das cadeias pesada e leve de 16D3 que correspondem a SEQ ID Nº: 2 e SEQ ID Nº: 4, respectivamente. Uma modalidade particular adicional da invenção se
- 20 refere a fragmentos que compreendem as regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de 16D3 e derivados desses. Os dois métodos mais comumente seguidos para identificar CDRs são IMGT e KABAT, e fragmentos que compreendem mais de um tipo de CDR de 16D3 são considerados dentro do contexto da invenção, assim como derivados de 16D3 que com-
- 25 preendem esses fragmentos ou CDRs. De acordo com a identificação por IMGT de CDRs, as regiões CDR dentro das regiões variáveis de 16D3 correspondem a SEQ ID Nº: 17 (GYTFTDYY), SEQ ID Nº: 18 (IYPGSGNT); SEQ ID Nº: 19 (VRDSPFFDY), SEQ ID Nº: 20 (QSLLNSGMRKSF), SEQ ID Nº: 21 (WAS) e SEQ ID Nº: 22 (KQSYHLFT). Dessa forma, a presente in-
- 30 venção fornece fragmentos do anticorpo 16D3 que compreendem uma ou mais das CRDs de 16D3 como fornecido em SEQ ID Nº: 17 a SEQ ID Nº: 22.

Uma modalidade específica adicional da invenção fornece fragmentos de 16D3 que são partes variáveis de cadeia única ancoradas à membrana ou solúveis de 16D3. Um fragmento variável de cadeia única (scFv) é um fragmento de anticorpo geneticamente projetado que geralmente consiste na cadeia variável pesada (VH) e cadeia leve (VL) de uma imunoglobulina, ou partes dessas, unidas juntas por um ligante de peptídeo flexível. Opcionalmente, scFvs compreendem as regiões CDR do anticorpo de interesse e regiões de arcabouço de outro anticorpo. A sequência de aminoácido das regiões de arcabouço e/ou CDR de scFv é opcionalmente humanizada para reduzir antigenicidade para uso como um farmacêutico em seres humanos. A invenção fornece um scFv de 16D3 e uma versão humanizada desse que compreende SEQ ID Nº: 24 e SEQ ID Nº: 26, respectivamente. Métodos para obter partes variáveis de cadeia única de anticorpos são conhecidas do versado na técnica e estão descritas no exemplo 6 aqui contido. Por exemplo o método pode incluir amplificação das seqüências de DNA das partes variáveis das cadeias pesada e leve humanas em reações separadas e clonagem, seguida por inserção de uma seqüência ligante de quinze aminoácidos, por exemplo (Gly4Ser)₃ entre VH e VL por uma reação em cadeia da polimerase (PCR) de duas etapas (veja por exemplo Dieffleibach & Dveksler, "PCR Primer, a laboratory manual" (1995), Cold Spring Harbour Press, Plainview, NY, USA). O fragmento resultante pode então ser inserido em um vetor adequado para expressão de um fragmento variável de cadeia única como um polipeptídeo solúvel ou apresentado em fago. Isso pode ser alcançado por métodos bem-conhecidos daqueles versados na técnica, tal como descrito por Gilliland et al., *Tissue Antigens* (1996) 47: 1-20.

A presente invenção também fornece fragmentos de 16D3 que são peptídeos de ligação ao antígeno representativos das regiões hipervariáveis do anticorpo 16D3 ou combinações desses. Tais peptídeos podem ser obtidos por síntese usando um sintetizador de biosistema aplicado por exemplo um sintetizador de polipeptídeos tal como o modelo 9050 disponível por Milligen (USA) ou um modelo de uma tecnologia relacionada.

Uma modalidade adicional da invenção se refere a derivados do

anticorpo 16D3 ou fragmentos desses. Mais particularmente, a invenção se refere a anticorpos que compreendem uma região de cadeia pesada variável e ou uma região de cadeia leve variável como descrito em SEQ ID Nº: 2 e SEQ ID Nº: 4, respectivamente, mas das quais as regiões constantes são diferentes daquelas em 16D3. Adicional ou alternativamente, os derivados do anticorpo 16D3 da presente invenção compreendem pelo menos duas das CDRs de 16D3 como fornecido em SEQ ID Nº: 17 (GYTFTDYY), SEQ ID Nº: 18 (IYPGSGNT); SEQ ID Nº: 19 (VRDSPFFDY), SEQ ID Nº: 20 (QSLNLSGMRKSF), SEQ ID Nº: 21 (WAS) e SEQ ID Nº: 22 (KQSYHLFT), enquanto as regiões de arcabouço entre as CDRs e/ou regiões constantes são diferentes.

De acordo com uma modalidade da invenção, derivados do anticorpo 16D3 ou fragmentos desses são fornecidos tendo pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de sequência com a região variável de cadeia pesada e leve de 16D3 fornecida em SEQ ID Nº: 2 e SEQ ID Nº: 4, respectivamente. O mais particularmente, a presente invenção fornece derivados do anticorpo 16D3 ou fragmentos desses que compreendem uma região variável de cadeia pesada e/ou uma região variável de cadeia leve que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de sequência com SEQ ID Nº: 2 e SEQ ID Nº: 4, respectivamente dentro das regiões CDR. Identidade de sequência dentro das regiões de arcabouço pode ser, mas não é limitada a, menos do que 80%. Também considerados são derivados que compreendem pelo menos duas CDRs que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de sequência com as seqüências de SEQ ID Nº: 17 a 22, respectivamente.

De acordo com uma modalidade adicional, a invenção fornece derivado de uma scFV de 16D3 que compreende uma sequência que tem pelo menos 80%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particular-

mente pelo menos 95% de identidade de seqüência com SEQ ID Nº: 24 e uma seqüência que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de seqüência com SEQ ID Nº: 26, o mais particularmente dentro das regiões CDR.

- 5 De acordo com outra modalidade, a invenção fornece derivados de 16D3 ou fragmentos desses que são humanizados. Tais derivados humanizados de 16D3 são homólogos em que eles retêm sua afinidade de ligação por PIGF. De acordo com uma modalidade particular, os derivados humanizados de 16D3 também retêm a habilidade de inibir a atividade de
- 10 PIGF. Humanização de anticorpos não humanos é alcançada pela substituição de um ou mais aminoácidos na cadeia principal do anticorpo, isto é aqueles aminoácidos que não estão envolvidos na ligação do anticorpo ao antígeno, a fim de assemelhar-se mais intimamente à cadeia principal de um anticorpo humano. Diferentes tipos ou níveis de humanização são conside-
- 15 rados. Modalidades particulares da invenção se referem a anticorpos ou fragmentos nos quais regiões inteiras, mais particularmente a(s) região(s) constante(s) do anticorpo não humano ou fragmento é (são) substituídas pela(s) região(ões) constante(s) de um anticorpo humano, a fim de resultar em anticorpos ou fragmentos quiméricos (por exemplo humano/murino). Mo-
- 20 dalidades particulares adicionais são anticorpos onde os aminoácidos de ligação ao antígeno (por exemplo duas ou mais CDRs) do anticorpo não humano contra PIGF é introduzido dentro da cadeia principal de um anticorpo humano (por exemplo anticorpos de CDR enxertada). Métodos para associar a ligação da região de determinação de complementaridade ("CDR")
- 25 do anticorpo monoclonal não humano com as regiões de arcabouço humanas – em particular a região constante C do gene humano – são conhecidos do versado na técnica, tal como descrito por Jones et al. em *Nature* (1986) 321 :522 ou Riechmann em *Nature* (1988) 332:323. Alternativamente a substituição de um número mais limitado de aminoácidos dos anticorpos anti-
- 30 PIGF não humanos da invenção também é considerada. Modalidades particulares da invenção se referem a anticorpos que compreendem regiões de cadeia pesada e/ou leve variáveis humanizadas da Figura 9 ou partes des-

sas e anticorpos que compreendem pelo menos duas, mais particularmente três a cinco, o mais particularmente todas as seis CDRs de SEQ ID Nº: 17 a SEQ ID Nº: 22. Modalidades adicionais da invenção se referem a anticorpos humanizados que compreendem regiões de cadeia pesada e/ou leve variáveis que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de sequência com SEQ ID Nº: 6 e SEQ D NO: 8, respectivamente. Alternativamente a presente invenção fornece anticorpos humanizados que compreendem pelo menos duas, mais particularmente três a cinco, o mais particularmente seis CDRs que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de sequência com SEQ ID Nº: 17 a 22, respectivamente.

A presente invenção dessa forma se refere a anticorpos humanizados e/ou quiméricos ou híbridos derivados do anticorpo murino 16D3. Em uma modalidade particular, aminoácidos específicos do anticorpo murino 16D3 estão mutados a fim de eliminar aminoácidos imunogênicos. Portanto, em uma modalidade particular, a presente invenção se refere a moléculas de ligação ao antígeno que compreendem uma sequência de aminoácido da parte variável de cadeia pesada de acordo com SEQ ID Nº: 2 em que um ou mais dos seguintes aminoácidos foram alterados: I2V, P9A, K40A e/ou T1 IL. Adicional ou alternativamente, os anticorpos humanizados derivados do anticorpo 16D3 são moléculas de ligação ao antígeno que compreendem uma sequência de aminoácido da parte variável de cadeia leve de acordo com SEQ ID Nº: 4, em que um ou mais dos seguintes aminoácidos foi alterado: S5T, S9D, A15L, KI 8R, R22N e/ou L89V. Dessa forma, de acordo com uma modalidade particular, a invenção fornece moléculas de ligação ao antígeno que compreendem tanto uma sequência de aminoácido de parte variável da cadeia pesada de acordo com SEQ ID Nº: 2, em que um ou mais dos seguintes aminoácidos foi alterado: I2V, P9A, K40A e/ou T111L e uma sequência de aminoácido de parte variável de cadeia leve de SEQ ID Nº: 4 em que um ou mais dos seguintes aminoácidos foi alterado: S5T, S9D, AI

5L, KI 8R, R22N e/ou L89V.

Em outra modalidade, o anticorpo é adicionalmente humanizado em que as cadeias leve variável e/ou pesada variável (humanizadas) do anticorpo murino 16D3 são enxertadas em uma estrutura de uma imunoglobulina humana ou são acopladas à região constante de um anticorpo humano, mais em particular a uma região constante de IgG humana. Particularmente adequados nesse respeito são IgG1κ (IgG1-kappa), que são capazes de ativar células destruidoras naturais no corpo. Em uma modalidade particular, a presente invenção assim se refere a um híbrido Hu16D3 – IgG1κ. Uma modalidade alternativa da presente invenção é um híbrido Hu16D3 – IgG4κ. Anticorpos IgG humanos (e assim também anticorpos híbridos obtidos usando a cadeia principal e/ou regiões constantes de IgG humana) exibem um tempo de meia-vida prolongado, assim fornecendo níveis plasmáticos muito estáveis e permitindo uma drástica redução na frequência de administração. Além disso, o uso de anticorpos ou derivados humanizados carrega um risco mínimo de induzir respostas imunes.

Modalidades adicionais da presente invenção se referem a moléculas de ligação ao antígeno que são homólogas ao anticorpo 16D3 ou fragmentos desses, isto é moléculas de ligação ao antígeno que se ligam ao mesmo epitopo que o anticorpo 16D3. Em uma modalidade as moléculas de ligação ao antígeno homólogas são produzidas pela imunização intencional em animais, mais particularmente em camundongo, por exemplo pela injeção de PIGF nos camundongos e então fusão do linfócitos do baço com uma linhagem celular de mieloma de camundongo, seguida pela identificação das culturas celulares que produzem anticorpos anti-PIGF (por exemplo pelo rastreamento da ligação a PIGF) e clonagem deles. Opcionalmente a seleção adicional dos anticorpos é realizada com base na reatividade com o epitopo de 16D3, ou competição com o anticorpo 16D3 ou um fragmento desse.

Ainda outro aspecto da invenção se refere a métodos para produzir as moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção. Esses métodos incluem mas não são limitados, aos métodos de humanização do anticorpo 16D3 como fornecido na seção de Exemplos aqui contida.

Ainda outro aspecto da presente invenção se refere ao fornecimento de seqüências de nucleotídeos que codificam moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção, o mais particularmente as regiões de ligação ao antígeno desse. Modalidades particulares da invenção se referem às seqüências de nucleotídeos que codificam região de cadeia pesada variável e a região de cadeia leve variável definidas por SEQ ID Nº: 2 e SEQ ID Nº: 4, respectivamente, tais como, mas não limitadas, às seqüências de nucleotídeos de SEQ ID Nº: 1 e SEQ ID Nº: 3, que correspondem às seqüências da linhagem celular 16D3 que codificam a região de cadeia pesada e leve do anticorpo 16D3. Também dentro do contexto da presente invenção seqüências de nucleotídeos são fornecidas que codificam uma ou mais das regiões de CDR do anticorpo monoclonal 16D3 como identificado nas SEQ ID Nºs: 17 a 22. Modalidades particulares da invenção incluem a seqüência que codifica scFvs e scFvs humanizadas de 16D3 tais como mas não limitado a SEQ ID Nº: 23 e SEQ ID Nº: 25, respectivamente. A invenção também fornece seqüências de nucleotídeos que codificam os derivados de 16D3 e fragmentos desses, descritos aqui. A presente invenção também fornece sondas e iniciadores capazes de hibridizar especificamente com as seqüências de nucleotídeos descritas acima, tal como, mas não limitados aos iniciadores descritos na seção de Exemplos.

A presente invenção também inclui seqüências de nucleotídeos que são complementares às seqüências que codificam anticorpos monoclonais, fragmentos ou derivados desses, descritos aqui.

Outro aspecto ainda da presente invenção, se refere à aplicação terapêutica das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção. A presente invenção assim fornece o uso de moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção como um medicamento. Em relação a isso, a invenção fornece composições farmacêuticas, que compreendem uma ou mais das moléculas de ligação ao antígeno da invenção, para a prevenção ou tratamento de doenças ou distúrbios nas quais a angiogênese contribui para a patologia da doença ou distúrbio. Conseqüentemente métodos de tratamento e/ou prevenção de doenças nas quais a angiogênese contribui para a pa-

tologia da doença ou distúrbio que compreendem administrar a um mamífero que necessite de tal tratamento ou prevenção, uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição que compreende uma ou mais das moléculas de ligação ao antígeno descritas aqui.

5 Em tais doenças a angiogênese também é referida como "angiogênese patológica". Exemplos de tal angiogênese patológica incluem a angiogênese observada em patologias de vasos sangüíneos (aterosclerose, hemangioma, hemangioendotelioma), de ossos e articulações (artrite reumatóide, sinovite, destruição de ossos de cartilagens, osteomielite, crescimento
10 de pannus, formação de osteofito, neoplasmas e metástases), de pele (verrugas, granulomas piogênicos, crescimento de cabelo, sarcoma de Kaposi, quelóides de cicatrizes, edema alérgico, neoplasmas), de fígado, rim, pulmão, ouvido e outros epitélios (processos inflamatórios e infecciosos incluindo hepatite, glomerulonefrite, pneumonia, asma, pólipos nasais, otite, e
15 transplante, regeneração, neoplasmas e metástase nesses órgãos), em certas patologias do útero, ovário e placenta (sangramento uterino disfuncional por exemplo devido a dispositivos contraceptivos intra-uterinos, formação de cisto folicular, síndrome de hiperestimulação ovariana, endometriose, neoplasmas), patologias no cérebro ou nervos (neoplasmas e metástase), certas
20 afecções cardíacas e musculares esqueléticas (por exemplo devido a sobrecarga de trabalho), condições patológicas de tecido adiposo (obesidade) e órgãos endócrinos (tireoidite, dilatação de tireóide, transplante de pâncreas). Angiogênese patológica também pode contribuir para doenças de hematopoiese (AIDS, Kaposi), malignidades hematológicas (leucemias, etc).

