



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

(21) PI 0714893-3 A2



* B R P I 0 7 1 4 8 9 3 A 2 *

(22) Data de Depósito: 05/09/2007

(43) Data da Publicação: 28/05/2013
(RPI 2212)

(51) Int.Cl.:

C07K 16/00
C07K 16/18
C07K 16/22
C07K 16/26
C07K 16/46
C12N 15/13
C12N 15/63
C12N 15/10
C12N 15/16
C12N 15/22
C12N 15/24
C12N 15/26
C12N 15/28
C12N 1/15
C12N 1/19
C12N 1/21

(54) Título: ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO OU UMA PORÇÃO DE LIGAÇÃO AO SEU ANTÍGENO, UM FRAGMENTO DE ANTICORPO, UM ANTICORPO MIMÉTICO, IMUNOCONJUGADO, COMPOSIÇÃO MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA PREPARAR UM ANTICORPO ANTI-BMP2 OU ANTI-BMP4, MÉTODO PARA TRATAR OU PREVENIR UMA DOENÇA ASSOCIADA COM FORMAÇÃO ÓSSEA NORMAL E OSSIFICAÇÃO, HIBRIDOMA E METODO PARA PREPARAR O ANTICORPO

(30) Prioridade Unionista: 05/09/2006 US 60/824,596

(73) Titular(es): MEDAREX, INC.

(72) Inventor(es): ALASDAIR BELL, DEBORAH ZIMMERMAN, HEIDI N. LEBLANC, KYRA D. EMORY, MARK SELBY, MOHAN SRINIVASAN, RICHARD THEOLIS JR., SUJATA SINGH, TIMOTHY WILLIAM SPROUL

(74) Procurador(es): Antonio Mauricio Pedras Arnaud

(86) Pedido Internacional: PCT US2007019652 de 05/09/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/030611 de 13/03/2008

(57) Resumo: ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO OU UMA PORÇÃO DE LIGAÇÃO AO SEU ANTÍGENO, UM FRAGMENTO DE ANTICORPO, UM ANTICORPO MIMÉTICO, IMUNOCONJUGADO, COMPOSIÇÃO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA PREPARAR UM ANTICORPO ANTI-BMP2 OU ANTI-BMP4, MÉTODO PARA TRATAR OU PREVENIR UMA DOENÇA ASSOCIADA COM A FORMAÇÃO ÓSSEA ANORMAL E OSSIFICAÇÃO, HIBRIDOMA E MÉTODO PARA PREPARAR O ANTICORPO. A presente invenção proporciona anticorpos monoclonais isolados, particularmente anticorpos monoclonais humanos, que especificamente se ligam a BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 com alta afinidade. São também proporcionadas moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos da invenção, vetores de expressão, células hospedeiras e métodos para expressar os anticorpos da invenção. São também proporcionados imunconjugados, moléculas biespecíficas e composições farmacêuticas que compreendem os anticorpos da invenção e, opcionalmente, um ou mais agente terapêutico adicional. A invenção também proporciona métodos para tratar doenças associadas com a formação óssea anormal e ossificações mediadas por BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2.

"ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO OU UMA PORÇÃO DE LIGAÇÃO AO SEU ANTÍGENO, UM FRAGMENTO DE ANTICORPO, UM ANTICORPO MIMÉTICO, IMUNOCONJUGADO, COMPOSIÇÃO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, 5 MÉTODO PARA PREPARAR UM ANTICORPO ANTI-BMP2 OU ANTI-BMP4, MÉTODO PARA TRATAR OU PREVENIR UMA DOENÇA ASSOCIADA COM A FORMAÇÃO ÓSSEA ANORMAL E OSSIFICAÇÃO, HIBRIDOMA E MÉTODO PARA PREPARAR O ANTICORPO".

CAMPO DA INVENÇÃO

10 A presente invenção se refere, de uma maneira genérica, aos campos da imunologia e biologia molecular. Mais especificamente, são aqui proporcionados anticorpos e outras proteínas terapêuticas dirigidas contra as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e seus receptores, 15 ácidos nucleicos que codificam estes anticorpos e proteínas terapêuticas, métodos para preparar os anticorpos monoclonais da invenção e outras proteínas terapêuticas e métodos para o tratamento de doenças, tais como doenças ósseas e cânceres mediados pela expressão/atividade da BMP e/ou associados com a 20 expressão/atividade anormal de um seu receptor.

TÉCNICA ANTECEDENTE

O esqueleto humano compreende mais de 200 ossos articulados. Durante a embriogênese, o esqueleto se desenvolve a partir de mesênquima indiferenciado de 25 acordo com um programa genético que dita a formação temporal e espacial. Em indivíduos saudáveis, o desenvolvimento pós-natal inclui a iniciação de novos elementos do esqueleto através da regeneração óssea em locais de fratura óssea. 30

Alteração na regulação normal da esqueletogênese pode resultar na formação anormal de osso em tecidos moles. Shafritz et al., N. Engl. J. Med. 335:555-561 (1996) e Kaplan et al., J. Am. Acad. Orthop. Surg. 2:288-296 35 (1994). Em casos extremos, esta formação óssea anormal, também referida como ossificação heterotópica, pode levar a consequências clinicamente significativas ou

devastadoras, que podem comprometer, de forma dramática, a qualidade de vida de um paciente. As causas da ossificação heterotópica são várias e podem ser adquiridas por meio de lesão do sistema nervoso central ou tecido mole; doença vascular (por exemplo, aterosclerose e doença valvular cardíaca); e artropatias (por exemplo, espondilite anquilosante, artrite psoriática, artropatias seronegativas e hiperostose esquelética idiopática difusa). Em outros casos, a ossificação heterotópica pode se desenvolver por uma causa genética, tal como a fibrodisplasia ossificante progressiva ou heteroplasia óssea progressiva. Revista por Kaplan et al., "Heterotopic Ossification" J. Amer. Acad. of Orth. Surg. 12(2):116-125 (2004).

Espondiloartrite (SpA) se refere a um grupo de doenças que, em conjunto, são caracterizadas por inflamação espinal, dor significativa e desabilidade funcional; estas doenças causam grande impacto na qualidade de vida de um paciente. Braun et al., Arthritis Rheum. 41:58-67 (1998); Zink et al., J. Rheumatol. 27:613-622 (2000); e Dagfinrud et al., Ann. Rheum. Dis. 63:1605-1610 (2004). SpA inclui, por exemplo, distúrbios debilitantes tais como a espondilite anquilosante, espondiloartrite psoriática, espondiloartrite reativa, espondiloartrite associada à doença inflamatória do intestino e espondiloartrite indiferenciada.

A espondilite anquilosante (AS) e as espondiloartropatias relacionadas estão entre as doenças reumáticas inflamatórias mais comuns. Nos Estados Unidos e no Norte da Europa estas doenças têm uma prevalência estimada de aproximadamente 0,1% a 0,3% -- afetando principalmente indivíduos entre os 20 e 40 anos de idade. Khan, "A Worldwide Overview: The Epidemiology of HLA-B27 and Associated Spondyloarthritides," (Oxford: Oxford University Press (1998)) e Saraux et al., J. Rheumatol. 26:2622-2627 (1999). Os componentes clínicos característicos da AS incluem dor inflamatória nas

costas, em geral causada por sacroiliíte e entesite. Tipicamente, a AS envolve o esqueleto axial, mas também pode afetar as juntas periféricas (ombros e quadril) e estruturas extra-articulares.

- 5 Os pacientes com espondilite anquilosante apresentam os envolvimentos espinais mais graves devido à nova formação óssea que leva à sindesmofitose e anquilose. Deste modo, a AS é uma das muitas doenças que apresentam ossificação heterotópica. Gladman et al., *Arthritis Rheum.* 50:24-35
 10 (2004) e Edmunds et al., *J. Rheumatol.* 18:696-698 (1991). Crescentes evidências sugerem que na AS uma zona anatômica referida como entese, onde tendões e ligamentos se ligam ao osso subjacente, seja o alvo principal do processo patológico. Ball, *Ann. Rheum. Dis.* 30:213-223
 15 (1971) e Benjamin e McGonagle, *J. Anat.* 199:503-526 (2001).

Foram descritos sistemas de modelo animal para espondilite anquilosante e espondiloartropatias relacionadas, a maioria dos quais têm por base a estreita
 20 associação entre a AS e a expressão do antígeno B27 (HLA-B27) do leucócito humano. Revisto em, Zhang et al., *Current Rheum. Reports* 4:507-512 (2002). A introdução do HLA-B27 transgênico em ratos induz o desenvolvimento espontâneo de uma perturbação multissistêmica que envolve
 25 a espondilite. Hammer et al., *Cell* 63:1099-1112 (1990). Os camundongos transgênicos para HLA-B27 (C57BL/10) desenvolvem artrite periférica com o progressivo endurecimento do tornozelo ou juntas tarsais, embora a espinha não seja afetada. Weinreich et al., *Hum. Immunol.*
 30 42:103-115 (1995). Foi também relatado que imunidade a qualquer dos domínios G1 dos proteoglicanos agrecanos e versicanos pode induzir em camundongos BALB/c uma patologia semelhante a AS, que inclui a espondilite, sacroiliíte e entesite. Glant et al., *Arthritis Rheum.*
 35 30:201-212 (1987) e Shi et al., *Arthritis Rheum.* 44:S240 (2001). Os camundongos DBA/1 são um modelo espontâneo de artrite, entesite anquilosante e formação óssea anormal.

Lories et al., *J Clin. Invest.* 115(6):1571-9 (2005). Os camundongos deficientes em proteína GLA da matriz demonstraram que exibem calcificação espontânea das artérias e cartilagem e, deste modo, são utilizados como
 5 um sistema modelo para a calcificação vascular. Luo et al., *Nature* 386:78-81 (1997).

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são fatores de crescimento multifuncionais que são membros da superfamília do fator de crescimento de transformação β
 10 (TGF β). A sinalização da BMP desempenha um papel no desenvolvimento cardíaco, neural e de cartilagem, bem como na formação óssea pós-natal. As BMPs induzem ectopicamente uma cascata de formação óssea endocondrial e desempenham um papel crítico na morfogênese esquelética
 15 e das juntas. Urist, *Science* 150:893-899 (1965); Olsen et al., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:191-220 (2000); Kronenberg, *Nature* 423:332-336 (2003); Thomas et al., *Nat. Genet.* 12:315-317 (1996); Thomas et al., *Nat. Genet.* 17:58-64 (1997); Polinkowsky et al., *Nat. Genet.* 17:18-19
 20 (1997); e Storm et al., *Nature* 368:639-643 (1994).

Foram identificados, aproximadamente, 20 membros da família BMP. As BMPs sinalizam através dos receptores serina/treonina quinases, que inclui os tipos I e II. Três receptores tipo I ligam ligandos BMP (receptores
 25 tipo IA e IB BMP e receptor de activina (ActRI) tipo I. Koenig et al., *Mol. Cell. Biol.* 14:5961-5974 (1994) e Ten Dijke et al., *J. Biol. Chem.* 269:16985-16988 (1994); e Macias-Silva et al., *J. Biol. Chem.* 273:25628-25636 (1998). As BMPs são sintetizadas e dobradas como pró-
 30 proteínas diméricas grandes no citoplasma e clivadas por proteases durante a secreção. Cada monômero contém cerca de 300 aminoácidos como pró-proteína. A região funcional carboxi (100-120 aminoácidos em cada monômero) é libertada no compartimento extracelular para ligar os
 35 receptores de membrana às células alvo. Embora a dimerização das BMPs conte com várias ligações dissulfureto entre as suas subunidades, a bioquímica

precisa da dimerização e clivagem permanece para ser caracterizada. Além disso, parece haver uma série de proteínas extracelulares que antagonizam ou, de resto, alteram a função das BMPs; estas proteínas incluem

5 Glipican-3, Noguina, Cordina, Cerberus, e Folistatina. Fainsod et al., *Mech. Dev.* 63:39-50 (1997); Grisaru et al., *Dev. Biol.* 231:31-46 (2001); Holley et al., *Cell* 86:607-617 (1996); Iemura et al., *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 95:9337-9342 (1998); Jackson et al., *Development*

10 124:4113-4120 (1997); Paine-Saunders et al., *Dev. Biol.* 225:179-187 (2000); Piccolo et al., *Cell* 86:589-598 (1996); Re'em-Kalma et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:12141-12145 (1995); Sasai et al., *Nature* 376:333-336 (1995); e Zimmerman et al., *Cell* 86:599-606 (1996). Foram

15 também identificados três tipos de receptores tipo II para BMPs (isto é, BMPRI, ActRII e ActRIIB). Yamashita et al., *J. Cell. Biol.* 130:217-226 (1995); Rosenzweig et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 92:7632-7636 (1995); Kawabata et al., *J. Biol. Chem.* 270:5625-5630 (1995).

20 Os receptores de BMP tipo I e II são expressos diferencialmente em vários tecidos, no entanto ambos são indispensáveis para a transdução de sinal. Depois de ligação ao ligando, os receptores de BMP tipo I e II formam

25 heterotetramicamente, que incluem dois pares de complexos do tipo I e II. Moustakas e Heldi, *Genes Dev.* 16:67-87 (2002). Ambos os tipos de receptores são essenciais para a transdução de sinal. Hogan, *Genes Dev.* 10:1580-1594 (1996); Nellen et al., *Cell* 78:225-237 (1994); Ruberte et

30 al., *Cell* 80:889-897 (1995); ten Dijke et al., *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:139-145 (1996); Weis-Garcia e Massague, *EMBO J.* 15:276-289 (1996); e Wrana et al., *Nature* 370:341-347 (1994). Os receptores tipo II têm

35 atividade quinase constitutivamente ativa que fosforila os receptores tipo I depois de ligação ao ligando. Os receptores tipo I fosforilados transduzem o sinal a proteínas alvo a jusante.

Os receptores BMP tipo I sinalizam através das proteínas Smad (smad 1/5), que são importantes na transmissão do sinal da BMP do receptor para os genes alvo no núcleo. Mediante a libertação do receptor, as proteínas Smad fosforiladas se associam com a proteína Smad4 relacionada que atua como um parceiro compartilhado. Este complexo transloca para dentro do núcleo e participa na transcrição do gene com outros fatores de transcrição.

A sinalização da BMP é controlada em muitos níveis, incluindo por meio de antagonistas extracelulares tais como a noguina. Massague, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1:169-178 (2000). Sugeriu-se que a ativação prematura ou indesejada de cascatas de sinalização fundamental para o desenvolvimento normal pode promover processos de doença como por exemplo espondiloartropatias. Podem ter sido descritos os efeitos da sinalização da BMP sobre a iniciação e progresso da artrite por transferência de gene de noguina. Lories et al., *J. Clin. Invest.* 115(6):1571-1579 (2005).

Os papéis fisiológicos das BMPs e o receptor de BMP que sinalizam na formação óssea normal, incluindo o desenvolvimento esquelético e de membros foram estudados e recentemente revistos em Zhao, *Genetics* 35:43-56 (2003). Durante a ossificação endocondrial, as células mesenquimais se condensam e diferenciam em condrócitos. Os condrócitos passam por um programa de diferenciação altamente organizado formando o modelo para a formação óssea. Kronenberg, *Nature* 423:332-336 (2003) e Olsen et al., *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16:191-220 (2000). As BMPs foram identificadas por sua capacidade em promover cartilagem ectópica e formação óssea. Wozney, *Prog. Growth Factor Res.* 1:267-280 (1989). As afinidades diferenciais de ligandos de BMP distintos para os três receptores tipo I, BMPRIa, BMPRIb e ActRI (receptor tipo I da activina), contribuem para a diversidade de sinalização durante o curso do desenvolvimento. Estes receptores participam da condrogênese -- cada um tendo

uma distribuição de tecido e função diferentes.

Os camundongos deficientes de BMP2 e BMP4 são inviáveis. Embriões mutantes BMP2 homozigóticos morrem entre o 7,5 e 10,5 dia embriônico e têm defeitos no desenvolvimento cardíaco. Zhang e Bradley, *Development* 122:2977-2986 (1996). Embriões mutantes Homozygous BMP4 homozigóticos morrem entre o 6,5 e 9,5 dia embriônico e são defeituosos na diferenciação mesodérmica. Winnier et al., *Genes Dev.* 9:2105-2116 (1995).

- 10 Yoon et al. descreveram a geração de camundongos que são invalidados tanto para *Bmpr1a* como *Bmpr1b* em condrócitos. *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 102(14):5062-5067 (2005). Estes autores demonstram que camundongos knockout condicionais *Bmpr1a*, como os camundongos invalidados para *Bmpr1b*, exibem menos defeitos esqueléticos. Os camundongos que abrigam ambas as mutações, no entanto, desenvolvem uma condrodysplasia grave e generalizada. Estes dados sugerem que a sobreposição funciona para BMPR1A e BMPR1B durante o início da condrogênese e que a sinalização da BMP é necessária para a proliferação, sobrevivência e diferenciação de condrócitos. A mutação invalidada do gene BMPR1A provoca letalidade embriônica em camundongos; os animais morrem no 9,5 dia embriônico. Os mutantes homozigóticos com defeitos morfológicos são detectáveis no 7,5 dia embriônico e os embriões são defeituosos na formação mesodérmica. Mishina et al., *Genes Dev.* 9:3027-3037 (1995).

Os camundongos desprovidos de BMPR1B são viáveis mas exibem defeitos no esqueleto apendicular. Em camundongos deficientes de BMPR1B a proliferação de células precondrogênicas e a diferenciação de condrócitos na região falangeal são reduzidas. Em camundongos mutantes adultos, a articulação interfalangeal proximal está ausente e as falanges são substituídas por um único elemento rudimentar, ao passo que as falanges distais não são afetadas. Os comprimentos do rádio, ulna e tíbia são normais, mas os metacarpos e metatarsos são reduzidos. Yi

et al., Development 127:621-630 (2000). Sugeriu-se que a BMPR1B possivelmente desempenhe um papel não redundante na formação de cartilagem in vivo. Gannon et al., Hum. Pathol. 28:339-343 (1997). Os ligandos de BMP podem
 5 utilizar receptores de BMP tipo I para mediar a sua sinalização durante a formação de cartilagem e osso e que BMPR1B e ActR1A (Alk2) podem desempenhar papéis sinérgicos e/ou de sobreposição na formação óssea e de cartilagem in vivo. Macias-Silva et al., J. Biol. Chem.
 10 273:25628-25636 (1998).

A noguina é um polipeptídeo segregado que se liga e desativa a BMP-2 e a BMP-4. Estruturas de co-cristal de noguina em BMP mostram que a noguina inibe a sinalização da BMP bloqueando as interfaces moleculares dos epítomos
 15 de ligação para os receptores de BMP tipo I e tipo II. Foi estabelecido um modelo de camundongo transgênico utilizando promotor de osteocalcina para acionar a noguina transgênica. Estes animais desenvolveram osteoporose conforme evidenciado por reduções
 20 significativas na densidade mineral óssea, volume ósseo e taxas de formação óssea. Devlin et al., Endocrinology 144:1972-1978 (2003) e Wu et al., J. Clin. Investig. 112:924-924 (2003). No total, estes experimentos com antagonistas de BMP demonstram que a regulação da
 25 sinalização das proteínas BMP é fundamental para a formação óssea in vivo.

Foram descritos sistema de modelo animal e utilizados para a avaliação da capacidade da BMP2 em curar defeitos ósseos iniciando a condrogênese e formação óssea. A
 30 capacidade osteoindutiva da BMP2 é consistente com os efeitos de cura em osso longo mediada por este fator de crescimento observado em ratos, coelhos, cães, ovelhas e primatas não humanos. Murakami et al., J. Biomed. Mater. Res. 62:169-174 (2002). Injeção de BMP-2 localmente sobre
 35 a superfície da calvária de camundongos induziu a formação de osso periosteal sobre a superfície da calvária sem uma fase anterior de cartilagem. Chen et

al., *Calcif. Tissue Int.* 60:283-290 (1997). Além disso, a administração sistêmica de BMP2 humana recombinante aumenta a atividade da célula tronco mesenquimal e reverte a perda óssea induzida por ovariectomia e relacionada com a idade em modelos murinos sugerindo que a BMP2 pode ser terapeuticamente eficaz no tratamento da osteoporose. Turgeman et al., *J. Cell. Biochem.* 86:461-474 (2002).

A superexpressão da BMP2 e 4 bem como BMPR1A está associada à malignidade do epitélio oral, ao passo que a superexpressão de BMP2 foi relatada em células de câncer da próstata. Jin et al., *Oral Oncol.* 37:225-233 (2001) e Harris et al., *Prostate* 24:204-211 (1994), respectivamente. A BMP também demonstrou que promove o comportamento metastático em linhas celulares de melanoma. Rothhammer et al., *Cancer Res.* 65(2):448-56 (2005).

A fibrodysplasia ossificante progressiva (FOP) é uma doença genética rara e incapacitante caracterizada por má-formações congênitas dos dedos grandes dos pés e pela progressiva ossificação endocondral heterotópica em padrões anatômicos previsíveis. A expressão ectópica da BMP4 foi observada em pacientes com FOP. Gannon et al., *Hum. Pathol.* 28:339-343 (1997) e Xu et al., *Clin. Genet.* 58:291-298 (2000). Foi recentemente demonstrado que pacientes com FOP têm mutações de ativação no receptor ACVRI tipo I de BMP. Shore et al., *Nat. Gen.* 23 April advance online publication (2006). Camundongos transgênicos que superexpressam BMP4 sob o controle de um promotor de enolase específico de neurônio (NSE) foram também descritos como desenvolvendo um fenótipo semelhante a FOP. Kan et al., *Am. J. of Path.* 165(4):1107-1115 (2004). O acasalamento destes animais com camundongos transgênicos que superexpressam a noguina evita a doença, confirmando, deste modo, o papel da BMP4 na patogênese da doença.

SpA é outro estado patológico com envolvimento de

formação óssea heterotópica ou anormal. As modalidades terapêuticas existentes para SpA, em particular a espondilite anquilosante, são revistas em Zochling et al., Curr. Opin Rheumatol. 17:418-425 (2005) e van der Heijde et al., Ann. Rheum. Dis. 61:24-32 (2002). A terapêutica de linha de base inclui a utilização de drogas antiinflamatórias não esteróides (NSAIDs) e exercício estruturado. Dougados et al., Arthritis Rheum. 44:180-185 (2001); Khan, Sem. Arthritis Rheum. 15(Suppl 1):80-84 (1985); Wasner et al., JAMA 246:2168-2172 (1981); Hidding et al., Arthritis Care Res. 6:117-125 (1993); Sweeney et al., J. Rheumatol. 29:763-766 (2002); e Dagfinrud et al., "The Cochrane Database of Systematic Reviews", Issue 4, Art. No.: CD002822, DOI: 10.1002/14651858.CD002822.pub2 (2004). As tentativas de tratar a espondilite anquilosante com drogas antirreumáticas foram decepcionantes. A Sulfasalazina melhora a artrite periférica associada a SpA, mas não a dor espinal. Clegg et al., Arthritis Rheum. 39:2004-2012 (1996); Clegg et al., Arthritis Rheum. 42:2325-2329 (1999); Dougados et al., Arthritis Rheum. 38:618-627 (1995); e Nissila et al., Arthritis Rheum. 31:1111-1116 (1988). De modo similar, metotrexato e leflunomida, embora eficazes no tratamento de artrite reumatóide, exibem uma eficácia mínima contra a espondilite anquilosante. Chen et al., "The Cochrane Database of Systematic Reviews", Iss. 3, Art. No.: CD004524, DOI: 10.1002/14651858.CD004524.pub2 (2003); Haibel et al., Ann. Rheum Dis. 64:124-126 (2005); e Van Denderen et al., Ann. Rheum. Dis. 63(Suppl 1):397 (2004).

Mais recentemente, foi tentada a utilização de bloqueadores do fator de necrose tumoral (TNF) e desfrutou de sucesso limitado. Por exemplo, Van der Heijde et al., Arthritis Rheum. 52:582-591 (2005) relataram que 61% de um grupo de tratamento alcançaram uma resposta ASAS20 depois de 24 semanas de tratamento com infliximab. Ver, também, Braun et al., Ann. Rheum.

Dis. 64:229-234 (2005); Braun et al., Lancet 359:1187-1193 (2002); e Mease et al., Lancet 356:385-390 (2000). De modo similar, estudos recentes com etanercept indicaram uma taxa de respostas de aproximadamente 60% no

5 tratamento de espondilite anquilosante onde uma resposta positiva inclui inflamação espinal, dores nas costas e debilitamento físico reduzidos. Brandt et al., Arthritis Rheum. 48:1667-1675 (2003), Davis et al., Arthritis Rheum. 48:3230-3236 (2003); e Gorman et al., N. Engl. J.

10 Med. 346:1349-1356 (2002).

Embora preliminarmente, estudos iniciais com adalimumab, um anticorpo anti-TNF humanizado monoclonal, indica que esta terapêutica pode ser comparável ao infliximab e etanercept no tratamento da espondilite anquilosante.

15 Haibel et al., Arthritis Rheum. 50(Suppl):S217 (2004). Além disso, anakinra, um antagonista do receptor da interleucina-1 humana recombinante; bisfosfonatos e talidomida; e terapêuticas com antibióticos foram

20 tentadas para o tratamento de espondilite anquilosante, mas os resultados são inconclusivos até a presente data. Ver, Tan et al., Ann. Rheum. Dis. 63:1041-1045 (2004); Maksymowych et al., Arthritis Rheum. 46:766-773 (2002); e Kvein et al., Ann. Rheum. Dis. 63:1113-1119 (2004).

Como um todo, pouco progresso foi obtido no

25 desenvolvimento de regimes terapêuticos para o tratamento da espondilite anquilosante e outras doenças classificadas como espondiloartrites, em parte porque os tratamentos não evitam a formação óssea e a fusão

30 espinal. A fim de ganhar total controle da doença, podem ser necessárias estratégias terapêuticas dirigidas especificamente à formação óssea e de cartilagem, como uma alternativa ou complementares às terapêuticas

35 imunossupressoras existentes. Assim sendo, permanece a necessidade na técnica de novas modalidades para o tratamento de doenças ósseas associadas à espondilite anquilosante e outras doenças espondoartrites, bem como outros doenças associadas à formação óssea e ossificação

anormais, incluindo aquelas causadas pela expressão/atividade anormal das proteínas morfogenéticas e seus receptores.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção trata destas e outras necessidades relacionadas proporcionando anticorpos e outras proteínas terapêuticas dirigidas contra as proteínas morfogenéticas ósseas e seus receptores, ácidos nucleicos que codificam estes anticorpos e proteínas terapêuticas, métodos para
10 preparar os anticorpos monoclonais anti-BMP e anti-BMPR e outras proteínas terapêuticas e métodos para o tratamento de doenças tais como doenças ósseas e cânceres incluindo, mas não limitado a fibrodysplasia ossificante progressiva (FOP), heteroplasia óssea progressiva (POH), lesão da
15 medula espinhal, traumatismo contuso resultante em hematoma intramuscular, cirurgia ortopédica, artrite psoriática, osteoartrite, espondilite anquilosante, antropatias seronegativas, hiperostose esquelética, otosclerose, anquilose do estribo, cânceres ósseos, câncer da próstata e exotose, arteriosclerose, doença
20 cardíaca valvular, câncer do pulmão, melanoma, câncer hematopoiético, câncer renal e câncer da mama.

Deste modo, a presente invenção proporciona anticorpos monoclonais isolados, em particular anticorpos
25 monoclonais murinos, quiméricos, humanizados e totalmente humanos que se ligam a uma ou mais proteínas morfogenéticas ósseas e seus receptores e que exibem uma ou mais propriedades funcionais desejáveis. Estas propriedades incluem, por exemplo ligação específica de
30 alta afinidade a uma proteína morfogenética óssea humana, tal como a BMP2 e/ou BMP4 ou ligação específica de alta afinidade a um receptor da proteína morfogenética óssea humana como por exemplo BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2. São também proporcionados métodos para tratar uma
35 variedade de doenças mediadas por proteína morfogenética óssea utilizando os anticorpos, proteínas e composições da presente invenção.

Os anticorpos e proteínas terapêuticas aqui revelados são capazes de bloquear (a) ligação de ligando (isto é, BMP2 e/ou BMP4) a um receptor cognato (isto é, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2) e/ou (b) formação de heterodímero de
 5 receptor e/ou (c) sinalização de receptor.

Em um aspecto, a invenção pertence a um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao seu antígeno, onde o anticorpo:

(a) liga-se a uma proteína morfogenética óssea humana
 10 (por exemplo, BMP2, ou BMP4) ou a um seu receptor (por exemplo, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1 ou BMPR2) com um K_D de 1×10^{-7} M ou menos; e/ou

(b) liga-se a células (por exemplo, humanas ou CHO), onde a referida célula expressa uma proteína morfogenética óssea humana e/ou um seu receptor.
 15

Em modalidades mais específicas, o anticorpo se liga a uma proteína morfogenética óssea humana ou seu receptor com uma K_D de 5×10^{-8} M ou menos, tipicamente 2×10^{-8} M ou menos, mais tipicamente 1×10^{-8} M ou menos, ainda
 20 mais tipicamente 6×10^{-9} M ou menos, 3×10^{-9} M ou menos ou 2×10^{-9} M ou menos.

Em uma outra modalidade, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação a uma proteína morfogenética óssea ou um seu receptor, onde
 25 o anticorpo entra em competição cruzada para ligação a uma proteína morfogenética óssea ou um receptor para a mesma, com um anticorpo de referência, onde o anticorpo de referência:

(a) liga-se a uma proteína morfogenética humana óssea ou
 30 um receptor para a mesma com uma K_D de 1×10^{-7} M ou menos; e/ou

(b) liga-se a uma célula que expressa uma proteína morfogenética óssea humana e/ou um seu receptor.

Em uma outra modalidade, a invenção proporciona um
 35 anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, onde o anticorpo entra em competição cruzada para ligação a BMP2 ou BMP4 com um anticorpo de

referência compreendendo:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 31, 32, ou 33; e

5 (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34, 35, ou 36.

Em várias modalidades, o anticorpo de referência compreende:

10 (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 31; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 34; ou o anticorpo de referência compreende:

15 (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 32; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 35. ou o anticorpo de referência compreende:

20 (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 33; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 36.

Em um outro aspecto, a invenção pertence a um
25 anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao seu antígeno compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto ou é derivada de um gene V_H 3-33 humano, onde o anticorpo especificamente se liga a BMP2 ou BMP4. A invenção também proporciona um anticorpo
30 monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao seu antígeno compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto ou é derivada de um gene V_H 4-34 humano, onde o anticorpo especificamente se liga a BMP2 ou BMP4. A invenção também proporciona um anticorpo
35 monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao seu antígeno compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto ou é derivada de um gene V_H 4-59

humano, onde o anticorpo especificamente se liga a BMP2 ou BMP4. A invenção proporcionará também um anticorpo monoclonal, ou uma porção de ligação ao seu antígeno compreendendo uma região de cadeia leve que é o produto
5 ou é derivada de um gene V_K A27 humano, onde o anticorpo especificamente se liga a BMP2 ou BMP4. A invenção também proporciona um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao seu antígeno compreendendo uma região variável de cadeia leve que é o produto ou é derivada de
10 um gene V_K L6 humano, onde o anticorpo especificamente se liga a BMP2 ou BMP4. A invenção proporciona ainda mais um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao seu antígeno compreendendo uma região variável de cadeia leve que é o produto ou é derivada de um gene V_K L15
15 humano, onde o anticorpo especificamente se liga a BMP2 ou BMP4.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação ao seu antígeno, compreendendo:

- 20 (a) uma região variável de cadeia pesada de um gene V_H 3-33, 4-34, ou 4-59 humano; e
(b) uma região variável de cadeia leve de um gene V_K A27, L6, ou V_K L15 humano;
em que o anticorpo especificamente se liga a BMP2 ou
25 BMP4.

Em uma modalidade preferida, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada de um gene V_H 4-59 humano e uma região variável de cadeia leve de um gene V_K A27 humano. Em uma outra modalidade preferida, o
30 anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada de um gene V_H 4-34 humano e uma região variável de cadeia leve de um gene V_K L6 humano. Em outra modalidade preferida, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada de um gene V_H 3-33 humano e e uma região
35 variável de cadeia leve de um gene V_K L15 humano.

Em um outro aspecto, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação ao seu

antígeno, compreendendo:

uma região variável de cadeia pesada que compreende as seqüências CDR1, CDR2, e CDR3; e uma região variável de cadeia leve que compreende as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, onde:

(a) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste de seqüências de aminoácido das SEQ ID NOs: 19, 20 e 21 e modificações conservadoras das mesmas;

(b) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste de seqüências de aminoácido das SEQ ID NOs: 28, 29 e 30 e modificações conservadoras das mesmas; e

(c) o anticorpo se liga a BMP2 ou BMP4 humana com uma K_D de 1×10^{-7} M ou menos.