25 Em várias doenças do olho acredita-se que a angiogênese patológica seja um fator importante, e dessa forma o tratamento com moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção é considerado. Nas "doenças isquêmicas da retina" o suprimento de sangue e oxigênio da retina é diminuído, as porções periféricas da retina perdem sua fonte de nutrição e param
30 de funcionar apropriadamente. Causas comuns de retinopatia são oclusão da veia central da retina, estenose da artéria carótida, diabetes (retinopatia diabética) e anemia (retinopatia de célula calciforme). Retinopatia também é

observada em crianças prematuras (retinopatia da prematuridade). Retinopatia diabética é uma importante causa de perda visual em pacientes com diabetes. Na retina isquêmica ocorre o crescimento de novos vasos sanguíneos (neovascularização). Esses vasos freqüentemente crescem sobre a superfície da retina, no nervo ótico, ou na frente do olho, na íris. Os novos vasos não conseguem substituir o fluxo de nutrientes necessários, e ao contrário, pode causar vários problemas tais como hemorragia vítrea, descolamento de retina, e glaucoma incontrolado. Esses problemas ocorrem porque os novos vasos são frágeis e tendem a sangrar. Se descoberto nos seus estágios iniciais, a retinopatia diabética proliferativa pode algumas vezes ser interrompida com fotocoagulação panretinal. Entretanto, em alguns casos, cirurgia de vitrectomia é a única opção. Outras doenças dos olhos nas quais acredita-se que a angiogênese desempenhe um papel crítico são distúrbios intraoculares, leucomalácia, e neoplasmas e metástase. Neovascularização coroidal, é o crescimento de novos vasos sanguíneos que se originam do coróide através de uma quebra na membrana de Bruch dentro do epitélio do pigmento sub-retinal (sub-RPE) ou espaço subretinal. A localização, padrão de crescimento, e tipo (1 ou 2) de CNV dependem da idade do paciente e da doença subjacente. Sangramento e exsudação ocorrem com crescimento adicional, sendo responsáveis pelos sintomas visuais. A neovascularização coroidal (CNV) é uma causa importante de perda visual. É estimado que a CNV ocorre em 5-10% de míopes e ocorre em virtualmente todas as rupturas coroidais durante a fase de cura; a maioria regride espontaneamente mas em 15-30% dos pacientes, a CNV pode recorrer e levar a um deslocamento hemorrágico ou macular seroso com perda visual concomitante.

O termo "hipertensão pulmonar" se refere a um distúrbio no qual a pressão sanguínea nas artérias pulmonares é anormalmente alta. Na ausência de outras doenças do coração ou pulmões ela é chamada hipertensão pulmonar primária. O estreitamento difuso das arteríolas pulmonares ocorre como um resultado de arteriogênese patológica seguida por hipertensão pulmonar como uma resposta à resistência aumentada ao fluxo sanguíneo. A incidência é 8 em cada 100.000 pessoas. Entretanto, hipertensão

pulmonar também pode ocorrer como uma complicação de Doenças Pulmonares Obstrutivas Crônicas (COPD) tais como enfisema, bronquite crônica ou fibrose intersticial difusa e em paciente com COPD asmatiforme. A incidência de COPD é de aproximadamente 5 em cada 10.000 pessoas.

5 Ainda um exemplo adicional de uma doença na qual a angiogênese contribui para a patologia da doença, e na qual é considerado para tratamento com as moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção, é o grupo de distúrbios inflamatórios. "Inflamação" como usado aqui significa a
10 reação local descontrolada à lesão (isto é física, química ou como um resultado de infecção) de tecidos vivos, especialmente a reação local dos vasos sangüíneos pequenos, seus conteúdos, e suas estruturas associadas. A
passagem dos constituintes do sangue através das paredes dos vasos para dentro dos tecidos é a característica distintiva da inflamação, e o conjunto de tecido assim formado é chamado o exsudato ou edema. Qualquer processo
15 nocivo que danifica o tecido vivo tal como mas não limitado a infecção com bactérias, calor excessivo, frio, lesão mecânica tal como compressão, ácidos, álcalis, irradiação, ou infecção com vírus pode causar inflamação independentemente do órgão ou tecido envolvido. Tais "doenças inflamatórias" incluem reações que variam de queimaduras até pneumonia, leprosia, tuberculose, e artrite reumatóide.
20

Formação de adesão pós-operatória (POA) é uma complicação cirúrgica freqüente em cirurgias ginecológicas, pélvicas e cardiológicas. O trauma cirúrgico aos tecidos freqüentemente causa formação de cicatriz permanente que conecta o tecido traumatizado a outro órgão. Dessa forma,
25 no sítio de tal dano, os tecidos internos que normalmente permanecem separados, freqüentemente se tornam unidos. Complicações que surgem da formação de adesão são obstruções intestinais, obstruções do intestino delgado, dor pélvica crônica, e infertilidade em mulheres. O termo "formação de adesão" no seu sentido médico se refere a conglutinação, o processo de
30 adesão ou união de duas superfícies ou partes. Por exemplo a união das superfícies opostas de uma ferida, ou superfícies opostas do peritônio. Ainda, adesões, no plural, podem se referir a faixas inflamatórias que conectam

superfícies serosas opostas. O termo adesão, como usado aqui, também inclui adesões fibrinosas, que são adesões que consistem em finos filamentos de fibrina que resultam de um exsudato de plasma ou linfa, ou um extravasamento de sangue. Quelóide, um leve crescimento excessivo de tecido fibroelástico que surge em uma área de lesão ou, ocasionalmente, espontaneamente também é uma forma de adesão. Foi mostrado que a inibição de fator de crescimento placentário (PIGF) leva a uma supressão notável de formação de adesão pós-operatória (WO03063904).

5 Foi ainda demonstrado que doenças caracterizadas por reabsorção óssea, tais como, mas não limitadas a osteoporose, podem se beneficiar da inibição de PIGF (WO2004002524).

Dessa forma, de acordo com uma modalidade específica as moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção são particularmente adequadas para o tratamento e/ou prevenção de crescimento tumoral e metástase, doenças do olho, inflamação, formação de adesão, e hipertensão pulmonar.

Uma modalidade particular adicional da invenção se refere ao uso das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção para a prevenção e/ou tratamento de câncer, tal como, mas não limitado a câncer de mama, pulmão, próstata, cérebro, fígado, pâncreas, cólon, rim, útero ou medula óssea. Mais particularmente, a invenção se refere ao uso das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção para a prevenção e/ou tratamento de tumores sólidos tais como mas não limitados a câncer de cólon, câncer de mama, câncer pancreático, e melanomas. Mais particularmente os dados são fornecidos aqui demonstrando que os anticorpos da presente invenção são particularmente adequados para obter regressão de tumores humanos pancreáticos. Os anticorpos da presente invenção são demonstrados reduzir significativamente o tamanho do tumor *in vivo*, pelo qual, reduções no tamanho de até cerca de 50% são demonstradas. Dessa forma, a presente invenção fornece métodos e composições farmacêuticas para reduzir o tamanho do tumor em pelo menos 20%, mais particularmente pelo menos 30%, o mais particularmente pelo menos 50%.

Uma modalidade particular adicional da invenção se refere ao uso das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção no tratamento ou prevenção de distúrbios ósseos e mais especificamente para o tratamento de condições onde há uma reabsorção óssea aumentada tal como por exemplo osteoporose e osteomalácia.

Conseqüentemente, a presente invenção se refere ao uso das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção para a produção de um medicamento para o tratamento das doenças acima mencionadas. Um aspecto importante da presente invenção é que os anticorpos, fragmentos e derivados desses permitem o tratamento e/ou prevenção das doenças acima mencionadas sem os efeitos colaterais atribuídos ou esperados com outros tratamentos antiangiogênicos, mais particularmente tratamentos alternativos que atingem fatores angiogênicos, tais como VEGF. Testes de segurança pré-clínicos com anticorpos humanos anti-VEGF recombinantes demonstraram já em 1999 que a inibição de VEGF resulta na inibição de angiogênese fisiológica, mais particularmente neovascularização no crescimento ósseo longitudinal e formação de *corpora lutea* (Ryan et al., 1999) Toxicologic pathology 27(1):78-86). Estudos recentes descrevem que inibidores de VEGF causam regressão de vasos em traquéia e glândulas tireóides saudáveis, o que pode levar a disfunção de órgãos (Baffert et al, 2004, Circ Res 94:984-992; Inai et al., 2004 Am J Pathol 165:35- 52). Apesar disso, bevacizumab, um anticorpo anti-VEGF humano é usado atualmente no mercado como supressor de angiogênese apesar dos seus efeitos observados na cura de feridas, pressão sangüínea e risco de trombose, por causa da eficácia geral dessa abordagem antiangiogênica sobre a regressão do tumor. Os anticorpos anti-PIGF e derivados da presente invenção permitem a inibição de angiogênese indesejada sem esses efeitos colaterais observados sobre a pressão sangüínea, cura de feridas, risco de trombose, e regressão de vasos em órgãos saudáveis.

Uma modalidade particular da presente invenção se refere a composições farmacêuticas, como um princípio ativo, o anticorpo monoclonal 16D3 ou um fragmento ou derivado desse, em mistura com um veículo

farmaceuticamente aceitável. A composição farmacêutica da presente invenção compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma ou mais das moléculas de ligação ao antígeno. De forma semelhante, a presente invenção fornece métodos de tratamento e/ou prevenção que compreendem a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma ou mais das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz como usada aqui significa uma quantidade dentro da faixa de cerca de 0,5 mg por quilograma de peso (mg/kg) a cerca de 50 mg/kg, mais preferivelmente de cerca de 1 mg/kg e cerca de 10 mg/kg do mamífero a ser tratado. Será observado que, em vista do longo tempo de meia vida da maioria dos anticorpos IgG humanos, as moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção que são anticorpos monoclonais dessa classe irão possuir uma periodicidade de tratamento que participa no conforto do paciente.

De acordo com outro aspecto ainda da invenção, composições farmacêuticas são fornecidas que compreendem as moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção e outro agente antiangiogênico, assim como métodos de tratamento que fornecem uma administração seqüencial das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção e outro agente antiangiogênico. De fato, a presente invenção demonstra um efeito aditivo das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção e outros agentes antiangiogênicos, tais como anticorpos anti-VEGF sobre a inibição do crescimento tumoral. Mais particularmente é demonstrado que o uso combinado do anticorpo 16D3 da presente invenção e Avastin® é capaz de reduzir o tamanho do tumor em até 70%, enquanto doses aumentadas tanto de Avastin® sozinho como do anticorpo anti-PIGF não alcançam uma redução do tamanho do tumor de mais do que 55% nas mesmas condições. Outros produtos antiangiogênicos adequados, assim como, sua dosagem usual dependendo da classe a qual eles pertencem, são bem-conhecidas daqueles versados na técnica. Exemplos de agentes antiangiogênicos incluem inibidores de VEGF que agem diretamente sobre VEGF, tal como o anticorpo direcionado contra VEGF comercializado sob o nome Avastin® ou que age sobre os

receptores de VEGF. Os anticorpos da presente invenção tornam possível diminuir a dosagem de por exemplo agentes antiangiogênicos que inibem VEGF, conhecidos por induzir vários efeitos colaterais como descrito acima.

As composições farmacêuticas da presente invenção podem ainda compreender, uma quantidade terapeuticamente eficaz de outros compostos/fármacos ativos contra a doença a ser tratada, mais particularmente outros compostos/fármacos úteis no tratamento de crescimento tumoral, inflamação, doenças do olho e hipertensão pulmonar.

Veículos farmacêuticos adequados para uso nas composições farmacêuticas da invenção são descritos por exemplo em Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a ed. (1980) e sua formulação é bem-conhecida daqueles versados na técnica. Eles incluem quaisquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos (por exemplo fenol, ácido sórbico e clorobutanol), agentes isotônicos, (tal como açúcares ou cloreto de sódio) e similares. Ingredientes adicionais podem estar incluídos a fim de controlar a duração da ação do princípio ativo de anticorpo monoclonal na composição. Composições de liberação controlada podem assim ser obtidas pela seleção de veículos de polímeros apropriados tais como por exemplo poliésteres, ácidos de poliamino, polivinil pirrolidona, copolímeros de acetato de etileno-vinila, metilcelulose, carboximetilcelulose, sulfato de protamina e similares. A taxa da liberação e duração da ação do fármaco também pode ser controlada pela incorporação do princípio ativo de anticorpo monoclonal em partículas, por exemplo microcápsulas, de uma substância polimérica tais como hidrogéis, ácido polilático, hidroximetilcelulose, metacrilato de polimetila e os outros polímeros descritos acima. Tais métodos incluem sistemas de liberação de fármacos colóides como lipossomos, microesferas, microemulsões, nanopartículas, e assim por diante. Dependendo da via de administração, a composição farmacêutica que compreende o princípio ativo pode requerer revestimentos protetores. A forma farmacêutica adequada para uso injetável inclui soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea dessas. Veículos típicos incluem portanto tampões aquosos biocompatíveis, e-

tanol, glicerol, propileno glicol, polietileno glicol e misturas desses.

As moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção podem ser fornecidas a um paciente por qualquer meio bem-conhecido na técnica, isto é oral, intranasal, intramuscular, intradérmica, intravenosa, intra-
5 arterial ou parenteralmente, ou por cateterização.

De acordo com um aspecto particular da presente invenção, as moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção são administradas por terapia gênica. Terapia gênica a base de anticorpos torna possível superar várias das potenciais limitações associadas com a administração de anticorpos tais como produção em larga escala, biodistribuição, rápida depuração do sangue e fraca retenção de anticorpos monovalentes. A produção *in vivo* faz os anticorpos menos imunogênicos e mais bem-tolerados e resulta em níveis eficazes e persistentes de moléculas de ligação ao antígeno ou fragmentos desses. Além disso, abordagens genéticas tornam possível fornecer moléculas de ligação ao antígeno com novas funções. A viabilidade da
10 produção *in vivo* e a liberação sistêmica de anticorpos monoclonais por diferentes células/tecidos tem sido demonstrada usando transferência de gene *in vivo* por vetores virais (Pelegri et al., 2004, Gene Ther 4: 347-356). A redução do crescimento do tumor *in vitro* e *in vivo* por modificação gênica de
15 células de fibrosarcoma com um anticorpo antilaminina com atividade anti-angiogênica também tem sido demonstrada (Sanz et al. 2001, Cancer Immunol Immunother 50:557-565).

Dessa forma, de acordo com essa modalidade, a presente invenção fornece nucleotídeos que codificam as moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção para uso em terapia gênica no tratamento das
25 doenças caracterizadas por angiogênese patológica descrita aqui. Particularmente, a presente invenção fornece composições que compreendem seqüências de nucleotídeos que codificam a região de cadeia pesada variável definida por SEQ ID Nº: 2 e/ou seqüências de nucleotídeos que codificam a região variável de cadeia leve definida por SEQ ID Nº: 4, para uso em terapia
30 gênica. Mais particularmente, a presente invenção fornece composições que compreendem a seqüência de nucleotídeos de SEQ ID Nº: 1 e/ou SEQ

ID Nº: 3, que corresponde às seqüências da linhagem celular 16D3 que codifica a região de cadeia leve e pesada do anticorpo 16D3. Também dentro do contexto da presente invenção composições que compreendem seqüências de nucleotídeos são fornecidas que codificam uma ou mais das regiões de CDR do anticorpo monoclonal 16D3 como identificado nas SEQ ID Nºs 17 a 22. Modalidades particulares da invenção incluem a seqüência que codifica as scFvs e scFvs humanizadas de 16D3 tais como mas não limitadas a SEQ ID Nº: 23 e SEQ ID Nº: 25, respectivamente.

O método de tratamento e/ou prevenção de acordo com a invenção pode incluir tratamento ou prevenção adicional da mesma condição de angiogênese patológica pela administração, preferivelmente pela administração seqüencial, ao paciente uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente antiangiogênico ou antitumoral tal como descrito aqui acima sob tópico de composições farmacêuticas. Seqüencialmente, como usado aqui, significa que o ligante da presente invenção e o agente antiangiogênese conhecidos são administrados ao paciente seqüencialmente mas não simultaneamente.

Ainda outro aspecto da presente invenção se refere ao uso das moléculas de ligação ao antígeno da invenção para a detecção imunológica de PIGF em amostras humanas e como componentes de kits adequados para tal detecção. Métodos de detecção imunológica de um antígeno são conhecidos na técnica e incluem, mas não são limitados a, EIA, ELISA e RIA e métodos imunohistoquímicos. A ligação dos anticorpos murinos da presente invenção ao antígeno de PIGF pode ser detectada indiretamente por exemplo por meio de um anticorpo anticamundongo marcado. Alternativamente os anticorpos ou fragmentos desses podem ser marcados diretamente. Uma modalidade específica desse aspecto da invenção se refere ao uso dos anticorpos contra PIGF e fragmentos de ligação ao antígeno desses na identificação de pacientes susceptíveis a um tratamento com anti-PIGF. Isso é de interesse particular no tratamento de câncer.

Ainda outro aspecto da presente invenção se refere ao uso das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção como uma ferra-

menta de diagnóstico. Foi demonstrado na técnica que em várias condições patológicas a expressão de PIGF está regulada positivamente. Mais particularmente, vários tumores foram demonstrados superexpressando PIGF. Os anticorpos humanizados ou fragmentos de anticorpo da presente invenção
5 podem ser usados no diagnóstico dessas condições patológicas por exemplo por técnicas de imagem nas quais o anticorpo ou fragmentos de ligação ao antígeno da invenção são marcados e visualizados *in vivo*. Uma variedade de marcadores para visualização por imagem da ligação das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção *in vivo* são conhecidos na técnica e incluem, mas não são limitados a marcadores ópticos (por exemplo fluorescentes), de metal, e magnéticos, cada um requerendo aparatos de
10 (radiação e) detecção específicos. Uma modalidade particular desse aspecto da invenção se refere ao uso dos anticorpos da invenção para prever o prognóstico da doença e decidir o regime de tratamento.

15 Ainda outro aspecto da presente invenção se refere ao uso das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção em modelos animais no rastreamento de compostos para uso em combinação com uma terapia anti-PIGF. Tais modelos incluem mas não estão limitados a modelos de tumor pelos quais o crescimento e desenvolvimento de células tumorais humanas em camundongos nu/nu é investigada. A administração combinada
20 do composto a ser testado e do anticorpo ou fragmento de anticorpo da presente invenção torna possível identificar se o composto tem um efeito aditivo ao efeito observado por administração dos anticorpos ou fragmentos da invenção sozinhos. Outros aspectos tais como contra-eficácia ou toxicidade de
25 um composto em combinação com um anticorpo anti-PIGF também podem ser determinados dessa forma.

Apesar da aplicação terapêutica descrita acima, as seqüências de nucleotídeos da presente invenção descritas acima são úteis na produção de anticorpos e outros fragmentos de ligação ao antígeno, por exemplo por
30 métodos recombinantes. Dessa forma, a presente invenção ainda fornece métodos de produzir anticorpos recombinantes e fragmentos de anticorpos, incluindo clonagem e manipulação de genes de anticorpo, produção de scFv

e outros fragmentos de ligação ao antígeno usando as seqüências de nucleotídeos descritas aqui. O protocolo desses métodos está disponível na técnica. Adicionalmente, as sondas que hibridizam especificamente à seqüência de nucleotídeo da presente invenção podem ser usadas para rastrear a expressão dos anticorpos e fragmentos de anticorpo da presente invenção.

A presente invenção é ainda descrita pelos exemplos seguintes que são fornecidos apenas para fins ilustrativos.

Exemplos

Exemplo 1 – Produção e caracterização de anticorpos de murino anti-PIGF humano (16D3)

1. Imunização de camundongos e fusão

Anticorpos monoclonais contra PIGF humano foram produzidos essencialmente como descrito por Galfré e Milstein (Galfré F, Milstein C. *Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. Methods Enzymol* 1981; 73:3-46). Resumidamente, camundongos *knock-out* para PIGF (Luttun et al., 2002, *Biochem Biophys Res Comm* 295(2): 428-34, Carmeliet et al. (2001), *Nat Med* 7:575-593 ou WO01/85796) foram imunizados por injeção subcutânea de 50 µg de PIGF-2 humano recombinante (produzido em *Pichia*) em adjuvante de Freund Completo, seguido duas semanas mais tarde por injeção subcutânea com 50 µg de PIGF recombinante humano em adjuvante de Freund incompleto. Amostras de sangue (cerca de 100 µl) foram coletadas das caudas dos camundongos após 10 dias. Os soros foram testados quanto aos anticorpos anti-huPIGF por ELISA usando placas de microtitulação cobertas com PIGF humano como captura, aplicação de soros diluídos (de 1/500 a 1/8000), e IgG de cabra anticamundongo conjugada a peroxidase de rábano silvestre (HRP) para sinalização.

Após um intervalo de pelo menos 6 semanas, os camundongos (com respostas positivas elevadas) foram estimulados intraperitonalmente com 50 µg de PIGF recombinante humano em solução salina nos dias 4 e 2 antes da fusão celular.

Células do baço foram isoladas e fundidas com células de mieloma Sp2/0-Ag14. Após seleção em meio com hipoxantina, aminopterin e

timidina, clones positivos foram selecionados pela aplicação dos sobrenadantes de cultura em ELISA como descrito acima.

2. Purificação de anticorpos em ProSep vA Ultra

Anticorpos foram purificados a partir dos sobrenadantes da cultura celular por cromatografia de afinidade em ProSep vA Ultra (Millipore) de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, NaCl 150 mM foi adicionado ao sobrenadante e o sobrenadante foi aplicado em uma coluna ProSep vA Ultra que foi pré-equilibrada com PBS. A coluna foi lavada com PBS e a proteína ligada foi eluída com glicina 0,1M pH 2,8. A proteína eluída foi dialisada ON contra PBS. A pureza da proteína eluída foi checada sob condições redutoras e não redutoras por SDS-PAGE.

3. Ligação de 16D3/hu16D3 (obtido como descrito no Exemplo2) a PIGF (veja Figura 1)

Placas de ELISA foram revestidas ON com 1 µg/ml de huPIGF-2 (Pichia) em PBS, 100 µL/cavidade, 4°C. Após bloqueio com BSA 1%, uma hora, TA, uma série de diluições de 16D3/hu16D3 foi adicionada, 100 µL/cavidade, o anticorpo foi deixado se ligar por uma hora, TA. 16D3 ligado foi detectado com IgG-HRP de cabra anti-humano ou de cabra antimurino (Sigma), 100 µL/cavidade, uma hora, TA. O ensaio foi desenvolvido com OPD.

4. Inibição da ligação de PIGF ao receptor huFlt-1 (veja Figura 2)

Placas de ELISA foram revestidas ON com 1 µg/ml de huFlt-1 (R&D Systems), 200 µL/cavidade, ON, 4°C. Após bloqueio com BSA 1%, uma hora, TA, uma série de diluições de 16D3/hu16D3 foi adicionada, 100 µL/cavidade e um adicional de 100 µL/cavidade de huPIGF-2 foi adicionado. Após uma incubação de duas horas em TA, PIGF ligado foi detectado com anti-huPIGF de cabra (R&D Systems), 180 µL/cavidade, uma hora, TA, seguido por uma incubação com RAG-HRP (DAKO), uma hora, TA. O ensaio foi desenvolvido com OPD.

5. Caracterização adicional de 16D3 e Fab 16D3 com experimentos Biacore

- Inibição: rhuPIGF-2 (Pichia, TX) foi imobilizado sobre um chip CM5 usando química EDC/NHS (*Amine Coupling Kit*, Biacore), dando

412 RU. O 16D3 foi injeto seguido de quimera rhuFlt-1/Fc (R&D Systems). Isso também foi realizado com tampão ao invés do anticorpo de camundongo. Esses também foram injetados em um canal de Fluxo de controle negativo e esses valores também já são subtraídos. Esse ensaio foi realizado em um tampão de fosfato em pH 9,6.

Em comparação com a ligação máxima de rhuFlt-1 a rhuPIGF-2, o sinal de rhuFlt-1 é reduzido se 16D3 ou 16D3Fab é injetado primeiro (Figura 3).

6. Clonagem e seqüenciamento das regiões variáveis de camundongo de 16D3

- Isolamento de mRNA: O mRNA de células de hibridoma de 16D3 foi isolado usando o *QuickPrep® Micro mRNA Purification Kit* (Amersham Biosciences). Esse mRNA foi usado para fazer cDNA usando o *First-Strand cDNA Synthesis Kit* (Amersham Biosciences) com o iniciador pd(N)₆ disponível no kit.

- PCR: As seqüências das partes variáveis das cadeias pesada e leve foram encontradas pela realização de um PCR com um conjunto de iniciadores: 8 iniciadores começando na seqüência líder e 2 na região constante da cadeia pesada, 11 iniciadores começando na seqüência líder e 1 na região constante da cadeia leve. 8 e 11 reações de PCR com combinações diferentes dos iniciadores foram realizadas.

Iniciadores usados para a cadeia pesada do anticorpo 16D3:

MHVR3 5'-ATG GRA TGG AGC TGK ATC WTT HTC- 3' (SEQ ID Nº:9)

MHCRI 5'- CAS AYM CAG GGG CCA GTG GAT AGA C- 3' (SEQ ID Nº: 10)

Iniciadores usados para a cadeia leve do anticorpo 16D3:

MKVR3 5'- ATG RAG TCA CAK ACY CAG GTC TTY RTA- 3' (SEQ ID Nº: 11)

MKCRI 5'- GCT CAC TGG ATG GTG GGA AGA TGG- 3' (SEQ ID Nº: 12)

Configuração do PCR: desnaturação 10 min. 94°C, desnaturação 30 seg. 94°C, anelamento 30 seg. 55°C, extensão 1 min 72°C, extensão 5 min. 72°C, número de ciclos 30.

A redundância na seqüência de SEQ ID Nº: 9 a 11 é indicada usando as abreviações convencionais R = A ou G, K= G ou T, W= A ou T,

H= A ou C ou T, S= C ou G, Y= C ou T, M= A ou C.

- Clonagem e seqüenciamento: Os produtos de PCR foram aplicados em um gel de agarose, as bandas corretas foram selecionadas, purificadas (*QIAquick® Gel Extraction Kit*, Qiagen GmbH) e clonados no vetor pCR®4Blunt-TOPO® fornecido no *Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing* (Invitrogen® life Technologies). O plasmídeo de DNA foi preparado usando o *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche Diagnostics GmbH) e os insertos foram seqüenciados usando os iniciadores de sentido reverso T7 e M13 no ABI PRISM® 310 (PE Applied Biosystems).

- As seqüências de nucleotídeo e aminoácido das regiões variáveis das cadeias pesada e leve do anticorpo 16D3 estão representadas nas SEQ ID N°s 1, 2, 3 e 4 (veja Figura 11).

Exemplo 2 – Produção e caracterização de anticorpos anti-PIGF humano (16D3) humanizados

1. Construção de 16D3 humanizado

Humanização das regiões variáveis

- Mutações: As seguintes mutações foram feitas a fim de humanizar as partes variáveis do anticorpo de camundongo 16D3:

Cadeia pesada:I2V

20 P9A
K40A
T111L

Cadeia leve:S5T

S9D
25 A15L
K18R
R22N
L89V

- As mutações foram feitas pelo uso do *QuickChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene®). 1 a 5 iniciadores contendo as mutações puderam ser usados em 1 PCR. Após a transformação colônias foram retiradas e o DNA seqüenciado para determinar o clone com a maioria

das mutações pontuais. Esse clone foi usado para repetir esse procedimento até que todas as mutações estavam presentes na sequência.

Ligando as regiões variáveis a uma região constante de IgG humana:

Pela realização de um PCR as partes variáveis humanizadas
5 das cadeias pesada e leve foram obtidas, as quais os sítios de restrição apropriados foram adicionados.

Iniciadores para a parte variável da cadeia leve:

Iniciador 1: 5'-CCACCGGT GAC ATT GTG CTG ACC CAG TCT
CC-3' (SEQ ID Nº: 13)

10 Iniciador 2: 5'-CACCGTACG TTT TAT TTC CAA CTT TGT CCC
CGA G-3' (SEQ ID Nº:14)

Iniciadores para a região variável da cadeia pesada:

Iniciador 3: 5'-CAG GTC CAG CTG CAG CAG TCT G-3' (SEQ
ID Nº: 15)

15 Iniciador 4: 5'-GATGGGCCCTTGGTCGACGC TGA GGA GAC
TGT GAG CAG GG-3' (SEQ ID Nº: 16)

Configuração do PCR: desnaturação 5 min. 94°C, desnaturação
30 seg. 94°C, anelamento 30 seg. 60°C, extensão 30 seg. 72°C, extensão 5
min. 72°C, número de ciclos 25.

20 Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose, as
bandas foram selecionadas e purificadas (*QIAquick® Gel Extraction Kit*, Qia-
gen GmbH). O produto de PCR da parte variável da cadeia pesada de 16D3
foi digerido com Sall, o vetor pKNEO-MCS50-Hleu-var Nº 24 contendo a
parte constante completa da cadeia pesada de um anticorpo humano (IgG4),
25 com Eco47III e Sall e ligados. O produto de PCR da parte variável da cadeia
leve foi clonado primeiro no vetor pCR®4Blunt-TOPO® fornecido no *Zero
Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing* (Invitrogen®life Technologi-
es). A parte variável da cadeia leve foi cortada por Agel e BsiWI e clonada
no vetor pKNEO-CM30-L var Nº 7 que já continha a parte constante de
30 uma cadeia leve kappa humana. Ambos os vetores foram reunidos para um
vetor pela extração do cassete de expressão da cadeia leve do vetor usando
PmeI e PacI e adicionando-o ao vetor que continha a cadeia pesada.