De preferência, a seqüência CDR2 da região variável de cadeia pesada compreende um aminoácido selecionado do grupo que consiste das seqüências de aminoácido das SEQ ID NOs: 16, 17 e 18 e modificações conservadoras das mesmas; e a seqüência CDR2 da região variável de cadeia leve compreende um aminoácido selecionado do grupo que consiste das seqüências de aminoácido das SEQ ID NOs: 25, 26 e 27 e modificações conservadoras das mesmas. De preferência, a seqüência CDR1 da região variável de cadeia pesada compreende um aminoácido selecionado do grupo que consiste das seqüências de aminoácido das SEQ ID NOs: 13, 14 e 15, e modificações conservadoras das mesmas; e a seqüência CDR1 da região variável de cadeia leve compreende um aminoácido selecionado do grupo que consiste das seqüências de aminoácido das SEQ ID NOs: 22, 23 e 24 e modificações conservadoras das mesmas.

Uma combinação preferida compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a SEQ ID NO: 13;

(b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a SEQ ID NO: 16;

(c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a SEQ ID NO: 19;

(d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a SEQ ID NO: 22;

5 (e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a SEQ ID NO: 25; e

(f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a SEQ ID NO: 28.

Outra combinação preferida compreende:

10 (a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a SEQ ID NO: 14;

(b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a SEQ ID NO: 17;

15 (c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a SEQ ID NO: 20;

(d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a SEQ ID NO: 23;

(e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a SEQ ID NO: 26; e

20 (f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a SEQ ID NO: 29.

Outra combinação preferida compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a SEQ ID NO: 15;

25 (b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a SEQ ID NO: 18;

(c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a SEQ ID NO: 21;

30 (d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a SEQ ID NO: 24;

(e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a SEQ ID NO: 27; e

(f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a SEQ ID NO: 30.

35 Outros anticorpos preferidos da invenção, ou suas porções de ligação ao antígeno compreendem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo

uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 31, 32 e 33; e

- (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 34, 35 e 36;
- em que o anticorpo especificamente se liga a BMP2 ou BMP4.

Uma combinação preferida compreende:

- (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 31; e
- (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 34.

Outra combinação preferida compreende:

- (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 32; e
- (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 35.

Outra combinação preferida compreende:

- (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 33; e
- (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 36.

Em um outro aspecto da invenção, são proporcionados anticorpos ou suas porções de ligação ao antígeno que competem pela ligação a BMP2 ou BMP4 com qualquer um dos anticorpos acima mencionados.

Os anticorpos da invenção podem ser, por exemplo, anticorpos de comprimento total, tipicamente de um isótopo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Alternativamente, os anticorpos podem ser fragmentos de anticorpos, tais como Fab, Fab' ou Fab'₂ ou anticorpos de cadeia única (por exemplo, scFv).

A invenção também proporciona um imunoc conjugado compreendendo um anticorpo da invenção ou sua porção de ligação ao antígeno, ligado a um agente terapêutico tal como uma citotoxina ou um isótopo radioativo. A invenção também proporciona uma molécula biespecífica

compreendendo um anticorpo ou sua porção de ligação ao antígeno, da invenção, ligada a uma segunda unidade funcional tendo uma especificidade de ligação diferente do que o referido anticorpo ou sua porção de ligação ao antígeno. A invenção também proporciona Affibodies, anticorpos de domínio, Nanocorpos, UniBodies, DARPins, Anticalins, Avimers, Versabodies, e Duocalins dirigidos a BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1 ou BMPR2.

São também proporcionadas composições que compreendem um anticorpo ou sua porção de ligação ao antígeno ou imunoconjugado ou molécula biespecífica da invenção e um veículo farmacologicamente aceitável.

Moléculas de ácido nucléico que codificam os anticorpos ou suas porções de ligação ao antígeno são também abrangidas pela presente invenção, assim como vetores de expressão compreendendo estes ácidos nucléicos, células hospedeiras compreendendo estes vetores de expressão e métodos para produzir anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2 utilizando estas células hospedeiras.

Além disso, a presente invenção proporciona um camundongo transgênico compreendendo transgenes de cadeia pesada e leve de imunoglobulina humana, onde o camundongo expressa um anticorpo da invenção, bem como hibridomas preparados a partir deste camundongo, onde o hibridoma produz o anticorpo da invenção.

Em ainda outro aspecto, a invenção proporciona um método para tratar ou prevenir uma doença caracterizada pelo crescimento de osso e/ou células tumorais que expressam BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1 e/ou BMPR2, compreendendo administrar a um indivíduo um anticorpo humano anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2 da presente invenção em uma quantidade eficaz para tratar ou prevenir a doença. A doença pode ser uma doença óssea e/ou pode ser um câncer. Em ainda outro aspecto, a invenção proporciona um método de tratar uma doença autoimune, compreendendo administra

a um indivíduo um anticorpo humano anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 da presente invenção em uma quantidade eficaz para tratar a doença.

5 Outras características e vantagens da presente invenção ficarão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada e exemplos que não devem ser interpretados como limitativos. Os conteúdos de todas as referências, números de acesso no GenBank, patentes e pedidos de
10 patentes publicados citados por toda esta memória descritiva são expressamente aqui incorporados por citação.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1a ilustra a sequência de nucleotídeos (SEQ
15 ID NO: 37) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 31) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 6H4. As regiões CDR1 (SEQ ID NO: 13), CDR2 (SEQ ID NO: 16) e CDR3 (SEQ ID NO: 19) estão delineadas e as derivações da linha germinal V, D e J estão indicadas.

20 A Figura 1b ilustra a sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 40) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 34) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 6H4. As regiões CDR1 (SEQ ID NO: 22), CDR2 (SEQ ID NO: 25) e CDR3 (SEQ ID NO: 28) estão delineadas e as
25 derivações da linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 2a ilustra a sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 38) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 32) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 11F2. As regiões CDR1 (SEQ ID NO: 14), CDR2 (SEQ
30 ID NO: 17) e CDR3 (SEQ ID NO: 20) estão delineadas e as derivações da linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 2b ilustra a sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 41) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 35) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal
35 humano 11F2. As regiões CDR1 (SEQ ID NO: 23), CDR2 (SEQ ID NO: 26) e CDR3 (SEQ ID NO: 29) estão delineadas e as derivações da linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 3a ilustra a sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 39) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 33) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 12E3. As regiões CDR1 (SEQ ID NO: 15), CDR2 (SEQ ID NO: 18) e CDR3 (SEQ ID NO: 21) estão delineadas e as derivações da linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 3b ilustra a sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 42) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 36) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 12E3. As regiões CDR1 (SEQ ID NO: 24), CDR2 (SEQ ID NO: 27) e CDR3 (SEQ ID NO: 30) estão delineadas e as derivações da linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 4 ilustra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 6H4 (SEQ ID NO: 31) com a sequência de aminoácidos V_H 4-34 da linha germinal humana (SEQ ID NO: 51), a sequência de aminoácidos D_H 3-10 da linha germinal humana (SEQ ID NO: 52), localizadas entre as regiões V e J e a sequência de aminoácidos J_H JH1 da linha germinal humana (SEQ ID NO: 53).

A Figura 5 ilustra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 11F2 (SEQ ID NO: 32) com a sequência de aminoácidos V_H 4-59 da linha germinal humana (SEQ ID NO: 43), a sequência de aminoácidos D_H 2-2 da linha germinal humana (SEQ ID NO: 45), localizadas entre as regiões V e J e a sequência de aminoácidos J_H JH5b da linha germinal humana (SEQ ID NO: 46).

A Figura 6 ilustra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 12E3 (SEQ ID NO: 33) com a sequência de aminoácidos V_H 3-33 da linha germinal humana (SEQ ID NO: 44) e a sequência de aminoácidos J_H JH6b da linha germinal humana (SEQ ID NO: 47).

A Figura 7 ilustra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 6H4 (SEQ ID NO: 34) com a sequência de aminoácidos V_K L6 da linha

germinal humana (SEQ ID NO: 54) e a sequência de aminoácidos J_K JK2 da linha germinal humana (SEQ ID NO: 55).

5 A Figura 8 ilustra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 11F2 (SEQ ID NO: 35) com a sequência de aminoácidos V_K A27 da linha germinal humana (SEQ ID NO: 48) e a sequência de aminoácidos J_K JK4 da linha germinal humana (SEQ ID NO: 50).

10 A Figura 9 ilustra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 12E3 (SEQ ID NO: 36) com a sequência de aminoácidos V_K L15 da linha germinal humana (SEQ ID NO: 49) e a sequência de aminoácidos J_K JK4 da linha germinal humana (SEQ ID NO: 50).

A Figura 10 ilustra anticorpos monoclonais anti-BMP2/4 que bloqueiam a ligação de BMP4 a receptores de BMP tipo II (Figura 10a) e tipo I (Figura 10b) por análise Biacore.

20 A Figura 11 ilustra a inibição da sinalização de BMP2 e BMP4 por anticorpos anti-BMP2/4. Células C2C12 foram incubadas com BMP2 recombinante humana (Figura 11a) ou BMP4 (Figura 11b) e várias concentrações de cinco anticorpos monoclonais anti-BMP2/4 neutralizantes diferentes ou controle de IgG1 de mAb. As células foram fixadas, lisadas e testadas quanto a atividade da fosfatase alcalina.

30 A Figura 12 ilustra por meio de varredura de densitometria que a formação óssea é reduzida, de forma significativa pelos anticorpos monoclonais anti-BMP2 da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNA MORFOGENÉTICAS ÓSSEAS

35 A SEQ ID NO: 1 é a sequência de nucleotídeo de um cADN que codifica a proteína morfogênética óssea humana 2 (BMP2) revelada sob o N° de acesso no GenBank NM_001200.

A SEQ ID NO: 2 é a sequência de aminoácido da proteína

morfogenética óssea humana 2 (BMP2) codificada pela sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 1.

A SEQ ID NO: 3 é a sequência de nucleotídeo de um cADN que codifica a proteína morfogenética óssea humana 4 (BMP4) revelada sob o N° de acesso no GenBank NM_130851.

5 A SEQ ID NO: 4 é a sequência de aminoácido da proteína morfogenética óssea humana 4 (BMP4) codificada pela sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 3.

A SEQ ID NO: 5 é a sequência de nucleotídeo de um cADN que codifica o receptor da proteína morfogenética óssea humana 1A (BMPR1A) revelada sob o N° de acesso no GenBank NM_004329.

10 A SEQ ID NO: 6 é a sequência de aminoácido do receptor da proteína morfogenética óssea humana 1A (BMPR1A) codificada pela sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 5.

A SEQ ID NO: 7 é a sequência de nucleotídeo de um cADN que codifica o receptor da proteína morfogenética óssea humana 1B (BMPR1B) revelada sob o N° de acesso no GenBank NM_001203.

20 A SEQ ID NO: 8 apresenta a sequência de aminoácido do receptor da proteína morfogenética óssea humana 1B (BMPR1B) codificada pela sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 7.

25 A SEQ ID NO: 9 é a sequência de nucleotídeo de um cADN que codifica o receptor da activina A humana tipo I (ACTR1) revelada sob o N° de acesso no GenBank BC033867.

A SEQ ID NO: 10 é a sequência de aminoácido do receptor da activina A humana, tipo I (ACTR1) codificada pela sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 9.

30 A SEQ ID NO: 11 é a sequência de nucleotídeo de um cADN que codifica o receptor da proteína morfogenética óssea humana 2 (BMPR2) revelada sob o N° de acesso no GenBank N°. NM_001204.

35 A SEQ ID NO: 12 é a sequência de aminoácido do receptor da proteína morfogenética óssea humana 2 (BMPR2) codificada pela sequência de nucleotídeo apresentada na

SEQ ID NO: 11.

DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção se refere a anticorpos monoclonais isolados, particularmente anticorpos murinos, quiméricos
5 humanizados e totalmente humanos que se ligam especificamente a uma ou mais proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) ou um ou mais receptores da proteína morfogenética óssea (BMPR) e/ou receptor da activina A (ACTR1) com alta afinidade. Em certas modalidades, os
10 anticorpos da presente invenção são derivados de seqüências de linha germinal de cadeia pesada e leve e/ou compreendem características estruturais específicas tais como regiões CDR compreendendo seqüências de aminoácidos específicas. Deste modo, a invenção proporciona
15 anticorpos isolados, imunoconjugados, moléculas biespecíficas, Affibodies, anticorpos de domínio, Nanocorpos, UniBodies, DARPs, Anticalins, Avimers, Versabodies e Duocalins, métodos para produzir as referidas moléculas e composições farmacêuticas
20 compreendendo as referidas moléculas e um veículo farmacêutico. A invenção também se refere a métodos para utilizar os referidos anticorpos, imunoconjugados, moléculas biespecíficas, Affibodies, anticorpos de domínio, Nanocorpos, UniBodies, DARPs, Anticalins,
25 Avimers, Versabodies e Duocalins, para tratar doenças com formação óssea anormal e cânceres.

Definições

A fim de que a presente invenção possa ser entendida mais prontamente, certos termos são primeiro definidos.
30 Definições adicionais são apresentadas por toda a descrição detalhada.

O termo "anticorpo" conforme aqui referido, inclui anticorpos inteiros e qualquer fragmento de ligação ao antígeno (isto é, "porção de ligação ao antígeno") ou
35 suas cadeias simples. Um "anticorpo" se refere a uma glicoproteína compreendendo pelo menos duas cadeia pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interligadas por

ligações dissulfureto ou uma porção de ligação ao seu antígeno. Cada cadeia pesada é compreendida por uma região variável de cadeia pesada (aqui abreviada como V_H) e uma região constante de cadeia pesada. A região

5 constante de cadeia pesada é compreendida por três domínios, C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} . Cada cadeia leve é compreendida por uma região variável de cadeia leve (aqui abreviada como V_L) e uma região constante de cadeia leve. A região

10 constante de cadeia leve é compreendida por um domínio, C_L . As regiões V_H e V_L podem ainda ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, chamadas de regiões determinantes complementares (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, chamadas de regiões de suporte (FR). Cada V_H e V_L é composta por três CDRs e

15 quatro FRs, dispostas do amino-terminal até o carboxi-terminal na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesadas e leves contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem

20 mediar a ligação da imunoglobulina a tecidos hospedeiros ou fatores, incluindo várias células do sistema imunológico (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (Clq) do sistema de complemento clássico.

O termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo

25 (ou "porção do anticorpo"), conforme aqui utilizado, se refere a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retêm a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno (aqui exemplificado por BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1 e/ou BMPR2). Foi demonstrado que a função de ligação ao

30 antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpos de comprimento total. Exemplos de fragmentos de ligação abrangidos pelo termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo incluem

(i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente

35 consistindo dos domínios V_L , V_H , C_L e C_{H1} ; (ii) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfureto

na região conectora (hinge); (iii) um fragmento Fab', que é essencialmente um Fab com parte da região conectora (hinge) (ver, Fundamental Immunology (Paul ed., 3rd ed. 1993); (iv) um fragmento Fd consistindo dos domínios V_H e C_{H1}; (v) um fragmento Fv consistindo dos domínios V_L e V_H de um único braço de um anticorpo, (vi) um fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste de um domínio V_H; e (vii) uma região determinante complementar isolada (CDR). Além disso, embora os dois domínios da fragmento Fv, V_L e V_H, sejam codificados por genes separados, os mesmos podem ser unidos, utilizando métodos recombinantes, por um ligante sintético que permite que os mesmos sejam feitos como uma cadeia simples de proteína onde as regiões V_L e V_H se emparelham para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia simples (scFv); ver, por exemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; e Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Estes anticorpos de cadeia simples também se destinam a ser abrangidos no termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo. Estes fragmentos de anticorpos são obtidos utilizando técnicas convencionais conhecidas dos especialistas na técnica e os fragmentos são rastreados quanto à utilidade, da mesma maneira que anticorpos intactos.

Um "anticorpo isolado", conforme aqui utilizado, pretende se referir a um anticorpo que é substancialmente livre de outros anticorpos tendo especificidades antigénicas diferentes (por exemplo, um anticorpo isolado que especificamente se liga a BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 é substancialmente livre de anticorpos que especificamente ligam antígenos a não ser qualquer um ou mais destas seis proteínas). Um anticorpo isolado que especificamente se liga a BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 pode, no entanto, ter reatividade cruzada a outros antígenos, tais como BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou moléculas BMPR2 de outras espécies. Além disso, um anticorpo isolado pode ser

substancialmente livre de outros materiais celulares e/ou químicos.

Os termos "anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpo monoclonal " conforme aqui utilizados se referem a uma preparação de moléculas de anticorpo de
5 composição molecular simples. Uma composição de anticorpo monoclonal apresenta uma especificidade e afinidade de ligação simples e para um epítopo em particular.

O termo "anticorpo humano" ou "anticorpo de sequência humana", conforme aqui utilizado, pretende incluir anticorpos que têm regiões variáveis onde tanto a estrutura como as regiões CDR são derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinal humana. Além disso, se o anticorpo contiver uma região constante, a região
10 constante também é derivada de sequências de imunoglobulina da linha germinal humana. Os anticorpos humanos podem incluir modificações posteriores, incluindo modificações naturais ou sintéticas. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácidos
15 não codificados por sequências de imunoglobulina da linha germinal humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou sítio-específica in vitro ou por mutação somática in vivo). No entanto, o termo "anticorpo humano" conforme aqui utilizado, não pretende incluir
20 anticorpos onde as sequências CDR derivadas da linha germinal de outras espécies de mamíferos, tais como camundongo, tenham sido enxertadas nas sequências da estrutura humana.

O termo "anticorpo monoclonal humano", que pode incluir o termo "sequência" depois de "humano", se refere a anticorpos que apresentam uma especificidade de ligação simples que têm regiões variáveis onde tanto a estrutura como as regiões CDR são derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinal humana. Em uma
25 modalidade, os anticorpos monoclonais humanas são produzidos por um hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não humano transgênico, por exemplo,
30

um camundongo transgênico, tendo um genoma que compreende um transgene de cadeia pesada humana e um transgene de cadeia leve fundidas em uma célula imortalizada.

O termo "anticorpo humano recombinante", conforme aqui
5 utilizado, inclui todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como (a) anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico ou transcromossômico para genes de imunoglobulina humana ou
10 um hibridoma preparados destes (descrito mais adiante), (b) anticorpos isolados de uma célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo humano, por exemplo um transfectoma, (c) anticorpos isolados de uma biblioteca de anticorpos humanos combinatórios,
15 recombinantes e (d) anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer meio que envolva a união (splicing) das seqüências do gene da imunoglobulina humana a outras seqüências de ADN. Estes anticorpos humanos recombinantes têm regiões variáveis onde a
20 estrutura e as regiões CDR são derivadas das seqüências da imunoglobulina da linha germinal humana. Em certas modalidades, no entanto, estes anticorpos humanos recombinantes podem ser submetidos a mutagênese in vitro (ou, quando é utilizado um animal transgênico para as
25 seqüências de Ig humana, mutagênese somática in vivo) e, deste modo, as seqüências de aminoácidos das regiões V_H e V_L dos anticorpos recombinantes são seqüências que, embora derivadas e relacionadas às seqüências V_H e V_L da linha germinal humana, podem não existir naturalmente no
30 repertório in vivo da linha germinal de anticorpos humano.

Conforme aqui utilizado, "isotipo" se refere à classe de anticorpo (por exemplo, IgM ou IgG1) que é codificado pelos genes da região constante de cadeia pesada.

35 As frases "um anticorpo que reconhece um antígeno" e "um anticorpo específico para um antígeno" são aqui usadas de forma intercambiável com o termo "um anticorpo que se

liga especificamente a um antígeno”.

O termo “derivados de anticorpo humano” se refere a qualquer forma modificada do anticorpo humana, por exemplo, um conjugado do anticorpo e outra agente ou anticorpo.

O termo “anticorpo humanizado” pretende se referir a anticorpos onde as seqüências CDR derivadas da linha germinal de outra espécie mamífera, tal como camundongo, foram enxertadas nas seqüências da estrutura humana.

Modificações da região da estrutura adicionais podem ser feitas nas seqüências da estrutura humana.

O termo “anticorpo quimérico” pretende se referir a anticorpos onde as seqüências da região variável são derivadas de uma espécie e as seqüências da região constante são derivadas de outra espécie, por exemplo, como um anticorpo onde as seqüências da região variável são derivadas de um anticorpo de camundongo e as seqüências da região constante são derivadas de um anticorpo humano.

Conforme aqui utilizado, um anticorpo que “se liga especificamente” pretende se referir a um anticorpo que se liga ao seu antígeno cognato com uma K_D de 1×10^{-7} ou menos, particularmente 5×10^{-8} M ou menos, more particularmente 1×10^{-8} M ou menos, ainda mais particularmente 6×10^{-9} M ou menos, mais particularmente 3×10^{-9} M ou menos, ainda mais particularmente 2×10^{-9} M ou menos.

O termo “não se liga substancialmente” a uma proteína ou célula, conforme aqui utilizado, significa que não se liga com uma alta afinidade à proteína ou células, isto é, liga-se à proteína ou células com uma K_D de 1×10^{-6} M ou mais, mais preferencialmente 1×10^{-5} M ou mais, mais preferencialmente 1×10^{-4} M ou mais, mais preferencialmente 1×10^{-3} M ou mais, ainda mais preferencialmente 1×10^{-2} M ou mais.

O termo “ K_{assoc} ” or “ K_a ”, conforme aqui utilizado, pretende se referir à taxa de associação de uma interação

específica anticorpo-antígeno, ao passo que o termo "K_{dis}" ou "K_d", conforme aqui utilizado, pretende se referir à taxa de dissociação de uma interação específica anticorpo-antígeno. O termo "K_D", conforme aqui
5 utilizado, pretende se referir à constante de dissociação que é obtida da proporção de K_d para K_a (isto é, K_d/K_a) e é expressa como uma concentração molar (M). Os valores K_D para anticorpos podem ser determinados utilizando métodos estabelecidos na técnica. Um método preferido para
10 determinar o K_D de um anticorpo é por meio da utilização de ressonância de plasmons de superfície, tipicamente usando um sistema biossensor, tal como um sistema Biacore®.

Conforme aqui utilizado, o termo "alta afinidade" por um
15 anticorpo IgG se refere a um anticorpo que tem uma K_D de 10⁻⁷ M ou menos, mais tipicamente 10⁻⁸ M ou menos, mais tipicamente 10⁻⁹ M ou menos, e ainda mais tipicamente 10⁻¹⁰ M ou menos para um antígeno alvo. No entanto, a ligação de "alta afinidade" pode variar para outros
20 isotipos de anticorpos. Por exemplo, a ligação de "alta afinidade" para um isotipo IgM se refere a um anticorpo que tem uma K_D de 10⁻⁷ M ou menos, mais tipicamente 10⁻⁸ M ou menos, ainda mais tipicamente 10⁻⁹ M ou menos.

Conforme aqui utilizado, o termo "indivíduo" inclui
25 qualquer animal humano ou não humano. O termo "animal não humano" inclui todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, tais como primatas não humanos, ovelhas, cães, gatos, cavalos, vacas, galinhas, anfíbios, peixes, répteis, etc.

30 O termo "resposta imune" se refere à ação, por exemplo, de linfócitos, células que apresentam antígeno, células fagocíticas, granulócitos e macromoléculas solúveis produzidas pelas células acima mencionadas ou o fígado (incluindo anticorpos, citocinas e complemento) que
35 resulta em lesão, destruição ou eliminação seletiva do corpo humano de patógenos invasores, células ou tecidos infectados com patógenos, células cancerosas ou, nos

casos de autoimunidade ou inflamação patológica, células ou tecidos humanos normais.

Uma "via de transdução de sinal" se refere à relação bioquímica entre uma variedade de moléculas de transdução de sinal que desempenham um papel na transmissão de um sinal de uma porção de uma células para outra porção de uma célula. Conforme aqui utilizada, a frase "receptor da superfície celular" inclui, por exemplo, moléculas e complexos de moléculas capazes de receber um sinal e a transmissão deste sinal através da membrana plasmática de uma célula. Um exemplo de um "receptor da superfície celular" da presente invenção são os receptores BMPR1A, BMPR1B, ACTR1 e BMPR2.

Conforme aqui utilizado, o termo "BMP2" é usado para se referir à proteína morfogenética óssea humana 2. A sequência de nucleotídeos da BMP2 humana está disponível publicamente por referência ao N° NM_001200 de acesso ao GenBank e é aqui revelada como a SEQ ID NO. 1. A sequência de aminoácidos correspondente de BMP2 está aqui apresentada como a SEQ ID NO: 2.

Conforme aqui utilizado, o termo "BMP4" é usado para se referir à proteína morfogenética óssea humana 4. A sequência de nucleotídeos da BMP4 humana está disponível publicamente por referência ao N° NM_130851 de acesso ao GenBank e é aqui revelada como a SEQ ID NO. 3. A sequência de aminoácidos correspondente de BMP4 está aqui apresentada como a SEQ ID NO: 4.

Conforme aqui utilizado, o termo "BMPR1A" (aka Alk3) é usado para se referir ao receptor da proteína morfogenética óssea humana 1A. A sequência de nucleotídeos do BMPR1A humano está disponível publicamente por referência ao N° NM_004329 de acesso ao GenBank e é aqui revelada como a SEQ ID NO. 5. A sequência de aminoácidos correspondente de BMPR1A está aqui apresentada como a SEQ ID NO: 6.

Conforme aqui utilizado, o termo "BMPR1B" (aka Alk6) é usado para se referir ao receptor da proteína

morfogenética óssea humana 1B. A sequência de nucleotídeos do BMPR1B humano está disponível publicamente por referência ao N° NM_001203 de acesso ao GenBank e é aqui revelada como a SEQ ID NO. 7. A

5 sequência de aminoácidos correspondente de BMPR1B está aqui apresentada como a SEQ ID NO: 8.

Conforme aqui utilizado, o termo "ACTR1" é usado para se referir ao receptor da activina A humana 1. A sequência de nucleotídeos da ACTR1 humana está disponível

10 publicamente por referência ao N° BC033867 de acesso ao GenBank e é aqui revelada como a SEQ ID NO. 9. A sequência de aminoácidos correspondente de ACTR1 está aqui apresentada como a SEQ ID NO: 10.

Conforme aqui utilizado, o termo "BMPR2" é usado para se referir ao receptor da proteína morfogenética óssea

15 humana 2. A sequência de nucleotídeos do BMPR2 humano está disponível publicamente por referência ao N° NM_001204 de acesso ao GenBank e é aqui revelada como a SEQ ID NO. 11. A sequência de aminoácidos correspondente

20 de BMPR2 está aqui apresentada como a SEQ ID NO: 12.

Vários aspectos da invenção são descritos em mais detalhes nas subseções a seguir.

Anticorpos dirigidos contra BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1 e BMPR2

25 Os anticorpos da presente invenção são caracterizados por características ou propriedades funcionais específicas. Por exemplo, em modalidades, os anticorpos se ligam especificamente a uma ou mais proteínas morfogenéticas ósseas selecionadas da BMP2 humana e BMP4 humana. Em

30 modalidades alternativas, os anticorpos se ligam especificamente a um ou mais receptores da proteína morfogenética óssea selecionado de BMPR1A, BMPR1B e BMPR2 e/ou um ou mais receptor tipo 1 da activina selecionado de ACTR1. Tipicamente, um anticorpo da invenção se liga

35 com alta afinidade, por exemplo com uma K_D de 5×10^{-7} M ou menos, ainda mais tipicamente $5,5 \times 10^{-9}$ ou menos, ainda mais tipicamente 3×10^{-9} ou menos, ainda mais

tipicamente 2×10^{-9} ou menos ou ainda mais tipicamente $1,5 \times 10^{-9}$ ou menos.

Em uma modalidade, os anticorpos preferencialmente se ligam a um epítopo antigénico presente em BMP2 ou BMP4, cujo epítopo não está presente em outras proteínas. Tipicamente, os anticorpos se ligam a BMP2 ou BMP4 mas não se ligam a outras proteínas, ou se ligam a outras proteínas com uma baixa afinidade, como por exemplo com uma K_D de 1×10^{-6} M ou mais, mais preferencialmente 1×10^{-5} M ou mais, mais preferencialmente 1×10^{-4} M ou mais, mais preferencialmente 1×10^{-3} M ou mais, ainda mais preferencialmente 1×10^{-2} M ou mais. Preferencialmente, os anticorpos não se ligam substancialmente a proteínas relacionadas, por exemplo, os anticorpos não se ligam substancialmente, a BMP3 ou BMP8b.

Ensaio padrão para avaliar a capacidade de ligação dos anticorpos a uma ou mais proteínas morfogenéticas ósseas ou seus receptores são conhecidos na técnica incluindo, por exemplo, ELISAs, Western blots, citometria de fluxo e RIAs. Ensaio adequado estão descritos em detalhes nos Exemplos. A cinética da ligação (por exemplo, afinidade de ligação) dos anticorpos também pode ser avaliada por ensaio padrão conhecidos na técnica tal como por ELISA, análise de Scatchard e Biacore. Como outro exemplo, os anticorpos da presente invenção podem se ligar a uma célula óssea, tal como um pré-condrócito e/ou um condrócito.

Anticorpos Monoclonais Humanos Dirigidos contra BMP2, BMP4,

BMPR1A, BMPR1B, ACTR1 e/ou BMPR2

Será entendido que os anticorpos dirigidos a BMP2, desejavelmente, podem ter reação cruzada com BMP4 e os anticorpos dirigidos a BMP4 podem, desejavelmente, ter reação cruzada com BMP2. De modo similar, os anticorpos dirigidos contra qualquer uma de BMPR1A, BMPR1B, ACTR1 e BMPR2 podem, desejavelmente, ter reação cruzada com qualquer uma das BMP alternativas e/ou receptores de ACV.

Deste modo, a presente invenção contempla que as seqüências V_H e V_L podem ser "misturadas e combinadas" com vantagem para criar outras moléculas de ligação antígeno-específicas no âmbito da invenção presentemente reivindicada. A ligação específica destes anticorpos "misturados e combinados" podem ser testadas utilizando os ensaios de ligação descritos acima e nos Exemplos (por exemplo, FACS ou ELISAs). Tipicamente, quando as cadeias V_H e V_L são misturadas e combinadas, uma seqüência V_H de um emparelhamento V_H/V_L em particular é substituída por uma seqüência V_H estruturalmente similar. Do mesmo modo, tipicamente, uma seqüência V_L de um emparelhamento V_H/V_L em particular é substituída por uma seqüência V_L estruturalmente similar.

Anticorpos preferidos da invenção foram isolados e estruturalmente caracterizados conforme descrito nos Exemplo 1 e 2 e incluem os anticorpos monoclonais humanos 6H4, 11F2 e 12E3. As seqüências de aminoácidos V_H de 6H4, 11F2 e 12E3 são apresentadas nas SEQ ID NOs: 31, 32 e 33, respectivamente. As seqüências de aminoácidos V_L de 6H4, 11F2 e 12E3 são apresentadas nas SEQ ID NOs: 34, 35 e 36, respectivamente.

Em um aspecto, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado ou sua porção de ligação ao antígeno compreendendo:

- (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 31, 32 e 33; e
- (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 34, 35 e 36;

em que o anticorpo especificamente se liga a BMP2 ou BMP4, preferencialmente a BMP2 ou BMP4 humanas.

Combinações preferidas de cadeia pesada e leve incluem:

- (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO: 31; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência

de aminoácidos da SEQ ID NO: 34; ou

(b) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 32; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência

5 de aminoácidos da SEQ ID NO: 35; ou

(b) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 33; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 36.

10 Em um outro aspecto, a invenção proporciona anticorpos que compreendem a cadeia pesada e cadeia leve CDR1s, CDR2s e CDR3s de 6H4, 11F2 e 12E3, ou suas combinações. A sequência de aminoácidos de V_H CDR1s de 6H4, 11F2 e 12E3 são apresentadas nas SEQ ID NOs: 13, 14
15 e 15. A sequência de aminoácidos de V_H CDR2s de 6H4, 11F2 e 12E3 são apresentadas nas SEQ ID NOs: 16, 17 e 18. A sequência de aminoácidos e V_H CDR3s de 6H4, 11F2 e 12E3 são apresentadas nas SEQ ID NOs: 19, 20 e 21. A sequência de aminoácidos de V_K CDR1s de 6H4, 11F2 e 12E3 são
20 apresentadas nas SEQ ID NOs: 22, 23 e 24. A sequência de aminoácidos de V_K CDR2s de 6H4, 11F2 e 12E3 são apresentadas nas SEQ ID NOs: 25, 26 e 27. A sequência de aminoácidos de V_K CDR3s de 6H4, 11F2 e 12E3 são apresentadas nas SEQ ID NOs: 28, 29 e 30. As regiões CDR
25 estão delineadas usando o sistema Kabat (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication N° 91-3242).