As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos das partes variáveis das cadeias pesada e leve do anticorpo 16D3 humanizado estão representadas nas SEQ ID N°s. 5, 6, 7 e 8 (veja Figura 12).

2. Expressão transitória de hu16D3

5 Hu16D3 IgG4k foi expresso transitoriamente em células HEK 293 usando o *FreeStyle 293 Expression System* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Hu16D3 foi purificado a partir do sobrenadante usando cromatografia de afinidade em proSep vA Ultra. Hu16D3 purificado foi checado quanto à pureza por SDS-PAGE sob condições redutoras e não redutoras. Hu16D3 foi ainda testado quanto a ligação a huPIGF e quanto a inibição da ligação de HuPIGF/huFLT-1 através de ELISA (veja Figura 1 e 2).

Exemplo 3: Investigação *in vivo* da inibição de crescimento tumoral com anticorpos anti-PLGF

1. Descrição geral de materiais e métodos

15 Cultura celular

As linhagens de células pancreáticas Panc02 de murino e a linhagem de célula pancreática humana DanG são uma gentil doação de S. Rosewicz (Charité-Universitätsmedizin Berlin, Alemanha). As linhagens celulares humanas MDA-MB de mama, LOVO de cólon e Mel2a de melanoma foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA, USA). Todas as células foram cultivadas como recomendado. Anticorpos 20 16D3 anti-PIGF de murino foram usados para todos os experimentos *in vivo*, para evitar reação imune ao anticorpo.

Experimentos em animais

25 Todos os procedimentos em animais foram completamente aprovados pelo comitê institucional para uso e cuidados de animais. Camundongos nu/nu NMRI fêmeas foram abrigadas sob condições semi-estéreis e foram usadas rotineiramente com 8-10 semanas de idade (peso aproximado, 25 g). Para a preparação da fonte de tumor, células de tumor foram tripsinizadas para preparar uma suspensão de células isoladas, lavadas com PBS. 30 O precipitado centrifugado foi re-suspenso em 200 µl de PBS e injetado subcutaneamente no flanco direito dos camundongos. Para o modelo de tumor

pancreático ortotópico, 1×10^6 células tumorais em 30 μ l de PBS foram injetadas na cabeça do pâncreas através de laparotomia ventral de camundongos C57B16 fêmeas com idade de 9-10 semanas. Antes dos procedimentos, os camundongos foram anestesiados com quetamina (90 mg/kg de peso corporal) e xilazina (9 mg/kg de peso corporal).

Administração de fármacos (isto é anticorpos, veículo, etc.)

Tratamento com anticorpos ou controle com veículo foi iniciado quando os tumores atingiram um tamanho aproximado de 60 mm³. Anticorpos P15D11D4 (WO01/85796), 16D3, 1C8 ou veículo foram administrados nas doses indicadas intraperitonealmente em dias alternados. Avastin foi injetado nas doses indicadas intraperitonealmente duas vezes por semana.

Medidas dos tumores

Tumores que cresciam subcutaneamente foram medidos em dias alternados usando um calibrador e os volumes dos tumores calculados usando a fórmula $p/6 (w1 \times w2 \times w2)$, onde 'w1' e 'w2' representam o maior e o menor diâmetro do tumor, respectivamente. Quando os camundongos foram sacrificados o tumores ortotópicos em crescimento do pâncreas foi medido após laparotomia ventral usando o mesmo método.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo teste de t-Student bicaudal para observações pareadas usando um programa estatístico *GraphPad* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Todos os dados são expressos com média $\pm$ SEM, a menos que indicado de outra maneira. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, a menos que indicado de outra maneira.

2. Inibição de crescimento tumoral em um modelo de xenoenxerto de tumor pancreático humano subcutâneo DanG com anticorpo anti-PIGF de murino 16D3.

1×10^6 células tumorais foram injetadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos fêmeas nu/nu NMRI de 11 semanas de idade. Após os tumores atingirem um tamanho de aproximadamente 60 mm³, o tratamento com anti-hPIGF (16D3, 50 mg/kg de peso corporal; $n=10$), anti-mPIGF (PL5D11D4 (obtido como descrito na WO01/85796; 50 mg/kg de pe-

so corporal; n=10), IgG de controle (1C8; 50 mg/kg de peso corporal; n=10), uma combinação de anti-hPIGF e anti-mPIGF (25 mg/kg de peso corporal de cada; n=10) e veículo (n=10) foi iniciado. Os anticorpos foram injetados i.p. em dias alternados. (A) Os tumores foram medidos em dias alternados e o volume do tumor foi calculado usando a fórmula $W1 \times W2 \times W2 \times \pi / 2$, onde W1 representa o maior e W2 representa o menor diâmetro. (B) Os camundongos foram sacrificados no dia 18 após a inoculação do tumor, os tumores foram ressecados e pesados. Volume médio do tumor: veículo: $915 \pm 90 \text{ mm}^3$, IgG: $\pm 89 \text{ mm}^3$, PL5D11D4: $832 \pm 118 \text{ mm}^3$, 16D3: $521 \pm 83 \text{ mm}^3$, PL5D11D4 + 16D3: $497 \pm 86 \text{ mm}^3$.

Os resultados, como mostrado na Figura 4, mostram que a administração de anticorpo 16D3 anti-PIGF humano tem uma clara influência sobre o tamanho e peso do tumor.

3. Anti-hPIGF inibe o crescimento tumoral em um modelo de xenoenxerto de tumor pancreático humano subcutâneo DanG de uma maneira dependente da dose.

1×10^6 células tumorais foram injetadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos fêmeas nu/nu NMRI de 11 semanas de idade. Após os tumores atingirem um tamanho de aproximadamente 60 mm^3 , o tratamento com anti-hPIGF, IgG (1C8; 50 mg/kg), 16D3 (50 mg/kg, 37,5 mg/kg, 25 mg/kg, 12,5 mg/kg de peso corporal; n=10 para cada concentração) e veículo (n=10). (B) Os camundongos foram sacrificados no dia 18 após a inoculação do tumor.

Os resultados são mostrados na Figura 5. Volume médio do tumor $\pm$ SEM: 16D3, 50 mg/kg de peso corporal: $450 \pm 37 \text{ mm}^3$; 37,5 mg/kg de peso corporal: $469 \pm 97 \text{ mm}^3$; 25 mg/kg de peso corporal: $493 \pm 107 \text{ mm}^3$; 12,5 mg/kg de peso corporal: $693 \pm 107 \text{ mm}^3$; 1C8: $865 \pm 109 \text{ mm}^3$; veículo: $889 \pm 100 \text{ mm}^3$.

4. Anti-huPIGF inibe o crescimento tumoral em um modelo de xenoenxerto de tumor de mama humano subcutâneo MDA-MB

1×10^7 Células tumorais foram injetadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos fêmeas nu/nu NMRI de 11 semanas de ida-

de. Após os tumores atingirem um tamanho de aproximadamente 60 mm³, tratamento com anti-hPIGF, 16D3 (50 mg/kg de peso corporal; n=10) e veículo (n=10).

Os resultados são mostrados na Figura 6 (e Tabela 1 abaixo).

5 Tabela 1.

	Média	SEM	N	Valor de P
peso TM PBS	1086	154,1	10	
peso TM 16D3	586,6	71,89	10	0,0088
tamanho TM PBS	991,5	160,8	10	
tamanho TM 16D3	485,9	63,76	10	0,0091

5. Anti-huPIGF inibe o crescimento tumoral em um modelo de xenoenxerto de tumor cólon humano subcutâneo LOVO.

10 1x10⁷ células tumorais foram injetadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos fêmeas nu/nu NMRI de 11 semanas de idade. Após os tumores atingirem um tamanho de aproximadamente 60 mm³, tratamento com anti-hPIGF, 16D3 (50 mg/kg de peso corporal; n=10) e veículo (n=10).

Os resultados são mostrados na Figura 7 e Tabela 2 abaixo.

Tabela 2

	Média	SEM	N	Valor de P
peso TM PBS	669,3	103	10	
peso TM 16D3	415	65,85	10	0,052
tamanho TM PBS	568,3	95,38	10	
tamanho TM 16D3	306,4	50,27	10	0,0258

15 6. Anti-huPIGF inibe o crescimento tumoral em um modelo de xenoenxerto de tumor de melanoma humano subcutâneo Mel2a.

20 4 x 10⁶ células tumorais foram injetadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos fêmeas nu/nu NMRI de 11 semanas de idade. Após os tumores atingirem um tamanho de aproximadamente 60 mm³, tratamento com anti-hPIGF, 16D3 (50 mg/kg de peso corporal; n=10) e veículo (n=10).

Os resultados são mostrados na Figura 8 e Tabela 3 abaixo.

Tabela 3.

	Média	SEM	N	Valor de P
peso TM PBS	753,3	87,26	10	
peso TM 16D3	468,9	70,57	9	0,023

Exemplo 4: Investigação *in vivo* do efeito do tratamento com anticorpos 16D3 sobre a perda de peso.

Materiais e métodos são como descritos no Exemplo 3.

5 1×10^6 células tumorais foram injetadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos fêmeas nu/nu NMRI de 11 semanas de idade. Após os tumores atingirem um tamanho de aproximadamente 60 mm^3 , o tratamento com anti-hPIGF (16D3, 50mg/kg de peso corporal; n=10), anti-mPIGF (PL5D11D4 50 mg/kg de peso corporal; n=10), IgG de controle (1C8; 10 50 mg/kg de peso corporal; n=10), uma combinação de anti-hPIGF e anti-mPIGF (25 mg/kg de peso corporal de cada; n=10) e veículo (n=10) foi iniciado. Os anticorpos foram injetados i.p. em dias alternados. O peso corporal dos camundongos foi medido no primeiro e no último dia do tratamento com anticorpo. O peso do tumor foi subtraído do peso corporal antes do cálculo 15 do percentual de perda de peso corporal.

Os resultados são mostrados na Figura 9. É mostrado que anti-hPIGF evita a perda de peso corporal nesse modelo de xenoenxerto de tumor pancreático humano subcutâneo DanG.

20 Exemplo 5: Combinação de anti-hPIGF e um anticorpo anti-VEGF para o tratamento de crescimento tumoral

Materiais e métodos são como descritos no Exemplo 3.

1×10^6 células tumorais foram injetadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos fêmeas nu/nu NMRI de 11 semanas de idade. Após os tumores atingirem um tamanho de aproximadamente 60 mm^3 , 25 tratamento com anti-hPIGF (16D3, 50mg/kg, 37,5 mg/kg, 12,5 mg/kg de peso corporal i.p. em dias alternados; n=10 para cada concentração), Avastin (15 mg/kg e 5 mg/kg de peso corporal, i.p. duas vezes por semana, n=10 cada) e uma combinação de anti-PIGF (12,5 mg/kg de peso corporal) e Avastin (5 mg/kg de peso corporal; n=10). Os camundongos foram sacrificados após 20

dias da inoculação do tumor.

Os resultados são mostrados na Figura 10. Volume tumoral médio $\pm$ SEM: 1C8, 37; 37,5 mg/kg de peso corporal: $954 \pm 164 \text{ mm}^3$; 12,5 mg/kg de peso corporal: $1398 \pm 236 \text{ mm}^3$; IgG: $1789 \pm 231 \text{ mm}^3$; Avastin 15 mg/kg de peso corporal: $828 \pm 186 \text{ mm}^3$; 5 mg/kg de peso corporal: $926 \pm 202 \text{ mm}^3$; Avastin + 16D3: $569 \pm 94 \text{ mm}^3$. É observado que anti-hPIGF e Avastin exercem um efeito adicional sobre a inibição do crescimento tumoral em um DanG pancreático subcutâneo humano.

Exemplo 6: Produção de scFv de 16D3

10 As seqüências das partes variáveis das cadeias pesada e leve (SEQ IDs NO: 2 e 4, respectivamente, obtidas como descrito no Exemplo 1) foram amplificadas por PCR usando iniciadores com os sítios de restrição de ligação e ligantes apropriados. Após um SOE PCR (estrançamento de genes por extensão de super posição) scFv foi clonado em pEE14.4 (sítios de clonagem HindIII-EcoRI) (Figura 12). Esse scFvhp16D3/pEE14.4 foi transfectado para células CHO-K1 após linearização com BamHI usando Eugene 6 (Boehringer Mannheim) e subclonado duas vezes por diluição. Um scFv hp16D3 monoclonal, 6C5D4, foi obtido e produzido. Esse clone também foi transfectado transitoriamente em células 293 por Producell em paralelo com scFv
15 hp16D3/pKANE0-MCS50-dhfr1 (sítios de clonagem NheI-NotI) (Figura 13).
20

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido do scFv de 16D3 são fornecidas como SEQ ID Nº: 23 e SEQ ID Nº: 24, respectivamente. A seqüência de aminoácidos que demonstra as regiões variáveis das cadeias pesada e leve, a seqüência ligante e HA-tag e His Tag também é fornecida
25 na Figura 15.

Exemplo 7: Humanização de scFv 16D3

Humanização das regiões variáveis do scFv foi realizada como descrito no Exemplo 2. As seqüências de nucleotídeo e aminoácido de scFv de 16D3 são fornecidas nas SEQ ID Nº: 25 e SEQ ID Nº: 26, respectivamente. A seqüência de aminoácidos que demonstra as regiões variáveis das ca-
30 deias pesada e leve, a seqüência ligante e HA-Tag e His tag de scFv humanizado também é fornecida na Figura 15.

Exemplo 8: Produção de Fab 16D3 humanizado

1. Amplificação dos fragmentos VH e VL de scFv16D3 humanizado

Iniciadores para amplificação de fragmento VH de scFv16D3 humanizado

- 5 16D3Vhbackblunt 5'-CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTG-3' (SEQ ID Nº: 27)
16D3VhforSall 5'-GATGGGCCCTTGGT**CGAC**GCTGAGGAGACTGTGAGCAGGG-3' (SEQ ID Nº: 28)

Iniciadores para amplificação de fragmento VL de scFv16D3 humanizado

- 10 16D3VLBackAgel 5'-CCACCGGTGACATTGTGCTGACCCAGTCTCC-3' (SEQ ID Nº: 29)
16D3VLForBsiWI 5'-CACCGTACGTTTTATTTC**CAACT**TTGTCCCCGAG-3' (SEQ ID Nº: 30)

2. Construção de vetores de cadeia pesada e leve

- 15 O produto de PCR da cadeia leve foi clonado primeiro no vetor pCR4blunt-TOPO. Após o seqüenciamento a cadeia leve foi removida por digestão com Agel e BsiWI e clonada no vetor pKNEO-CM30-LvarNº 7. O produto de PCR da cadeia pesada foi clonado após digestão diretamente em pKNEO-MCS50-FabvarNº 3.

20 3. União de construtos de ligação de cadeia pesada e leve

- Ambos os vetores (acima descritos), contendo o segmento leve e pesado, foram unidos juntos pela remoção do cassete contendo o segmento leve e adicionando-o ao vetor contendo o segmento pesado pelo uso das enzimas Pmel e PacI, para obter o construto final,
25 hp16D3mutcmlFab/pKNEO-MCS50-FabvarNº 3. (veja Figura 16).