Dado que cada um dos anticorpos monoclonais aqui
30 proporcionados podem se ligar (1) a uma proteína morfogênica óssea selecionada de BMP2 e BMP4 ou (2) a um receptor da proteína morfogênica óssea selecionado de BMPR1A, BMPR1B, BMPR2 e/ou a um receptor tipo 1 da activina selecionado de ACTR1 e que a especificidade de
35 ligação ao antígeno é proporcionada principalmente pelas regiões CDR1, CDR2 e CDR3, as sequências V_H de CDR1, CDR2 e CDR3 e as sequências V_K de CDR1, CDR2 e CDR3 podem ser

"misturadas e combinadas" (isto é, CDRs de anticorpos diferentes podem ser misturados e combinados, embora cada anticorpo tenha de conter uma V_H de CDR1, CDR2 e CDR3, e uma V_k de CDR1, CDR2 e CDR3) para criar outras moléculas de ligação antígeno-específicas da invenção. A ligação destes anticorpos "misturados e combinados" pode ser testada utilizando os ensaios de ligação descritos acima e nos Exemplos (por exemplo, FACS, ELISAs, análise Biacore). Tipicamente, quando as seqüências V_H de CDR são misturadas e combinadas, a seqüência CDR1, CDR2, e/ou CDR3 de uma seqüência V_H específica é substituída por uma seqüência(s) CDR estruturalmente similar(es). Do mesmo modo, quando as seqüências V_k de CDR são misturadas e combinadas, a seqüência CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de uma seqüência V_k em particular é tipicamente substituída por uma seqüência(s) CDR estruturalmente similar(es). Ficará prontamente evidente para o especialista na técnica que novas seqüências V_H e V_L podem ser criadas substituindo uma ou mais seqüências V_H e/ou V_L da região CDR por seqüências estruturalmente similares a partir das seqüências CDR aqui reveladas para os anticorpos monoclonais da presente invenção.

Em um outro aspecto, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado ou sua porção de ligação ao antígeno compreendendo:

- (a) uma região variável de cadeia pesada CDR1;
- (b) uma região variável de cadeia pesada CDR2;
- (c) uma região variável de cadeia pesada CDR3;
- (d) uma região variável de cadeia leve CDR1;
- (e) uma região variável de cadeia leve CDR2; e
- (f) uma região variável de cadeia leve CDR3; onde cada região variável de cadeia pesada CDR1, CDR2, e/ou CDR3 e cada região variável de cadeia leve CDR1, CDR2, e/ou CDR3 compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada de um, dois, três, quatro, cinco ou seis receptores da proteína morfogenética óssea que se ligam a anticorpo(s); e onde o(s) anticorpo(s) se liga(m) especificamente a

BMP2 e/ou BMP4 (tipicamente BMP2 e/ou BMP4 humanas).

Em concordância, em um outro aspecto, a invenção proporciona um anticorpomonoclonal isolado, ou sua porção de ligação ao antígeno compreendendo:

- 5 (a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 13, 14, e 15;
 - (b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do
10 grupo que consiste das SEQ ID NOs: 16, 17, e 18;
 - (c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 19, 20 e 21;
 - (d) uma região variável de cadeia leve CDR1
15 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 22, 23 e 24;
 - (e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 25, 26 e 27; e
 - 20 (f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 28, 29 e 30;
- em que o anticorpo especificamente se liga a BMP2 ou BMP4, preferencialmente a BMP2 ou BMP4 humanas.
- 25 Em uma modalidade preferida, o anticorpo compreende:
 (a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a SEQ ID NO: 13;
 - (b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a SEQ ID NO: 16;
 - 30 (c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a SEQ ID NO: 19;
 - (d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a SEQ ID NO: 22;
 - (e) uma região variável de cadeia leve CDR2
35 compreendendo a SEQ ID NO: 25; e
 - (f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a SEQ ID NO: 28.

Em uma outra modalidade preferida, o anticorpo compreende:

- (a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a SEQ ID NO: 14;
- 5 (b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a SEQ ID NO: 17;
- (c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a SEQ ID NO: 20;
- (d) uma região variável de cadeia leve CDR1
- 10 compreendendo a SEQ ID NO: 23;
- (e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a SEQ ID NO: 26; e
- (f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a SEQ ID NO: 29.

15 Em uma outra modalidade, o anticorpo compreende:

- (a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a SEQ ID NO: 15;
- (b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a SEQ ID NO: 18;
- 20 (c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a SEQ ID NO: 21;
- (d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a SEQ ID NO: 24;
- (e) uma região variável de cadeia leve CDR2
- 25 compreendendo a SEQ ID NO: 27; e
- (f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a SEQ ID NO: 30.

É sabido na técnica que o domínio CDR3, independentemente do(s) domínio(s) CDR1 e/ou CDR2, por si só pode

30 determinar a especificidade da ligação de um anticorpo para um antígeno cognato e que, previsivelmente, podem ser gerados anticorpos múltiplos tendo a mesma especificidade de ligação com base em uma sequência CDR3 comum. Ver, por exemplo, Klimka et al., British J. of

35 Cancer 83(2):252-260 (2000) [que descreve a produção de um anticorpo anti-CD30 humanizado utilizando apenas o domínio variável CDR3 de cadeia pesada de anticorpo Ki-4

anti-CD30 de murino]; Beiboer et al., J. Mol. Biol. 296:833-849 (2000) [que descreve anticorpos da glicoproteína-2 epitelial recombinante (EGP-2) utilizando apenas a sequência CDR3 de cadeia pesada do anticorpo anti-EGP-2 MOC-31 do murino parental]; Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 95:8910-8915 (1998) [que descreve um painel de anticorpos $\alpha_v\beta_3$ anti-integrina humanizados utilizando um domínio CDR3 variável de cadeia pesada e leve de um anticorpo $\alpha_v\beta_3$ anti-integrina murino LM609 onde cada anticorpo membro compreende um sequência distinta fora do domínio CDR3 e capaz de ligar o mesmo epítipo que o anticorpo do murino precursor com afinidades tão altas ou mais altas do que o anticorpo do murino precursor]; Barbas et al., J. Am. Chem. Soc. 116:2161-2162 (1994) [que descreve que o domínio CDR3 proporciona a contribuição mais significativa à ligação ao antígeno]; Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 92:2529-2533 (1995) [que descreve o enxerto de sequências CDR3 de cadeia pesada de três Fabs (SI-1, SI-40 e SI-32) contra ADN placentar humano na cadeia pesada de um Fab toxóide anti-tétano deste modo substituindo a cadeia pesada CD3 existente e demonstrando que o domínio CDR3 por si só conferiu a especificidade da ligação]; e Ditzel et al., J. Immunol. 157:739-749 (1996) [que descreve estudos de enxertos onde a transferência apenas da cadeia pesada CDR3 de um Fab LNA3 poliespecífico precursor para uma cadeia pesada de um Fab p313 de ligação a toxóide de tétano IgG monoespecífico foi suficiente para reter a especificidade da ligação do Fab precursor]. Cada uma destas referências é aqui integralmente incorporada por referência.

Em concordância, em certos aspectos, a presente invenção proporciona anticorpos monoclonais compreendendo um ou mais domínios CDR3 de cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo não humano, como por exemplo um anticorpo de camundongo ou rato, onde o anticorpo monoclonal é capaz de se ligar especificamente à BMP2 e/ou BMP4 (tipicamente

BMP2 e/ou BMP4 humanas) ou a BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 (tipicamente BMPR1A, BMPR1B, ACTR1 e/ou BMPR2 humanas). Em algumas modalidades, estes anticorpos da invenção compreendendo um ou mais domínios CDR3 de cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo não humano (a) são capazes de competir para ligação; (b) reter as características funcionais; (c) ligar-se ao mesmo epítopo; e/ou (d) ter uma afinidade de ligação similar do anticorpo não humano parental correspondente.

Em outros aspectos, a presente invenção proporciona anticorpos monoclonais compreendendo um ou mais domínios CDR3 de cadeia pesada e/ou leve de um primeiro anticorpo humano, tal como, por exemplo, um anticorpo humano obtido de um animal não humano, onde o primeiro anticorpo humano é capaz de se ligar especificamente à BMP2 e/ou BMP4 (tipicamente BMP2 e/ou BMP4 humanas) ou a BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 (tipicamente BMPR1A, BMPR1B, ACTR1 e/ou BMPR2 humanas) e, onde o domínio CDR3 do primeiro anticorpo humano substitui um domínio CDR3 em um anticorpo humano que não tem especificidade de ligação para BMP2 e/ou BMP4 ou para BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 para gerar um segundo anticorpo humano que é capaz de se ligar especificamente a BMP2 e/ou BMP4 ou a BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2, respectivamente. Em algumas modalidades, estes anticorpos da invenção que compreendem um ou mais domínios CDR3 de cadeia pesada e/ou leve do primeiro anticorpo humano (a) são capazes de competir para ligação; (b) reter as características funcionais; (c) ligar-se ao mesmo epítopo; e/ou (d) ter uma afinidade de ligação como o primeiro anticorpo humano parental.

Anticorpos com Sequências de Linha Germinal Específicas

Em certas modalidades, um anticorpo da presente invenção compreende uma região variável de cadeia pesada de um gene de imunoglobulina de cadeia pesada de linha germinal específica e/ou uma região variável de cadeia leve de um gene de imunoglobulina de cadeia leve de linha germinal específica.

Conforme aqui utilizado, um anticorpo humano compreende regiões variáveis de cadeia pesada ou leve que é "o produto de" ou "derivado de" uma sequência de linha germinal específica se as regiões variáveis do anticorpo
5 forem obtidas de um sistema que utiliza genes de imunoglobulina de linha germinal humana. Estes sistemas incluem imunizar um camundongo transgênico portador de imunoglobulina humana com o antígeno de interesse ou rastrear uma biblioteca de genes de imunoglobulina humana
10 apresentados sobre a superfície de fagos com o antígeno de interesse. Um anticorpo humano que é "o produto de" ou "derivado de" uma sequência de imunoglobulina de linha germinal humana pode ser identificado como tal por comparação da sequência de aminoácidos do anticorpo
15 humano com as sequências de aminoácidos das imunoglobulinas de linha germinal humana e selecionando a sequência de imunoglobulina de linha germinal humana que seja mais próxima em sequência (isto é, maior % de identidade) à sequência do anticorpo humano.
20 Por exemplo, em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao seu antígeno, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto ou é derivado de um gene V_H 4-59 humano, onde o anticorpo,
25 especificamente, se liga a BMP2 ou BMP4. Em uma outra modalidade preferida, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao seu antígeno, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto ou é derivado de um gene V_H 4-34
30 humano, onde o anticorpo, especificamente, se liga a BMP2 ou BMP4. Em uma outra modalidade preferida, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao seu antígeno, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto ou é derivado
35 de um gene V_H 3-33 humano, onde o anticorpo, especificamente, se liga a BMP2 ou BMP4. Em uma outra modalidade preferida, a invenção proporciona um anticorpo

monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao seu antígeno, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto ou é derivado de um gene V_H 1-69 humano, onde o anticorpo, especificamente, se liga a BMP2 ou BMP4.

Em um outro exemplo, em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao seu antígeno, compreendendo uma região variável de cadeia leve que é o produto ou é derivado de um gene V_K A27 humano, onde o anticorpo, especificamente, se liga a BMP2 ou BMP4. Em ainda outra modalidade preferida, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao seu antígeno, compreendendo uma região variável de cadeia leve que é o produto ou é derivado de um gene V_K L15 humano, onde o anticorpo, especificamente, se liga a BMP2 ou BMP4. Em ainda outra modalidade preferida, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao seu antígeno, compreendendo uma região variável de cadeia leve que é o produto ou é derivado de um gene V_K L6 humano, onde o anticorpo, especificamente, se liga a BMP2 ou BMP4.

Em uma outra modalidade preferida, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao seu antígeno, onde o anticorpo:

(a) compreende uma região variável de cadeia pesada que é o produto ou é derivada de um gene V_H 4-59, 4-34, ou 3-33 humano (cujos genes codificam as seqüências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 43, 51 e 44, respectivamente);

(b) compreende uma região variável de cadeia leve que é o produto ou é derivada de um gene V_K A27, L6, ou L15 humano (cujos genes codificam as seqüências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 48, 54 e 49, respectivamente); e

(c) especificamente se liga a BMP2 ou BMP4, de preferência BMP2 ou BMP4 humanas.

Um exemplo de um anticorpo que tem V_H e V_K de V_H 4-34 e V_K L6, respectivamente, é 6H4. Um exemplo de um anticorpo que tem um V_H e V_K de V_H 4-59 e V_K A27, respectivamente, é 11F2. Um exemplo de um anticorpo que
5 tem V_H e V_K de V_H 3-33 e V_K L15, respectivamente, é 12E3. Um anticorpo humano que é "o produto de" ou "derivado de" uma sequência de imunoglobulina de linha germinal humana específica pode conter diferenças de aminoácidos em comparação com a sequência da linha germinal, por
10 exemplo, devido a mutações somáticas de ocorrência natural ou introdução intencional de mutação sítio-dirigida. No entanto, um anticorpo humano selecionado, tipicamente, é pelo menos 90% idêntico em sequência de aminoácidos a uma sequência de aminoácidos codificada por
15 um gene de imunoglobulina de linha germinal humana e contém resíduos de aminoácidos que identificam o anticorpo humano como sendo humano quando comparado a sequências de aminoácido de imunoglobulina de linha germinal de outras espécies (por exemplo sequências de
20 linha germinal murina). Em certos casos, um anticorpo humano pode ser pelo menos 95% ou mesmo pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99% idêntico em sequência de aminoácidos à sequência de aminoácidos codificada pelo gene de imunoglobulina de linha germinal humana. Tipicamente, um
25 anticorpo humano derivado de um sequência de linha germinal humana específica não apresentará mais de 10 aminoácidos diferentes da sequência de aminoácidos codificada pelo gene de imunoglobulina de linha germinal humana. Em certos casos, o anticorpo humano pode
30 apresentar não mais de 5 ou mesmo não mais de 4, 3, 2 ou 1 aminoácidos diferentes da sequência de aminoácidos codificada pelo gene de imunoglobulina de linha germinal.

Anticorpos Homólogos

Em ainda outra modalidade, um anticorpo da invenção
35 compreende regiões variáveis de cadeia pesada e leve compreendendo sequências de aminoácido que são homólogas às sequências de aminoácido dos anticorpos aqui descrito

e onde os anticorpos retêm as propriedades funcionais desejadas das anticorpos da presente invenção.

Por exemplo, a presente invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado ou porção de ligação ao seu antígeno, compreendendo uma região variável de cadeia pesada e uma
5 região variável de cadeia leve, onde:

(a) a região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que
10 consiste das SEQ ID NOs: 31, 32 e 33;

(b) a região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 34, 35 e 36; e

15 (c) o anticorpo se liga a BMP2 ou BMP4 humanas com uma K_D de 1×10^{-7} M ou menos.

O anticorpo também pode se ligar a células CHO que têm uma BMP2 ou BMP4 humana ligada à superfície da célula. A BMP2 ou BMP4 pode ser ligada a receptores ou
20 entidade bivalente na superfície da células ou pode ser expressa como proteínas de fusão com domínios transmembrana.

Em várias modalidades, o anticorpo pode ser, por exemplo, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado ou
25 um anticorpo quimérico.

Em outras modalidades, a sequência de aminoácidos V_H e/ou V_L pode ser 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homóloga à sequências apresentadas acima. Um anticorpo que tem as regiões V_H e V_L tendo alta (isto é, 80% ou mais)
30 homologia às regiões V_H e V_L das sequências apresentadas acima, pode ser obtido por mutagênese (por exemplo, mutagênese sítio-dirigida ou mediada por PCR) de moléculas de ácido nucléico que codificam as SEQ ID NOs: 31, 32, 33, 34, 35 e 36, seguido por teste do anticorpo
35 alterado codificado quanto à função retida utilizando os ensaios aqui descritos.

A presente invenção também proporciona um anticorpo

monoclonal isolado ou porção de ligação ao seu antígeno, compreendendo uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, onde:

(a) a região variável de cadeia pesada compreende uma
5 sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica à
sequência de aminoácidos de uma região variável de cadeia
pesada aqui apresentada onde a região variável de cadeia
pesada é de um anticorpo que especificamente se liga a um
receptor da proteína morfogenética óssea selecionado de
10 BMPR1A, BMPR1B e/ou BMPR2 e/ou a um receptor tipo 1 de
activina selecionado de ACTR1;

(b) a região variável de cadeia leve compreende uma
sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica à
sequência de aminoácidos de uma região variável de cadeia
15 leve aqui apresentada onde a região variável de cadeia
leve é de um anticorpo que especificamente se liga a um
receptor da proteína morfogenética óssea selecionado de
BMPR1A, BMPR1B, e/ou BMPR2 e/ou a um receptor tipo 1 de
activina selecionado de ACTR1; e

(c) o anticorpo se liga especificamente a um receptor da
20 proteína morfogenética óssea selecionado de BMPR1A,
BMPR1B, e/ou BMPR2 e/ou a um receptor tipo 1 de activina
selecionado de ACTR1.

Em outras modalidades, a sequência de aminoácidos V_H e/ou
25 V_L pode ser 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica
a um anticorpo anti-BMPR1A, BMPR1B, e/ou BMPR2 e/ou a uma
sequência anti-ACTR1 aqui apresentada. Um anticorpo que
tem regiões V_H e V_L com alta (isto é, 80% ou mais)
identidade às regiões V_H e V_L das sequências aqui
30 apresentadas, pode ser obtido por mutagênese (por
exemplo, mutagênese sítio-dirigida ou mediada por PCR) de
moléculas de um ácido nucléico que codificam uma região
 V_H ou uma região V_L de um anticorpo anti-BMPR1A, BMPR1B
e/ou BMPR2 e/ou a uma anti-ACTR1.

35 Conforme aqui utilizado, a percentagem da identidade
entre as duas sequências é uma função do número de
posições idênticas compartilhadas pelas sequências (isto

é, % de homologia = n° de posições idênticas/ n° total de posições x 100), levando em conta o número de espaços (gaps) e o comprimento de cada espaço que necessita ser introduzido para o alinhamento ótimo das duas seqüências.

5 A comparação de seqüências e a determinação da percentagem de identidade entre duas seqüências pode ser obtida utilizando um algoritmo matemático, conforme descrito nos exemplos não limitativos adiante.

10 A percentagem de identidade entre duas seqüências de aminoácidos pode ser determinada utilizando o algoritmo de E. Meyers e W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)), que foi incorporado no programa ALIGN (versão 2.0) usando uma tabela de resíduo de peso PAM120, uma penalidade para comprimento de espaços (gap lenght
15 penalty) de 12 e uma penalidade para espaços (gap penalty) de 4. Além disso, a percentagem de identidade entre duas seqüências de aminoácidos pode ser determinada utilizando o algoritmo de Needleman e Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) que foi incorporado no programa
20 GAP no pacote de software GCG (disponível em <http://www.gcg.com>), utilizando uma matriz Blossum 62 ou uma matriz PAM250 e um gap weight de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ou 4 e um length weight de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

Adicionalmente ou alternativamente, as seqüências de
25 proteínas da presente invenção também podem ser utilizadas como uma "seqüência de consulta" (query sequence) para realizar uma busca em bases de dados públicas a fim de, por exemplo, identificar seqüências relacionadas. Estas buscas podem ser realizadas
30 utilizando o programa XBLAST (versão 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Buscas da proteína BLAST podem ser realizadas com o programa XBLAST, score = 50, comprimento da palavra = 3 para obter seqüências de aminoácidos homólogas às moléculas de anticorpos da
35 invenção. Para obter alinhamentos espaçados com finalidade de comparação, pode-se utilizar Gapped BLAST conforme descrito em Altschul et al., (1997) Nucleic

Acids Res. 25(17):3389-3402. Quando se utiliza os programas BLAST e Gapped BLAST, pode-se utilizar os parâmetros por defeito dos respectivos programas (por exemplo, XBLAST e NBLAST). Ver

5 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Anticorpos com Modificações Conservadoras

Em certas modalidades, um anticorpo da invenção compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 e uma
10 região variável de cadeia leve compreendendo as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, onde uma ou mais destas seqüências CDR compreende seqüências de aminoácidos com base nos anticorpos exemplificativos aqui descritos ou modificações conservadoras dos mesmos e onde os
15 anticorpos retêm as propriedades funcionais dos anticorpos monoclonais da presente invenção.

Em concordância, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado ou porção de ligação ao seu antígeno, compreendendo uma região variável de cadeia pesada
20 compreendendo as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve compreendendo as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, onde:

(a) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do
25 grupo que consiste das seqüências de aminoácido SEQ ID NOs: 19, 20 e 21, e modificações conservadoras das mesmas;

(b) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada
30 do grupo que consiste das seqüências de aminoácido SEQ ID NOs: 28, 29 e 30, e modificações conservadoras das mesmas; e

(c) o anticorpo se liga a BMP2 ou BMP4 com uma K_D de 1×10^{-7} M ou menos.

35 O anticorpo também pode se ligar a células CHO que têm uma BMP2 ou BMP4 ligada à superfície da célula.

Em uma modalidade preferida, a seqüência CDR2 da

região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das sequências de aminoácido SEQ ID NOs: 16, 17 e 18, e modificações conservadoras das mesmas; e a sequência CDR2 da região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das sequências de aminoácido SEQ ID NOs: 25, 26 e 27, e modificações conservadoras das mesmas.

Em uma outra modalidade preferida, a sequência CDR1 da região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das sequências de aminoácido SEQ ID NOs: 13, 14 e 15, e modificações conservadoras das mesmas; a sequência CDR1 da região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das sequências de aminoácido SEQ ID NOs: 22, 23 e 24, e modificações conservadoras das mesmas.

Em várias modalidades, o anticorpo pode ser, por exemplo, anticorpos humanos, anticorpos humanizados ou anticorpos quiméricos.

A presente invenção também proporciona um anticorpo monoclonal isolado ou porção de ligação ao seu antígeno, compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve compreendendo as sequências CDR1, CDR2 e CDR3, onde:

(a) a sequência CDR3 da região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de um anticorpo monoclonal anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1 e anti-BMPR2 aqui descrito e modificações conservadoras das mesmas;

(b) a sequência CDR3 da região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de um anticorpo monoclonal anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1 e anti-BMPR2 aqui descrito e modificações conservadoras das mesmas; e

(c) o anticorpo especificamente se liga a BMPR1A, BMPR1B,

ACTR1, e/ou BMPR2.

Conforme aqui utilizado, o termo "modificações conservadoras da seqüência" pretende se referir a modificações do aminoácido que não afetam ou alteram de forma significativa as características do anticorpo que contém a seqüência de aminoácidos. Estas modificações conservadoras incluem substituições, adições e deleções de aminoácidos. As modificações podem ser introduzidas em um anticorpo da invenção por meio de métodos convencionais conhecidos na técnica, tais como mutagênese sítio-dirigida e mutagênese mediada por PCR. As substituições conservadoras de aminoácidos são aquelas onde o resíduo do aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos de aminoácidos com cadeias laterais similares foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Deste modo, um ou mais resíduos de aminoácido nas regiões CDR de um anticorpo da invenção podem ser substituídos por outros resíduos de aminoácido da mesma família de cadeia lateral e o anticorpo alterado pode ser testado quanto à função retida (isto é, a função apresentada em (c)) utilizando os ensaios funcionais aqui descritos.

Anticorpos que se Ligam ao Mesmo Epítopo que os Anticorpos da Invenção

Em uma outra modalidade, a invenção proporciona anticorpos que se ligam ao(s) mesmo(s) epítopo(s) em

BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1 humanas, e/ou BMPR2 como qualquer um dos anticorpos monoclonais da presente invenção (isto é, anticorpos que têm a capacidade de competição cruzada para ligação a BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 com qualquer dos anticorpos monoclonais da invenção). Em algumas modalidades, o anticorpo de referência para estudos de competição cruzada pode ser um anticorpo monoclonal aqui descrito. Estes anticorpos de competição cruzada podem ser identificados com base na sua capacidade de competição cruzada com um anticorpo aqui descrito em ensaios convencionais de ligação de BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2.

Em modalidades preferidas, o anticorpo de referência para estudos de competição cruzada pode ser o anticorpos monoclonal 6H4 (que tem seqüências V_H e V_L conforme apresentado nas SEQ ID NOs: 31 e 34, respectivamente), o anticorpo monoclonal 11F2 (que tem seqüências V_H e V_L conforme apresentado nas SEQ ID NOs: 32 e 35, respectivamente), o anticorpo monoclonal 12E3 (que tem seqüências V_H e V_L conforme apresentado nas SEQ ID NOs: 33 e 36, respectivamente), ou qualquer um dos anticorpos monoclonais identificados nos Exemplos 1 e 2. Estes anticorpos de competição cruzada podem ser identificados com base na sua capacidade de competição cruzada com estes anticorpos em ensaios convencionais de ligação de BMP2 ou BMP4. Por exemplo, pode-se utilizar análise BIAcore, ensaios ELISA ou citometria de fluxo para demonstrar a competição cruzada com os anticorpos da presente invenção. A capacidade de um anticorpo de teste de inibir a ligação, por exemplo, de 6H4, 11F2, ou 12E3, a BMP2 ou BMP4 humanas demonstra que o anticorpo de teste pode competir com 6H4, 11F2, ou 12E3 para ligação a BMP2 ou BMP4 humanas e, deste modo, se liga ao mesmo epítopo em BMP2 ou BMP4 humanas como 6H4, 11F2, ou 12E3. Em uma modalidade preferida, o anticorpo que se liga ao mesmo epítopo em BMP2 ou BMP4 humanas como 6H4, 11F2, ou 12E3 é

um anticorpo monoclonal humano. Estes anticorpos monoclonais humanos podem ser preparados e isolados conforme descrito nos Exemplos.

Anticorpos Produzidos e Modificados

- 5 Um anticorpo da invenção também pode ser preparado utilizando um anticorpo que tem uma ou mais das seqüências V_H e/ou V_L aqui descritas como material de partida para produzir um anticorpo modificado, cujo anticorpo modificado pode ter propriedades alteradas em
- 10 relação ao anticorpo de partida. Um anticorpo pode ser produzido pela modificação de um ou mais resíduos em uma ou ambas as regiões variáveis (isto é, V_H e/ou V_L), por exemplo em uma ou mais regiões CDR e/ou em uma ou mais regiões da estrutura. Adicionalmente ou alternativamente,
- 15 um anticorpo pode ser produzido pela modificação dos resíduos na(s) região(ões) constante(s), por exemplo para alterar a(s) função(ões) efetora(s) do anticorpo.
- Um tipo de produção de região variável que pode ser realizado é o enxerto de CDR. Os anticorpos interagem com
- 20 antígenos alvo predominantemente por meio de resíduos de aminoácidos que estão localizados nas seis regiões determinantes complementares de cadeia pesada e leve (CDRs). Por este motivo, as seqüências de aminoácido no interior das CDRs são mais diversas entre anticorpos
- 25 individuais do que seqüências fora das CDRs. Devido ao fato das seqüências de CDR serem responsáveis pela maior parte das interações anticorpo-antígeno, é possível expressar anticorpos recombinantes que simulam as propriedades de anticorpos específicos de ocorrência
- 30 natural construindo vetores de expressão que incluem seqüências de CDR do anticorpo específico de ocorrência natural enxertado nas seqüências de estrutura de um anticorpo diferente com propriedades diferentes (ver, por exemplo, Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332:323-327;
- 35 Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033; Patente U.S. Nº 5,225,539 de Winter e Patentes U.S. Nº

5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 e 6,180,370 de Queen et al.).

Em concordância, outra modalidade da invenção pertence a um anticorpo monoclonal isolado ou porção de ligação ao seu antígeno, compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 compreendendo uma seqüência de aminoácidos de um primeiro anticorpo anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2 aqui apresentado e uma região variável de cadeia leve compreendendo seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 compreendendo uma seqüência de aminoácidos de um segundo anticorpo anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2. Em uma modalidade preferida, um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação ao seu antígeno, compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 compreendendo uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 13, 14 e 15, SEQ ID NOs: 16, 17, e 18 e SEQ ID NOs: 19, 20, e 21, respectivamente, e uma região variável de cadeia leve compreendendo seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 compreendendo uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 22, 23 e 24, SEQ ID NOs: 25, 26 e 27 e SEQ ID NOs: 28, 29 e 30, respectivamente. Deste modo, estes anticorpos contêm seqüências CDR de V_H e V_L de anticorpos monoclonais 6H4, 11F2 e 12E3, no entanto podem conter seqüências de estrutura diferentes destes anticorpos.

Estas seqüências de estrutura podem ser obtidas, por exemplo, de bases de dados públicas de ADN ou referências publicadas que incluem seqüências de gene de anticorpo de linha germinal. Por exemplo, as seqüências de ADN de linha germinal para genes da região variável de cadeia pesada e leve podem ser encontradas na base de dados de seqüências de linha germinal humana "VBase" (disponível na Internet em www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), bem como em Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of

Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication N° 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; e Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Germline V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836; os conteúdos integrais de cada uma das quais são aqui expressamente incorporados por citação. Como outro exemplo, as seqüências de ADN de linha germinal para genes da região variável de cadeia pesada e leve podem ser encontradas na base de dados do GenBank. Por exemplo, as seguintes seqüências de linha germinal de cadeia pesada encontradas no camundongo HCo7 HuMAb estão disponíveis nos seguinte números de acesso do GenBank: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 e BC070333), 3-33 (NG_0010109 e NT_024637) e 3-7 (NG_0010109 e NT_024637). Como outro exemplo, as seguintes seqüências de linha germinal de cadeia pesada encontradas no camundongo HCo12 HuMAb estão disponíveis nos seguinte números de acesso do GenBank: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 e BC070333), 5-51 (NG_0010109 e NT_024637), 4-34 (NG_0010109 e NT_024637), 3-30.3 (CAJ556644) e 3-23 (AJ406678).

As seqüências de proteínas de anticorpos são comparadas a uma base de dados compilada de seqüências de proteínas utilizando um dos métodos de busca de similaridade de seqüência chamado Gapped BLAST (Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Research 25:3389-3402), que é bem conhecido dos especialistas na técnica. BLAST é um algoritmo heurístico onde é provável que um alinhamento estatisticamente significativo entre a seqüência de anticorpos e a seqüência da base de dados de contenha pares de segmentos de alto escore (do inglês High-scoring segment pairs, HSP) de palavras alinhadas. Os pares de segmentos cujos escores não podem ser melhorados por extensão ou corte é chamado de hit. Em resumo, as

seqüências de nucleotídeos de origem VBASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php>) são traduzidas e a região entre e incluindo a região de estrutura FR1 até FR3 é retida. As seqüências da base de dados têm um comprimento médio de 98 resíduos. São removidas as seqüências em duplicata que são correspondências exatas do comprimento total da proteína. Um BLAST busca proteínas utilizando o programa blastp com default, parâmetros padrão exceto o filtro de baixa complexidade que é desligado e a matriz de substituição de BLOSUM62, filtros dos 5 maiores hits dando correspondências de seqüência. As seqüências de nucleotídeos são traduzidas em todas as seis fases e a fase sem códon de parada no segmento correspondente da seqüência da base de dados é considerado o hit potencial. Isto é confirmado, por sua vez, utilizando o programa tblastx BLAST. Isto traduz a seqüência de anticorpos em todas as seis fases e compara estas traduções às seqüências de nucleotídeos da VBASE traduzidos dinamicamente em todas as seis fases.

As identidades são correspondências de aminoácidos exatas entre a seqüência de anticorpos e a base de dados de proteínas ao longo de um comprimento total da seqüência. Os positivos (identidades + correspondências de substituição) não são idênticos mas as substituições de aminoácidos guiadas pela matriz de substituição BLOSUM62. Se a seqüência de anticorpos corresponde a duas das seqüências da base de dados com a mesma identidade, o hit com mais positivos seria decidido como sendo o hit da seqüência correspondente.

As seqüências de estrutura preferidas para utilização nos anticorpos da invenção são aquelas que são estruturalmente similares às seqüências de estrutura utilizadas por anticorpos selecionados da invenção, por exemplo similares às seqüências de estrutura V_H 4-59 (SEQ ID NO: 43) e/ou as seqüências de estrutura V_H 3-33 (SEQ ID NO: 44) e/ou as seqüências de estrutura V_H 4-34 (SEQ

ID NO: 51) e/ou as seqüências de estrutura V_H 1-69 e/ou as seqüências de estrutura V_K A27 (SEQ ID NO: 48) e/ou as seqüências de estrutura V_K L15 (SEQ ID NO: 49) e/ou as seqüências de estrutura L6 V_K (SEQ ID NO: 54) utilizadas pelos anticorpos monoclonais preferidos da invenção. As seqüências V_H CDR1, CDR2 e CDR3, e as seqüências V_K CDR1, CDR2 e CDR3, podem ser enxertadas em regiões de estrutura que têm a seqüência idêntica àquela encontrada no gene da imunoglobulina de linha germinal do qual a seqüência de estrutura deriva ou as seqüências de CDR podem ser enxertadas nas regiões da estrutura que contêm uma ou mais mutações em comparação com as seqüências da linha germinal. Por exemplo, constatou-se que em certos casos é benéfico causar uma mutação dos resíduos no interior das regiões de estrutura para manter ou aumentar a capacidade de ligação do antígeno do anticorpo (ver, por exemplo, Patentes U.S. N° 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 e 6,180,370 de Queen et al.).

Outro tipo de modificação da região variável é causar uma mutação dos resíduos de aminoácidos no interior das regiões V_H e/ou V_K CDR1, CDR2 e/ou CDR3 para, deste modo, melhorar uma ou mais propriedades de ligação (por exemplo, a afinidade) do anticorpo de interesse. Pode-se realizar a mutagênese sítio-dirigida ou a mutagênese mediada por PCR para introduzir a(s) mutação(ões) e o efeito sobre a ligação ao anticorpo ou outras propriedades funcionais de interesse pode ser avaliado em ensaios in vitro ou in vivo conforme aqui descrito e proporcionado nos Exemplos. Tipicamente são introduzidas modificações conservadoras (conforme discutido acima). As mutações podem ser substituições, adições ou deleções de aminoácidos, mas, tipicamente, são substituições. Além disso, tipicamente, não são alterados mais de um, dois, três, quatro ou cinco resíduos no interior de uma região CDR.

Em concordância, em uma outra modalidade, a presente descrição proporciona anticorpos monoclonais anti-

BMP2/BMP4 isolados, ou porções de ligação ao seu antígeno, compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo: (a) uma região V_H CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 13, 14 e 15, ou uma sequência de aminoácidos que tem uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácidos em comparação com as SEQ ID NOs: 13, 14 e 15; (b) uma região V_H CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 16, 17 e 18, ou uma sequência de aminoácidos que tem uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácidos em comparação com as que tem uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácidos em comparação com as SEQ ID NOs: 16, 17 e 18; (c) a V_H CDR3 região compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 19, 20 e 21, ou uma sequência de aminoácidos que tem uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácidos em comparação com as SEQ ID NOs: 19, 20 e 21; (d) a V_K CDR1 região compreendendo uma sequência de selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 22, 23 e 24, ou uma sequência de aminoácidos que tem uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácidos em comparação com as SEQ ID NOs: 22, 23 e 24; (e) a V_K CDR2 região compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 25, 26 e 27, ou uma sequência de aminoácidos que tem uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácidos em comparação com as SEQ ID NOs: 25, 26 e 27; e (f) a V_K CDR3 região compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 28, 29 e 30, ou uma sequência de aminoácidos que tem uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácidos em comparação com as SEQ ID NOs: 28, 29 e 30.

Em ainda outra modalidade, a invenção proporciona anticorpos monoclonais isolados ou porções de ligação ao seu antígeno, compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo: (a) uma região V_H CDR1; (b) uma
5 região V_H CDR2; (c) uma região V_H CDR3; (d) uma região V_K CDR1; (e) uma região V_K CDR2; e (f) uma região V_K CDR3; onde cada região V_H CDR1, CDR2 e/ou CDR3 e cada região V_K CDR1, CDR2 e/ou CDR3 é de um, dois, três, quatro, cinco ou seis anticorpos anti-BMPR1A distintos; um, dois, três,
10 quatro, cinco ou seis anticorpos anti-BMPR1B distintos; um, dois, três, quatro, cinco ou seis anticorpos anti-ACR1 distintos e/ou um, dois, três, quatro, cinco ou seis anticorpos anti-BMPR2 distintos; ou uma sequência de aminoácidos que tem um, dois, três, quatro ou cinco
15 substituições, deleções ou adições de aminoácidos comparadas com os um, dois, três, quatro, cinco ou seis anticorpos anti-BMPR1A distintos; um, dois, três, quatro, cinco ou seis anticorpos anti-BMPR1B distintos; um, dois, três, quatro, cinco ou seis anticorpos anti-ACR1
20 distintos; e/ou um, dois, três, quatro, cinco ou seis anticorpos anti-BMPR2 distintos.

Os anticorpos produzidos da invenção incluem aqueles onde foram feitas modificações aos resíduos da estrutura no interior da V_H e/ou V_K , por exemplo para melhorar as
25 propriedades do anticorpo. Tipicamente, estas modificações da estrutura são feitas para diminuir a imunogenicidade do anticorpo. Por exemplo, uma abordagem é "reverter" um ou mais resíduos da estrutura à sequência da linha germinal correspondente. Mais especificamente,
30 um anticorpo que foi submetido a mutação somática pode conter resíduos de estrutura que diferem da sequência da linha germinal da qual o anticorpo é derivado. Estes resíduos podem ser identificados por comparação das sequências de estrutura do anticorpo com as sequências da
35 linha germinal da qual o anticorpo é derivado. Estes anticorpos "revertidos" também pretendem ser abrangidos pela invenção.

Por exemplo, para 6H4, utilizando o sistema de numeração de Kabat, o resíduo de aminoácido nº 3 (no FR1) de V_H é uma histidina (SEQ ID NO: 31) ao passo que este resíduo na seqüência de linha germinal V_H 4-34 correspondente é uma glutamina (SEQ ID NO: 51). Para voltar as seqüências da região de estrutura à suas configurações de linha germinal, as mutações somáticas podem ser "revertidas" para a seqüência de linha germinal, por exemplo por meio de mutagênese sítio-dirigida ou mutagênese mediada por PCR (por exemplo, resíduo nº 3 (o resíduo nº 3 de FR1) da V_H de 6H4 pode ser "revertido" de histidina para glutamina).

Como outro exemplo, para 11F2, o resíduo de aminoácido nº 27 (no FR1) da V_H é um aspartato (SEQ ID NO: 32) ao passo que este resíduo na seqüência de linha germinal V_H 4-59 correspondente é uma glicina (SEQ ID NO: 43). Para voltar as seqüências da região de estrutura à suas configurações de linha germinal, as mutações somáticas podem ser "revertidas" para a seqüência de linha germinal, por exemplo por meio de mutagênese sítio-dirigida ou mutagênese mediada por PCR (por exemplo, o resíduo nº 27 (resíduo nº 27 de FR1) da V_H de 11F2 pode ser "revertido" de aspartato para glicina).

Como outro exemplo, para 11F2, o resíduo de aminoácido nº 30 (no FR1) da V_H é uma arginina (SEQ ID NO: 32) ao passo que este resíduo na seqüência de linha germinal V_H 4-59 correspondente é uma serina (SEQ ID NO: 43). Para voltar as seqüências da região de estrutura à suas configurações de linha germinal, as mutações somáticas podem ser "revertidas" para a seqüência de linha germinal, por exemplo por meio de mutagênese sítio-dirigida ou mutagênese mediada por PCR (por exemplo, o resíduo nº 30 (resíduo nº 30 de FR1) da V_H de 11F2 pode ser "revertido" de arginina para serina).

Como outro exemplo, para 11F2, o resíduo de aminoácido nº 54 (no CDR2) da V_H é uma arginina (SEQ ID NO: 32) ao passo que este resíduo na seqüência de linha

germinal V_H 4-59 correspondente é uma serina (SEQ ID NO: 43). Para voltar as seqüências da região de estrutura à suas configurações de linha germinal, as mutações somáticas podem ser "revertidas" para a seqüência de
5 linha germinal, por exemplo por meio de mutagênese sítio-dirigida ou mutagênese mediada por PCR (por exemplo, o resíduo n° 54 (resíduo n° 5 de CDR2) da V_H de 11F2 pode ser "revertido" de arginina para serina).

Como outro exemplo, para 11F2, o resíduo de
10 aminoácido n° 58 (no CDR2) da V_H é uma histidina (SEQ ID NO: 32) ao passo que este resíduo na seqüência de linha germinal V_H 4-59 correspondente é uma asparagina (SEQ ID NO: 43). Para voltar as seqüências da região de estrutura à suas configurações de linha germinal, as mutações
15 somáticas podem ser "revertidas" para a seqüência de linha germinal, por exemplo por meio de mutagênese sítio-dirigida ou mutagênese mediada por PCR (por exemplo, o resíduo n° 58 (resíduo n° 9 de CDR2) da V_H de 11F2 pode ser "revertido" de histidina para asparagina).

20 Como outro exemplo, para 12E3, o resíduo de aminoácido n° 52A (no CDR2) da V_H é um aspartato (SEQ ID NO: 33) ao passo que este resíduo na seqüência de linha germinal V_H 3-33 correspondente é uma tirosina (SEQ ID NO: 44). Para voltar as seqüências da região de estrutura
25 à suas configurações de linha germinal, as mutações somáticas podem ser "revertidas" para a seqüência de linha germinal, por exemplo por meio de mutagênese sítio-dirigida ou mutagênese mediada por PCR (por exemplo, o resíduo n° 52A (resíduo n° 4 de CDR2) da V_H de 12E3 pode
30 ser "revertido" de aspartato para tirosina).

Como outro exemplo, for 12E3, o resíduo de
aminoácido n° 55 (no CDR2) da V_H é uma arginina (SEQ ID NO: 33) ao passo que este resíduo na seqüência de linha germinal V_H 3-33 correspondente é uma serina (SEQ ID NO:
35 44). Para voltar as seqüências da região de estrutura à suas configurações de linha germinal, as mutações somáticas podem ser "revertidas" para a seqüência de

linha germinal, por exemplo por meio de mutagênese sítio-dirigida ou mutagênese mediada por PCR (por exemplo, o resíduo nº 55 (resíduo nº 7 de CDR2) a V_H de 12E3 pode ser "revertido" de arginina para serina).

5 Como outro exemplo, para 12E3, o resíduo de aminoácido nº 56 (no CDR2) da V_H é uma lisina (SEQ ID NO: 33) ao passo que este resíduo na seqüência de linha germinal V_H 3-33 correspondente é uma asparagina (SEQ ID NO: 44). Para voltar as seqüências da região de estrutura
10 à suas configurações de linha germinal, as mutações somáticas podem ser "revertidas" para a seqüência de linha germinal, por exemplo por meio de mutagênese sítio-dirigida ou mutagênese mediada por PCR (por exemplo, o resíduo nº 56 (resíduo nº 8 de CDR2) da V_H de 12E3 pode
15 ser "revertido" de lisina para asparagina).

 Como outro exemplo, para 11F2, o resíduo de aminoácido nº 82 (no FR3) da V_H is a metionina (SEQ ID NO: 32) ao passo que este resíduo na seqüência de linha germinal V_H 4-59 correspondente é uma leucina (SEQ ID NO: 43). Para voltar
20 as seqüências da região de estrutura à suas configurações de linha germinal, as mutações somáticas podem ser "revertidas" para a seqüência de linha germinal, por exemplo por meio de mutagênese sítio-dirigida ou mutagênese mediada por PCR (por exemplo, o resíduo nº 82
25 (resíduo nº 17 de FR3) da V_H de 11F2 pode ser "revertido" de metionina para leucina).

 Outro tipo de modificação de estrutura envolve a mutação de um ou mais resíduos na região de estrutura ou mesmo uma ou mais regiões CDR, para remover epítomos de células
30 T a fim de, deste modo, reduzir a imunogenicidade potencial do anticorpo. Esta abordagem é também referida como "desimunização" e é descrita em mais detalhes na Publicação de Patente U.S. Nº 20030153043 por Carr et al. Os anticorpos produzidos da invenção também incluem
35 aqueles nos quais foram feitas modificações nos resíduos de aminoácidos para aumentar ou diminuir as respostas imunogênicas através das modificações dos aminoácidos que

alteram as interações de um epítopo de célula T sobre o anticorpo (ver, por exemplo, as Patentes U.S. Nº 6,835,550; 6,897,049 e 6,936,249).

Adicionalmente ou alternativamente às modificações feitas
5 no interior da estrutura ou regiões CDR, os anticorpos da invenção podem ser produzidos para incluir modificações na região Fc, tipicamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo, tal como a meia-vida sérica, fixação do complemento, ligação ao receptor
10 de Fc e/ou citotoxicidade celular antígeno-dependente. Além disso, um anticorpo da invenção pode ser quimicamente modificado (por exemplo, uma ou mais unidades químicas podem ser ligadas ao anticorpo) ou pode ser modificado para alterar a glicosilação, uma vez mais
15 para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo. Cada uma destas modalidades é descrita em mais detalhe adiante. A numeração dos resíduos na região Fc é a do índice EU de Kabat.

Em uma modalidade, a região conectora de CH1 é modificada
20 de tal modo que o número de cisteínas na região conectora é alterada, por exemplo, aumentada ou diminuída. Esta abordagem é melhor descrita na Patente U.S. Nº 5,677,425 por Bodmer et al. O número de resíduos de cisteína na região conectora de CH1 é alterada para, por exemplo,
25 facilitar a montagem das cadeias leve e pesada ou para aumentar ou diminuir a estabilidade do anticorpo.

Em outra modalidade, a região conectora de Fc de um anticorpo é submetida a mutação para diminuir a meia-vida biológica do anticorpo. Mais especificamente, uma ou mais
30 mutações de aminoácidos são introduzidas na região de interface do domínio CH2-CH3 do fragmento Fc conector de tal modo que o anticorpo tem a ligação à proteína A de *Staphylococcus* (SpA) prejudicada em relação à ligação a SpA do domínio do Fc conector nativo. Esta abordagem é
35 descrita em mais detalhes na Patente U.S. Nº 6,165,745 por Ward et al.

Em uma outra modalidade, o anticorpo é modificado para

aumentar a sua meia-vida biológica. São possíveis várias abordagens. Por exemplo, uma ou mais das seguintes mutações podem ser introduzidas: T252L, T254S, T256F, conforme descrito na Patente U.S. N° 6,277,375 de Ward.

5 Alternativamente, para aumentar a meia-vida biológica, o anticorpo pode ser alterado no interior da região CH1 ou CL para conter um epítopo de ligação ao receptor selvagem tomado de dois loops de um domínio CH2 de uma região Fc de uma IgG, conforme descrito nas Patentes U.S. N°

10 5,869,046 e 6,121,022 por Presta et al.

Em uma outra modalidade, o anticorpo é produzido como um UniBody conforme descrito no documento WO/2007/059782 que é aqui incorporado integralmente por citação.

Em ainda outras formas de realizações, a região Fc é

15 alterada pela substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido por um resíduo de aminoácido diferente para alterar a(s) função(ões) efetora(s) do anticorpo. Por exemplo, um ou mais aminoácidos selecionados dos resíduos de aminoácido 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 e 322

20 podem ser substituídos por um resíduo de aminoácido diferente, de tal modo que o anticorpo tem uma afinidade alterada por um ligando efetor mas retém a capacidade de ligação ao antígeno do anticorpo precursor. O ligando efetor para o qual a afinidade é alterada pode ser, por

25 exemplo, um receptor de Fc ou o componente C1 do complemento. Esta abordagem é descrita em mais detalhe nas Patentes U.S. N° 5,624,821 e 5,648,260, ambas por Winter et al.

Em outro exemplo, um ou mais aminoácidos selecionados dos

30 resíduos de aminoácidos 329, 331 e 322 podem ser substituídos por um resíduo de aminoácido diferente de tal modo que o anticorpo tem a ligação C1q alterada e/ou a citotoxicidade pendente de complemento (CDC) reduzida ou abolida. Esta abordagem é descrita em mais detalhe nas

35 Patentes U.S. N° 6,194,551 por Idusogie et al.

Em um outro exemplo, um ou mais resíduos de aminoácidos nas posições de aminoácidos 231 e 239 são alterados para,

deste modo, alterar a capacidade do anticorpo em fixar o complemento. Esta abordagem é melhor descrita na Publicação PCT WO 94/29351 por Bodmer et al.

Em ainda outro exemplo, a região Fc é modificada para
5 aumentar a capacidade do anticorpo em mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou para aumentar a afinidade do anticorpo por um receptor Fc γ modificando um ou mais aminoácidos nas seguintes posições: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255,
10 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430,
15 434, 435, 437, 438 ou 439. Esta abordagem é melhor descrita na Publicação PCT WO 00/42072 por Presta. Além disso, os sítios de ligação na IgG1 humana para Fc γ R1, Fc γ R2, Fc γ R3 e FcRn foram mapeados e as variantes com ligações melhoradas foram descritas (ver Shields, R.L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Mutações específicas nas posições 256, 290, 298, 333, 334 e 339 demonstram que melhoram a ligação a Fc γ R3. Além disso, as seguintes combinações de mutantes demonstraram que melhoram a ligação Fc γ R3: T256A/S298A, S298A/E333A,
20 S298A/K224A e S298A/E333A/K334A.

Em ainda outra modalidade, a glicosilação de um anticorpo é modificada. Por exemplo, pode-se fazer um anticorpo aglicosilado (isto é, o anticorpo não tem glicosilação). A glicosilação pode ser alterada, por exemplo, para
30 aumentar a afinidade do anticorpo pelo antígeno. Estas modificações de hidrato de carbono podem ser acompanhadas, por exemplo, pela alteração de um ou mais sítios de glicosilação na sequência de anticorpos. Por exemplo, podem ser feitas uma ou mais substituições de
35 aminoácidos, as quais resultam na eliminação de uma ou mais sítios de glicosilação da estrutura da região variável para, deste modo, eliminar a glicosilação

naquele sítio. Esta aglicosilação pode aumentar a afinidade do anticorpo para o antígeno. Esta abordagem é descrita em mais detalhe nas Patentes U.S. N° 5,714,350 e 6,350,861 por Co et al.

- 5 Adicionalmente ou alternativamente, pode-se fazer um anticorpo que tem uma tipo alterado de glicosilação, tal como um anticorpo hipofucosilado que tem quantidades reduzidas de resíduos fucosil ou um anticorpo que tem estruturas GlcNac de seccionamento aumentadas.
- 10 Demonstrou-se que estes padrões de glicosilação alterados alteram a capacidade ADCC dos anticorpos. Estas modificações de hidrato de carbono podem ser conseguidas, por exemplo, expressando o anticorpo em uma célula hospedeira com maquinaria de glicosilação alterada.
- 15 Células em maquinaria de glicosilação alterada foram descritas na técnica e podem ser utilizadas como células hospedeiras nas quais expressar anticorpos recombinantes da invenção para, deste modo, produzir anticorpos com glicosilação alterada. Por exemplo, as linhas celulares
- 20 Ms704, Ms705 e Ms709 não tem o gene fucosiltransferase, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferase), de tal modo que anticorpos expressos nas linhas celulares Ms704, Ms705 e Ms709 não têm fucose nos seus hidratos de carbono. As linhas celulares Ms704, Ms705 e Ms709 FUT8^{-/-} foram
- 25 criadas pela ruptura dirigida do gene FUT8 em células CHO/DG44 utilizando dois vetores de substituição (ver a Publicação de Patente U.S. N° 20040110704 por Yamane et al. e Yamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol Bioeng 87:614-22). Como outro exemplo, o documento EP 1 176 195
- 30 por Hanai et al. descreve uma linha celular com uma gene FUT8 de funcionalidade rompida que codifica uma fucosil transferase, de tal modo que anticorpos expressos neste tipo de linha celular exibem hipofucosilação reduzindo ou eliminando a relacionada à ligação alfa 1,6. Hanai et al.
- 35 também descreve linhas celulares que têm uma baixa atividade enzimática para adicionar fucose à N-acetilglucosamina que se liga à região Fc do anticorpo e

não tem atividade enzimática, por exemplo a linha celular de mieloma de rato YB2/0 (ATCC CRL 1662). A Publicação PCT WO 03/035835 por Presta descreve uma linha celular variante de células CHO, Lec13, com capacidade reduzida para ligar fucose a hidratos de carbono ligados a Asn(297), também resultando em hipofucosilação dos anticorpos expressos naquela célula hospedeira (ver também Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740). A Publicação PCT WO 99/54342 por Umana et al. Descreve linhas celulares produzidas para expressar glicosil transferases modificadoras de glicoproteína (por exemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferase III (GnTIII)) de tal modo que anticorpos expressos nas linhas celulares produzidas exibem estruturas GlcNac de seccionamento aumentadas que resulta na atividade ADCC aumentada dos anticorpos (ver também Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180). Alternativamente, os resíduos de fucose do anticorpo podem ser clivados utilizando uma enzima de fucosidase. Por exemplo, a fucosidase alfa-L-fucosidase remove resíduos de fucosil dos anticorpos (Tarentino, A.L. et al. (1975) Biochem. 14:5516-23).

Desfucosilação também pode ser obtida pela metodologia Potelligent™ descrita na Patente U.S. Nº 6,946,292 intitulada "Cells Producing Antibody Compositions with Increased Antibody Dependent Cytotoxic Activity" (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd, Tóquio, Japão). Por meio desta metodologia, utiliza-se uma células hospedeira fucosiltransferase-deficiente para a produção de um anticorpo que tem um nível aumentado de atividade de citotoxicidade celular (ADCC) dependente do anticorpo.

Uma abordagem alternativa para gerar anticorpos desfucosilados de acordo cm a presente invenção emprega a metodologia descrita por Zhu et al., "Production of Human Monoclonal Antibody in Eggs of Chimeric Chickens," Nature Biotech. 23:1159-1169 (2005). Por meio desta metodologia, anticorpos monoclonais totalmente funcionais são

expressos nas claras de ovos de galinhas quiméricas com rendimento de aproximadamente três miligramas por ovo [Origen Therapeutics, Burlingame, CA]. O anticorpo gerado desta maneira não tem o ácido

5 siálico terminal e resíduos de fucose e, consequentemente, têm citotoxicidade celular dependente do anticorpo até 100 vezes maior do que os anticorpos produzidos em culturas celulares de mamíferos

10 convencionais (por exemplo, células de ovário de hamster chinês). Tipicamente, os domínios variáveis do anticorpo da invenção são clonados em um sistema vetor (descrito em Zhu et al.), que é transfectado em uma célula estaminal embrionária de galinha e introduzido em um embrião de pinto, produzindo, deste modo, um reator de ave

15 quimérica.

Outra modificação dos anticorpos aqui, que é contemplada pela invenção é a peguilação. Um anticorpo pode ser peguilaado, por exemplo, para aumentar a meia-vida biológica (por exemplo, sérica) do anticorpo. Para

20 peguilar um anticorpo o anticorpo ou seu fragmento, tipicamente é feito reagir com polietileno glicol (PEG), tal como um éster ou aldeído reativo ou derivado de PEG, em condições onde um ou mais grupos PEG fica ligado ao anticorpo ou fragmento do anticorpo. Tipicamente, a

25 peguilação é realizada por meio de uma reação de acilação ou uma reação de alquilação com uma molécula PEG reativa (ou um polímero solúvel em água reativo análogo). Conforme aqui utilizado, o termo "polietileno glicol" pretende abranger qualquer das formas de PEG que foram

30 utilizadas para derivatizar outras proteínas, tais como mono (C1-C10) alcoxi- ou ariloxi-polietileno glicol ou polietileno glicol-maleimida. Em certas modalidades, o anticorpo a ser peguilaado é um anticorpo aglicosilado. Métodos para peguilar proteínas são conhecidos na técnica

35 e podem ser aplicados aos anticorpos da invenção. Ver por exemplo, os documentos EP 0 154 316 por Nishimura et al. e EP 0 401 384 por Ishikawa et al.

Propriedades Físicas do Anticorpo

Os anticorpos da presente invenção podem ser também caracterizados pelas várias propriedades físicas dos anticorpos BMP2/BMP4. Vários ensaios podem ser utilizados para detectar e/ou diferenciar classes diferentes de anticorpos com base nestas propriedades físicas.

Em algumas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem conter um ou mais sítios de glicosilação tanto na região variável leve como na pesada. A presença de um ou mais sítios de glicosilação na região variável pode resultar em imunogenicidade aumentada do anticorpo ou uma alteração do pK do anticorpo devido a ligação ao antígeno alterado (Marshall et al (1972) Annu Rev Biochem 41:673-702; Gala FA e Morrison SL (2004) J Immunol 172:5489-94; Wallick et al (1988) J Exp Med 168:1099-109; Spiro RG (2002) Glycobiology 12:43R-56R; Parekh et al (1985) Nature 316:452-7; Mimura et al. (2000) Mol Immunol 37:697-706). Sabe-se que a glicosilação ocorre em motivos contendo uma seqüência N-X-S/T. A glicosilação da região variável pode ser testada usando um ensaio Glycoblott, que cliva o anticorpo para produzir um Fab e depois testes para glicosilação utilizando um ensaio que mede oxidação por periodato e formação de base Schiff. Alternativamente, a glicosilação da região variável pode ser testada usando cromatografia leve Dionex (Dionex-LC) que cliva sacarídeos de um Fab em monossacarídeos e analisa o teor do sacarídeo individual. Em alguns casos, é preferido um anticorpo anti-CD19 que não contém glicosilação da região variável. Isto pode ser conseguido selecionado anticorpos que não contêm o motivo de glicosilação na região variável ou pela mutação dos resíduos no motivo de glicosilação utilizando métodos padrão conhecidas na técnica.

Em uma modalidade preferida, os anticorpos da presente invenção não contêm sítios de isomerização de asparagina. Uma desamidação ou efeito do ácido isoaspártico pode ocorrer nas seqüências N-G ou D-G, respectivamente. A

desamidação ou efeito do ácido isoaspártico resulta na criação de ácido isoaspártico que diminui a estabilidade de um anticorpo criando uma estrutura torcida fora de um terminal carboxi de cadeia lateral em vez da cadeia principal. A criação de ácido isoaspártico pode ser medida utilizando um ensaio iso-quant, que utiliza uma HPLC de fase reversa para testar quando ao ácido isoaspático.

Cada anticorpo terá um ponto isoelétrico (pI) único, mas, em geral, os anticorpos se enquadram na faixa de pH entre 6 e 9,5. O pI para um anticorpo IgG1 tipicamente se enquadram na faixa de pH de 7-9,5 e o pI para um anticorpo IgG4 tipicamente se enquadra na faixa de pH de 6-8. Anticorpos podem ter um pI que seja fora desta faixa. Embora os efeitos sejam em geral desconhecidos, há especulações de que anticorpos com um pI fora da faixa normal têm algum desdobramento e instabilidade em condições in vivo. O ponto isoelétrico pode ser testado utilizando um ensaio de focagem isoelétrica capilar que cria um gradiente de pH e pode utilizar focagem a laser para uma precisão aumentada (Janini et al (2002) Electrophoresis 23:1605-11; Ma et al. (2001) Chromatographia 53:S75-89; Hunt et al (1998) J Chromatogr A 800:355-67). Em alguns casos, é preferido ter um anticorpo anti-CD19 que contenha um valor de pI que se enquadra na faixa normal. Isto pode ser conseguido pela seleção de anticorpos com um pI na faixa normal ou por mutação de resíduos de superfície carregadas utilizando métodos padrão conhecidos na técnica.

Cada anticorpo terá uma temperatura de fusão que é indicativa da estabilidade térmica (Krishnamurthy R e Manning MC (2002) Curr Pharm Biotechnol 3:361-71). Uma estabilidade térmica mais alta indica uma maior estabilidade do anticorpo in vivo como um todo. O ponto de fusão de um anticorpo pode ser medido utilizando técnicas tais como calorimetria diferencial de varredura (Chen et al (2003) Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando et al

(1999) Immunol Lett 68:47-52). T_{M1} indica a temperatura do desdobramento inicial do anticorpo. T_{M2} indica a temperatura do completo desdobramento do anticorpo. De um modo geral, é preferido que a T_{M1} de um anticorpo da
 5 presente invenção seja superior a 60 °C, preferencialmente superior a 65°C, ainda mais preferencialmente superior a 70 °C. Alternativamente, a estabilidade térmica de uma anticorpo pode ser medida utilizando dicroísmo (Murray et al. (2002) J. Chromatogr
 10 Sci 40:343-9).

Em uma modalidade preferida, são selecionados anticorpos que se degradam rapidamente. A fragmentação de uma anticorpo anti-CD19 pode ser medida utilizando eletroforese capilar (CE) e MALDI-MS, como é entendido na
 15 técnica (Alexander AJ e Hughes DE (1995) Anal Chem 67:3626-32).

Em uma outra modalidade preferida são selecionados anticorpos que têm efeitos mínimos de agregação. A agregação pode levar ao desencadeamento de uma resposta
 20 imune indesejada e/ou alterada ou propriedades farmacocinéticas desfavoráveis. De um modo geral, os anticorpos são aceitáveis com agregação de 25% ou menos, preferencialmente 20% ou menos, ainda mais preferencialmente 15% ou menos, ainda mais
 25 preferencialmente 10% ou menos e ainda mais preferencialmente 5% ou menos. A agregação pode ser medida por vários métodos conhecidas na técnica, incluindo cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em coluna de exclusão por tamanho (SEC) e difusão da luz
 30 para identificar monômeros, dímeros, trímeros ou multímeros.

Métodos para Produzir Anticorpos

Conforme discutido acima, os anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1 e/ou anti-
 35 BMPR2 que têm as seqüências V_H e V_K aqui descritas podem ser utilizados para criar novos anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1 e/ou

anti-BMPR2 por meio da modificação das seqüências V_H e/ou V_K ou da(s) região(ões) constante(s) ligada(s) ao mesmo. Deste modo, em um outro aspecto da invenção, as características estruturais de um anticorpo anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1 e/ou anti-BMPR2 da invenção são utilizadas para criar anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 estruturalmente relacionados que retêm pelo menos uma propriedade funcional da invenção, tal como a ligação específica a BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACR1, e/ou BMPR2 humanas. Por exemplo, uma ou mais regiões CDR de um anticorpo anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 da invenção ou suas mutações podem ser combinadas de forma recombinante com regiões de estrutura conhecidas e/ou outras CDRs para criar anticorpos adicional, produzidos de forma recombinante, da presente invenção, conforme discutido acima.

Outros tipos de modificações incluem aquelas descritas na seção anterior. O material de partida para o método de produção é uma ou mais das seqüências V_H e/ou V_K aqui proporcionadas ou uma ou mais das suas regiões CDR. Para criar o anticorpo produzido, não é necessário de fato preparar (isto é, expressar uma proteína) um anticorpo tendo uma ou mais seqüências V_H e/ou V_K aqui proporcionadas ou uma ou mais das suas regiões CDR. Mais precisamente, a informação contida na(s) seqüência(s) é utilizada como o material de partida para criar uma seqüência de "segunda geração" derivada da(s) seqüência(s) original(ais) e depois a(s) seqüência(s) de "segunda geração" é(são) preparada(s) e expressa(s) como uma proteína.

Em concordância, em uma outra modalidade, a invenção proporciona um método para preparar um anticorpo anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2. Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um método para preparar um anticorpo anti-

BMP2/BMP4 compreendendo:

(a) proporcionar: (i) uma seqüência de anticorpo de região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência CDR1 selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 13, 14 e 15, uma seqüência CDR2 selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 16, 17 e 18, e/ou uma seqüência CDR3 selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 19, 20 e 21; e/ou (ii) uma seqüência de anticorpo de região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüência CDR1 selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 22, 23 e 24, uma seqüência CDR2 selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 25, 26 e 27, e/ou uma seqüência CDR3 selecionada do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 28, 29 e 30;

(b) alterar pelo menos um resíduo de aminoácido na seqüência de anticorpo de região variável de cadeia pesada e/ou seqüência de anticorpo de região variável de cadeia leve para criar pelo menos uma seqüência de anticorpo alterado; e

(c) expressar a uma seqüência de anticorpo alterado como uma proteína.

Pode-se utilizar técnicas convencionais de biologia molecular para preparar e expressar a seqüência de anticorpo alterado.

Tipicamente, o anticorpo codificado pela(s) seqüência(s) de anticorpo alterado (s) é um que retém uma, algumas ou todas das propriedades funcionais de um ou mais anticorpos aqui descritos, cujas propriedades funcionais incluem, mas não são limitadas à ligação específica a BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2.

As propriedades funcionais dos anticorpos alterados podem ser expressas utilizando ensaios convencionais disponíveis na técnica e/ou aqui descritos, tais como aqueles apresentados nos Exemplos (por exemplo, citometria de fluxo, ensaios de ligação).

Em certas modalidades dos métodos de produzir anticorpos da invenção, pode-se introduzir mutações aleatoriamente

ou seletivamente ao longo de toda ou parte de uma sequência de codificação de anticorpo anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 e os anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 resultantes modificados podem ser rastreados quanto à atividade de ligação e/ou outras propriedades funcionais conforme aqui descrito. Métodos mutacionais foram descritos na técnica. Por exemplo a Publicação PCT WO 02/092780 por Short descreve métodos para criar e rastrear mutações de anticorpos utilizando mutagênese de saturação, montagem de ligação sintética ou uma combinação destes. Alternativamente, a Publicação PCT WO 03/074679 por Lazar et al. descreve métodos para utilização de métodos de rastreio computacionais para otimizar as propriedades físico-químicas dos anticorpos.