Exemplo 9: Análise de ligação ao antígeno e inibição da interação de PIGF/flt-1 por scFv 16D3 e scFv16D3 humanizado (Figura 14)

1. ELISA de ligação ao antígeno

- 30 Placas de ELISA foram revestidas ON com 1 µg/ml de huPIGF-1 em PBS, 200 µL/cavidade, 4°C. Após bloqueio com BSA 1%, uma hora, TA, uma série de diluições de scFv16D3/ scFv16D3 humanizado foi adicionada, 200 µL/cavidade, o fragmento de anticorpo foi deixado se ligar por uma ho-

ra., TA. scFv16D3 ligado foi detectado com anti-HA de murino (180 μ L/cavidade, uma hora, TA) seguida pela incubação com IgG- HRP de cabra antimurino (Sigma), 170 μ L/cavidade, uma hora, TA. O ensaio foi desenvolvido com OPD.

5 2. Inibição de interação de PIGF/Flt-1 através de ELISA

Placas de ELISA foram revestidas ON com 1 μ g/ml de huFlt-1 (R&D Systems), 200 μ L/cavidade, ON, 4°C. Após bloqueio com BSA 1%, uma hora, TA, uma série de diluições de scFv16D3/scFv16D3 humanizado foi adicionada, 100 μ L/cavidade e um adicional de 100 μ L /cavidade de huPIGF-2 foi adicionado. Após uma incubação de duas horas em TA, PIGF ligado foi detectado com anti-huPIGF de cabra (R&D Systems), 180 μ L/cavidade, uma hora, TA, seguido por uma incubação com RAG-HRP (DAKO), uma hora, TA. O ensaio foi desenvolvido com OPD.

15 Exemplo 10: Análise de ligação ao antígeno e inibição da interação de PIGF/flt-1 por Fab16D3 humanizado.

1. ELISA de ligação ao antígeno

Placas de ELISA foram revestidas ON com 1 μ g/ml de huPIGF-1 em PBS, 100 μ L/cavidade, 4°C. Após bloqueio com BSA 1%, uma hora, TA, uma série de diluições de Fab16D3 humanizado foi adicionada, 100 μ L/cavidade, o fragmento de anticorpo foi deixado se ligar por uma hora, TA. Fab16D3 humanizado ligado foi detectado com anti-huIgG-HRP (Fab específico) (100 μ L/cavidade, uma hora TA). O ensaio foi desenvolvido com OPD. Os resultados são fornecidos na Figura 17A.

2. Inibição de interação PIGF/Flt-1 através de ELISA

25 Placas de ELISA foram cobertas ON com 1 μ g/ml de huFlt-1 (R&D Systems), 200 μ L/cavidade, ON, 4°C. Após bloquear com BSA 1%, uma hora, TA, uma série de diluições de Fab16D3 humanizado foi adicionada, 100 μ L/cavidade e um adicional de 100 μ L /cavidade de huPIGF-2 foi adicionado. Após uma incubação de duas horas em TA, PIGF ligado foi detectado com anti-huPIGF de cabra (R&D Systems), 180 μ L/cavidade, uma hora, TA, seguido por uma incubação com RAG-HRP (DAKO), uma hora, TA. O ensaio foi desenvolvido com OPD. Os resultados são fornecidos na

Figura 17B.

Exemplo 11: Determinação dos valores de K_D

Os valores de K_D para 16D3, 16D3 IgG4 humanizado, scFv16D3 humanizado e Fab16D3 humanizado foram determinados por Biacore. Os resultados são fornecidos na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4: Tabela resumida de valores de K_D

proteína imobilizada	anticorpo injetado	K_D (M)
rhu-PIGF-2 Pichia	scFvhp16D3mut	1,95E-10
rhu-PIGF-2 Pichia	hp16D3camundongocomplAB	2,90E-10
rhu-PIGF-2 Pichia	hp16D3mutcomplABIgG4	1,61E-10
rhu-PIGF-2 Pichia	hp16D3mutcomplFab	1,31E-10

Valores de K_D de 16D3, 16D3 IgG4 humanizado, Fab 16D3 humanizado e scFv16D3 humanizado.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

- 10 <110> Thromb-X nv
Collen Research Foundation vzw
Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnologie
(VIB)
- <120> Novo anticorpo anti-PLGF
- 15 <130> T3326-BR
<150> US 60/664,768
<151> 2005-03-24
<160> 30
<170> Versão da Patente 3.3
- 20 <210> 1
<211> 348
<212> DNA
<213> Mus músculo
<220>
- 25 <221> CDS
<222> (1) .. (348)
<223> parte variante da cadeia pesada de 16D3 de camundongo

<400> 1

cag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct 48
 Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

5 tca gtg aag ata tcc tgc aag gcc tct ggc tac acc ttc act gac tac 96
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

tat ata aac tgg gtg aag ttg aag cct gga cag gga ctt gag tgg att 144
 Tyr Ile Asn Trp Val Lys Leu Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 10 35 40 45

gga tgg att tat cct gga agc ggt aat act aag tac aat gag aag ttc 192
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

aag ggc aag gcc aca ttg act ata gac aca tcc tcc agc aca gcc tac 240
 15 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gct gtc tat ttc tgt 288
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

20 gta aga gac agc cct ttc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc act ctc 336
 Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

aca gtc tcc tca 348
 Thr Val Ser Ser

25 115

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus músculo

30 <400> 2

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile Asn Trp Val Lys Leu Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 5 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 10 85 90 95
 Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115
 15 <210> 3
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Mus músculo
 <220>
 20 <221> CDS
 <222> (1)..(336)
 <223> parte variante da cadeia leve de 16D3 de camundongo
 <400> 3
 gac att gtg ctg tca cag tct cca tcc tcc ctg gct gtg tca gca gga 48
 25 Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 gag aag gtc act atg cgc tgc aaa tcc agt cag agt ctg ctc aac agt 96
 Glu Lys Val Thr Met Arg Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 30 gga atg cga aag agt ttc ttg gct tgg tac cag cag aaa cca ggg cag 144
 Gly Met Arg Lys Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

tct cct aag ctg ctg atc tac tgg gca tcc act agg gaa tct ggg gtc 192
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

cct gat cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc 240
 5 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

atc agc agt gtg cag gct gaa gac ctg gca gtt tat tac tgc aag caa 288
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95

10 tct tat cat cta ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa 336
 Ser Tyr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 4
 <211> 112

15 <212> PRT
 <213> Mus músculo
 <400> 4

Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

20 Glu Lys Val Thr Met Arg Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Met Arg Lys Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 25 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95

30 Ser Tyr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 5

<211> 348
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 5 <223> Fragmento de anticorpo humanizado
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(348)
 <223> parte variante da cadeia pesada de 16D3 humanizada
 10 <400> 5
 cag gtc cag ctg cag cag tct gga gcc gag ctg gtg aag cct ggg gct 48
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tca gtg aag ata tcc tgc aag gcc tct ggc tac acc ttc act gac tac 96
 15 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 tat ata aac tgg gtg aag ttg gcc cct gga cag gga ctt gag tgg att 144
 Tyr Ile Asn Trp Val Lys Leu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 20 gga tgg att tat cct gga agc ggt aat act aag tac aat gag aag ttc 192
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 aag ggc aag gcc aca ttg act ata gac aca tcc tcc agc aca gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 25 65 70 75 80
 atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gct gtc tat ttc tgt 288
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 gta aga gac agc cct ttc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc ctg ctc 336
 30 Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu
 100 105 110
 aca gtc tcc tca 348

Thr Val Ser Ser
115

<210> 6

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 6

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

20 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu
100 105 110
Thr Val Ser Ser

25 115

<210> 7

<211> 336

<212> DNA

<213> Sequência artificial

30 <220>

<223> Fragmento de anticorpo humanizado

<220>

<221> CDS
 <222> (1)..(336)
 <223> parte variante da cadeia leve de 16D3 humanizada
 <400> 7

5 gac att gtg ctg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tca ctg gga 48
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 gag cgg gtc act atg aac tgc aaa tcc agt cag agt ctg ctc aac agt 96
 Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 10 20 25 30
 gga atg cga aag agt ttc ttg gct tgg tac cag cag aaa cca ggg cag 144
 Gly Met Arg Lys Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 tct cct aag ctg ctg atc tac tgg gca tcc act agg gaa tct ggg gtc 192
 15 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 cct gat cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc 240
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 20 atc agc agt gtg cag gct gaa gac gtc gca gtt tat tac tgc aag caa 288
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95
 tct tat cat cta ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa 336
 Ser Tyr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 25 100 105 110

<210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 30 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 8

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
5 Gly Met Arg Lys Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
10 65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95
Ser Tyr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
15 <210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> Sequência artificial
<220>
20 <223> iniciador oligonucleotídeo
<400> 9
atggratgga gctgkacwt thtc 24
<210> 10
<211> 25
25 <212> DNA
<213> Sequência artificial
<220>
<223> iniciador oligonucleotídeo
<400> 10
30 casaymcagg ggccagtgga tagac 25
<210> 11
<211> 27

	<212> DNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> iniciador oligonucleotídeo	
5	<400> 11	
	atgragtcac akacycaggt cttyrta	27
	<210> 12	
	<211> 24	
	<212> DNA	
10	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> iniciador oligonucleotídeo	
	<400> 12	
	gctcactgga tggtaggaag atgg	24
15	<210> 13	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
20	<223> iniciador oligonucleotídeo	
	<400> 13	
	ccaccggtga cattgtgctg acccagtctc c	31
	<210> 14	
	<211> 34	
25	<212> DNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> iniciador oligonucleotídeo	
	<400> 14	
30	caccgtacgt tttatttcca actttgtccc cgag	34
	<210> 15	
	<211> 22	

<212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> iniciador oligonucleotídeo
 5 <400> 15
 caggtccagc tgcagcagtc tg 22
 <210> 16
 <211> 40
 <212> DNA
 10 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> iniciador oligonucleotídeo
 <400> 16
 gatggggccct tggtcgacgc tgaggagact gtgagcaggg 40
 15 <210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus músculo
 <220>
 20 <221> misc
 <222> (1)..(8)
 <223> cadeia pesada CDR1 de 16D3
 <400> 17
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
 25 1 5
 <210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus músculo
 30 <220>
 <221> REGIÃO DE INTERESSE BIOLÓGICO
 <222> (1)..(8)

<223> cadeia pesada CDR2 de 16D3
 <400> 18
 Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr
 1 5
 5 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus músculo
 <220>
 10 <221> REGIÃO DE INTERESSE BIOLÓGICO
 <222> (1)..(9)
 <223> cadeia leve CDR3 de 16D3
 <400> 19
 Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr
 15 1 5
 <210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus músculo
 20 <220>
 <221> misc
 <222> (1)..(12)
 <223> cadeia leve CDR1 de 16D3
 <400> 20
 25 Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Met Arg Lys Ser Phe
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 3
 <212> PRT
 30 <213> Mus músculo
 <220>
 <221> misc

<222> (1)..(3)

<223> cadeia leve CDR2 de 16D3

<400> 21

Trp Ala Ser

5 1

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus músculo

10 <220>

<221> REGIÃO DE INTERESSE BIOLÓGICO

<222> (1)..(8)

<223> cadeia leve CDR3 de 16D3

<400> 22

15 Lys Gln Ser Tyr His Leu Phe Thr

1 5

<210> 23

<211> 786

<212> DNA

20 <213> Sequência artificial

<220>

<223> 16D3 ScFv

<220>

<221> CDS

25 <222> (1)..(786)

<220>

<221> misc

<222> (1)..(348)

<223> cadeia pesada

30 <220>

<221> misc

<222> (349)..(393)

<223> Ligante
 <220>
 <221> misc
 <222> (394)..(729)
 5 <223> Cadeia leve
 <220>
 <221> misc
 <222> (736)..(762)
 <223> HA-Tag
 10 <220>
 <221> misc
 <222> (769)..(786)
 <223> His-Tag
 <400> 23
 15 cag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct 48
 Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tca gtg aag ata tcc tgc aag gcc tct ggc tac acc ttc act gac tac 96
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 20 25 30
 tat ata aac tgg gtg aag ttg aag cct gga cag gga ctt gag tgg att 144
 Tyr Ile Asn Trp Val Lys Leu Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 gga tgg att tat cct gga agc ggt aat act aag tac aat gag aag ttc 192
 25 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 aag ggc aag gcc aca ttg act ata gac aca tcc tcc agc aca gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 30 atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gct gtc tat ttc tgt 288
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

	gta aga gac agc cct ttc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc act ctc	336
	Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu	
	100 105 110	
	aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tct ggc ggc ggc ggc tcc ggt gga	384
5	Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
	115 120 125	
	ggg ggt tct gac att gtg ctg tca cag tct cca tcc tcc ctg gct gtg	432
	Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val	
	130 135 140	
10	tca gca gga gag aag gtc act atg cgc tgc aaa tcc agt cag agt ctg	480
	Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Arg Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu	
	145 150 155 160	
	ctc aac agt gga atg cga aag agt ttc ttg gct tgg tac cag cag aaa	528
	Leu Asn Ser Gly Met Arg Lys Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys	
15	165 170 175	
	cca ggg cag tct cct aag ctg ctg atc tac tgg gca tcc act agg gaa	576
	Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu	
	180 185 190	
	tct ggg gtc cct gat cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc	624
20	Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
	195 200 205	
	act ctc acc atc agc agt gtg cag gct gaa gac ctg gca gtt tat tac	672
	Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr	
	210 215 220	
25	tgc aag caa tct tat cat cta ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg	720
	Cys Lys Gln Ser Tyr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu	
	225 230 235 240	
	gaa ata aaa ggt tct tac cca tac gac gtc cca gac tac gct ggt tct	768
	Glu Ile Lys Gly Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Ser	
30	245 250 255	
	cat cat cac cat cac cat	786
	His His His His His His	

260

<210> 24

<211> 262

<212> PRT

5 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 24

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

10 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Leu Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

15 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

20 85 90 95

Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

115 120 125

25 Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val

130 135 140

Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Arg Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu

145 150 155 160

Leu Asn Ser Gly Met Arg Lys Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys

30 165 170 175

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu

180 185 190

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

195

200

205

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr

210

215

220

5 Cys Lys Gln Ser Tyr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu

225

230

235

240

Glu Ile Lys Gly Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Ser

245

250

255

His His His His His His

10

260

<210> 25

<211> 786

<212> DNA

<213> Sequência artificial

15

<220>

<223> 16D3 ScFv humanizado

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(786)

20

<220>

<221> misc

<222> (1)..(348)

<223> Cadeia pesada

<220>

25

<221> misc

<222> (349)..(393)

<223> Ligante

<220>

<221> misc

30

<222> (394)..(729)

<223> Cadeia leve

<220>

<221> misc
 <222> (736)..(762)
 <223> HA-tag
 <220>

5 <221> misc
 <222> (769)..(786)
 <223> HA-tag
 <400> 25

10 cag gtc cag ctg cag cag tct gga gcc gag ctg gtg aag cct ggg gct 48
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tca gtg aag ata tcc tgc aag gcc tct ggc tac acc ttc act gac tac 96
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

15 tat ata aac tgg gtg aag ttg gcc cct gga cag gga ctt gag tgg att 144
 Tyr Ile Asn Trp Val Lys Leu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 gga tgg att tat cct gga agc ggt aat act aag tac aat gag aag ttc 192
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