Moléculas de Ácido Nucléico que Codificam os Anticorpos da Invenção

Outro aspecto da invenção pertence a moléculas de ácido nucléico que codificam os anticorpos da invenção. Os ácidos nucléicos podem estar presentes em células inteiras, em um lisato de célula ou em uma forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. Um ácido nucléico é "isolado" ou "tornado substancialmente puro" quando purificado distante de outros componentes celulares ou outros contaminantes, por exemplos, ácidos nucléicos celulares ou proteínas, por meio de técnicas convencionais, incluindo tratamento alcalino/SDS, bandejamento por CsCl, cromatografia em coluna, eletroforese em gel de agarose e outros conhecidos na técnica. Ver, F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing e Wiley Interscience, Nova Iorque. Um ácido nucléico da invenção pode ser, por exemplo ADN ou ARN e pode ou não conter sequências intrônicas. Em uma modalidade preferida o ácido nucléico é uma molécula de cADN. Os ácidos nucléicos da invenção podem ser obtidos

utilizando técnicas convencionais de biologia molecular. Para os anticorpos expressos por hibridomas (por exemplo hibridomas preparados a partir de camundongos transgênicos portadores de genes de imunoglobulina humana
5 conforme descrito adiante), cADNs que codificam as cadeias leve e pesada do anticorpo feitas pelo hibridoma podem ser obtidos por técnicas convencionais de amplificação por PCR ou clonagem de cADN. Ácidos
10 nucléicos que codificam anticorpos obtidos a partir de biblioteca de gene de imunoglobulina (por exemplo, utilizando técnicas de apresentação sobre a superfície de fagos) podem ser recuperados. Moléculas de ácidos nucléicos exemplificativas da invenção são aquelas que codificam as seqüências VH e VL dos anticorpos
15 monoclonais anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 aqui apresentados. As moléculas de ácidos nucléicos preferidas da invenção são aquelas que codificam as seqüências V_H e V_L dos anticorpos monoclonais 6H4, 11F2 e 12E3. As seqüências de
20 ADN que codificam as seqüências V_H de 6H4, 11F2 e 12E3 estão apresentadas SEQ ID NOs: 37, 38 e 39, respectivamente. As seqüências de ADN que codificam as seqüências V_L de 6H4, 11F2 e 12E3 estão apresentadas nas SEQ ID NOs: 40, 41 e 42, respectivamente.
25 Outros ácidos nucléicos preferidos da invenção são os ácidos nucléicos que têm pelo menos 80% de identidade de seqüência, tal como pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de seqüência com uma das seqüência apresentadas nas SEQ
30 ID NO: 37, 38, 39, 40, 41, ou 42, cujos pelo menos codificam um anticorpo da invenção ou uma porção de ligação ao se antígeno. A percentagem de identidade entre duas seqüências de ácido nucléico é o número de posições na seqüência onde o
35 nucleotídeo é idêntico, levando em consideração o número de espaços e o comprimento de cada espaço, que necessitam ser introduzidos para o alinhamento ótimo das duas

seqüências. A comparação de seqüências e a determinação da percentagem de identidade entre duas seqüências pode ser conseguida utilizando um algoritmo matemático, tal como o algoritmo de Meyers e Miller ou o programa XBLAST
5 de Altschul acima descrito.

Além disso, os ácidos nucleicos preferidos da invenção compreendem uma ou mais porções de codificação de CDR das seqüências de ácido nucleico apresentadas nas SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41 e 42. Nesta modalidade, o ácido
10 nucleico pode codificar a seqüência CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de cadeia pesada de 6H4, 11F2 e 12E3 ou a seqüência CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de 6H4, 11F2 e 12E3 de cadeia leve.

Os ácidos nucleicos que têm pelo menos 80%, tal como pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo
15 menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de seqüência, tal como um porção de codificação de CDR das SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41, ou 42 são também ácidos nucleicos preferidos da invenção. Estes ácidos nucleicos podem diferir das porções correspondentes das SEQ ID NO: 37,
20 38, 39, 40, 41, ou 42 em uma região de codificação não-CDR e/ou em uma região de codificação de CDR. Onde a diferença é em uma região de codificação de CDR a região CDR do ácido nucleico codificada pelo ácido nucleico tipicamente compreende uma ou mais modificações de
25 seqüência conservadora conforme aqui definido em comparação com a seqüência CDR correspondente de 6H4, 11F2 e 12E3.

Uma vez obtidos os segmentos V_H e V_L de codificação dos fragmentos de ADN, estes fragmentos de ADN podem ser
30 adicionalmente manipulados por meio de técnicas convencionais de ADN recombinante, por exemplo, para converter os genes da região variável em genes de cadeia de anticorpos de comprimento total, em genes de fragmento Fab em um gene scFv. Nestas manipulações um fragmento de
35 ADN que codifica V_L - ou V_H - é operativamente ligado a outro fragmento de ADN que codifica outra proteína, tal como uma região constante do anticorpo ou um ligante

flexível. O termo "operativamente ligado", conforme utilizado neste contexto, pretende significar que os dois fragmentos de ADN são unidos de tal modo que as seqüências de aminoácidos codificadas pelo dois
5 fragmentos de ADN permanecem in-frame.

O ADN isolado que codifica a região V_H pode ser convertido em um gene de cadeia pesada de comprimento total ligando operativamente o ADN que codifica a V_H a outra molécula de ADN que codifica regiões constantes de
10 cadeia pesada (CH1, CH2 e CH3). As seqüências de genes humanos de região constante de cadeia pesada são conhecidas na técnica (ver, por exemplo, Kabat, E. A., et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human
15 Services, NIH Publication N° 91-3242, 1991) e os fragmentos de ADN que abrangem estas regiões podem ser obtidos por meio de amplificação por PCR convencional. A região constante de cadeia pesada pode ser uma região constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM ou
20 IgD, mas, mais tipicamente, é uma região constante de uma IgG1 ou IgG4. Para um gene de cadeia pesada de fragmento Fab, o operativamente o ADN que codifica a V_H pode ser operativamente ligado a outra molécula de ADN que codifica apenas a região constante CH1 de cadeia pesada.
25 O ADN isolado que codifica a região V_L pode ser convertido em um gene de cadeia leve de comprimento total (bem como um gene de cadeia leve Fab) ligando operativamente o ADN que codifica a V_L a outra molécula de ADN que codifica a região constante de cadeia leve,
30 C_L . As seqüências de genes humanos da região constante de cadeia leve são conhecidas na técnica (ver, por exemplo, Kabat, E. A., et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication N° 91-3242,
35 1991) e os fragmentos de ADN que abrangem estas regiões podem ser obtidos por meio de amplificação por PCR convencional. A região constante de cadeia leve pode ser

uma região constante kappa ou lambda, mas, mais tipicamente, é uma região constante kappa.

Para criar um gene scFv, os fragmentos de ADN que codificam V_H e V_L são ligados operativamente a outro
5 fragmento que codifica um ligante flexível, por exemplo, codificando a sequência de aminoácidos $(Gly_4 - Ser)_3$, de tal modo que as sequências V_H e V_L possam ser expressas como uma proteína de cadeia simples contígua, com as regiões V_H e V_L unidas pelo ligante flexível (ver, por
10 exemplo, Bird et al. Science 242:423-426 (1988); Huston et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); e McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990)).

Produção dos Anticorpos Monoclonais da Invenção

Os anticorpos monoclonais (mAbs) da presente invenção
15 podem ser produzidos por uma variedade de técnicas, incluindo metodologia de anticorpo monoclonal convencional, por exemplo a técnica de hibridação somática padrão de Kohler e Milstein Nature 256:495 (1975). Embora os procedimentos de hibridação de células
20 somática seja preferido, em princípio, outras técnicas para produzir anticorpo monoclonal podem ser utilizadas, por exemplo, transformação viral ou oncogênica de linfócitos B.

O sistema animal preferido para preparar hibridomas é o
25 sistema murino. A produção de hibridoma em um camundongo é um procedimento bem estabelecido. Os protocolos e técnicas de imunização para o isolamento de esplenócitos imunizados para fusão são conhecidos na técnica. Os parceiros de fusão (por exemplo, células de mieloma
30 murino) e os procedimentos de fusão também são conhecidos.

Os anticorpos quiméricos ou humanizados da presente invenção podem ser preparados com base na sequência de um anticorpo monoclonal murino preparado conforme descrito
35 acima. O ADN que codifica as imunoglobulinas de cadeia pesada e leve podem ser obtidos do hibridoma murino de interesse e produzidos para conter sequências de

imunoglobulina não murina (por exemplo, humana) utilizando técnicas convencionais de biologia molecular. Por exemplo, para criar um anticorpo quimérico, as regiões variáveis murinas podem ser ligadas às regiões constantes humanas utilizando métodos conhecidos na técnica (ver, por exemplo, a Patente U.S. Nº 4,816,567 de Cabilly et al.). Para criar um anticorpo humanizado, as regiões CDR murinas podem ser inseridas em uma estrutura humana utilizando métodos conhecidos na técnica (ver, por exemplo, a Patente U.S. Nº 5,225,539 de Winter e as Patentes U.S. Nº 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 e 6,180,370 de Queen et al.).

Em uma modalidade preferida, os anticorpos da invenção são anticorpos monoclonais humanos. Estes anticorpos monoclonais humanos dirigidos contra BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 podem ser gerados utilizando camundongos transgênicos ou transcromossômicos portadores de partes do sistema imunológico humano em vez do sistema de camundongo. Estes camundongos transgênicos ou transcromossômicos incluem camundongos aqui referidos como o camundongo HuMAb® e o camundongo KM®, respectivamente e são coletivamente aqui referidos como "camundongos Ig humanos".

O camundongo HuMAb® (Medarex, Inc.) contém o miniloci do gene da imunoglobulina humana que codifica seqüências de imunoglobulina de cadeia pesada (κ e λ) e κ cadeia leve não rearranjadas humanas, juntamente com mutações dirigidas que desativam o loci da cadeia κ e λ endógeno (ver, por exemplo, Lonberg, et al. Nature 368(6474):856-859 (1994)). Em concordância, o camundongo exibe expressão reduzida de IgM ou κ de camundongo e em resposta a imunização, os transgenes de cadeia pesada e leve humanos introduzidos são submetidos a troca de classe e mutação somática para gerar IgG κ monoclonal humano de alta afinidade (Lonberg et al., supra; revisto em Lonberg Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101 (1994); Lonberg e Huszar Intern. Rev. Immunol. 13:65-

93 (1995) e Harding e Lonberg Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546 (1995)). A preparação e a utilização dos camundongos HuMab e as modificações genômicas portadas por este camundongo são melhor descritas em Taylor, et al. Nucleic Acids Research 20:6287-6295 (1992); Chen et al. International Immunology 5:647-656 (1993); Tuaillon et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724 (1995); Choi et al. Nature Genetics 4:117-123 (1993); Chen et al. EMBO J. 12:821-830 (1993); Tuaillon et al. J. Immunol. 152:2912-2920 (1994); Taylor et al. International Immunology 6:579-591 (1994); e Fishwild et al. Nature Biotechnology 14:845-851 (1996), cujos teores são aqui especificamente incorporados por citação na sua totalidade. Ver também as Patentes U.S. N° 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; e 5,770,429; todas de Lonberg e Kay; a Patente U.S. N° 5,545,807 de Surani et al.; as Publicações PCT N° WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 e WO 99/45962, todas de Lonberg e Kay; e a Publicação PCT N° WO 01/14424 de Korman et al.

Em uma modalidade relacionada, os camundongos portadores de genes de imunoglobulina humana podem ser imunizados. Por exemplo, os camundongos portadores de apenas uma região V de um gene de imunoglobulina humana. A imunização destes animais resultará em anticorpos quiméricos.

Em uma outra modalidade, os anticorpos humanos da invenção podem ser produzidos utilizando um camundongo que porta seqüências de imunoglobulina humana em transgenes ou transcromossomas, tal como um camundongo que porta um transgene humano de cadeia pesada e um transcromossoma humano de cadeia leve. Estes camundongos aqui referidos como o "camundongo KM[®]", são descritos em detalhe na Publicação PCT WO 02/43478 de Ishida et al.

Além disso, sistemas animais transgênicos alternativos que expressam genes de imunoglobulina humana estão

disponíveis na técnica e podem ser utilizados para produzir os anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2 da invenção. Por exemplo, pode-se utilizar um sistema transgênico alternativo referido como Xenomouse (Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA); estes camundongos estão descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. N° 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 e 6,162,963 de Kucherlapati et al. Além disso, sistemas animais transcromossômicos que expressam genes de imunoglobulina humana estão disponíveis na técnica e podem ser utilizados para produzir os anticorpos da invenção. Por exemplo, pode-se utilizar camundongos portadores tanto de um transcromossoma humano de cadeia pesada como um transcromossoma humano de cadeia leve, referido como "camundongo TC"; estes camundongos são descritos em Tomizuka et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 97:722-727 (2000). Como outro exemplo, vacas portadoras de transcromossoma humano de cadeia pesada e leve foram descritas na técnica (Kuroiwa et al. Nature Biotechnology 20:889-894 (2002)) e podem ser utilizadas para produzir os anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2 da invenção. Além disso, pode-se utilizar métodos de ADN conhecidos na técnica (com ou sem proteína relacionada a BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 purificada ou células que expressam BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2) para gerar uma resposta imune ao imunogênio codificado (para análise, ver Donnelly et al., 1997, Ann. Rev. Immunol. 15: 617-648, cujos teores são aqui especificamente incorporados por citação na sua totalidade). Em concordância, a presente invenção também inclui imunização com ADN com um gene BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 ou uma porção do mesmo. Os anticorpos monoclonais humanos da invenção também podem ser preparados utilizando métodos de apresentação em fagos para rastreamento de bibliotecas de genes de

imunoglobulina humana. Estes métodos de apresentação em fagos para isolar anticorpos humanos são estabelecidos na técnica. Ver, por exemplo: Patentes U.S. N° 5,223,409; 5,403,484; e 5,571,698 de Ladner et al.; Patente U.S. N° 5,427,908 e 5,580,717 de Dower et al.; Patentes U.S. N° 5,969,108 e 6,172,197 de McCafferty et al.; e Patentes U.S. N° 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 e 6,593,081 de Griffiths et al.

Os anticorpos monoclonais humanos da invenção também podem ser preparados utilizando camundongos SCID nos quais células imunes humanas foram reconstituídas de tal modo que uma resposta ao anticorpo humano pode ser gerada por imunização. Estes camundongos são descritos, por exemplo nas Patentes U.S. N° 5,476,996 e 5,698,767 e Wilson et al.

Os anticorpos de acordo com a presente invenção também podem ser produzidos pelas metodologias LEX System™ e Plantibodies™ [Biolex, Inc., Pittsboro, NC] onde o anticorpo da invenção é produzido em plantas transgênicas. Ver a Patente U.S. N° 6,852,319, recentemente publicada, intitulada "Method of Use of Transgenic Plant Expressed Antibodies". O LEX System™ combina as características naturais da pequena planta aquática Lemnaceae, com métodos de engenharia genética e recuperação de proteína para criar uma tecnologia de desenvolvimento e produção que, dependendo da aplicação precisa contemplada, podem proporcionar certas vantagens em relação a sistemas existentes de cultura de células e expressão transgênica. Ver a Patente U.S. N° 6,040,498, intitulada "Genetically Engineered Duckweed" e o Pedido de Publicação de Patente PCT N° WO 99/07210 (que revela métodos de transformação e seleção, métodos de regeneração de plantas transgênicas, métodos de crescimento e recuperação, utilização de genes e vetores múltiplos e tecidos e plantas transformados); o Pedido de Publicação de Patente PCT N° WO 02/10414, intitulado "Expression of Biologically Active Polypeptides in

Duckweed" (que revela métodos e composições para expressão, métodos e composições para recuperação, métodos para níveis de expressão aumentados e métodos para secreção dirigida); o Pedido de Publicação de Patente PCT N° WO 02/097029 intitulado "Plate and Method for High Throughput Screening"; o Pedido de Publicação de Patente PCT WO 02/097433, intitulado "Use of Duckweed in High Throughput Screening"; e a Patente U.S. N° 6,680,200, intitulada "LED Array for Illuminating Cell Well Plates e Automated Rack System for Handling the Same". A metodologia Plantibodies™ para a expressão e anticorpos humanos e outros em plantas é revelada nas Patentes U.S. N° 6,417,429; 5,202,422; 5,639,947; 5,959,177; e 6,417,429. Cada uma destas patentes e pedidos de patente são aqui integralmente incorporadas por citação.

Imunização de Camundongos com Ig Humana

Quando camundongos Ig são utilizados para produzir os anticorpos humanos, estes camundongos podem ser imunizados com os anticorpos BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 da invenção os anticorpos BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 da invenção os anticorpos BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 da invenção que expressam linha celular, uma preparação purificada ou enriquecida de antígeno BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 e/ou BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1 e/ou BMPR2 recombinante, ou uma proteína de fusão BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2, conforme descrito por Lonberg et al. Nature 368(6474):856-859 (1994); Fishwild et al. Nature Biotechnology 14:845-851 (1996); e Publicações PCT WO 98/24884 e WO 01/14424. Tipicamente, os camundongos terão 6-16 semanas de idade na primeira imunização. Por exemplo, uma preparação purificada ou recombinante (5-50 µg) de antígeno pode ser utilizada para imunizar o camundongo Ig humano por via intraperitoneal.

Procedimentos detalhados para gerar anticorpos

monoclonais totalmente humanos para BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 são descritos no Exemplo 1 adiante. Experiência cumulativa com vários antígenos demonstrou que os camundongos transgênicos respondem quando inicialmente imunizados por via intraperitoneal (IP) com antígeno em adjuvante completo de Freund, seguido por imunizações IP em semanas alternadas até um total de 6) com antígeno em adjuvante completo de Freund. No entanto, constatou-se que adjuvantes que não sejam de Freund também são eficazes. Além disso, constatou-se que células inteiras na ausência de adjuvante são altamente imunogênicas. A resposta imune pode ser monitorizada ao longo do transcurso do protocolo de imunização com amostras de plasma sendo obtidas, por exemplo, por sangramentos retro-orbitais. O plasma pode ser rastreado por ELISA e os camundongos com titulações suficientes de imunoglobulina humana podem ser utilizados para fusões (conforme descrito no Exemplo 1). Os camundongos podem ser reforçados por via intravenosa com o antígeno 3 dias antes do sacrifício e remoção do baço. Espera-se que seja necessário realizar 2-3 fusões para cada imunização. Entre 6 e 24 camundongos são tipicamente imunizados para cada antígeno. Habitualmente, são utilizadas tanto as estirpes HCo7 como HCo12. A geração de estirpes de camundongos da estirpe HCo7 e HCo12 é descrita na Patente U.S. N° 5,770,429 e Exemplo 2 da Publicação PCT WO 01/09187, respectivamente. Além disso, tanto o transgene HCo7 como HCo12 podem ser gerados juntos em um único camundongo com dois transgenes diferentes de cadeia pesada humana (HCo7/HCo12). Alternativamente ou adicionalmente, pode-se utilizar a estirpe do camundongo KM®, conforme descrito na Publicação PCT Publication WO 02/43478.

Geração de Hibridomas que Produzem os Anticorpos Monoclonais Humanos da Invenção

Para geral hibridomas que produzem os anticorpos

monoclonais humanos da invenção, esplenócitos e/ou gânglios linfáticas de camundongos imunizados podem ser isolados e fundidos a uma linha celular imortalizada apropriada, tal como uma linha celular de mieloma de camundongo. Os hibridomas resultantes podem ser rastreados quando à produção de anticorpos antígeno-específicos. Por exemplo, suspensões de célula única de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados podem ser fundidas a um sexto do número células de mieloma (ATCC, CRL 1580) de camundongo não secretoras de P3X63-Ag8.653 com 50% de PEG. Alternativamente, as suspensões de célula única de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados podem ser fundidas utilizando um método de eletrofusão com base em campo elétrico usando um eletroporador Cyto Pulse de fusão de células de câmara grande (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). As células são plaqueadas em 2×10^5 em placas de microtitulação de fundo plano seguido por uma semana de incubação em meio DMEM de alta concentração de glicose com L-glutamina e piruvato de sódio (Mediatech, Inc., Herndon, VA) e contendo também 20% de Soro fetal Bovino (Hyclone, Logan, UT), 18% de meios condicionais P388DI, 5% de fator de clonagem Origen Hybridoma (BioVeris, Gaithersburg, VA), 4 mM de L-glutamina, 5 mM HEPES, 0,055 mM de β -mercaptoetanol, 50 unidades/mL de penicilina, 50 mg/mL de estreptomicina e 1X meio contendo Hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) (Sigma; o HAT é adicionado 24 horas depois da fusão). Depois de uma semana, as células cultivadas em meio no qual foi utilizado HAT foi substituído por HT. Poços individuais podem então ser rastreados por ELISA quanto a anticorpos IgM ou IgG monoclonais humanos. O crescimento do hibridoma pode ser observado, em geral, depois de 10-14 dias. Os hibridomas que segregam anticorpos podem ser replaqueados uma vez mais e se ainda der resultado positivo para IgG humana, os anticorpos monoclonais podem ser subclonados pelo menos duas vezes por diluição limitadora. Os subclones

estáveis podem, então, ser cultivados in vitro para gerar pequenas quantidades de anticorpo em meio de cultura de tecido para caracterização.

Para purificar os anticorpos monoclonais humanos, 5 hibridomas selecionados podem ser desenvolvidos em frascos spinner de dois litros para a purificação dos anticorpos monoclonais. Os sobrenadantes podem ser filtrados antes da cromatografia de afinidade com proteína A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). A IgG 10 eluída pode ser verificada por eletroforese em gel e cromatografia líquida de alto desempenho para assegurar pureza. A solução tampão pode ser trocada por PBS e a concentração pode ser determinada por OD280 utilizando coeficiente de extinção de 1,43. Os anticorpos 15 monoclonais pode ser divididos e armazenados a -80 °C.

Geração de Transfectomas que Produzem os Anticorpos Monoclonais Humanos da Invenção

Os anticorpos da invenção também podem ser produzidos em 20 um transfectoma em célula hospedeira utilizando, por exemplo, uma combinação de técnicas de ADN recombinante e métodos de transfecção de gene conforme é conhecido na técnica (por exemplo, Morrison Science 229:1202 (1985)). Por exemplo, para expressar anticorpos ou seus fragmentos 25 de anticorpos, pode-se obter ADNs que codificam cadeias leves e pesadas de comprimento parcial ou total por meio de técnicas convencionais de biologia molecular (por exemplo, amplificação por PCR ou clonagem de cADN utilizando um hibridoma que expressa o anticorpo de 30 interesse) e os ADNs podem ser inseridos nos vetores de expressão de tal modo que os genes são operativamente ligados a seqüências de controlo transcricionais e translacionais. Nestes contexto, o termo "operativamente 35 ligado" pretende significar que um gene de anticorpo é ligado a um vetor de tal modo que as seqüências de controlo transcricionais e translacionais no vetor servem a sua função pretendida de regular a transcrição e a

translação do gene do anticorpo. O vetor de expressão e as seqüências de controlo da expressão são selecionadas para serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão utilizada. O gene de cadeia leve do anticorpo e o gene de cadeia pesada do anticorpo podem ser inseridos em vetores separados ou, mais tipicamente, ambos os genes são inseridos no mesmo vetor de expressão. Os genes do anticorpo são inseridos no vetor de expressão por meio de métodos padrão (por exemplo, ligação de sítios de restrição complementares no fragmento do gene do anticorpo e ligação de vetor ou extremidade romba se não estiverem presentes sítios de restrição).

As regiões variáveis de cadeia leve e pesada dos anticorpos aqui descritos podem ser utilizadas para criar genes de anticorpos de comprimento total de qualquer isótopo de anticorpo pela inserção dos mesmos em vetores de expressão que já codificam a região constantes de cadeia pesa e a região constante de cadeia leve do isótopo desejado de tal modo que o segmento V_H seja operativamente ligado ao(s) segmento(s) C_H no vetor e o segmento V_K seja operativamente ligado ao segmento C_L no vetor. Adicionalmente ou alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode codificar um peptídeo sinal que facilita a secreção da cadeia do anticorpo de uma célula hospedeira. O gene da cadeia do anticorpo pode ser clonado no vetor de tal modo que o peptídeo sinal seja ligado in-frame ao terminal amino do gene da cadeia de anticorpo. O peptídeo sinal pode ser um peptídeo sinal de imunoglobulina ou um peptídeo sinal heterólogo (isto é, um peptídeo sinal de uma proteína não-imunoglobulina).

Além dos genes de cadeia de anticorpo e seqüências reguladoras, os vetores de expressão recombinante da invenção podem ter seqüências reguladoras que controlam a expressão dos genes de cadeia de anticorpo em uma célula hospedeira. O termo "seqüência reguladora" destina-se a incluir promotores, intensificadores e outros elementos de controlo (por exemplo, sinais de poliadenilação) que

controlam a transcrição ou translação dos genes de cadeia de anticorpo. Estas seqüências reguladoras são descritas, por exemplo em Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Será entendido pelos especialistas na técnica que a concepção do vetor de expressão, incluindo a seleção de seqüências reguladoras, podem depender de fatores tais como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão de proteína desejado, etc. As seqüências reguladoras preferidas para expressão de célula hospedeira de mamífero incluem elementos virais que dirigem altos nível de expressão de proteína em células de mamíferos, tais como promotores e/ou intensificadores derivados de citomagalovírus (CMV), Simian Vírus 40 (SV40), adenovírus, (por exemplo, o principal promotor de adenovírus tardio (AdMLP) e políoma. Alternativamente, podem ser utilizadas seqüências reguladoras não virais tais como o promotor de ubiquitina ou promotor de β -globina. Além disso ainda, os elementos reguladores compostos de seqüências de fontes diferentes, tais como o sistema promotor SR α que contém seqüências do promotor prematuro de SV40 e a repetição terminal longa de leucemia de células T humanas tipo 1 (Takebe et al., Mol. Cell. Biol. 8:466-472 (1988)).

Além dos genes de cadeia de anticorpo e seqüências reguladoras, os vetores de expressão recombinantes da invenção podem ter seqüências adicionais, tais como seqüências que regulam a replicação do vetor nas células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e genes marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita a seleção de células hospedeiras nas quais o vetor foi introduzido (ver, por exemplo, as Patentes U.S. N° 4,399,216, 4,634,665 e 5,179,017, todas por Axel et al.). Por exemplo, tipicamente, o gene marcador selecionável confere resistência a drogas, tais como G418, higromicina ou metotrexato, em uma célula hospedeira na qual o vetor foi introduzido. Os genes

marcadores selecionáveis preferidos incluem o gene di-hidrofolato redutase (DHFR) (para utilização em células hospedeiras dhfr- com seleção/amplificação de metotrexato) e o neo gene (para seleção de G418).

5 Para a expressão das cadeias leves e pesadas, o(s) vetor(es) de expressão que codificam as cadeias leves e pesadas é(são) transferido(s) para uma célula hospedeira por meio de técnicas padrão. As várias formas do termo "transfecção" destinam-se a abranger uma ampla variedade
10 de técnicas habitualmente utilizadas para a introdução de ADN exógeno em uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica, por exemplo, eletroporação, precipitação de cálcio-fosfato, transfecção DEAE-dextrano e outras. Embora seja teoricamente possível expressar os anticorpos
15 da invenção tanto em células procarióticas como eucarióticas, a expressão de anticorpos em células eucarióticas, e mais tipicamente em células hospedeiras de mamíferos, é a mais preferida porque estas células eucarióticas e, em particular as células de mamíferos,
20 são mais prováveis do que as células procarióticas de montar e segregar um anticorpos apropriadamente dobrado e imunologicamente ativo. A expressão procariótica de genes de anticorpos foi relatada como sendo ineficaz para a produção de altos rendimentos de anticorpo ativo (Boss e
25 Wood, Immunology Today 6:12-13 (1985)).

As células hospedeiras de mamíferos preferidas para expressar os anticorpos recombinantes da invenção incluem células de Ovário de Hamster Chinês (células CHO) (incluindo células CHO dhfr- descritas em Urlaub e
30 Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 77:4216-4220 (1980), usadas com um marcador selecionável DHFR, por exemplo como descrito em Kaufman e Sharp Mol. Biol. 159:601-621 (1982)), células de mieloma NSO, células COS e células SP2. Em particular, para utilização com células de
35 mieloma NSO, outro sistema de expressão preferido é o sistema de expressão de gene GS revelado nos documentos WO 87/04462, WO 89/01036 e EP 338,841. Quando vetores de

expressão recombinantes que codificam genes de anticorpos são introduzidos em células hospedeiras de mamíferos, os anticorpos são produzidos cultivando as células hospedeiras por um período de tempo suficiente para
 5 permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, mais tipicamente, a secreção do anticorpo no meio de cultura no qual as células hospedeiras se desenvolvem. Os anticorpos podem ser recuperados do meio de cultura utilizando métodos convencionais de purificação de
 10 proteína.

Caracterização de Ligação do Anticorpo ao Antígeno

Os anticorpo da invenção podem ser testados quanto à ligação a BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2, por exemplo, por, citometria de fluxo. Em resumo, células
 15 que expressam BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 são colhidas de fresco de frascos de cultura de tecido e é preparada uma suspensão de célula única. Suspensões de células que expressam BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 são manchadas com anticorpos
 20 primário diretamente ou depois de fixação com 1% de paraformaldeído em PBS com ou sem permeabilização. Aproximadamente um milhão de células são ressuspensas em PBS contendo 0,5% de BSA e 50-200 μ g/mL de anticorpo primário e incubadas em gelo por 30 minutos. As células
 25 são lavadas duas vezes com PBS contendo 0,1% de BSA, 0,01% de NaN_3 , ressuspensas em 100 μ L de 1:100 de IgG de cabra anti-humano-FITC conjugado diluído (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) e incubadas em gelo por mais 30 minutos. As células são de novo lavadas duas
 30 vezes, ressuspensas em 0,5 mL de tampão de lavagem e analisadas quanto a manchamento fluorescente em um citômetro FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA). Alternativamente, os anticorpos da invenção podem ser testados quanto à ligação a BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B,
 35 ACTR1, e/ou BMPR2 por ELISA padrão. Em resumo, as placas de microtitulação são revestidas com BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 purificada a 0,25 μ g/mL em PBS

e depois bloqueadas com 5% de albumina de soro bovino em PBS. São adicionadas diluições de anticorpo (por exemplo, diluições de plasma de camundongos imunizados com BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2) a cada poço e
5 incubadas por 1-2 horas a 37°C. As placas são lavadas com PBS/Tween e depois incubadas com reagente secundário (por exemplo, para anticorpos humanos, um reagente policlonal Fc-específico de IgG de cabra anti-humano) conjugado com uma fosfatase alcalina por 1 hora a 37 °C. Depois da
10 lavagem, as placas são desenvolvidas como substrato de pNPP (1 mg/mL) e analisadas em OD de 405-650. Tipicamente, os camundongos que desenvolvem as titulações mais altas serão usados para fusões.

Um ensaio ELISA, conforme descrito acima, também pode ser
15 utilizado para rastrear hibridomas que apresentam reatividade positiva com o imunogênio BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2. Os hibridomas que se ligam com alta avidéz a BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 são subclonados e também caracterizados. Um clone
20 de cada hibridoma que retém a reatividade das células progenitoras (por ELISA) podem ser selecionados para fazer um banco de células de 5-10 frascos armazenados a -140 °C e para purificação de anticorpo.

Para purificar anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-
25 BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2, hibridomas selecionados podem ser desenvolvidos em frascos spinner de dois litros para a purificação dos anticorpos monoclonais. Os sobrenadantes podem ser filtrados antes da cromatografia de afinidade com
30 proteína A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). A IgG eluída pode ser verificada por eletroforese em gel e cromatografia líquida de alto desempenho para assegurar pureza. A solução tampão pode ser trocada por PBS e a concentração pode ser determinada por OD₂₈₀ utilizando
35 coeficiente de extinção de 1,43. Os anticorpos monoclonais pode ser divididos e armazenados a -80° C. Para determinar se os anticorpos monoclonais anti-BMP2,

anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 selecionados ligam-se a epítomos únicos, cada anticorpo pode ser biotinilado utilizando reagentes disponíveis comercialmente (Pierce, Rockford, IL). Pode-se realizar estudos de competição utilizando anticorpos monoclonais não marcados e anticorpos monoclonais biotinilados podem ser realizados utilizando placas ELISA revestidas com BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACR1, e/ou BMPR2 conforme descrito acima. A ligação de mAb biotinilados pode ser detectada com uma sonda estreptavidina-fosfatase alcalina. Alternativamente, pode-se realizar estudos de competição utilizando anticorpos radiomarcados e anticorpos de competição não marcados podem ser detectados em uma análise de Scatchard, conforme melhor descrito nos Exemplos adiante.

Para determinar o isotipo de anticorpos purificados, pode-se realizar ELISAs de isotipo utilizando reagentes específicos para anticorpos de um isotipo em particular. Por exemplo, para determinar o isotipo de um anticorpo monoclonal humano, poços de placas de microtitulação podem ser revestidas com 1 µg/mL de uma imunoglobulina anti-humana de um dia para o outro a 4°C. Depois de bloqueio com 1% de BSA, as placas são feitas reagir com 1 µg/mL ou menos de anticorpo monoclonal de teste ou controles de isotipo purificado, à temperatura ambiente por um a duas horas. Os poços podem, então, serem feitos reagir com IgG1 humana ou sondas fosfatase alcalina conjugadas com IgM específica humana. As placas são desenvolvidas e analisadas conforme descrito acima.

IgGs humanos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 também podem ser testados quanto à reatividade com antígeno BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACR1, e/ou BMPR2 por Western blotting. Em resumo, BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACR1, e/ou BMPR2 podem ser preparados e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio. Depois da eletroforese, os antígenos separados são transferidos

para membranas de nitrocelulose, bloqueados com 10% de soro fetal bovino e sondados com os anticorpos monoclonais a serem testados. A ligação a IgG humana pode ser detectada utilizando fosfatase alcalina de IgG anti-
 5 humana e desenvolvida com comprimidos de substrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

Imunoconjugados

Em um outro aspecto, a presente invenção apresenta anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-
 10 BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2, ou um fragmento destes, conjugados a uma unidade terapêutica, tal como uma citotoxina, uma droga (por exemplo, um imunossupressor) ou uma radiotoxina. Estes conjugados são aqui referidos como "imunoconjugados". Imunoconjugados
 15 que incluem uma ou mais citotoxinas são referidos como as "imunotoxinas." Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que é prejudicial (por exemplo, mata) às células. Exemplos incluem taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina,
 20 etoposide, tenoposide, vincristina, vinblastina, colcicina, doxorubicina, daunorubicina, di-hidroxi antracenediona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotosterona, glucocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol e puomicina e seus
 25 análogos ou homólogos. Agentes terapêuticos também incluem, por exemplo, antimetabólitos (por exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por exemplo, mecloretamina, tiotepa, clorambucil, melfalan,
 30 carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por exemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (por exemplo,
 35 dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina e antramicina (AMC)) e agentes anti-mitóticos (por exemplo, vincristina e vinblastina).

Em certos aspectos da presente invenção são proporcionados conjugados compreendendo anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2, ou fragmentos destes, conjugados a uma
5 unidade terapêutica onde a unidade terapêutica é uma Ultra-potent Therapeutic (UPTTM; Medarex, Inc., Milpitas, CA) conforme revelado nas Patentes U.S. N° 6,1003,236 e 6,638,509 [que descrevem um conjugado de toxina onde a toxina (por exemplo, vinblastine, risina, toxina da
10 difteria, abrina, vinblastina hidrazida, metotrexato hidrazide, antraciclina, quelatos de índio e ítrio, quelatos de metal e antraciclina) é ligada por meio de um espaçador clivável compreendendo polietileno glicol e dipeptídeo a um resíduo, tal como em um anticorpo ou
15 fragmento deste]; Patente U.S. N° 6,989,452 e Pedidos de Patente U.S. N° 10/160,972, 10/161,234, 11/133,970, 11/134,685, 11/134,826, 11/224,580 e 11/398,854 [que descrevem agentes citotóxicos, pró-fármacos dissulfureto, pró-fármacos peptídil e ligantes, incluindo ligantes
20 químicos].

Outros exemplos preferidos de citotoxinas terapêuticas que podem ser conjugadas a um anticorpo da invenção incluem duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas e auristatinas e seus derivados. Um exemplo de um conjugado
25 de anticorpo de caliqueamicina está disponível comercialmente (Mylotarg®; American Home Products).

As citotoxinas podem ser conjugadas a anticorpos da invenção utilizando tecnologia de ligante conhecida na técnica. Exemplos de tipos de ligantes que foram
30 utilizadas para conjugar uma citotoxina a um anticorpo incluem, mas não se limitam a hidrazonas, tioéteres, ésteres, dissulfuretos e ligantes contendo peptídeo. Pode-se escolher um ligante que é, por exemplo, susceptível a clivagem por pH baixo no compartimento
35 lisosomal ou susceptível a clivagem por proteases, tais como proteases preferencialmente expressas em tecido tumoral tal como catepsinas (por exemplo catepsinas B, C,

D).

Exemplos de citotoxinas são descritos, por exemplo nas Patentes U.S. N° 6,989,452, 7,087,600, e 7,129,261, e no Pedido PCT N° PCT/US02/17210, PCT/US2005/017804, 5 PCT/US06/37793, PCT/US06/060050, PCT/US2006/060711, WO/2006/110476, e no Pedido de Patente U.S. N° 60/891,028, que são todos aqui incorporados por citação na sua totalidade. Para discussão adicional de tipos de citotoxinas, ligantes e métodos para conjugação de 10 agentes terapêuticos a anticorpos, ver também Saito, G. et al. (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail, P.A. et al. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, T.M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. e Kreitman, 15 R. J. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter, P.D. e Springer, C.J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264.

Os anticorpos da presente invenção também podem ser conjugados a um isótopo radioativo para gerar produtos 20 radiofarmacêuticos citotóxicos, também referidos como radioimunoconjugados. Exemplos de isótopos radioativos que podem ser conjugados a anticorpos para utilização em diagnósticos ou terapêutica incluem, mas não se limitam a iodo¹³¹, iodo¹²⁵, índio¹¹¹, ítrio⁹⁰ e lutécio¹⁷⁷. Métodos para 25 preparar radioimunoconjugados são estabelecidos na técnica. Exemplos de radioimunoconjugados estão disponíveis comercialmente, incluindo Zevalin™ (Biogen ® IDEC) e Bexxar™ (Glaxo-SmithKline) e ® (Corixa Pharmaceuticals), e métodos similares podem ser 30 utilizados para preparar radioimunoconjugados usando os anticorpos da invenção.

Os conjugados de anticorpos da invenção podem ser utilizados para modificar uma dada resposta biológica e a unidade de droga não deve ser interpretada como limitada 35 a agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a unidade de droga pode ser uma proteína ou peptídeo que possui uma atividade biológica desejada. Estas proteínas

podem incluir, por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa ou seu fragmento ativo, tal como abrina, ricina A, pseudomonas exotoxina ou toxina diftérica; Uma proteína tal como o fator de necrose tumoral ou interferon- γ ; ou, 5 modificadores da resposta biológica tais como, por exemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos ("GM-CSF"), fator estimulante de colônia de granulócitos ("G-CSF") ou outros fatores de crescimento. 10

As técnicas para conjugar estas unidades terapêuticas a anticorpos são conhecidas, ver, por exemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", em Monoclonal Antibodies e Cancer 15 Therapy pp. 243-56 (Reisfeld et al., eds., Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", em Controlled Drug Delivery pp. 623-53 (2nd Ed., Robinson et al., eds., Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer 20 Therapy: A Review", em Monoclonal Antibodies '84: Biological e Clinical Applications, pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results e Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", em Monoclonal Antibodies For Cancer Detection e 25 Therapy, pp. 303-16 (Academic Press 1985); e Thorpe et al., "The Preparation and Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62:119-58 (1982).

Moléculas Biespecíficas

30 Em um outro aspecto, a presente invenção apresenta moléculas biespecíficas compreendendo anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 ou fragmentos destes, da presente invenção. Este anticorpo ou porção de ligação ao seu 35 antígeno, pode ser derivatizado ou ligado a outra molécula funcional, por exemplo, outro peptídeo ou proteína (por exemplo, outro anticorpo ou ligando para um

receptor) para gerar uma molécula biespecífica que se liga a pelo menos dois sítios de ligação ou moléculas alvo diferentes. O anticorpo da invenção pode, na realidade, ser derivatizado ou ligado a mais de uma outra

5 molécula funcional para gerar moléculas multiespecíficas que se ligam a mais de dois sítios de ligação e/ou moléculas alvo diferentes; estas moléculas multiespecíficas também pretendem ser abrangidas pelo termo "molécula biespecífica", conforme aqui utilizado.

10 Para criar uma molécula biespecífica da invenção, um anticorpo da invenção pode ser ligado funcionalmente (por exemplo, por acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou outras) a uma ou mais moléculas de ligação, tal como outro anticorpo, fragmento

15 de anticorpo, peptídeo ou ligação mimética, de tal modo que resulte uma molécula biespecífica.

Em concordância, a presente invenção inclui moléculas biespecíficas compreendendo pelo menos uma primeiro especificidade de ligação para BMP2, BMP4, BMPR1A,

20 BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 e uma segunda especificidade de ligação para um segundo epítipo alvo. Em uma modalidade em particular da invenção, o segundo epítipo alvo é um receptor Fc, por exemplo, Fc γ RI (CD64) humano ou um receptor Fc α (CD89) humano. Portanto, a invenção inclui

25 moléculas biespecíficas capazes de se ligarem tanto a Fc γ R como Fc α R que expressam células efetoras (por exemplo monócitos, macrófagos ou células polimorfonucleares (PMNs)) e dirigir-se a células que expressam BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2. Estas moléculas

30 biespecíficas se dirigem a BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 que expressam células para célula efetora e desencadeiam atividades de célula efetora mediada pelo receptor Fc, tais como a fagocitose de uma célula que expressa BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1,

35 e/ou BMPR2, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), libertação de citoquina ou geração de ânion superóxido.

Em uma modalidade da invenção na qual a molécula biespecífica é multiespecífica, a molécula pode ainda incluir uma terceira especificidade de ligação, além da especificidade de ligação anti-Fc e uma especificidade de
5 ligação anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2. Em uma modalidade, a terceira especificidade de ligação é uma porção do fator de anti-intensificação (EF), por exemplo, uma molécula que se liga a uma proteína de superfície envolvida em
10 atividade citotóxica e, deste modo, aumenta a resposta imune contra a célula alvo. A "porção do fator de anti-intensificação" pode ser um anticorpo, fragmento de anticorpo funcional ou um ligando que se liga a uma dada molécula, por exemplo, um antígeno ou um receptor e,
15 deste modo resulta numa intensificação do efeito das determinantes de ligação para o receptor F_C ou antígeno da célula alvo. A "porção do fator de anti-intensificação" pode ligar um receptor F_C ou antígeno da célula alvo. Alternativamente, a porção do fator de anti-intensificação pode se ligar a uma entidade que é
20 diferente da entidade à qual se ligam a primeira e a segunda especificidade. Por exemplo, a porção do fator de anti-intensificação pode se ligar a uma célula T citotóxica (por exemplo por meio de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 ou outra célula imune que resulta numa
25 resposta imune aumentada contra a células alvo). Em uma modalidade, as moléculas biespecíficas da invenção compreendem como uma especificidade de ligação pelo menos um anticorpo ou um seu fragmento de anticorpo, incluindo,
30 por exemplo, um Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, dAb, ou um Fv de cadeia única. O anticorpo também pode ser um dímero de cadeia leve ou cadeia pesada ou qualquer fragmento mínimo deste, tal como um Fv ou uma cadeia única construída como descrito em Ladner et al., Patente U.S. N° 4,946,778 de
35 Ladner et al., cujo teor é expressamente incorporado por citação. Em uma outra modalidade, a especificidade de ligação para

um receptor Fc γ é proporcionada por um anticorpo monoclonal, cuja ligação não é bloqueada por imunoglobulina G humana (IgG). Conforme aqui utilizado, o termo "receptor IgG" se refere a qualquer um dos oito genes de cadeia γ localizados no cromossoma 1. Estes genes codificam um total de doze isoformas transmembrana ou receptor solúvel que são agrupados em três classes de receptor Fc γ : Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16). Numa modalidade preferida, o receptor Fc γ é um Fc γ RI humano de alta afinidade. O Fc γ RI humano é uma molécula 72 kDa que apresenta alta afinidade por IgG monomérica ($10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1}$).

A produção e caracterização de certos anticorpos monoclonais anti-Fc γ são descritas por Fanger et al. na Publicação PCT WO 88/00052 e na Patente U.S. N° 4,954,617 de Fanger et al., cujos ensinamentos são aqui integralmente incorporados por citação. Estes anticorpos se ligam a um epítipo de Fc γ RI, Fc γ RII ou Fc γ RIII num sítio que é distinto do sítio de ligação de Fc γ do receptor e, deste modo, a sua ligação não é substancialmente bloqueada por níveis fisiológicos de IgG. Os anticorpos anti-Fc γ RI específicos úteis nesta invenção são mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 e mAb 197. O hibridoma que produz o mAb 32 está disponível da American type Culture Collection, N° de Acesso ATCC HB9469. Em outras modalidades, o anticorpo para o receptor anti-Fc γ é uma forma humanizada do anticorpo monoclonal 22 (H22). A produção e caracterização do anticorpo H22 é descrita em Graziano et al. J. Immunol 155 (10):4996-5002 (1995) e na Publicação PCT WO 94/10332 de Tempest et al.. A linha celular que produz o anticorpo H22 foi depositada na American type Culture Collection sob a designação HA022CL1 e tem o N° de Acesso CRL 11177.

Em ainda outras modalidades, a especificidade de ligação para um receptor Fc é proporcionada por um anticorpo que se liga a um receptor IgA humano, por exemplo, um receptor Fc-alfa (Fc α RI (CD89)), cuja ligação,

tipicamente, não é bloqueada por imunoglobulina humana A (IgA). O termo "receptor IgA" pretende incluir o gene produto de um α -gene (Fc α RI) localizado no cromossoma 19. Este gene é conhecido por codificar várias isoformas transmembranas unidas alternativamente de 55 a 110 kDa. O Fc α RI (CD89) é constitutivamente expresso sobre monócitos/macrófagos, granulócitos eosinofílicos e neutrofílicos, mas não em populações de células não efectoras. O Fc α RI tem afinidade média ($\approx 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) tanto por IgA1 como IgA2 que é aumentada mediante exposição a citocinas como, por exemplo, G-CSF ou GM-CSF (Morton et al., Critical Reviews in Immunology 16:423-440 (1996)). Foram descritos quatro anticorpos monoclonais Fc α RI-específicos, identificados como A3, A59, A62 e A77, que ligam Fc α RI fora do domínio de ligação do ligando IgA, (Monteiro et al., J. Immunol. 148:1764 (1992)).

Os Fc α RI e Fc γ RI são receptores de desencadeamento preferidos para utilização nas moléculas biespecíficas da invenção porque os mesmos são (1) expressos primariamente sobre células efectoras imunes, por exemplo, monócitos, PMNs, macrófagos e células dendríticas; (2) expressos em altos níveis (por exemplo 5.000-100.000 por célula); (3) mediadores de atividades citotóxicas (por exemplo, ADCC, fagocitose); e (4) mediam a apresentação de antígeno aumentada de antígenos, incluindo auto-antígenos, dirigidos aos mesmos.

As moléculas biespecíficas da presente invenção podem ser preparadas conjugando as especificidades de ligação constituintes, por exemplo, as especificidades de ligação de anti-FcR e anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2, utilizando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo cada especificidade de ligação da molécula biespecífica pode ser separadamente e depois conjugada a uma outra. Quando as especificidades de ligação são proteínas ou peptídeos, pode-se utilizar uma variedade de agentes de acoplamento ou ligação-cruzada para conjugação covalente. Exemplos de agentes de

ligação cruzada incluem a proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), o-fenilenedimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridiliditio)propionato (SPDP) e sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclo-

5 haxano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (ver, por exemplo Karpovsky et al. J. Exp. Med. 160:1686 (1984); Liu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 82:8648 (1985)). Outros métodos incluem aqueles descritos em Paulus, Behring Ins.

10 Mitt. N° 78:118-132 (1985); Brennan et al. Science 229:81-83 (1985)) e Glennie et al. J. Immunol. 139:2367-2375 (1987)). Os agentes de conjugação preferidos são SATA e sulfo-SMCC, ambos disponíveis da Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

15 Quando as especificidades de ligação são anticorpos, os mesmos podem ser conjugados por meio de uma ligação sulfidril das regiões conectoras do terminal C das duas cadeias pesadas. Numa modalidade particularmente preferida, a região conectora é modificada para conter um

20 número ímpar de resíduos de sulfidril, tipicamente um, antes da conjugação.

Alternativamente, ambas as especificidades de ligação podem ser codificadas no mesmo vetor e expressas e montadas na mesma célula hospedeira. Este método é

25 particularmente útil onde a molécula biespecífica é uma proteína de fusão mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ ou ligando x Fab. Uma molécula biespecífica da invenção pode ser uma molécula de cadeia única compreendendo um

30 anticorpos de cadeia única e um determinante de ligação e uma molécula biespecífica de cadeia única compreendendo dois determinantes de ligação. As moléculas biespecíficas podem compreender pelo menos duas moléculas de cadeia única. Métodos para preparar moléculas bioespecíficas são descritos, por exemplo nas Patentes U.S. N° 5,260,203;

35 5,455,030; 4,881,175; 5,132,405; 5,091,513; 5,476,786; 5,013,653; 5,258,498; e 5,482,858, cada uma das quais é aqui integralmente incorporada por citação.

A ligação das moléculas biespecíficas aos seu alvos específicos pode ser confirmada, por exemplo, por ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA), análise FACS, bioensaio (por exemplo, inibição do
 5 crescimento) ou ensaio Western Blot. Cada um destes ensaio, em geral, detecta a presença de complexos de proteína-anticorpo de particular interesse utilizando um reagente marcado (por exemplo, um anticorpo) específico para o complexo de interesse. Por exemplo, os complexos
 10 FcR-anticorpo podem ser detectados utilizando, por exemplo, um anticorpo ligado a enzima ou fragmento de anticorpo que reconhece e especificamente se liga aos complexos anticopos-FcR. Alternativamente, os complexos podem ser detectados utilizando qualquer um de uma
 15 variedade de outros imunoensaios. Por exemplo, o anticorpo pode ser marcado radioactivamente e utilizado num radioimunoensaio (RIA) (ver, por exemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine
 20 Society, March, 1986, que é aqui incorporado por citação). O isótopo radioativo pode ser detectado por meios tais como a utilização de um contador β ou um contador de cintilação ou por autoradiografia.

Fragmentos de Anticorpos e Mimetismo de Anticorpos

25 A presente invenção não está limitada a anticorpos tradicionais e pode ser praticada através da utilização de fragmentos de anticorpos e mimetismo de anticorpo. Conforme detalhado adiante, uma ampla variedade de tecnologias de fragmentos de anticorpos e mimetismo de
 30 anticorpos foram agora desenvolvidas e são amplamente conhecidas na técnica. Embora inúmeras destas tecnologias, tais como anticorpos de domínio, Nanocorpos, e UniBodies façam uso de fragmentos ou outras modificações a estruturas tradicionais de anticorpos, há
 35 também tecnologias alternativas, como por exemplo, Affibodies, DARPins, Anticalinas, Avimers e Versabodies que empregam estruturas de ligação que, ao mesmo tempo

que simulam a ligação tradicional de anticorpos, são geradas e funcionam por meio de mecanismos distintos.

Anticorpos de Domínio (dAbs) são as menores unidades de ligação funcional de anticorpos, correspondentes às
5 regiões variáveis das cadeias pesada (VH) ou leve (VL) dos anticorpos humanos. Os anticorpos de domínio têm um peso molecular de aproximadamente 13 kDa. A Domantis Limited desenvolveu uma série de bibliotecas grandes e altamente funcionais de dAbs VH e VL totalmente humanos
10 (mais de dez bilhões de seqüências diferentes em cada biblioteca) e utiliza estas bibliotecas para selecionar dAbs que são específicos para alvos terapêuticos. Em contraste com muitos anticorpos convencionais os Anticorpos de domínio são bem expressos em sistemas de
15 células bacterianas, de levedura e de mamíferos. Detalhes adicionais dos anticorpos de domínio e seus métodos de produção podem ser obtidos por referência às Patentes U.S. 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; 6,172,197; 6,696,245; U.S. Série N° 2004/0110941; Pedido de Patente
20 Européia N° 1433846 e Patentes Européias 0368684 & 0616640; WO05/035572, WO04/101790, WO04/081026, WO04/058821, WO04/003019 e WO03/002609, cada uma das quais são aqui integralmente incorporadas por citação.

Nanocorpos são proteínas terapêuticas derivadas de
25 anticorpo que contêm as propriedades estruturais e funcionais únicas de anticorpos de cadeia pesada de ocorrência natural. Estes anticorpos de cadeia pesada contêm um único domínio variável (VHH) e dois domínios constantes (CH2 e CH3). Significativamente, o domínio VHH
30 clonado e isolado é um polipeptídeo perfeitamente estável que abriga a capacidade total de ligação ao antígeno do anticorpo de cadeia pesada original. Os Nanocorpos têm uma alta homologia com os domínios VH dos anticorpos humanos e podem ainda ser humanizados sem qualquer perda
35 de atividade. Significativamente, os Nanocorpos têm um baixo potencial imunogênico que foi confirmado em estudos de primatas com compostos conduzidos por Nanocorpos.

Os Nanocorpos combinam as vantagens dos anticorpos convencionais com características importantes de drogas de molécula pequena. Como os anticorpos convencionais, os Nanocorpos apresentam alta especificidade ao alvo, alta afinidade para o seu alvo e baixa toxicidade inerente. No entanto, como as drogas de molécula pequena os mesmos podem inibir enzimas e ter pronto acesso a fissuras de receptores. Além disso, os Nanocorpos são extremamente estáveis, podem ser administrados por meios que não seja por injeção (ver, por exemplo, o documento WO 04/041867, que é aqui integralmente incorporado por citação) e são fáceis de fabricar. Outras vantagens dos Nanocorpos incluem o reconhecimento de epítomos incomuns ou escondidos como resultado do seu pequeno tamanho, ligando-se a cavidades ou sítios ativos de alvos de proteína com alta afinidade e seletividade devido ao seu formato tridimensional, flexibilidade de formato de droga, adaptação da meia-vida e facilidade e velocidade de descoberta da droga.

Os Nanocorpos são codificados por genes únicos e são produzidos de forma eficiente em quase todos os hospedeiros procarióticos e eucarióticos, por exemplo, E. coli (ver, por exemplo, a Patente U.S. 6,765,087, que é aqui integralmente incorporada por citação), bolores (por exemplo, Aspergillus ou Trichoderma) e levedura (por exemplo Saccharomyces, Kluyveromyces, Hansenula ou Pichia) (Ver, por exemplo, a Patente U.S. 6,838,254, que é aqui integralmente incorporada por citação). O processo de produção é escalonável e foram produzidas quantidades de muitos quilogramas de Nanocorpos. Pelo fato dos Nanocorpos exibirem uma estabilidade superior em comparação com anticorpos convencionais, os mesmos podem ser formulados como uma solução com longo prazo de validade e pronta para ser usada.

O método de Nanoclone (ver, por exemplo, o documento WO 06/079372, que é aqui integralmente incorporado por citação) é um método privado para gerar Nanocorpos contra

um alvo desejado, com base em seleção de high-throughput automático de células B e poderia ser utilizado no contexto da presente invenção.

UniBodies são uma outra tecnologia de fragmento de anticorpo, no entanto esta é baseada na remoção da região conectora dos anticorpos IgG4. A deleção da região conectora resulta numa molécula que é essencialmente metade do tamanho dos anticorpos IgG4 tradicionais e tem uma região de ligação univalente em vez da região de ligação bivalente dos anticorpos IgG4. É também sabido que os anticorpos IgG4 são inertes e, deste modo, não interagem com o sistema imunológico, o que pode ser vantajoso para o tratamento de doenças onde a resposta imune não é desejada e esta vantagem é passada aos UniBodies. Por exemplo, UniBodies podem funcionar para inibir ou silenciar, mas não matar, as células às quais estão ligados. Além disso, a ligação de UniBody a células de câncer não estimulam a proliferação das mesmas. Além disso, pelo fato dos UniBodies serem metade do tamanho dos anticorpos IgG4 tradicionais, os mesmos podem apresentar uma melhor distribuição sobre tumores grandes sólidos com eficácia potencialmente vantajosa. Os UniBodies são eliminados do corpo a uma taxa similar à dos anticorpos IgG4 inteiros e são capazes de ligar com uma afinidade similar aos seus antígenos como os anticorpos inteiros. Detalhes adicionais de UniBodies podem ser obtidos por referência à Publicação PCT N° WO2007/059782, que é aqui integralmente incorporada por citação.

As moléculas Affibody representam uma nova classe de proteínas baseadas num domínio de proteínas de resíduo de aminoácidos 58, derivadas de uma dos domínios de ligação a IgG da proteína A de staphylococcus. Este domínio de grupo de três hélices foi utilizado como um esqueleto (scaffold) para a construção de bibliotecas combinatórias de fagemidos das quais as variantes de Affibody que se dirigem às moléculas desejadas podem ser selecionadas

utilizando a tecnologia de apresentação sobre fago (Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain, Nat Biotechnol 1997;15:772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, Eur J Biochem 2002;269:2647-55.). A estrutura simples e robusta das moléculas de Affibody em combinação com o seu baixo peso molecular (6 kDa), torna as mesmas adequadas para uma ampla variedade de aplicações, por exemplo, como reagentes de detecção (Ronmark J, Hansson M, Nguyen T, et al., Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in Escherichia coli, J Immunol Methods 2002;261:199-211) e para inibir interações de receptor (Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA, Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering, Protein Eng 2003;16:691-7). Detalhes adicionais sobre Affibodies e seus métodos de produção podem ser obtidos por referência à Patente U.S. N° 5831012, que é aqui integralmente incorporada por citação.

Affibodies marcados também podem ser úteis em aplicações de imagiologia para determinar a abundância das isoformas.

As DARPins (Proteínas Projetadas de Repetição de Anquirina) são um exemplo de uma tecnologia de anticorpo mimético DRP (Proteína Projetada de Repetição) que foi desenvolvida para explorar as capacidades de ligação de polipeptídeos não-anticorpos. As proteínas de repetição como a anquirina ou proteínas ricas em leucina são moléculas de ligação ubíqua que ocorrem, ao contrário dos anticorpos, intra e extracelularmente. Suas características de arquitetura modular única apresenta unidades estruturais repetidas (repetições) que se empilham para formar domínios de repetição alongados

apresentando superfícies de ligação ao alvo variável e modular. Com base nesta modularidade, pode-se gerar bibliotecas combinatórias de polipeptídeos com especificidades de ligação altamente diversificadas. Esta
5 estratégia inclui a concepção de consenso de repetições auto-compatíveis que apresentam resíduos de superfície variável e sua montagem aleatória em domínios de repetição.

DARPinS podem ser produzidas em sistemas de expressão
10 bacteriano em rendimentos muito elevados e pertencem às proteínas mais estáveis conhecidas. Foram selecionadas DARPinS altamente específicas, de alta afinidade a uma ampla faixa de proteínas alvo, incluindo receptores humanos, citocinas, quinases, proteases humanas, vírus e
15 proteínas de membrana. Pode-se obter DARPinS que têm afinidade em nível de nonomolar de um dígito a picomolar .

As DARPinS foram utilizadas numa ampla faixa de aplicações, incluindo ELISA, ELISA sanduíche, análise
20 citométrica de fluxo (FACS), imuno-histoquímica (IHC), aplicações de chip, purificação de afinidade ou Western blotting. As DARPinS também demonstraram ser altamente ativas no compartimento intracelular por exemplo como proteínas marcadora intracelulares fundidas à proteína
25 fluorescente verde (GFP). As DARPinS foram também utilizadas para inibir a entrada viral com IC50 ao nível de pM. As DARPinS não são apenas ideais para bloquear interações proteína-proteína, mas também para inibir enzimas. Proteases, quinases e transportadores foram
30 inibidos com sucesso, na maioria dos casos um modo de inibição alostérico. Enriquecimentos específicos e muito rápidos no tumor e proporções de tumor para sangue muito favoráveis tornam as DARPinS muito adequadas para diagnósticos in vivo ou abordagens terapêuticas.

35 Informações adicionais referentes a DARPinS e outras tecnologias DRP podem ser encontradas na Publicação do Pedido de Patente U.S. N° 2004/0132028 e Publicação do

Pedido de Patente Internacional N° WO 02/20565, ambas as quais são aqui integralmente incorporadas por citação.

Anticalinas são uma tecnologia mimética de anticorpo adicional, no entanto, neste caso, a especificidade de
5 ligação é derivada de lipocalinas, uma família de proteínas de baixo peso molecular que são natural e abundantemente expressas em tecidos humanos e fluidos corporais. As lipocalinas evoluíram para realizar uma variedade de funções in vivo associadas com o transporte
10 fisiológico e a armazenagem de compostos quimicamente sensíveis ou insolúveis. As lipocalinas têm uma estrutura intrínseca robusta compreendendo um barril- β altamente conservado que suporta quatro loops num terminal da proteína. Estes loops foram a entrada para uma bolsa de
15 ligação e diferenças conformacionais nesta parte da molécula são responsáveis pela variação na especificidade de ligação entre lipocalinas individuais.

Embora a estrutura dos loops hipervariáveis como um todo suportados por uma estrutura de folha- β seja
20 remanescente de imunoglobulinas, as lipocalinas diferem consideravelmente dos anticorpos em termos de tamanho, sendo compostas de uma cadeia de polipeptídeo simples de 160-180 aminoácidos que é marginalmente maior do que um domínio de imunoglobulina simples.

25 As lipocalinas são clonadas e seus loops são submetidos a modificação a fim de criar Anticalinas. Foram geradas bibliotecas de Anticalinas estruturalmente diversas e a apresentação de Anticalina permite a seleção e rastreamento da função de ligação, seguida pela expressão e
30 produção de proteína solúvel para análise adicional em sistemas procarióticos ou eucarióticos. Estudos demonstraram com êxito que pode-se desenvolver Anticalinas que são específicas para virtualmente qualquer proteína alvo humana e podem ser isoladas e
35 pode-se obter afinidades de ligação ao nível nanomolar ou superior.

As Anticalinas também podem ser formatadas como

proteínas de direcionamento duplo, chamadas Duocalinas. A Duocalina liga dois alvos terapêuticos separados numa proteína monomérica facilmente produzida utilizando processos de fabricação padrão ao mesmo tempo que retém a especificidade e afinidade independentemente da orientação estrutural dos seus dois domínios de ligação.

A modulação de alvos múltiplos através de uma única molécula é particularmente vantajoso em doenças conhecidas por envolver mais de um único fator causador. Além disso, formatos de ligação bi ou multivalentes tais como Duocalinas têm potencial significativo em atingir moléculas da superfície celular em doença, mediando efeitos agonistas sobre vias de transdução de sinal ou induzindo efeitos de internalização aumentada por meio de ligação e agrupamento de receptores de superfície de célula. Além disso, a estabilidade das Duocalinas altamente intrínseca é comprável às Anticalinas monoméricas, oferecendo formulação flexível e potencial de administração para as Duocalinas.

Informações adicionais sobre Anticalinas podem ser encontradas na Patente U.S. Nº 7,250,297 e na Publicação do Pedido de Patente Internacional Nº WO 99/16873 ambas as quais são aqui integralmente incorporadas por citação.

Outra tecnologia de mimética de anticorpo útil no contexto da presente invenção são os Avimers. Avimers são evolvíveis de uma grande família de domínios de receptores extracelulares humanos por uma troca de éxons (exon shuffling) e apresentação sobre fago, gerando proteínas de domínios múltiplos com propriedades de ligação e inibidoras. Foi demonstrado que a ligação de domínios de ligação independentes múltiplos cria avidéz e resulta em afinidade e especificidade melhoradas compradas com proteínas de ligação de um epítipo convencionais. Outras vantagens potenciais incluem a produção simples e eficaz de moléculas específicas de alvo múltiplo em *Escherichia coli*, termoestabilidade melhorada e resistência a proteases. Avimers com afinidades sub-nanomolares foram

obtidos contra uma variedade de alvos.

Informações adicionais sobre Avimers podem ser encontradas nas Publicações de Pedidos de Patente U.S. N° 2006/0286603, 2006/0234299, 2006/0223114, 2006/0177831, 5 2006/0008844, 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0089932, 2005/0053973, 2005/0048512, 2004/0175756, todas as quais são aqui integralmente incorporadas por citação.

Versabodies são uma outra tecnologia de fragmento de anticorpo que pode ser utilizada no contexto da presente 10 invenção. Os Versabodies são proteínas pequenas de 3-5 kDa com >15% de cisteínas, que formam um esqueleto de alta densidade de dissulfureto, substituindo o núcleo hidrófobo que as proteínas típicas têm. A substituição de um grande número de aminoácidos hidrófobos, compreendendo 15 o núcleo hidrófobo, por um pequeno número de dissulfuretos resulta em uma proteína que é menor, mais hidrófila (menos agregação e ligação não específica), mas resistentes a proteases e calor e tem uma densidade menor de epítomos de células T, porque os resíduos que mais 20 contribuem para a apresentação de MHC são hidrófobos. Todas quatro destas propriedades são conhecidas por afetar a imunogenicidade, e juntas espera-se que as mesmas causem uma grande diminuição em imunogenicidade.

A inspiração para Versabodies vem dos biofarmacêuticos 25 injetáveis naturais produzidos por sanguessugas, cobras, aranhas, escorpiões, lesmas e anêmonas que são conhecidos por exibir uma imunogenicidade inesperadamente baixa. Partindo de famílias de proteínas naturais selecionadas, projetando e selecionando o tamanho, a hidrofobicidade, o 30 processamento de antígeno proteolítico e a densidade de epítopo são minimizados a níveis muito abaixo da média para proteínas injetáveis naturais.