20 50 55 60
 aag ggc aag gcc aca ttg act ata gac aca tcc tcc agc aca gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gct gtc tat ttc tgt 288

25 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 gta aga gac agc cct ttc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc ctg ctc 336
 Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu
 100 105 110

30 aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tct ggc ggc ggc ggc tcc ggt gga 384
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

	ggg ggt tct gac att gtg ctg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg	432
	Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val	
	130 135 140	
	tca ctg gga gag cgg gtc act atg aac tgc aaa tcc agt cag agt ctg	480
5	Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu	
	145 150 155 160	
	ctc aac agt gga atg cga aag agt ttc ttg gct tgg tac cag cag aaa	528
	Leu Asn Ser Gly Met Arg Lys Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys	
	165 170 175	
10	cca ggg cag tct cct aag ctg ctg atc tac tgg gca tcc act agg gaa	576
	Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu	
	180 185 190	
	tct ggg gtc cct gat cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc	624
	Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
15	195 200 205	
	act ctc acc atc agc agt gtg cag gct gaa gac gtc gca gtt tat tac	672
	Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr	
	210 215 220	
	tgc aag caa tct tat cat cta ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg	720
20	Cys Lys Gln Ser Tyr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu	
	225 230 235 240	
	gaa ata aaa ggt tct tac cca tac gac gtc cca gac tac gct ggt tct	768
	Glu Ile Lys Gly Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Ser	
	245 250 255	
25	cat cat cac cat cac cat	786
	His His His His His His	
	260	
	<210> 26	
	<211> 262	
30	<212> PRT	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	

<223> Constructo sintético

<400> 26

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 5 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile Asn Trp Val Lys Leu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 10 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 15 Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val
 20 130 135 140
 Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
 145 150 155 160
 Leu Asn Ser Gly Met Arg Lys Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175
 25 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
 180 185 190
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 195 200 205
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr
 30 210 215 220
 Cys Lys Gln Ser Tyr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 225 230 235 240

Glu Ile Lys Gly Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Ser

245

250

255

His His His His His His

260

5

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

10

<223> iniciador oligonucleotídeo

<400> 27

caggtccagc tgcagcagtc tg

22

<210> 28

<211> 40

15

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador oligonucleotídeo

<400> 28

20

gatgggacct tggtcgacgc tgaggagact gtgagcaggg

40

<210> 29

<211> 31

<212> DNA

<213> Sequência artificial

25

<220>

<223> iniciador oligonucleotídeo

<400> 29

ccaccggtga cattgtgctg acccagtctc c

31

<210> 30

30

<211> 34

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador oligonucleotídeo

<400> 30

caccgtacgt ttattttcca actttgtccc cgag

34

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ligação ao antígeno capaz de se ligar a PIGF, caracterizada em que ela compreende pelo menos duas CDRs selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº:17 a 22 ou pelo menos duas seqüências que tem pelo menos 90% de identidade de seqüência com elas.
5
2. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizada em que ela compreende as regiões de CDR que correspondem às seqüências de SEQ ID Nº:17 a SEQ ID Nº:22 ou seqüências que tem pelo menos 90% de identidade de seqüência com elas.
- 10 3. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1 ou 2, que é uma molécula selecionada a partir do grupo de Fab, Fab' ou F(ab')₂, uma combinação de pelo menos duas regiões de determinação de complementaridade (CDRs), uma parte variável de cadeia simples ancorada à membrana ou solúvel ou um domínio variável único.
- 15 4. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada em que ela compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a seqüência de SEQ ID Nº:2 ou uma seqüência que tem pelo menos 90% de identidade de seqüência com ela dentro das regiões de CDR e em que ela compreende uma região variável de
20 cadeia leve que compreende a seqüência de SEQ ID Nº:4 ou uma seqüência que tem pelo menos 80% de identidade de seqüência com ela dentro das regiões de CDR.
- 25 5. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, que é o anticorpo 16D3 como produzido pela linhagem celular depositada como LMBP 6399CB ou um fragmento do mesmo.
6. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, que é um anticorpo ou fragmento de anticorpo humanizado.
- 30 7. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, que é um anticorpo ou fragmento de anticorpo híbrido humano/camundongo.
8. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma

das reivindicações 1 a 4, em que as ditas regiões de CDR estão enxertadas na cadeia principal de um anticorpo humano.

9. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 8, em que o dito anticorpo humano é IgG 1κ ou IgG4κ.

5 10. Molécula de ligação ao antígeno da reivindicação 1 ou 2, que é um fragmento variável de cadeia única que se liga a PIGF que compreende pelo menos duas CDRs selecionadas a partir do grupo de SEQ ID Nº:17 a 22 ou pelo menos duas seqüências que tem pelo menos 80% de identidade de seqüência com elas.

10 11. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 10, que compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID Nº: 24.

12. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 11, que é uma molécula de ligação ao antígeno humanizada.

15 13. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 12, que compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID Nº: 26.

14. Linhagem celular que produz uma molécula de ligação ao antígeno como definida na reivindicação 1 ou 2.

15. Linhagem celular de acordo com a reivindicação 14, que é a linhagem celular depositada como LMPB 6399CB.

20 16. Composição farmacêutica para prevenção ou tratamento de angiogênese indesejada em condições patológicas em mamíferos, que compreende como um princípio ativo uma molécula de ligação a PIGF como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, em mistura com um veículo farmaceuticamente aceitável.

25 17. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 16, que compreende ainda uma quantidade terapeuticamente eficaz de outro agente antiangiogênico.

30 18. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 17, em que o dito outro agente antiangiogênico é selecionado a partir do grupo que consiste em inibidores de VEGF e bFGF.

19. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 18, em que o dito inibidor de VEGF é um anticorpo anti-VEGF.

20. Polinucleotídeo que codifica uma molécula de ligação ao antígeno como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 13.

21. Método de tratamento e/ou prevenção de angiogênese indesejada em condição patológica em um mamífero, que compreende administrar a um mamífero que necessite de tal tratamento ou prevenção, uma
5 quantidade terapeuticamente eficaz de um princípio ativo que é uma ou mais das moléculas de ligação ao antígeno como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 13.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, em que a condição patológica é selecionada a partir do grupo que consiste em câncer, inflamação, formação de adesão, doenças do olho, hipertensão pulmonar e extravasamento vascular.
10

23. Método de acordo com a reivindicação 22, em que o dito câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer de cólon, câncer de mama, câncer pancreático e melanomas.
15

24. Uso da molécula de ligação ao antígeno como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, para a detecção imunológica de PIGF em amostras humanas.

25. Uso da molécula de ligação ao antígeno como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, para o rastreamento de compostos com um efeito aditivo à inibição de PIGF no tratamento de câncer.
20

26. Uso da molécula de ligação ao antígeno como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, como uma ferramenta de diagnóstico *in vitro*.

27. Uso da molécula de ligação ao antígeno como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, para a produção de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de angiogênese indesejada em condição patológica em um mamífero.
25

28. Uso de acordo com a reivindicação 27, em que a condição patológica é selecionada a partir do grupo que consiste em câncer, inflamação, formação de adesão, doenças do olho, hipertensão pulmonar e extravasamento vascular.
30

29. Uso de acordo com a reivindicação 28, em que o dito câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer de cólon, câncer de mama, câncer pancreático e melanomas.

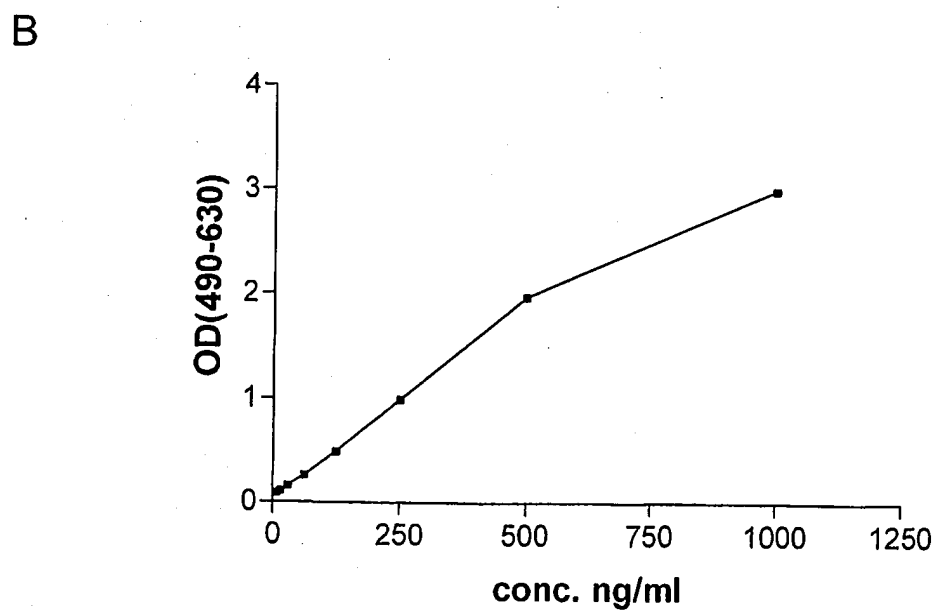
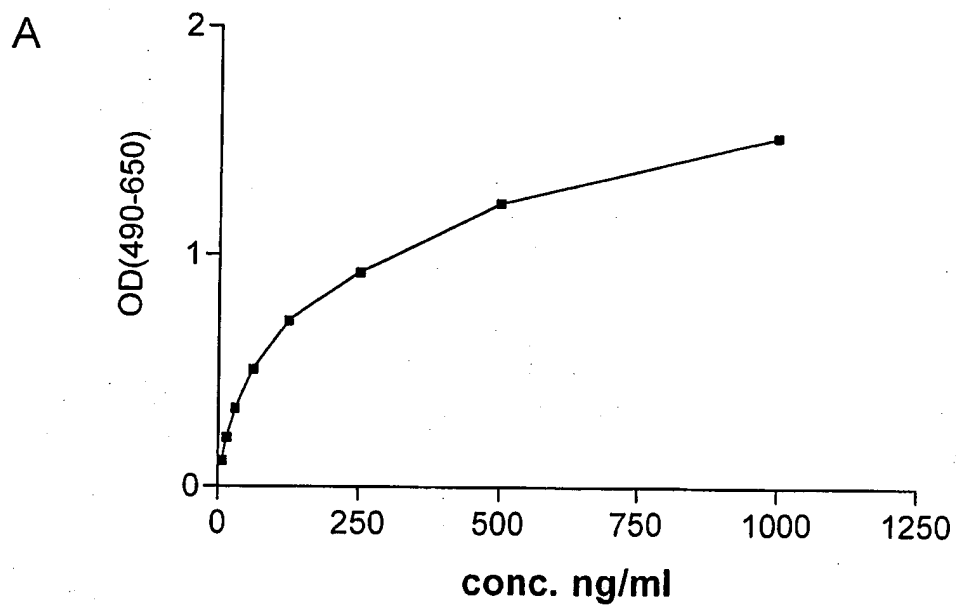


Fig. 1

2/15

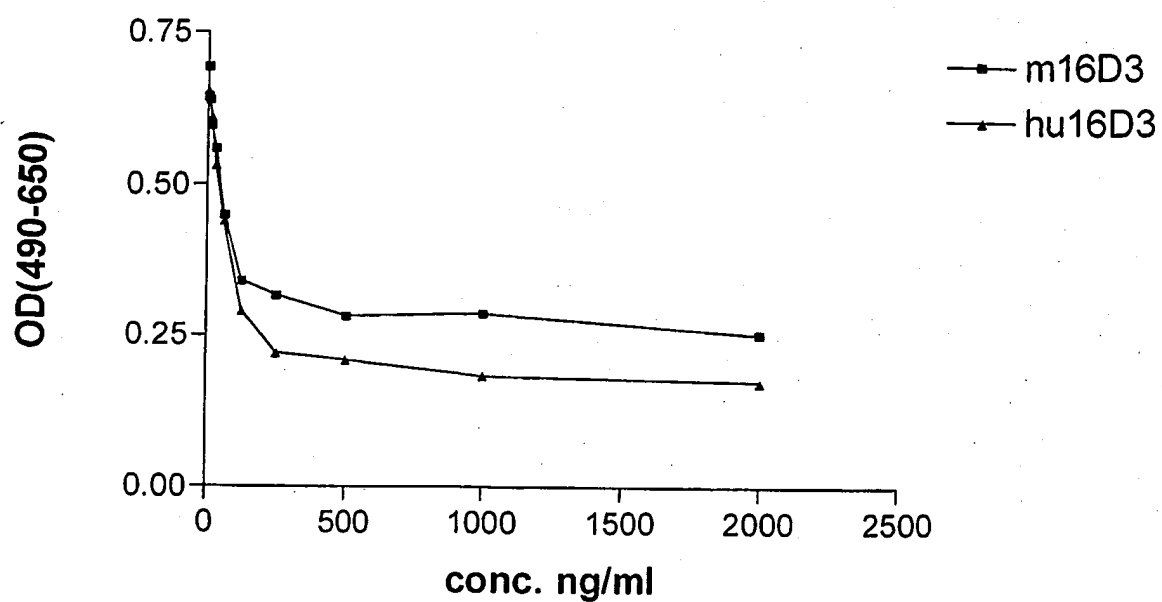


Fig. 2

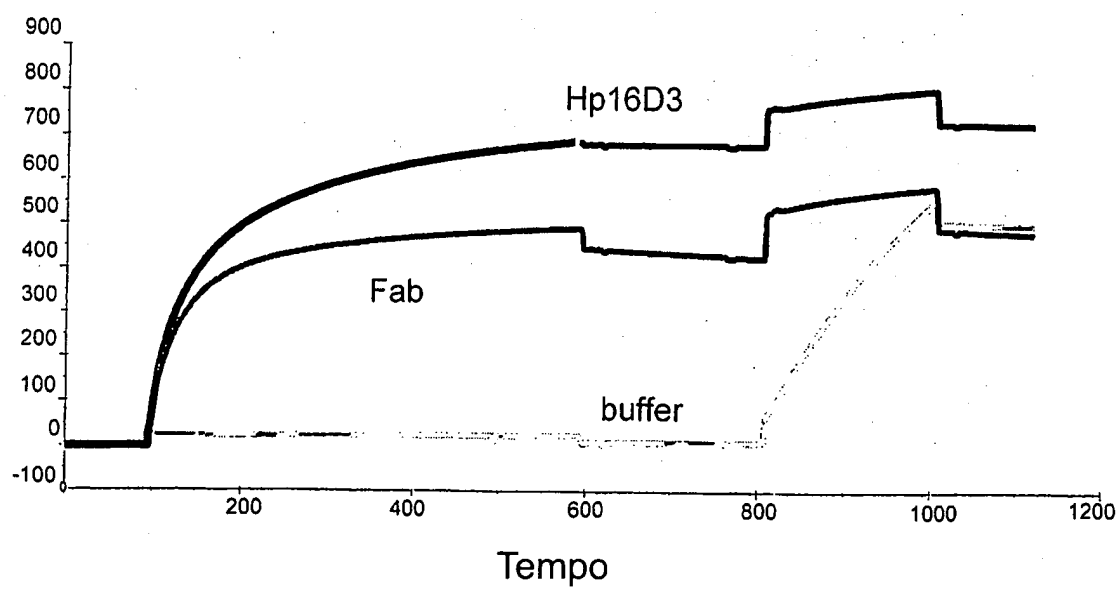
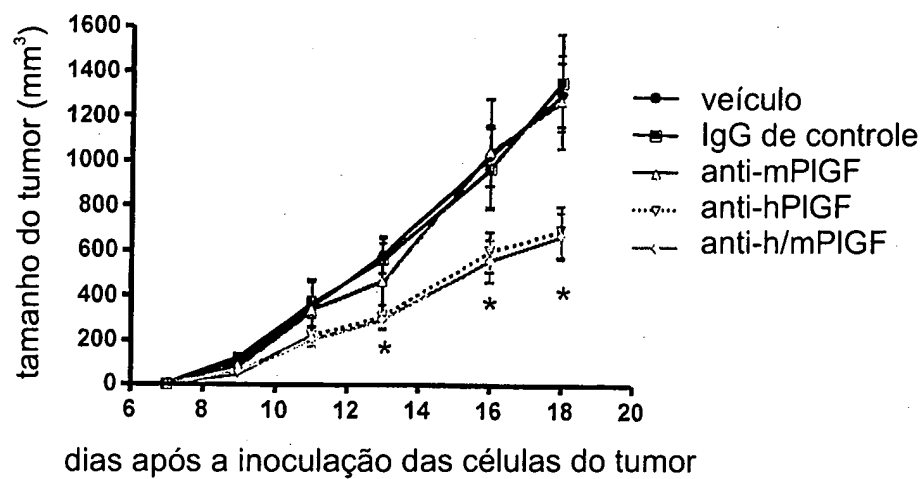