Dadas as estruturas de Versabodies, estes miméticos de anticorpo oferecem um forma versátil que inclui multi- 35 valência, multi-especificidade, uma diversidade de mecanismos de meia-vida, módulos de direcionamento a tecido e a ausência da região Fc do anticorpo. Além

disso, os Versabodies são fabricados em E. coli em altos rendimentos, e por causa da sua hidrofiliicidade e pequeno tamanho, os Versabodies são altamente solúveis e podem ser formulados em altas concentrações. Os Versabodies são
5 excepcionalmente termoestáveis (eles podem ser fervidos) e oferecem vida útil prolongada.

Informações adicionais sobre Versabodies podem ser encontradas na Publicação de Pedido de Patente U.S. N° 2007/0191272 que é aqui integralmente incorporada por
10 citação.

A descrição detalhada de fragmentos de anticorpos e tecnologias de mimética de anticorpos acima apresentada não pretende se uma lista completa de todas as tecnologias que poderia ser utilizadas no contexto da
15 presente memória descritiva. Por exemplo, e também não a título de limitação, uma variedade de tecnologias adicionais poderiam ser utilizadas no contexto da presente invenção, incluindo tecnologias à base de polipeptídeo alternativo, tais como fusões de regiões
20 determinantes complementares conforme descrito em Qui et al., Nature Biotechnology, 25(8) 921-929 (2007), que é aqui integralmente incorporado por citação, bem como tecnologias à base de ácido nucléico, tais como as tecnologias de aptâmeros de ARN descritas nas Patentes
25 U.S. N° 5,789,157, 5,864,026, 5,712,375, 5,763,566, 6,013,443, 6,376,474, 6,613,526, 6,114,120, 6,261,774 e 6,387,620, todas as quais são aqui integralmente incorporadas por citação.

Composições Farmacêuticas

30 Em um outro aspecto, a presente invenção proporciona uma composição, por exemplo, uma composição farmacêutica, contendo um ou uma combinação de anticorpos monoclonais ou suas porções de ligação ao antígeno, da presente invenção, formulada juntamente com um veículo
35 farmaceuticamente aceitável. Estas composições podem incluir um ou uma combinação de anticorpos (por exemplo, um ou mais anticorpos diferentes) ou imunoconjugados ou

moléculas biespecíficas da invenção. Por exemplo, uma composição farmacêutica da invenção pode compreender uma combinação de anticorpos (ou imunokonjugados ou biespecíficos) que se ligam a epítomos diferentes no antígeno alvo ou que têm atividades complementares.

5 As composições farmacêuticas da invenção também podem ser administradas em terapia de combinação, isto é, combinadas a outras agentes. Por exemplo a terapia de combinação pode incluir um anticorpo anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 da presente invenção combinado com pelo menos um outro agente antiinflamatório ou imunossupressor, um ou mais outro anticorpo tendo eficácia contra uma doença óssea ou câncer e/ou uma ou mais modalidades quimioterapêuticas. Será entendido que uma ampla variedade de abordagem co-terapêuticas são contempladas com a vantagem dosagens diminuídas de um anticorpo anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 da invenção pode resultar em uma redução de efeitos colaterais terapêuticos.

20 Em outras modalidades, os anticorpos terapêuticos aqui revelados podem ser utilizados em combinação com um ou mais anticorpos que suprime uma via imunossupressora como, por exemplo, em combinação com um anticorpo anti-CTLA-4 (aqui exemplificado pelo anticorpo designado MDX-010). A proteína CTLA-4 é encontrada em certos linfócitos que, quando reconhecem uma substância estranha, tal como um vírus ou bactérias, iniciam uma resposta imune para combater a infecção. As proteínas CTLA-4 ajudam a parar a resposta imune diminuindo o número de células imunológicas que lutam contra o vírus ou bactérias. Quando uma resposta imune é montada contra células ósseas e/ou de tumor, no entanto, pode ser benéfico não parar a resposta imune, mas, ao contrário, manter um grande número de linfócitos disponíveis. Deste modo, um anticorpo anti-CTLA-4, tal como MDX-010 pode ser utilizado vantajosamente em combinação com um ou mais

anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 da presente invenção para bloquear a CTLA-4 e manter a atividade imunológica.

Conforme aqui utilizado, "veículo farmacologicamente aceitável" inclui quaisquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de atraso de absorção e outros semelhantes que são fisiologicamente compatíveis. Tipicamente, o veículo é adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidérmica (por exemplo, por injeção ou perfusão). Dependendo da via de administração, o composto ativo, isto é, o anticorpo, imunocombinado ou molécula biespecífica, pode ser revestido em um material para proteger o composto contra a ação de ácidos e outras condições naturais que podem inativar o composto.

Os compostos farmacêuticos da invenção podem incluir um ou mais sais farmacologicamente aceitáveis. Um "sal farmacologicamente aceitável" se refere a um sal que retém a atividade biológica desejada do composto precursor e não confere quaisquer efeitos toxicológicos indesejáveis (ver, por exemplo, Berge et al., J. Pharm. Sci. 66:1-19 (1977)). Exemplos destes sais incluem sais de adição de ácido e sais de adição de base. Os sais de adição de ácido são aqueles derivados de ácidos inorgânicos não tóxicos, tais como, o ácido clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídrico, fosforoso e outros, bem como ácidos orgânicos não tóxicos, tais como ácidos alifáticos mono- e dicarboxílicos, ácidos alcanóicos fenil-substituídos, ácidos hidroxil alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos e outros. Os sais de adição de base incluem aqueles derivados de metais alcalino terrosos, tais como sódio, potássio, magnésio, cálcio e outros, bem como de aminas orgânicas não tóxicas, tais como N,N'-dibenziletilenediamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e outras.

Uma composição farmacêutica da invenção também pode incluir um antioxidante farmacêuticamente aceitável. Exemplos de antioxidantes farmacêuticamente aceitáveis incluem; (1) antioxidantes solúveis em água, tais como
5 ácido ascórbico, cloridrato de disteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e outros; (2) antioxidantes solúveis em óleo, tais como ascorbil palmitado, hidroxianisole butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propil galato,
10 alfa-tocoferol e outros; e (3) agentes quelantes metálicos, tais como ácido cítrico, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico e outros.

Exemplos de veículos aquosos e não aquosos adequados que
15 pode ser utilizados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (tais como glicol, propileno glicol, polietileno glicol e outros) e suas misturas adequadas, óleos vegetais, tais como azeite de oliva e ésteres orgânicos injetáveis, tais como oleato de
20 etila. Pode-se manter uma fluidez apropriada, por exemplo, pela utilização de materiais de revestimento, tais como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersões e pela utilização de tensoativos.

25 Estas composições também podem conter coadjuvantes tais como conservantes, agentes umectantes, agentes emulsionantes e agentes dispersantes. A prevenção da presença de microrganismos pode ser assegurada tanto por procedimentos de esterilização, supra como pela inclusão
30 de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico e outros. Pode também ser desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, cloreto de sódio e outros nas composições. Além disso, a absorção prolongada da
35 forma farmacêutica injetável pode ser ocasionada pela inclusão de agentes que retardam a absorção, tais como monoestearato de alumínio e gelatina.

Os veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem soluções ou dispersões aquosas e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. A utilização destes meios e agentes para substâncias farmacêuticamente ativas é conhecida na técnica. Exceto na medida em que quaisquer meios convencionais ou agente sejam incompatíveis com o composto ativo, é contemplada a utilização destes nas composições farmacêuticas da invenção. Compostos ativos suplementares também pode ser incorporados nas composições.

Tipicamente, as composições terapêuticas têm de ser estéreis e estáveis em condições de fabricação e armazenamento. As composições podem ser formuladas como uma solução, microemulsão, liposoma ou outra estrutura ordenada adequada a uma alta concentração de droga. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido e outros) e suas misturas adequadas. Pode-se manter uma fluidez apropriada, por exemplo, pela utilização de um revestimento, tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersões e pela utilização de tensoativos. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio nas composições. A absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser ocasionada pela inclusão de agentes que retardam a absorção, tais como sais monoestearato e gelatina.

Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando o composto ativo na quantidade necessária em um solvente apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido pela esterilização por microfiltração. De um modo geral, as dispersões são reparadas incorporando o composto ativo em um veículo estéril que contém um meio

de dispersão básico e outros ingredientes necessários destes enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem a vácuo e secagem por congelamento (liofilização) que produzem um pó do
5 ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional de uma sua solução anteriormente esterilizada por filtração.

A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material veículo para produzir uma forma de
10 dosagem única irá variar dependendo do indivíduo sendo tratado o modo de administração em particular. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material veículo para produzir uma forma de
15 dosagem única, de um modo geral, será aquela quantidade da composição que produz um efeito terapêutico. Em geral, de cem por cento, esta quantidade irá variar de cerca de 0,01 por cento a cerca de noventa e nove por cento do ingrediente ativo, tipicamente de cerca de 0,1 por cento
20 a cerca de 70 por cento, mais tipicamente de cerca de 1 por cento a cerca de 30 por cento do ingrediente ativo em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

Os regimes de dosagem são ajustados para proporcionar a resposta ótima desejada (por exemplo, uma resposta
25 terapêutica). Por exemplo, pode-se administrar um bolo único, pode-se administrar várias doses divididas ao longo do tempo ou a pode ser reduzida ou aumentada proporcionalmente conforme indicado pelas exigências das situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular
30 composições parenterais em forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. Conforme aqui utilizado, forma de dosagem unitária se refere a unidades fisicamente individuais adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos serem tratados;
35 cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo

farmacêutico necessário. As especificações para as formas de dosagem unitárias da invenção são ditadas e diretamente dependentes (a) das características únicas do composto ativo e o efeito terapêutico em particular a ser
5 obtido e (b) das limitações inerentes na técnica de formulação de compostos tal como um composto ativo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

Para a administração do anticorpo, as dosagens variam de cerca de 0,0001 a 100 mg/kg e mais frequentemente 0,01 to
10 25 mg/kg, do peso corporal do hospedeiro. Por exemplo, as dosagens podem ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal ou 10 mg/kg de peso corporal ou na faixa de 1-10 mg/kg. Podem ser utilizadas dosagens mais altas, por
15 exemplo, 15 mg/kg de peso corporal, 20 mg/kg de peso corporal ou 25 mg/kg de peso corporal conforme necessário. Um regime de tratamento exemplificativo implica a administração uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez a
20 cada quatro semanas, uma vez por mês, uma vez a cada 3 meses ou uma vez a cada três a 6 meses. Regimes de dosagem em particular para um anticorpo da invenção incluem 1 mg/kg de peso corporal ou 3 mg/kg de peso corporal por administração intravenosa, com o anticorpo
25 sendo dado utilizando um dos seguintes esquemas de dosagem: (i) a cada quatro semanas por seis dosagens, depois a cada três meses; (ii) a cada três semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal uma vez seguido por 1 mg/kg de peso corporal a cada três semanas.

30 Em alguns métodos, dois ou mais anticorpos monoclonais anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2 da invenção com especificidades de ligação diferentes são administrados simultaneamente, em cujo caso a dosagem de cada anticorpo administrado se
35 enquadra nas faixas indicadas. O anticorpo é, em geral, administrado em ocasiões múltiplas. Os intervalos entre dosagens unitárias podem ser, por exemplo, semanais,

mensais, a cada três meses ou anuais. Os intervalos também podem ser irregulares conforme indicado pela medição dos níveis de anticorpo no sangue do paciente contra o antígeno alvo. Em alguns métodos, a dosagem é

5 ajustada para obter uma concentração de anticorpos no plasma de cerca de 1-1000 μ g /mL e, em alguns métodos, cerca de 25-300 μ g /mL.

Em outros métodos, um ou mais anticorpos monoclonais

10 anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2 da invenção são administrados simultaneamente com um anticorpo que tem especificidade de ligação distinta, tal como, por exemplo, anti-CTLA-4 e/ou anti-PD-1, em cujo caso a dosagem de cada anticorpo

15 administrado se enquadra nas faixas indicadas.

Alternativamente, o anticorpo pode ser administrado como uma formulação de libertação sustentada, em cujo caso é necessária uma administração menos freqüente. A dosagem e freqüência variam dependendo da meia-vida do anticorpo no

20 doente. Em geral, os anticorpos humanos apresentam a meia-vida mais longa, seguido por anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos e anticorpos não humanos. A dosagem e a freqüência da administração pode variar dependendo se o tratamento é profilático ou terapêutico. Nas aplicações

25 profiláticas, uma dosagem relativamente baixa é administrada em intervalos relativamente freqüentes por um período de tempo prolongado. Alguns pacientes continuam a receber tratamento para o resto de suas vidas. Nas aplicações terapêuticas, uma dosagem

30 relativamente alta em intervalos relativamente curtos é, algumas vezes, necessária até que o progresso da doença seja reduzido ou terminado e, tipicamente, até que o paciente apresente uma melhora parcial ou completa dos sintomas da doença. Depois disto, o paciente pode ser

35 administrado um regime profilático.

Os níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem

variar de modo a obter uma quantidade do ingrediente ativo que seja eficaz para atingir a resposta terapêutica desejada para um paciente em particular, composição e modo de administração, sem ser tóxico para o paciente. O nível de dosagem selecionado irá depender de uma variedade de fatores farmacocinéticos incluindo a atividade das composições em particular utilizadas da presente invenção ou seu éster, sal ou amida, a via de administração, a hora da administração, a taxa de excreção do composto em particular sendo utilizado, a duração do tratamento, outras drogas, compostos e/ou materiais utilizados na combinação com as composições em particular utilizadas, a idade, sexo, peso, estado, saúde em geral e histórico médico anterior do paciente sendo tratado e fatores semelhantes conhecidos na medicina.

Uma "dosagem terapeuticamente eficaz" de um anticorpo anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 da invenção tipicamente resulta em uma diminuição na gravidade dos sintomas da doença, um aumento na frequência e duração de períodos livres de sintomas da doença ou uma prevenção de deficiência ou incapacidade face à aflição da doença. Por exemplo, para o tratamento de doença óssea ou cânceres associados com células ou tumores BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACR1, e/ou BMPR2, uma "dosagem terapeuticamente eficaz", tipicamente, inibe o crescimento celular ou crescimento do tumor em pelo menos cerca de 20%, mais tipicamente em pelo menos cerca de 40%, ainda mais tipicamente em pelo menos cerca de 60% e ainda mais tipicamente em pelo menos cerca de 80% em relação a indivíduos não tratados. A capacidade de um composto de inibir o crescimento do tumor pode ser avaliada em um sistema de modelo animal previsível da eficácia em tumores humanos. Alternativamente, esta propriedade de uma composição pode ser avaliada examinando a capacidade do composto de inibir o crescimento celular, esta inibição pode ser medida in vitro por ensaios conhecidos dos especialistas. Uma

quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico pode diminuir o tamanho do tumor ou, então, melhorar os sintomas em um indivíduo. Alguém com conhecimento corrente da técnica seria capaz de
5 determinar estas quantidades com base em fatores tais como o tamanho do indivíduo, a gravidade dos sintomas do indivíduo e a composição em particular ou via de administração selecionadas.

Uma composição da presente invenção pode ser administrada
10 por meio de uma ou mais vias de administração utilizando uma ou mais de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Conforme será entendido pelo técnico especialista, a via e/ou modo de administração irá variar dependendo dos resultados desejados. As vias de
15 administração preferidas para os anticorpos da invenção incluem as vias intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutânea, espinal ou outras vias parenterais de administração, por exemplo, por injeção ou perfusão. A expressão "administração parenterais"
20 conforme aqui utilizada, significa modos de administração além da administração entérica e tópica, em geral por injeção e inclui, sem limitação, injeção e perfusão intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica,
25 intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaraquinóide, intraespinal, epidural e intraesternal.

Alternativamente, um anticorpo da invenção pode ser administrado por uma via não parenteral, tal como uma via
30 de administração tópica, epidérmica ou mucosa, por exemplo por via intranasal, oral, vaginal, retal, sublingual ou tópica.

Os compostos ativos podem ser preparados com veículos que protegerão os compostos contra a libertação rápida, tal
35 como uma formulação de libertação controlada, incluindo implantes, adesivos transdérmicos e sistemas de administração microencapsulados. Polímeros

biodegradáveis, biocompatíveis podem ser utilizados, tais como o etileno vinil acetato, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação destas

5 formulações são patenteados e são, em geral, conhecidos dos especialistas na técnica. Ver, por exemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978). As composições terapêuticas podem ser administradas com

10 dispositivos médicos conhecidos na técnica. Por exemplo, em uma modalidade preferida, uma composição terapêutica da invenção pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmica sem agulha, tal como os dispositivos revelados nas Patentes U.S. N° 5,399,163; 5,383,851;

15 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; ou 4,596,556. Exemplos de implantes e módulos conhecidos úteis na presente invenção incluem: Patente U.S. N° 4,487,603, que revela uma bomba de micro-perfusão implantável para administrar um medicamento a uma taxa controlada; Patente

20 U.S. N° 4,486,194, que revela um dispositivo terapêutico para administrar medicamentos através da pele; Patente U.S. N° 4,447,233, que revela uma bomba de perfusão de medicamentos para administrar um medicamento a uma taxa de perfusão precisa; Patente U.S. N° 4,447,224, que

25 revela um aparelho de perfusão implantável de fluxo variável para a administração de droga de forma contínua; Patente U.S. N° 4,439,196, que revela um sistema de administração de droga osmótico com compartimentos de câmaras múltiplas; e Patente U.S. N° 4,475,196, que

30 revela um sistema de administração de droga osmótico. Estas patentes são aqui incorporadas por citação. Muitos outros implantes deste tipo, sistemas e módulos de administração são conhecidos dos especialistas na técnica.

35 Em certas modalidades, os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser formulados para assegurar uma distribuição apropriada in vivo. Por exemplo, a barreira

sangue cérebro (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrófilos. Para assegurar que os compostos terapêuticos da invenção cruzam a BBB (se desejado) os mesmos podem ser formulados, por exemplo, em liposomas. Para métodos de fabricar liposomas, ver, por exemplo as Patentes U.S. N° 4,522,811; 5,374,548; e 5,399,331. Os liposomas podem compreender uma ou mais unidades que são transportadas, de forma seletiva, para dentro de células ou órgãos específicos, deste modo aumenta a administração de droga dirigida (ver, por exemplo, Ranade, J. Clin. Pharmacol. 29:685 (1989)). Unidades de direcionamento exemplificativas incluem folato e biotina (ver, por exemplo, a Patente U.S. N° 5,416,016 de Low et al.); manosidos (Umezawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038 (1988)); anticorpos (Bloeman et al. FEBS Lett. 357:140 (1995); Owais et al. Antimicrob. Agents Chemother. 39:180 (1995)); receptor da proteína A tensoativa (Briscoe et al. Am. J. Physiol. 1233:134 (1995)); Schreier et al. J. Biol. Chem. 269:9090 (1994)); ver, também Keinanen e Laukkanen FEBS Lett. 346:123 (1994); Killion e Fidler Immunomethods 4:273 (1994).

Utilizações e Métodos da Invenção

Os anticorpos, particularmente os anticorpos humanos, composições de anticorpos e métodos da presente invenção têm inúmeras utilidades para diagnóstico e terapêuticas in vitro e in vivo envolvendo o diagnóstico e o tratamento de doenças mediadas por BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2. Por exemplo, estas moléculas podem ser administradas a células em cultura, in vitro ou ex vivo ou a indivíduos humanos, por exemplo, in vivo, para tratar, prevenir e diagnosticar uma variedade de doenças. Conforme aqui utilizado, o termo "indivíduo" pretende incluir seres humanos e animais não humanos. O termo "animais não humanos" inclui todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, tais como primatas não humanos, ovelhas, cães, gatos, vacas, cavalos, galinhas, anfíbios e répteis. Os indivíduos

preferidos incluem pacientes humanos com doenças mediadas pela atividade de BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2. Os métodos são particularmente adequados para tratar pacientes humanos que têm uma doença mediada pela expressão ou função de BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2. Quando anticorpos contra BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 são administrados juntamente com outro agente, os dois podem ser administrados em série ou simultaneamente.

10 Dada a ligação específica dos anticorpos da invenção para BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2, os anticorpos da invenção podem ser utilizados para detectar, especificamente a expressão de BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 por células e tecidos, além disto, podem ser utilizados para purificar BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 por meio de purificação por imunoafinidade.

Conforme descrito acima, as BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 estão associadas com uma variedade de doenças envolvendo inflamação e formação óssea anormal e ossificação. Estas doenças incluem as doenças Espondiloartrites (SpA) que, em conjunto, são caracterizadas por inflamação espinal, dor significativa e desabilidade funcional. As doenças SpA incluem, por exemplo, a espondilite anquilosante, espondiloartrites psoriáticas, espondiloartrite reativa, espondiloartrite associada à doença inflamatória do intestino e espondiloartrite indiferenciada. Em particular, os anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2 da presente invenção podem ser eficazes no tratamento de espondilite anquilosante (AS), outras espondiloartropatias e doenças reumáticas inflamatórias relacionadas, que são tipicamente caracterizadas por dor inflamatória nas costas, em geral causada por sacroiliíte e entesite. Deste modo, a invenção abrange métodos de tratamento das doenças acima mencionadas compreendendo administrar os

anticorpos monoclonais aqui revelados a um indivíduo.

O padrão atual de tratamento para muitos pacientes com AS inclui bloqueio do TNF α . A terapia com bloqueio do TNF α demonstrou ser eficaz em reduzir os sintomas da
5 doença, provavelmente reduzindo a inflamação crônica que contribui para a patologia da doença. No entanto, há consequências negativas que podem ocorrer depois do uso prolongado de bloqueadores do TNF α . Estes incluem, por exemplo, incidência aumentada de tuberculose, reações
10 alérgicas e doenças hematológicas como, por exemplo, a anemia. Além disso, o bloqueio do TNF α é contra indicado para aqueles com insuficiência cardíaca congestiva.

A fim de superar as dificuldades associadas ao tratamento de bloqueio do TNF α , os anticorpos da invenção podem ser
15 utilizados em combinação com o bloqueio do TNF α para o tratamento de AS. A combinação de ou mais anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 com bloqueio do TNF α é vantajoso uma vez que a combinação pode resultar em sinergia entre
20 as duas terapias resultando em tratamento ou prevenção do progresso da doença. Sem dúvida, a quantidade ou a frequência do bloqueio do TNF α podem ser reduzidas quando utilizadas em combinação com um anticorpo da invenção.

Esta terapia de combinação mitiga algumas das
25 consequências negativas do bloqueio prolongado do TNF α . Foi relatado (Kaplan et al, J. of Bone and Joint Surgery 2007 89:347-357) que a anulação da inflamação é ineficaz na inibição da formação óssea heterotrópica uma vez que o anlage endocondrial é induzido. Deste modo, a combinação
30 de um ou mais anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 e um paliativo, como por exemplo, o bloqueio do TNF α , poderia ser eficaz para tratar ou prevenir o progresso da doença AS e para melhorar os seus sintomas.

35 Os anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 são também utilizados para tratar outras doenças e enfermidades com formação

óssea anormal ou ossificação incluindo fibrodisplasia ossificante progressiva (FOP) (Kan et al., Am. J. Path. 165(4):1107-15 (2004)), heteroplasia óssea progressiva (POH), lesão da medula espinhal, traumatismo contuso
5 resultante em hematoma intramuscular, cirurgia ortopédica, artrite psoriática, osteoartrite, espondilite anquilosante, antopatias seronegativas, hiperostose esquelética, otosclerose, anquilose do estribo, cânceres ósseos, câncer da próstata e exotose, arterosclerose,
10 doença cardíaca valvular e resinostose pós-operatória.

As enfermidades que envolvem a formação óssea heterotrópica, algumas vezes, também incluem perda óssea ou osteólise em osso normal. Deste modo, a presente invenção inclui o tratamento de pacientes que têm
15 formação óssea heterotrópica com um ou mais anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2 em combinação com inibidores de reabsorção óssea incluindo, mas não limitado a bisfosfonatos, inibidores de PTH, inibidores diretos ou
20 indiretos de RANKL e inibidores de outros fatores osteoclásticos, tais como MCSF (ver o documento WO 2005/068503, cujo teor é aqui expressamente incorporado por citação).

As BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 são
25 também expressas em uma variedade de cânceres humanos incluindo cânceres ósseos, cânceres da próstata, cânceres do pulmão, melanomas e outros cânceres hematopoiéticos e cânceres da mama. Um ou mais anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2
30 podem ser utilizados sós para inibir o crescimento ou metástase de tumores cancerosos. Alternativamente, um ou mais anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2 podem ser utilizados em conjunto com outros agentes imunogênicos,
35 tratamentos convencionais de câncer ou outros anticorpos, conforme aqui descrito.

Os cânceres preferidos cuja crescimento ou metástases

podem ser inibidos utilizando os anticorpos da invenção incluem os cânceres tipicamente sensíveis a imunoterapia. Exemplos não limitativos de cânceres preferidos para tratamento incluem o câncer de mama (por exemplo, 5 carcinoma de células da mama), câncer ovariano (por exemplo, carcinoma de células ovarianas), tumores cerebrais, leucemias crônicas ou agudas incluindo leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crônica, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica crônica, 10 linfomas (por exemplo, linfoma de Hodgkin e não Hodgkin, linfoma linfocítico, linfoma primário do SNC, linfoma das células T) e carcinomas nasofaríngeais. Exemplos de outros cânceres que podem ser tratados utilizando os métodos da invenção incluem melanoma (por exemplo, 15 melanoma maligno metastático), câncer da próstata, câncer do cólon, câncer do pulmão, câncer ósseo, câncer pancreático, câncer de pele, câncer da cabeça ou pescoço, melanoma maligno cutâneo ou intraocular, câncer uterino, câncer retal, câncer da região anal, câncer do estômago, 20 câncer renal, câncer testicular, câncer uterino, carcinoma dos trompas de Falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma colo uterino, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, câncer do esôfago, câncer do intestino delgado, câncer do sistema endócrino, câncer da 25 tiróide, câncer da glândula paratiróide, câncer da glândula mamária, sarcoma do tecido mole, câncer da uretra, câncer do pênis, tumores sólidos da infância, câncer da bexiga, câncer do rim ou ureter, carcinoma da pélvis, neoplasma do sistema nervoso central (SNC), 30 angiogênese tumoral, tumor da espinha axial, glioma do tronco cerebral, adenoma da pituitária, sarcoma de Kaposi, câncer epidermóide, câncer da célula escamosa, cânceres induzidos ambientalmente incluindo aqueles induzidos por asbestos, por exemplo, mesotelioma e 35 combinações dos referidos cânceres.

Além disso, dada a expressão de BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 em várias células tumorais, os

anticorpos humanos, as composições de anticorpos e métodos da presente invenção podem ser utilizados para tratar um indivíduo com uma doença tumorigênica, por exemplo, uma doença caracterizada pela presença de

5 células tumorais que expressam BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 incluindo, por exemplo, o câncer de mama (por exemplo carcinoma de células da mama), câncer ovariano (por exemplo carcinoma de células ovarianas), glioblastoma, tumores cerebrais, carcinomas

10 nasofaringeais, linfoma não Hodgkin (NHL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma de Burkitt, linfomas anaplásicos de células grandes (ALCL), mieloma múltiplo, linfomas de células T cutâneas, linfomas nodulares de células

15 pequenas clivadas, linfomas linfocíticos, linfomas das células T periféricas, linfomas de Lennert, linfomas imunoblásticos, leucemia/linfomas das células T (ATLL), leucemia das células T do adulto (T-ALL), linfomas cancerosos foliculares centroblásticos/centrocíticos

20 (cb/cc), linfomas difusos de células grandes de linhagem B, linfoma de células T semelhantes a (AILD) linfadenopatia angioimunoblástica, linfomas das cavidades corporais associados a HIV, carcinomas embrionais, carcinomas indiferenciados da rinofaringe (por exemplo,

25 tumor de Schmincke), doença de Castleman, Sarcoma de Kaposi, mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom e outros linfomas das células B.

Em concordância, em uma modalidade, a invenção proporciona um método para inibir o crescimento de

30 células tumorais em um indivíduo compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2 anticorpo ou porção de ligação ao seu antígeno. Tipicamente, o

35 anticorpo é um anticorpo humano. Adicionalmente ou alternativamente, o anticorpo pode ser um anticorpo anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1,

e/ou anti-BMPR2 quiméricos ou humanizado.

Em uma modalidade, os anticorpos (por exemplo, os anticorpos monoclonais humanos, as moléculas multiespecíficas e biespecíficas e as composições) da invenção podem ser utilizados para detectar níveis de BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 ou níveis de células que contêm BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 na superfície da sua membrana, cujos níveis podem, então, ser ligados aos sintomas de certas doenças.

Alternativamente, os anticorpos podem ser usados para inibir ou bloquear a função das BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 que, por sua vez, podem ser ligados à prevenção ou melhoramento dos sintomas de certas doenças, deste modo implicando as BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 como um mediador da doença. Isto pode ser conseguido pondo uma amostra experimental e uma amostra de controle em contacto com o anticorpo anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2 em condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo e as BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2. Quaisquer complexos formados entre o anticorpo e as BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 são detectados e comparados na amostra experimental e de controle.

Em uma outra modalidade, os anticorpos (por exemplo, anticorpos humanos, anticorpos humanizados, as moléculas multiespecíficas e biespecíficas e as composições) da invenção podem ser inicialmente testados quanto à atividade de ligação associada a utilizações terapêuticas e para diagnóstico in vitro. Por exemplo, as composições da invenção podem ser testadas utilizando os ensaios citométricos de fluxo descritos nos Exemplos adiante.

Os anticorpos (por exemplo, anticorpos humanos, anticorpos humanizados, as moléculas multiespecíficas e biespecíficas, imunoconjugados e composições) da invenção têm utilidade adicional na terapia e diagnóstico de doenças relacionadas a BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1,

e/ou BMPR2. Por exemplo os anticorpos monoclonais, as moléculas multiespecíficas ou biespecíficas podem ser utilizadas para obter in vivo ou in vitro uma ou mais das seguintes atividades biológicas: inibir o crescimento
5 e/ou matar uma célula que expressa BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2; mediar a fagocitose ou ADCC de uma célula que expressa BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 na presença de células efetoras humanas; ou bloquear a ligação de BMP2 e/ou BMP4 a
10 BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2.

As vias adequadas de administração das composições de anticorpos (por exemplo, anticorpos humanos, anticorpos humanizados, as moléculas multiespecíficas e biespecíficas e imunocjugados) da invenção in vivo e in
15 vitro são conhecidas na técnica e podem ser selecionadas pelos especialistas. Por exemplo, as composições de anticorpo podem ser administradas por injeção (por exemplo, intravenosa ou subcutânea). As dosagens adequadas das moléculas utilizadas dependerá da idade e
20 do peso do indivíduo e a concentração e/ou formulação da composição de anticorpos.

Conforme descrito anteriormente, os anticorpos humanos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2 da invenção podem ser co-
25 administrados com um ou mais outros agentes terapêuticos, por exemplo, um agente citotóxico, um agente radiotóxico ou um agente imunossupressor. O anticorpo pode ser ligado ao agente (como um imunocomplexo) ou pode ser administrado separado do agente. Neste último caso
30 (administração separada), o anticorpo pode ser administrado antes, depois ou concomitantemente com o agente ou pode ser co-administrado com outras terapias conhecidas por exemplo, uma terapia anti-câncer, por exemplo, radiação. Estes agentes terapêuticos incluem,
35 entre outros, agentes anti-neoplásicos tais como doxorubicina (adriamicina), sulfato de bleomicina e cisplatina, carmustina, clorambucil e ciclofosfamida

hidroxiurea que, por si sós, são eficazes só em níveis que são tóxicos ou subtóxicos a um paciente. A cisplatina é administrada por via intravenosa como uma dose de 100 mg/kg uma vez cada quatro semanas e a adriamicina é administrada por via intravenosa como uma dose de 60-75 mg uma vez cada 21 dias. Co-administração dos anticorpos humanos anti- BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 ou fragmentos de ligação ao seu antígeno, da presente invenção com agentes quimioterapêuticos proporciona dois agentes anti-câncer que funciona por meio de mecanismos diferentes que produzem um efeito citotóxico em células tumorais humanas. Esta co-administração pode resolver problemas devidos ao desenvolvimento de resistência a drogas ou uma mudança na antigenicidade das células tumorais que as tornariam não reativas como o anticorpo.

As células efetoras específicas do alvo, por exemplo células efetoras ligadas a composições (por exemplo, anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas) da invenção também podem ser utilizadas como agentes terapêuticos. As células efetoras para direcionamento podem ser leucócitos humanos, tais como macrófagos, neutrófilos ou monócitos. Outras células incluem eosinófilos, células exterminadoras naturais (natural killer cells) e outras células portadora do receptor IgG ou IgA. Se desejado, as células efetoras podem ser obtidas do indivíduo a ser tratado. As células efetoras específicas do alvo podem ser administradas como uma suspensão de células uma solução fisiologicamente aceitável. O número de células administrado pode ser na ordem de 10^8 - 10^9 mas variará dependendo da finalidade terapêutica. Em geral, a quantidade será suficiente para obter a localização na células alvo, por exemplo, uma célula de tumor que expressa BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACR1, e/ou BMPR2 e para matar as células, por exemplo, por fagocitose. As vias de administração também podem variar.