Fig. 3

A



B

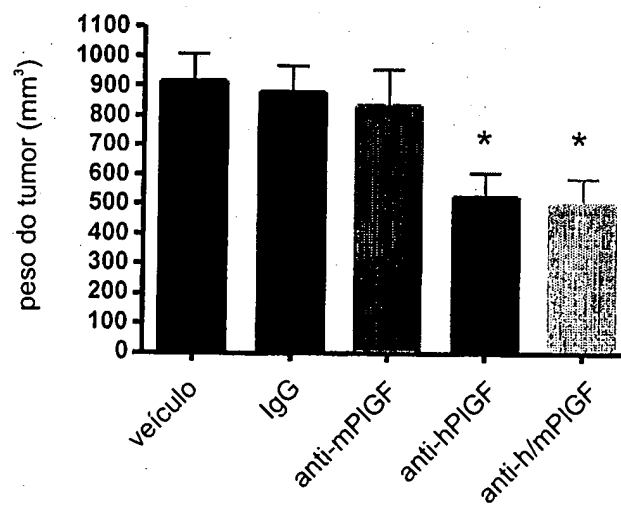
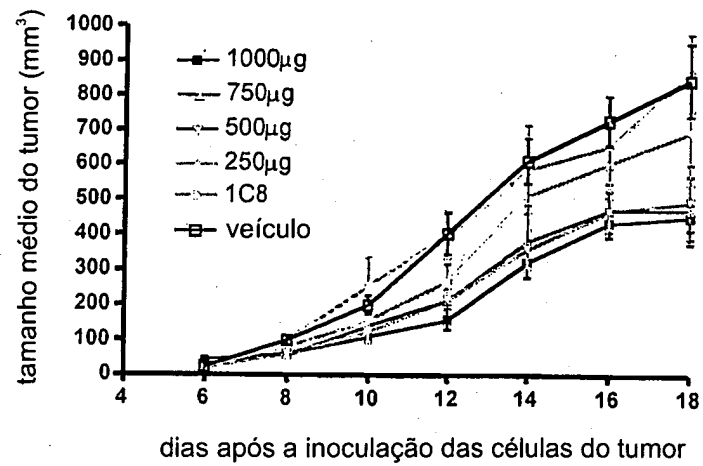
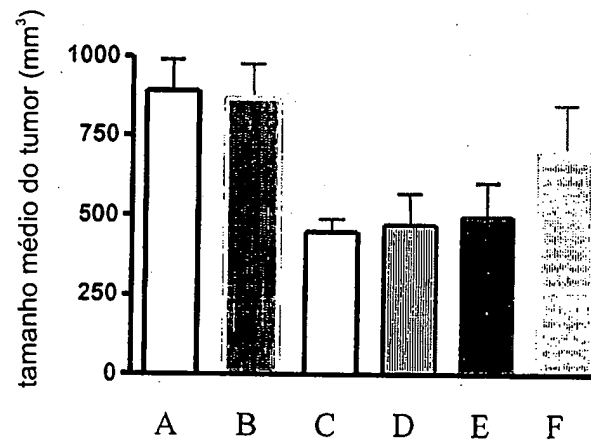


Fig. 4

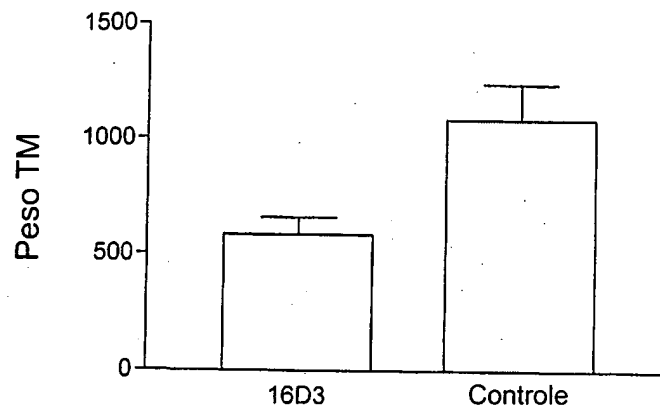
A



B

**Fig. 5**

A



B

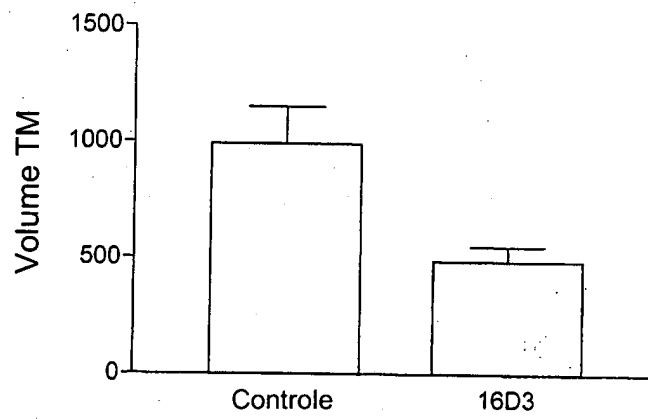
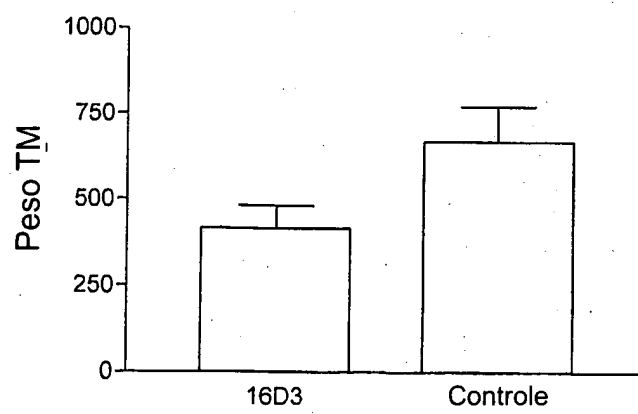


Fig. 6

A



B

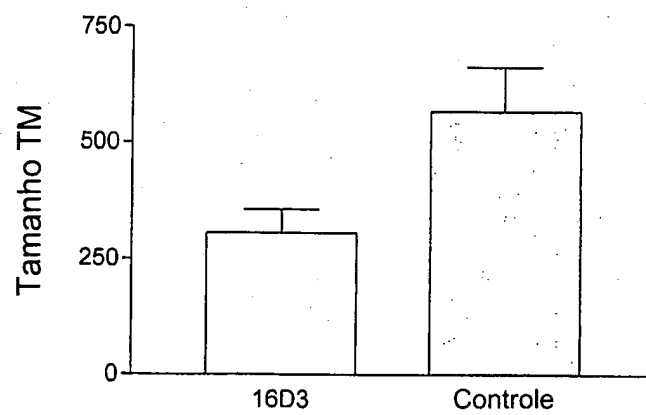


Fig. 7

7/15

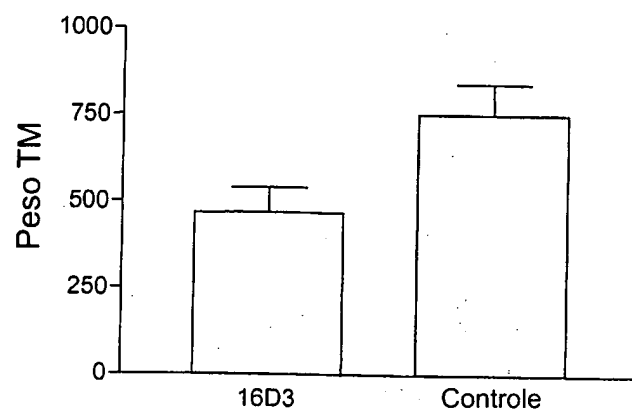


Fig. 8

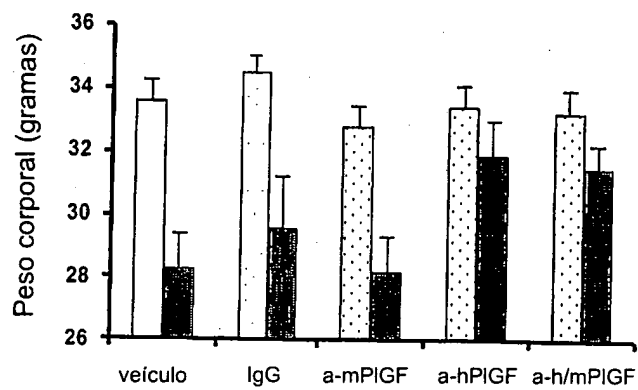
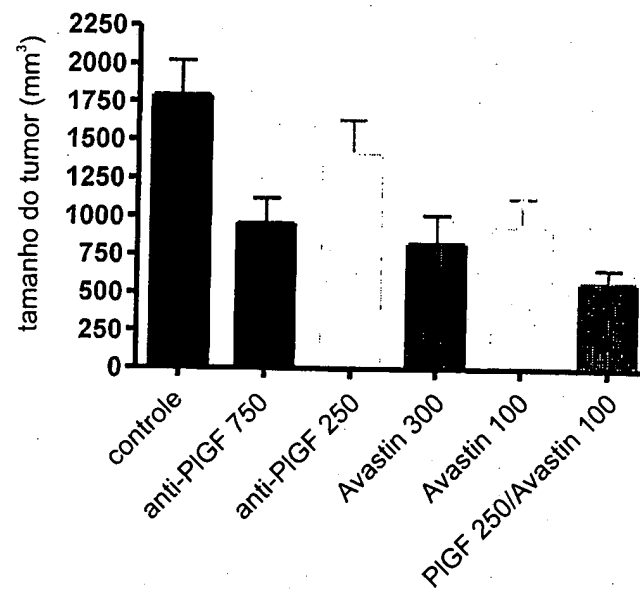


Fig. 9

**Fig. 10**

A: sequência de DNA da parte variável da cadeia pesada de camundongo (SEQ ID NO: 1)

cagatccagctgcagcagctctggacctgagctgggtgaagcctggggccttcagtgaagatatac
ctgcaaggcctctggctacaccttcactgactactatataaactgggtgaagttgaagcctg
gacagggacttgagtggattggatggattttatcctggaagcggtaataactaagtacaatgag
aagttcaagggaaggccacattgactatagacacatcctccagcacagcctacatgcagct
cagcagcctgacatctgaggacactgctgtctatcttctgtgtgaagagacagccctttctttg
actactggggccaaggcaccactctcacagtctcctca

B: sequência de DNA da parte variável da cadeia leve de camundongo (SEQ ID NO: 3)

gacattgtgctgtcacagtctccatctcctccctggctgtgtcagcaggagagaaggtcactat
gcgctgcaaattccagtcagagctctgctcaacagtggaatgcgaaagagtttcttggttggt
accagcagaaaccagggcagctctcctaagctgctgactctactgggcatccactagggaatct
ggggtccctgatcgcttcacaggcagtggtctgggacagatttcactctcaccatcagcag
tgtgcaggctgaagacctggcagtttattactgcaagcaatcttatcatctattcacgttcg
gctcggggacaaagttggaaataaaa

C: sequência de AA da parte variável da cadeia pesada de camundongo (SEQ ID NO: 2)

QIQQLQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFDYYINWVKLKPGQGLEWIGWIYPGSGN
TKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYMQLSSLTSEDVAVYFCVRDSPFFDYWGQGTTLTV
SS

D: sequência de AA da parte variável da cadeia leve de camundongo (SEQ ID NO: 4)

DIVLSQSPSSLAVSAGEKVTMRCKSSQSLLSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWA
STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIK

Fig. 11

A: sequência de DNA da parte variável humanizada da cadeia pesada (SEQ ID NO: 5)

cagggtccagctgcagcagctctggagccgagctggtgaagcctggggcttcagtgaagatatac
ctgcaaggcctctggctacaccttcactgactactatataaaactgggtgaagttggccctg
gacagggacttgagtggattggatggatttatcctggaagcggtaataactaagtacaatgag
aagttcaagggcaaggccacattgactatagacacatcctccagcacagcctacatgcagct
cagcagcctgacatctgaggacactgctgtctatattctgtgtgaagagacagccctttctttg
actactggggccaaggcaccctgctcacagtctcctca

B: sequência de DNA da parte variável humanizada da cadeia leve (SEQ ID NO: 7)

gacattgtgctgaccagctctccagactccctggctgtgtcactgggagagcgggtcactat
gaactgcaaatccagtcagagctctgctcaacagtggaaatgcgaaagagtttcttggcttgg
accagcagaaaccagggcagctctcctaagctgctgatctactgggcatccactagggaaatc
gggtccctgatcgcttcacaggcagtggaatctgggacagatttcactctcaccatcagcag
tgtgcaggctgaagacgtcgagtttattactgcaagcaatcttatcatctattcacgttcg
gctcggggacaaagttggaaataaaa

C: sequência de AA da parte variável humanizada da cadeia pesada (SEQ ID NO: 6)

QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGN
TKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYMQLSSLTSED~~T~~AVYFCVRDSPFFDYWGQGTL~~L~~TV
SS

D: sequência de AA da parte variável humanizada da cadeia leve (SEQ ID NO: 8)

DIVLTQSPDSLAVSLGERVTM~~N~~CKSSQSL~~L~~NSGM~~R~~KSF~~L~~AWYQQKPGQSPKLLIYWA
STRESGV~~P~~DRFTGSGSGTDFTLTIS~~S~~VQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIK

Fig. 12

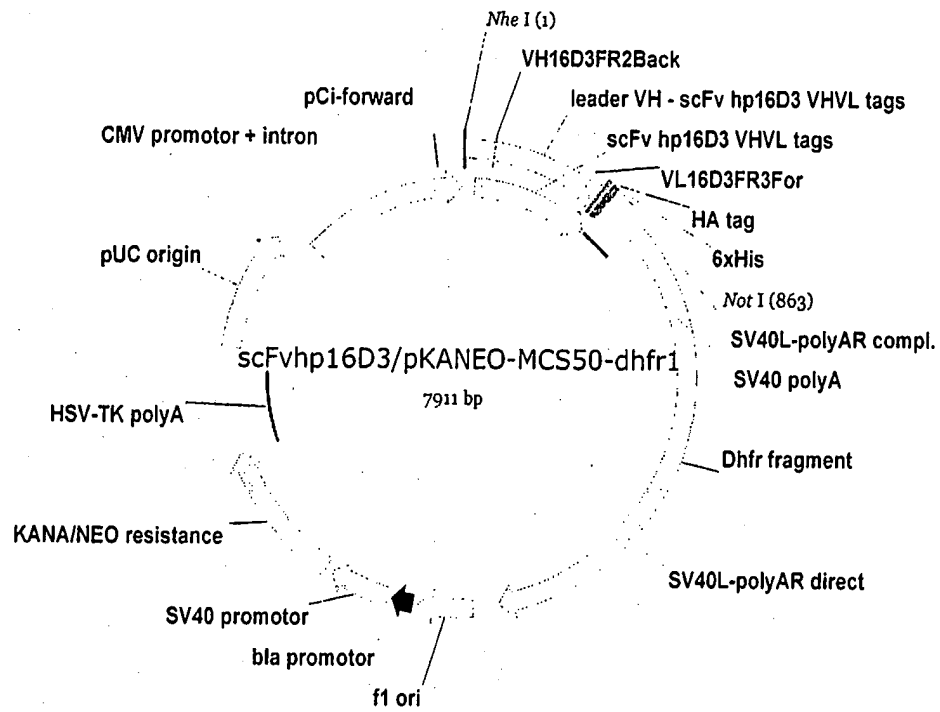
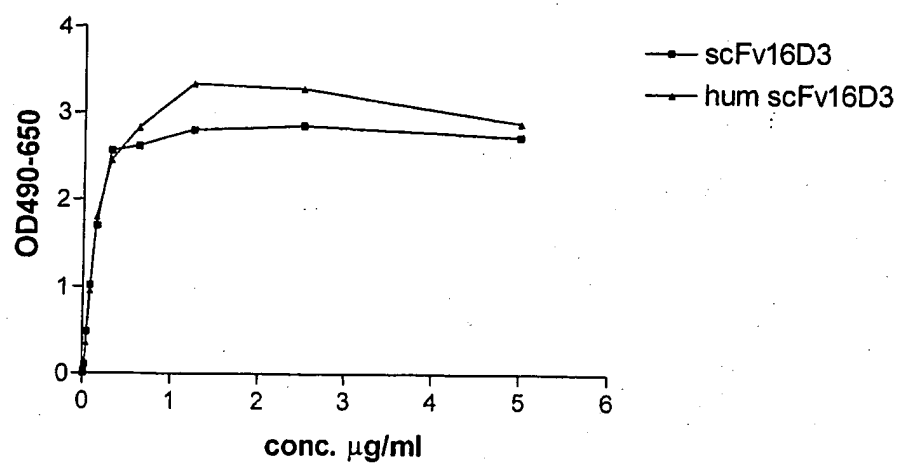


Fig. 13

12/15

A



B

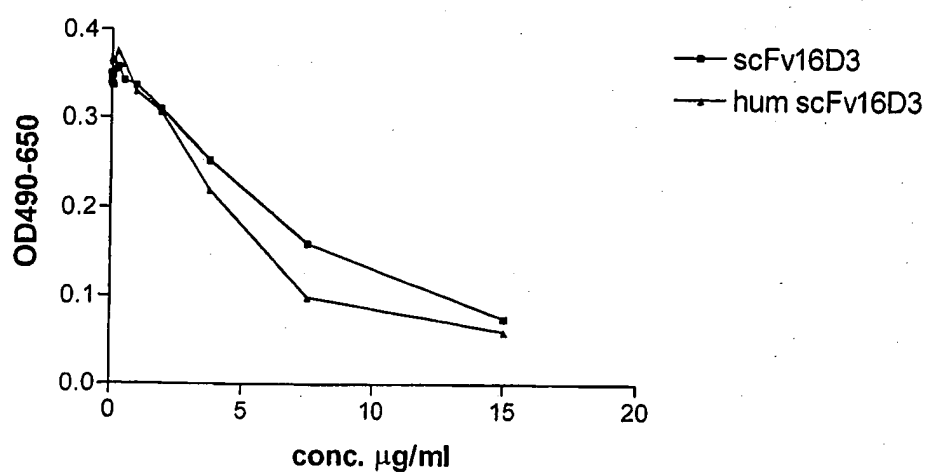


Fig. 14

A

QIQQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYTFT DYYINWVKLK PGQGLEWIGW 50
 IYPGSGNTKY NEKFKGKATL TIDTSSSTAY MQLSSLTSED TAVYFCVRDS 100
 PFFDYWGQGT TLTVSSGGGG SGGGSGGGG SDIVLSQSPS SLAVSAGEKV 150
 TMRCKSSQSL LNSGMRKSFL AWYQQKPGQS PKLLIYWAST RESGVPDRFT 200
 GSGSGTDFTL TISSVQAEDL AVYYCKQSYH LFTFGSGTKL EIKGSYPYDV 250
PDYAGSHHHH HH

Cadeia pesada :AA 1-116
 Sequência ligante :AA 117-131
 Cadeia leve :AA 132-243
 HA-tag :AA 246-254
 His Tag :AA 256-262

[SEQ ID No:24]

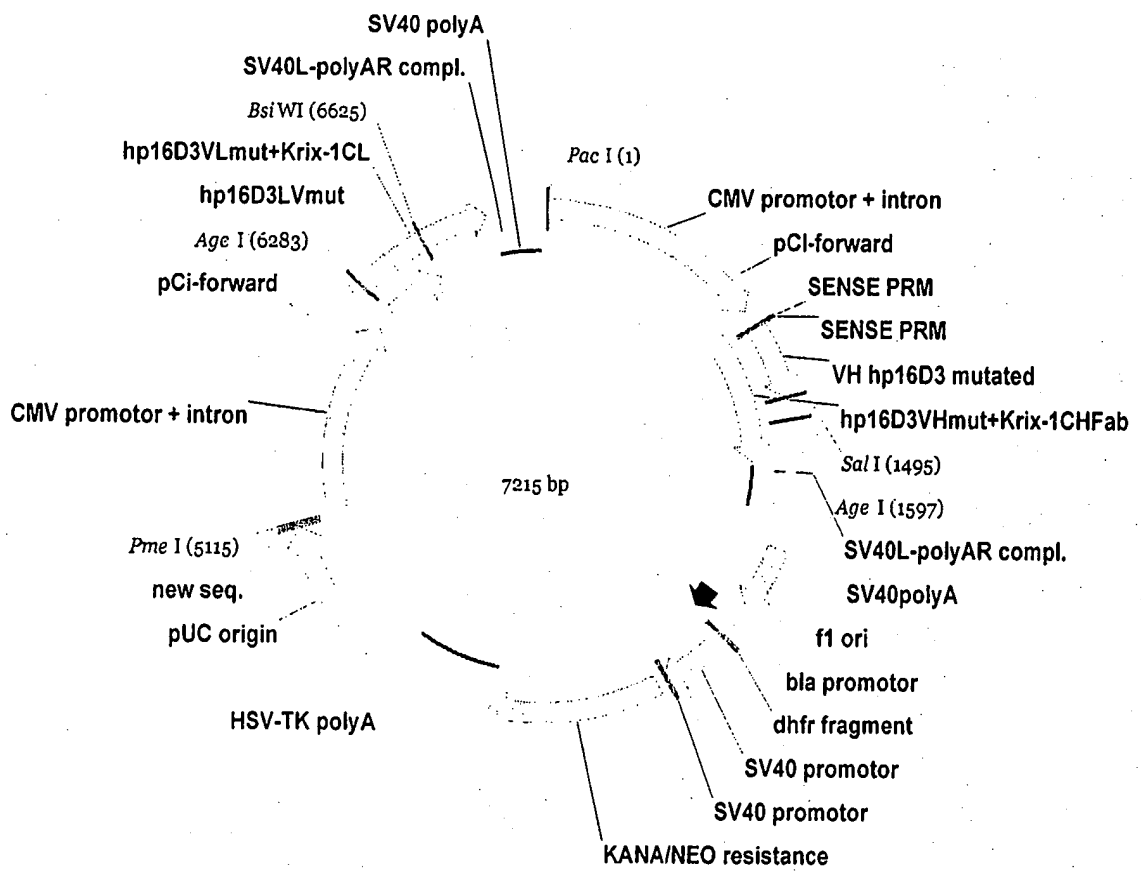
B

QVQLQQSGAE LVKPGASVKI SCKASGYTFT DYYINWVKLA PGQGLEWIGW 50
 IYPGSGNTKY NEKFKGKATL TIDTSSSTAY MQLSSLTSED TAVYFCVRDS 100
 PFFDYWGQGT LLTVSSGGGG SGGGSGGGG SDIVLTQSPD SLAVSLGERV 150
 TMNCKSSQSL LNSGMRKSFL AWYQQKPGQS PKLLIYWAST RESGVPDRFT 200
 GSGSGTDFTL TISSVQAEDV AVYYCKQSYH LFTFGSGTKL EIKGSYPYDV 250
PDYAGSHHHH HH

Cadeia pesada :AA 1-116
 Sequência ligante :AA 117-131
 Cadeia leve :AA 132-243
 HA-tag :AA 246-254
 His Tag :AA 256-262

[SEQ ID NO: 26]

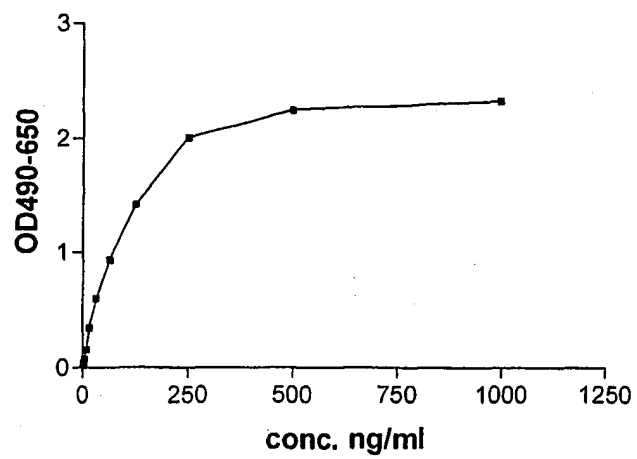
Fig. 15



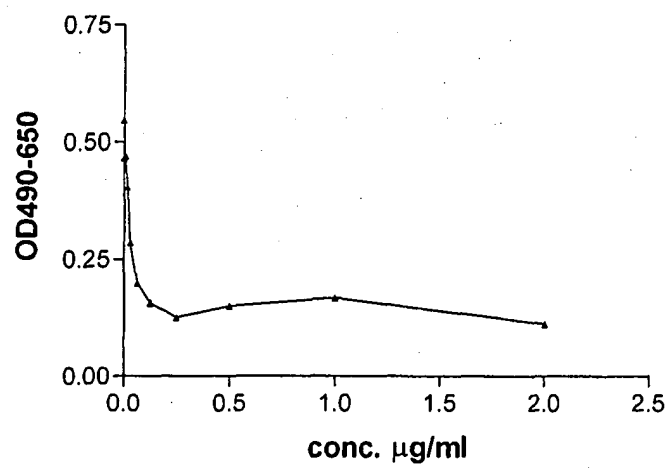
hp16D3mutcomplFab/pKNEO-MCS50-Fabvar #3 new seq

Fig. 16

A



B

**Fig. 17**

RESUMO

Patente de Invenção: "**ANTICORPO ANTI-PLGF**".

A presente invenção refere-se a novos anticorpos monoclonais direcionados para PIGF e fragmentos e derivados dos mesmos, mais particularmente a anticorpos humanizados e fragmentos desses para uso no tratamento e/ou prevenção de angiogênese patológica.

5

Novo quadro reivindicatório (total 19 reivindicações) para processamento na Fase Nacional Brasileira.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ligação ao antígeno capaz de se ligar a PIGF, caracterizada em que ela compreende pelo menos duas CDRs selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 17 a 22 ou pelo menos duas
5 seqüências que têm pelo menos 90% de identidade de seqüência com elas.

2. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizada em que ela compreende as regiões de CDR que correspondem às seqüências de SEQ ID Nº: 17 a SEQ ID Nº: 22 ou seqüências que têm pelo menos 90% de identidade de seqüência com elas.

10 3. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1 ou 2, que é uma moléculas selecionada a partir do grupo de Fab, Fab', ou F(ab')₂, uma combinação de pelo menos duas regiões de determinação de complementaridade (CDRs), uma parte variável de cadeia única ancorada à membrana ou solúvel, ou um domínio variável único.

15 4. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada em que ela compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 2 ou uma seqüência que tem pelo menos 90% de identidade de seqüência com ela dentro das regiões de CDR e em que ela compreende uma região variável de
20 cadeia leve que compreende a seqüência de SEQ ID Nº. 4 ou uma seqüência que tem pelo menos 80% de identidade de seqüência com ela dentro das regiões de CDR.

5. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, que é o anticorpo 16D3 como produzido pela linhagem celular depositada como LMBP 6399CB ou um fragmento do mesmo.
25

6. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, que é um anticorpo humanizado ou fragmento de anticorpo.

7. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1 ou 2, que é um fragmento variável de cadeia única.
30

8. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1, que compreende a seqüência de aminoácido de SEQ ID Nº: 24.

9. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1, que compreende a seqüência de aminoácido de SEQ ID Nº: 26.

10. Linhagem celular produzindo uma molécula de ligação ao antígeno como definida na reivindicação 1 ou 2.

5 11. Linhagem celular de acordo com a reivindicação 10, que é a linhagem celular depositada como LMBP6399CB.

12. Composição farmacêutica, que compreende como um princípio ativo uma molécula de ligação a PIGF como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em mistura com um veículo farmaceuticamente aceitável.

13. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 12, compreendendo adicionalmente uma quantidade terapeuticamente eficaz de outro agente antiangiogênico.

14. Polinucleotídeo que codifica uma molécula de ligação ao antígeno como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9.

15 15. Uso da molécula de ligação ao antígeno como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, para o rastreamento de compostos com um efeito aditivo à inibição de PIGF no tratamento de câncer.

16. Uso da molécula de ligação ao antígeno como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, como uma ferramenta de diagnóstico *in vitro*.

17. Uso de uma molécula de ligação ao antígeno como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado por ser para o preparo de um medicamento útil no tratamento e/ou prevenção de angiogênese indesejada em uma condição patológica em um mamífero.

18. Uso de acordo com a reivindicação 17, em que a condição patológica é selecionada a partir do grupo que consiste em câncer, inflamação, formação de adesão, doenças do olho, hipertensão pulmonar e extravasamento vascular.

30 19. Uso de acordo com a reivindicação 18, em que o dito câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer de cólon, câncer de mama, câncer pancreático e melanomas.