As terapias com células efetoras alvo-específicas podem ser realizada em conjunto com outras técnicas para a remoção das células atingidas. Por exemplo, a terapia anti-tumor que utiliza as composições (por exemplo anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas) da invenção e/ou células efetoras armadas com estas composições podem ser utilizadas em conjunto com quimioterapia. Adicionalmente, a imunoterapia de combinação pode ser utilizada para dirigir duas populações efetoras citotóxicas distintas para a rejeição da célula tumoral. Por exemplo, os anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2 ligados a anti-Fc-gamma RI ou anti-CD3 podem ser utilizados em conjunto com agentes de ligação específicos para o receptor IgG ou IgA.

As moléculas biespecíficas e multiespecíficas da invenção também podem ser utilizadas para modular os níveis de FcγR ou FcγR em células efetoras, como por exemplo, pela cobertura e eliminação dos receptores na superfície da célula. Misturas de receptores anti-Fc também podem ser utilizados para esta finalidade.

As composições (por exemplo, anticorpos humanos, humanizados ou quiméricos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas e imunoconjugados) da invenção que têm sítios de ligação complementares, tais como porções de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgM, que ligam o complemento, também podem ser utilizadas na presença de complemento. Em uma modalidade, o tratamento ex vivo de uma população de células compreendendo células alvo com um agente de ligação da invenção e células efetoras apropriadas pode ser suplementado por meio da adição de complemento ou complemento contendo soro. A fagocitose das células alvo revestidas com um agente de ligação da invenção pode ser melhorada pela ligação das proteínas do complemento. Em uma outra modalidade as células alvo revestidas com as composições (por exemplo anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas) da invenção também

podem ser lisadas pelo complemento. Em ainda outra modalidade, as composições da invenção não ativam o complemento.

As composições (por exemplo anticorpos humanos, humanizados ou quiméricos e moléculas biespecíficas e imunoconjugados) da invenção podem ser administradas juntamente com o complemento. Em concordância, no âmbito da invenção estão composições que compreendem anticorpos humanos, anticorpos humanizados, moléculas multiespecíficas ou biespecíficas e soro ou complemento. Estas composições são vantajosas uma vez que o complemento é localizado em estreita proximidade aos anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas ou biespecíficas. Alternativamente, os anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas ou biespecíficas da invenção e o complemento ou soro podem ser administrados separadamente.

Do mesmo modo no âmbito da presente invenção estão kits compreendendo as composições de anticorpos invenção (por exemplo, anticorpos humano, moléculas biespecíficas ou multiespecíficas ou imunoconjugados) e instruções para utilização. O kit pode ainda conter um ou mais reagentes adicionais, tais como um reagente imunossupressor, um agente citotóxico ou um agente radiotóxico ou um ou mais anticorpo humanos adicionais da invenção (por exemplo um anticorpo humano tendo uma atividade complementar que liga a um epítipo no antígeno BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 diferente do primeiro anticorpo humano).

Em concordância, os pacientes tratados com as composições de anticorpo da invenção podem ser adicionalmente administrados (antes, simultaneamente ou a seguir a administração de um anticorpo humano da invenção) com outro agente terapêutico, tal como um agente citotóxico ou radiotóxico, que intensifica ou aumenta o efeito terapêutico dos anticorpo humanos.

Em outras modalidades, o indivíduo pode ser

- adicionalmente tratado com um agente que modula (por exemplo intensifica ou inibe, a expressão ou atividade dos receptores Fc γ ou Fc ϵ , por exemplo, tratamento o indivíduo com uma citoquina. As citoquinas preferidas para administração durante o tratamento com a molécula multiespecífica inclui o fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF), fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF).
- 10 As composições (por exemplo anticorpos humanos, anticorpos humanizados, moléculas multiespecíficas e biespecíficas) da invenção também podem ser utilizadas para atingir células que expressam Fc γ R ou uma ou mais BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2, por exemplo para marcar estas células. Para esta utilização o agente de ligação pode ser ligado a uma molécula que pode ser detectada. Assim sendo, a invenção proporciona métodos para localizar ex vivo ou in vitro células que expressam receptores Fc, tais como Fc γ R e/ou uma ou mais BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2. O marcador detectável pode ser, por exemplo, um radioisótopo, um composto fluorescente, uma enzima ou um co-fator enzimático.
- 15 Em uma modalidade em particular, a invenção proporciona métodos para detectar a presença de antígeno de BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 em uma amostra ou medir a quantidade de antígeno de BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 compreendendo por a amostra e uma amostra de controle em contacto com um anticorpo monoclonal humano ou uma porção de ligação ao seu antígeno, que especificamente se liga a BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2, em condições que permitam a formação de um complexo entre o anticorpo ou sua porção e BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2. É, então, detectada a formação de um complexo onde uma formação de complexo diferente entre a amostra comparada com a amostra de controlo é indicativo da
- 25
- 30
- 35

presença do antígeno BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 na amostra.

Em ainda outra modalidade, os imunoconjugados da invenção podem ser utilizados para dirigir compostos (por exemplo, agentes terapêuticos, marcadores, citotoxinas, radiotoxinas, imunossuppressores, etc.) para células que têm receptores de superfície de célula de BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 ligando estes compostos ao anticorpo. Por exemplo, um anticorpo BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 pode ser conjugado a UPT, conforme descrito na Patente U.S. Nº 6,989,452, Pedidos de Patente U.S. Nº 10/160,972, 10/161,234, 11/134,826, 11/134,685, e Pedido de Patente Provisório U.S. Nº 60/720,499, e/ou qualquer um dos compostos de toxina descritos nas Patentes U.S. Nº 6,281,354 e 6,548,530, Publicações de Patente U.S. Nº 20030050331, 20030064984, 20030073852 e 20040087497 ou publicado no documento WO 03/022806, que são aqui integralmente incorporados por citação. Deste modo, a invenção também proporciona métodos para localizar ex vivo ou in vivo células que expressam BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 (por exemplo, um marcador detectável, tal como um radioisótopo, um composto fluorescente, uma enzima ou um co-fator enzimático). Alternativamente, os imunoconjugados podem ser utilizados para matar células que têm receptores de superfície celular de BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 dirigindo citotoxinas ou radiotoxinas para BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2.

A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos que não devem ser interpretados como mais limitadores. Os teores de todas as figuras e todas as referências, patentes e pedidos de publicações de patentes citados por toda esta memória descritiva são expressamente aqui incorporados por citação.

EXEMPLOS

35 Exemplo 1

Geração de Anticorpos Monoclonais humanos

Contra BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1 e BMPR2

Este exemplo revela uma metodologia para a geração de anticorpos monoclonais humanos que especificamente se ligam a BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1 e BMPR2 humana.

Antígeno

5 Camundongos são imunizados com BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 recombinante humana. Em particular, os camundongos foram imunizados com BMP2 ou BMP4 recombinante humana disponíveis comercialmente. A BMP-2 recombinante humana foi obtida da R&D Systems, Inc.
 10 (Catalog N° 355-BM/CF, Lot.- MSA10605H) ou Medtronic, Inc (Lot.- M115006AAJ). A BMP4 recombinante humana foi obtida da R&D Systems, Inc (Catalog N° 31-BP/CF, Lots BEM186051 e BEM316071 e MSA10605H). Os antígenos liofilizados foram reconstituídos de acordo com as instruções do fabricante
 15 e armazenados a -20 °C.

Camundongo HuMAb[®] e Camundongo KM[®] Transgênicos

Pode-se preparar anticorpos monoclonais totalmente humanos para BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1 e BMPR2 utilizando as estirpes HCo7, HCo12 e HCo17 de camundongos
 20 HuMAb transgênicos ou um camundongo KM transgênico, que expressa genes de anticorpo humano. Nas estirpes destes camundongos, o gene endógeno de camundongo de cadeia leve kappa foi dividido homozigoticamente, conforme descrito em Chen et al. (1993) EMBO J. 12:811-820 e o gene
 25 endógeno de cadeia pesada do camundongo foi dividido homozigoticamente conforme descrito no Exemplo 1 da Publicação PCT WO 01/09187. Além disso, esta estirpe de camundongo tem um transgene de cadeia leve kappa humano, KCo5, conforme descrito em Fishwild et al. Nature
 30 Biotechnology 14:845-851 (1996) e um transgene de cadeia pesada humano, HCo7, HCo12 ou HCo17 conforme descrito no Exemplo 2 da Publicação PCT WO 01/09187.

Anticorpos monoclonais totalmente humanos para BMP-2 e BMP-4 foram preparados utilizando estirpes HCo20:02{M/K}
 35 (Balb) F1 e HCo27:04{M/K} do camundongo HuMAb[®] transgênico e a estirpe KM de camundongos transcromossômicos transgênicos, cada um dos quais

expressa genes de anticorpos humanos. Os camundongos HCo20:02{M/K} (Balb) F1 e HCo27:04{M/K} foram construídos conforme descrito no documento WO 2005/058815, que é aqui integralmente incorporado por citação. A estirpe KM foi
5 construída conforme descrito no documento WO 02/43478, que é aqui integralmente incorporado por citação.

Imunizações de Camundongo HuMAb® e Camundongo KM®

Para gerar anticorpos monoclonais totalmente humanos para BMP2 e BMP4 humanas, camundongos do tipo Camundongo
10 HuMAb® e Camundongo KM® foram imunizados com BMP2 ou BMP4 recombinante humana. Os esquemas gerais de imunização para o Camundongo HuMAb® são descritos em Lonberg, N. et al (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 e Publicação PCT
15 WO 98/24884. Os camundongos tinham 6-16 semanas de idade na primeira perfusão de antígeno. Uma preparação purificada (10-15 µg) de BMP2 ou BMP4 recombinante foi utilizada para imunizar cada camundongo HuMAb® e camundongo KM®.

20 Os camundongos transgênicos foram imunizados com antígeno emulsificado em adjuvante Ribi por via intraperitoneal ou subcutânea ou por meio da almofada plantar com intervalos de uma semana por até 12 imunizações. Os camundongos selecionados para perfusões de células B foram ainda
25 imunizados por via intravenosa e intraperitoneal com antígeno 3 dias e novamente um dia antes da esplenectomia. A resposta imune foi monitorizada por sangramentos retroorbitais. O plasma foi rastreado por ELISA (conforme descrito adiante) e os camundongo com
30 titulações suficientes de imunoglobulina humana anti-BMP2 e BMP4 foram usados para fusões. Os camundongos receberam reforços por via intravenosa com antígeno 3 dias e 1 dia antes do sacrifício e remoção do baço. Foram realizadas quatro fusões e foram imunizados um total de 33
35 camundongos.

Seleção de Camundongos HuMAb® ou Camundongo KM® que Produzem Anticorpos Anti-BMP2, Anti-BMP4,

Anti-BMPR1A, Anti-BMPR1B, Anti-ACR1 e Anti-BMPR2

Para selecionar um Camundongo HuMabTM ou um Camundongo KMTM que produz anticorpos que se ligam a BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACR1, e/ou BMPR2, soros dos camundongos imunizados são rastreados por ELISA utilizando antígeno purificado adsorvido em placas de microtitulação conforme descrito por Fishwild et al. (1996), supra.

Em particular, as placas de microtitulação foram revestidas com BMP2 ou BMP4 recombinante purificadas a 1-2 µg /mL em PBS, 50 µL/poços, incubadas à temperatura ambiente de um dia para o outro, lavadas quatro vezes com PBS/Tween (0,05%) e depois bloqueadas com 200 µL/poço de PBS/Tween (0,05%) suplementado com 0,5% de albumina de soro bovino (BSA). Diluições de plasma de camundongos imunizados com BMP2 ou BMP4 foram adicionadas e incubadas por 1-2 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS/Tween (0,05%) e depois incubadas com um anticorpo policlonal específico para Fc de IgG anti-humana, de cabra conjugado com peroxidase do rábano silvestre (HRP) por 1 hora à temperatura ambiente. Depois da lavagem, as placas foram desenvolvidas com substrato ABTS (Moss, Inc. Cat. No. ABTS-1000) e analisadas por espectrofotômetro a uma OD de 415-495.

Os camundongos que desenvolvem as titulações mais altas de anticorpos antígeno-específicos podem ser utilizados para fusões. As fusões são realizadas conforme descrito adiante e os sobrenadantes do hibridoma são testados quanto à atividade anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 por ELISA. Os anticorpos que se ligam antígeno adsorvido a uma placa de microtitulação podem, por exemplo, ser expressos como uma proteína de fusão em células CHO, mas não as células CHO precursoras. Os anticorpos são identificados por citometria de fluxo quanto à ligação a uma linha celular que expressa o antígeno humano recombinante, mas não a uma linha celular de controle que não expressa o respectivo antígeno. A ligação dos anticorpos anti-BMP2,

anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1 e anti-BMPR2 pode ser avaliada, for exemplo, incubando células CHO que expressam o antígeno com o anticorpo de interesse a uma concentração de 20 µg/mL. As células são lavadas e a ligação é detectada com um marcador como, por exemplo FITC conjugado a um Ab IgG anti-humana. As análises citométricas de fluxo são realizadas utilizando um citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA).

10 Geração de Hibridomas Produtores de Anticorpos Monoclonais Humanos para BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACR1 e BMPR2

Hibridomas produtores de anticorpos monoclonais humanos para BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACR1 e BMPR2 são produzidos, por exemplo, utilizando o protocolo descrito adiante. Em particular, esplenócitos de camundongo de um camundongo HuMab® ou um camundongo KM® imunizado com BMP2, foram fundidos utilizando eletrofusão à base de campo elétrico usando um eletroporador de fusão de células de câmara grande Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Os hibridomas resultantes foram, então, rastreados quanto à produção de anticorpos antígeno-específicos utilizando um ensaio ELISA de captura de anticorpo. Suspensões de célula única de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados foram fundidas com células de mieloma de camundongo não secretoras Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) utilizando eletrofusão à base de campo elétrico usando um eletroporador de fusão de células de câmara grande Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). As células foram plaqueadas a aproximadamente 1×10^4 células/poço em placas de microtitulação de fundo plano, seguido por uma incubação de duas semanas em meio seletivo contendo 10% de soro fetal bovino (388D1 (ATCC, CRL TIB-63) meio condicionado, 3-5% de fator de clonagem de hibridoma (Bioveris, Inc.) em DMEM (Mediatech, CRL 10013, com alto teor de glicose, L-glutamina e piruvato

de sódio) suplementado com 10 mM de HEPES, 0,055 mM de 2-mercaptoetanol e 1 x HAT (Sigma, CRL P-7185). Depois de 1-2 semanas, as células foram cultivadas em meio no qual HAT foi substituído por HT. Poços individuais foram, então, rastreados por ELISA (acima descrito) quanto a anticorpos IgG monoclonais humanos anti-BMP2 ou BMP4. Uma vez que tenha ocorrido um extenso crescimento do hibridoma (10-14 dias), o meio foi monitorizado quanto à produção de anticorpos, geralmente depois de 10-14 dias. Os hibridomas secretores de anticorpos foram ainda propagados em vasos de cultura maiores e rastreados uma vez mais quanto à produção de anticorpos antígeno-específicos. Colônias selecionadas foram criopreservadas e clonadas uma ou duas vezes por diluição de limitação. Os subclones estáveis foram, então, criopreservados e propagados in vitro para gerar quantidades de anticorpos suficientes para caracterização adicional.

Dos camundongos imunizados com BMP2, foi produzido um total de 495 colônias de hibridoma que produzem anticorpos anti-BMP2/4 humanos. Trinta e cinco colônias foram selecionadas para clonagem e subsequente propagação para análise adicional. Dentre as trinta e cinco colônias, cinco colônias eram as linhas celulares hibridomais 6H4, 11F2, 12E3, 1F6, 10F6, 10H6, 16b7, 7D6, 8B3, 33F7 e 15F3.

25 Exemplo 2

Caracterização Estrutural de Anticorpos Monoclonais Humanos

Este exemplo revela as características estruturais dos anticorpos monoclonais humanos que especificamente se ligam a BMP2 e BMP4. Em particular, as estruturas dos anticorpos monoclonais anti-BMP2/4 6H4, 11F2, 12E3, 1F6, 10F6, 10H6, 16b7, 7D6, 8B3, 33F7 e 15F3 são reveladas neste exemplo.

As seqüências de cADN que codificam as regiões variáveis de cadeia pesada e leve dos anticorpos monoclonais derivados pela metodologia do Exemplo 1 são obtidas dos hibridomas anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPRIa, anti-

BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2, respectivamente, utilizando técnicas de PCR convencionais e são seqüenciadas utilizando técnicas de seqüenciamento ADN convencionais.

5 As seqüências de cADN que codificam as regiões variáveis de cadeia pesada e leve dos anticorpos monoclonais 6H4, 11F2 e 12E3 foram obtidas dos hibridomas 6H4, 11F2 e 12E3, respectivamente, utilizando técnicas de PCR convencionais e são seqüenciadas utilizando técnicas de
10 seqüenciamento ADN convencionais.

As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 6H4 estão apresentadas na Figura 1A e nas SEQ ID NO: 31 e 37, respectivamente. As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos da região
15 variável de cadeia leve de 6H4 estão apresentadas na Figura 1B e nas SEQ ID NO: 34 e 40, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia pesada 6H4 com as seqüências conhecidas de cadeia pesada de imunoglobulina da linha germinal humana demonstrou que
20 a cadeia pesada 6H4 utiliza um segmento V_H da linha germinal humana V_H 4-34 (SEQ ID NO: 51), um segmento D da linha germinal humana 3-10 (SEQ ID NO: 52) e um segmento J_H da linha germinal humana JH1 (SEQ ID NO: 53). O alinhamento da seqüência 6H4 V_H com a seqüência de linha
25 germinal V_H 4-34 está ilustrado na Figura 4. Análises adicionais da seqüência 6H4 V_H utilizando o sistema Kabat da determinação da região CDR levaram à delineação das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 conforme
ilustrado nas Figuras 1A e 4 e nas SEQ ID NOs: 13, 16 e
30 19, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia leve 6H4 com as seqüências conhecidas de cadeia leve de imunoglobulina da linha germinal humana demonstrou que a
cadeia leve 6H4 utiliza um segmento V_L da linha germinal
35 humana V_K L6 (SEQ ID NO: 54) e um segmento JK da linha germinal humana JK2 (SEQ ID NO: 55). O alinhamento da seqüência 6H4 V_K com a seqüência de linha germinal V_K L6

está ilustrado na Figura 7. Análises adicionais da sequência 6H4 V_L utilizando o sistema Kabat da determinação da região CDR levaram à delineação das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme
5 ilustrado nas Figuras 1B e 7 e nas SEQ ID NOs: 22, 25 e 28, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 11F2 estão apresentadas na Figura 2A e nas SEQ ID NO: 32 e 38, respectivamente. As
10 seqüências de nucleotídeos e aminoácidos da região variável de cadeia leve de 11F2 estão apresentadas na Figura 2B e nas SEQ ID NO: 35 e 41, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia pesada 11F2 com as seqüências conhecidas de cadeia pesada de imunoglobulina da linha germinal humana demonstrou que
15 a cadeia pesada 6H4 utiliza um segmento V_H da linha germinal humana V_H 4-59 (SEQ ID NO: 43), um segmento D da linha germinal humana 2-2 (SEQ ID NO: 45) e um segmento J_H da linha germinal humana JH5b (SEQ ID NO: 46). O
20 alinhamento da seqüência 11F2 V_H com a seqüência de linha germinal V_H 4-59 está ilustrado na Figura 5. Análises adicionais da seqüência 11F2 V_H utilizando o sistema Kabat da determinação da região CDR levaram à delineação das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 conforme
25 ilustrado nas Figuras 2A e 5 e nas SEQ ID NOs: 14, 17 e 20, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia leve 11F2 com as seqüências conhecidas de cadeia leve de imunoglobulina da linha germinal humana demonstrou que a
30 cadeia leve 11F2 utiliza um segmento V_L da linha germinal humana V_K A27 (SEQ ID NO: 48) e um segmento JK da linha germinal humana JK4 (SEQ ID NO: 50). O alinhamento da seqüência 11F2 V_K com a seqüência de linha germinal V_K A27 está ilustrado na Figura 8. Análises adicionais da
35 seqüência 11F2 V_L utilizando o sistema Kabat da determinação da região CDR levaram à delineação das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme

ilustrado nas Figuras 2B e 8 e nas SEQ ID NOs: 23, 26 e 29, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 12E3 estão apresentadas na
5 Figura 3A e nas SEQ ID NO: 33 e 39, respectivamente. As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos da região variável de cadeia leve de 12E3 estão apresentadas na Figura 3B e nas SEQ ID NO: 36 e 42, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia
10 pesada 12E3 com as seqüências conhecidas de cadeia pesada de imunoglobulina da linha germinal humana demonstrou que a cadeia pesada 12E3 utiliza um segmento V_H da linha germinal humana V_H 3-33 (SEQ ID NO: 44) e um segmento J_H da linha germinal humana JH6b (SEQ ID NO: 47). O
15 alinhamento da seqüência 12E3 V_H com a seqüência de linha germinal V_H 4-33 está ilustrado na Figura 6. Análises adicionais da seqüência 12E3 V_H utilizando o sistema Kabat da determinação da região CDR levaram à delineação das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 conforme
20 ilustrado nas 3A e 6 e nas SEQ ID NOs: 15, 18 e 21, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia leve 12E3 com as seqüências conhecidas de cadeia leve de imunoglobulina da linha germinal humana demonstrou que a
25 cadeia leve 12E3 utiliza um segmento V_L da linha germinal humana V_K L15 (SEQ ID NO: 49) e um segmento J_K da linha germinal humana JK4 (SEQ ID NO: 50). O alinhamento da seqüência 12E3 V_K com a seqüência da linha germinal V_K L15 está ilustrado na Figura 9. Análises adicionais da
30 seqüência 12E3 V_L utilizando o sistema Kabat da determinação da região CDR levaram à delineação das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 conforme ilustrado nas 3B e 9 e in SEQ ID NOs: 24, 27 e 30, respectivamente.

35 As seqüências de cADN que codificam as regiões variáveis de cadeia pesada e leve dos anticorpo monoclonais 10F6, 10H6 e 16b7 foram obtidas dos hibridomas 10F6, 10H6 e

16b7, respectivamente, utilizando técnicas de PCR convencionais e foram seqüenciadas utilizando técnicas de seqüenciamento de ADN convencionais. A cadeia pesada dos anticorpos monoclonais 10F6 e 10H6 utilizam a linha
 5 germinal humana V_H 3-33 (SEQ ID NO: 44), os genes D_H 6-13 e J_H JH4b (SEQ ID NO: 88). A cadeia leve dos anticorpos monoclonais 10F6 e 10H6 utilizam a linha germinal humana V_K L15 e os genes J_K JK4. A cadeia pesada do anticorpo monoclonal 16B7 utiliza a linha germinal humana V_H 3-33,
 10 D_H 6-13 e os genes J_H JH2 (SEQ ID NO: 89). A cadeia leve do anticorpo monoclonal 16B7 utiliza a linha germinal humana V_K L15 e os genes J_K JK4.

A seqüência de cADN que codifica as regiões variáveis de cadeia pesada e leve dos anticorpo monoclonais 1F6 foi
 15 obtida do hibridoma 1F6 utilizando técnicas de PCR convencionais e foi seqüenciada utilizando técnicas de seqüenciamento de ADN convencionas. A cadeia pesada do anticorpo monoclonal 1F6 utiliza a linha germinal humana V_H 4-59, D_H 2-2 e os genes J_H JH5b. A cadeia leve do
 20 anticorpo monoclonal 1F6 utiliza a linha germinal humana V_K A27 e os genes J_K JK4.

As seqüências de cADN que codificam as regiões variáveis de cadeia pesada e leve dos anticorpo monoclonais 7D6, 8B3, 33F7 e 15F3 foram obtidas dos hibridomas 7D6, 8B3,
 25 33F7 e 15F3, respectivamente, utilizando técnicas de PCR convencionais e foram seqüenciadas utilizando técnicas de seqüenciamento de ADN convencionais. As cadeias pesadas destes anticorpos monoclonais utilizam a linha germinal humana V_H 1-69 (SEQ ID NO: 91) e os genes J_H JH3b (SEQ ID
 30 NO: 90). As cadeia leves destes anticorpos monoclonais utilizam a linha germinal humana V_K A27 e os genes J_K JK2.

Exemplo 3

Caracterização da Especificidade de Ligação dos
 35 Anticorpos Monoclonais Anti-BMP2, Anti-BMP4, Anti-BMPR1A, Anti-BMPR1B, Anti-ACTR1 e Anti-BMPR2

Este exemplo revela metodologias para comparar os

anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 na ligação a antígeno imunopurificado por ensaios ELISA e Western blot ou
5 ligação a BMP2/4 em tecidos utilizando imuno-histoquímica para examinar a especificidade da ligação do antígeno.

Os antígenos recombinantes marcados com His e marcados com myc são revestidos numa placa de um dia para o outro, depois testados quanto à ligação contra os anticorpos monoclonais humanos gerados pela metodologia revelada no
10 Exemplo 1. São realizados procedimentos ELISA convencionais. Os anticorpos monoclonais humanos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 são adicionados a uma concentração de 1 µg/mL e a titulação foi diminuída por diluições em série
15 1:2. Anticorpo policlonal IgG anti-humano, de cabra (específico de cadeia Fc ou kappa) conjugado com peroxidase de rábano silvestre (HRP) é utilizado como o anticorpo secundário.

B7H4-Ig recombinante é purificada a partir de
20 sobrenadantes de células 293T transfectadas com uma construção de B7H4-Ig por cromatografia utilizando a proteína A. Uma placa ELISA é revestida com os anticorpos humanos, seguido pela adição de proteína purificada e, depois, a detecção como o antisoro anti-B7H4 de coelho. A
25 proteína recombinante Penta-B7H4 com um marcador C-9 é purificada a partir de sobrenadantes de células 293T transfectadas com uma construção de Penta-B7H4-C9 por cromatografia utilizando uma coluna de afinidade 2A7. Uma
30 placa ELISA é revestida com Fc anti-camundongo, seguido por um anti-C9 monoclonal (0,6 µg/mL), depois Penta-B7H4 titulado conforme indicado, depois os anticorpos monoclonais humanos a 1 µg/mL. Fc anti-camundongo
35 revestido seguido por M-anti-C9 (0,6 µg/mL), depois Penta-BMP2, Penta-BMP4, Penta-BMPR1A, Penta-BMPR1B, Penta-ACR1, e/ou Penta-BMPR2 titulados, depois anticorpos monoclonais humanos @ 1 µg/mL.

Os anticorpos anti-BMP2/4 foram caracterizados quanto à

ligação a BMP2 em condições de redução e não redução por ensaios Western blot. 0,5 µg da proteína BMP2 humana recombinante (Medtronic) foram diluídos numa amostra de tampão (Cell Signaling, Cat N° SB7722) com ou sem um
5 agente de redução. As amostras foram aquecidas até 100° por 3 minutos para desnaturar a proteína seguido por eletroforese e Western blotting. As proteínas ligadas a membrana foram sondadas com 0,5 µg/mL dos anticorpos de teste seguido pela detecção com IgG anti-humana de cabra
10 Fab2 conjugada com fosfatase alcalina (Jackson ImmunoResearch Labs, cat N° 109-056-09) e manchada com BCIP/NBT (Pierce, cat N° 34042). Os resultados demonstram que todos os anticorpos monoclonais testados reconhecem uma banda não reduzida a aproximadamente 36 kDa que
15 corresponde ao homodímero BMP2. Além disso, alguns dos anticorpos monoclonais (por exemplo, 8B3) reconheceram a BMP2 em condições de redução. Foram reveladas duas bandas de aproximadamente 17-18 kDa que correspondem a monómeros BMP.

20 Para imuno-histoquímica, são utilizados 2.000 µm de núcleos de tecido de camundongo (IMGENEX Histo-Array; Imgenex Corp., San Diego, CA). Depois de secar por 30 minutos, as seções são fixas com acetona (à temperatura ambiente por 10 minutos) e secas ao ar por 5 minutos. As
25 lâminas são lavadas em PBS e, depois, pré-incubadas com 10% de soro de cabra normal em PBS por 20 minutos e, subsequentemente, incubadas com 10 µg/mL de anticorpo fitcilado em PBS com 10% de soro de cabra normal por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas
30 foram lavadas três vezes com PBS e incubadas por 30 minutos com anti-FITC de camundongo (10 µg/mL DAKO) à temperatura ambiente. As lâminas são lavadas uma vez mais com PBS e incubadas com conjugado de HRP anti-camundongo de cabra (DAKO) por 30 minutos à temperatura ambiente. As
35 lâminas são lavadas de novo 3X com PBS. Diaminobenzidina (Sigma) é utilizada como substrato, resultando numa coloração marrom. Depois de lavagem com água destilada,

as lâminas são contra-coradas com hematoxilina por 1 minuto. Subsequentemente, as lâminas são lavadas por 10 segundos em água destilada corrente e montadas em glicerol (DAKO).

5 Os epítomos reconhecidos por um subconjunto dos anticorpos monoclonais anti-BMP2/4 foram determinados utilizando peptídeos dos receptores conjugados a biotina e capturados por chip de estreptavidina (SA chip, BIAcore) e analisados por BIAcore. Os anticorpos foram
10 fluídos pelos chips a 40 ug/mL. Os anticorpos 8B3 e 7D6 ligaram-se a um epítopo de BMP2 (ISMLYLDENEKVVLK) (SEQ ID NO:92) que se liga a um receptor BMP2 tipo 2. Os anticorpos 12E3, 11F2 e 16B7 se ligaram ao epítopo de BMP2 (QAKHKQRKRLKSSCKRH) (SEQ ID NO:93) que se liga à
15 heparina. Além disso, o anticorpo monoclonal humano anti-BMP2/4 33F7 (SEQ ID NOS: 63 e 71) bloquearam a interação entre a BMP2/4 e a heparina. Isto bloqueia a função da BMP2/4.

Exemplo 4

20 Caracterização da Ligação dos Anticorpos Anti-BMP2, Anti-BMP4, Anti-BMPR1A, Anti-BMPR1B, Anti-ACR1 e/ou Anti-BMPR2 ao Respectivo Antígeno Expresso Sobre a Superfície de uma Linha Celular de Condrócitos

Este exemplo revela a metodologia de citometria de fluxo
25 para testar os anticorpos anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 quanto à ligação a células transfectantes de antígeno de CHO e condrócitos que expressam BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACR1, e/ou BMPR2 sobre a sua superfície celular.

30 Uma linha celular CHO transfectada com BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACR1, e/ou BMPR2 bem como a linha celular de condrócitos ATDC5 (RIKEN Biosource, RCB0565) ou a linha celular fibroblástica MC3T3 (Nº de Acesso ATCC CRL-2595, CRL-2596, CRL-2594 e CRL-2593) são testadas
35 quanto à ligação ao anticorpo. As células são lavadas e a ligação é detectada com um Ab IgG anti-humano marcado com FITC. Análises por citometria de fluxo são realizadas

utilizando um citômetro FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Exemplo 5

Análise da Afinidade de Ligação de Anticorpos Monoclonais 5 Anti-BMP2, Anti-BMP4, Anti-BMPR1A, Anti-BMPR1B, Anti- ACTR1 e/ou Anti-BMPR2

Este exemplo revela metodologias para testar anticorpos monoclonais quanto à afinidade de ligação específica a uma BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2.

- 10 Em uma metodologia, células HEK são transfectadas com BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 de comprimento total utilizando técnicas convencionais e desenvolvidas em meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (FBS). As células são tripsinizadas e lavadas uma
- 15 vez em tampão de ligação à base de Tris (24 mM de Tris pH 7,2, 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 2 mM de Glicose, 1 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂, 0,1% de BSA) e ajustadas a 2×10^6 células/mL em tampão de ligação. Placas Millipore (MAFB NOB) são revestidas com 1% de leite seco magro em
- 20 água e armazenadas a 4 °C de um dia para o outro. As placas são lavadas três vezes com 0,2 mL de tampão de ligação. Cinquenta microlitros de tampão por si só são adicionados aos poços de ligação máxima (ligação total). Vinte e cinco microlitros de tampão por si só são
- 25 adicionados aos poços de controle (ligação não específica). Concentrações variadas de anticorpos ¹²⁵I são adicionadas a todos os poços num volume de 25 µL. Concentrações variadas de anticorpos não marcados num excesso de 100 vezes são adicionadas num volume de 25 µL
- 30 aos poços de controle e 25 µL de células CHO transfectadas com BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 (2×10^6 células/mL) em tampão de ligação são adicionadas a todos os poços. As placas são incubadas por 2 horas a 200 RPM num agitador a 4 °C. Depois da
- 35 incubação, as placas Millipore são lavadas três vezes com 0,2 mL de tampão de lavagem frio (24 mM de Tris pH 7,2, 500 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 2 mM de Glicose, 1 mM de

CaCl₂, 1 mM de MgCl₂, 0,1% de BSA). Os filtros são removidos e contados num contador gama. A avaliação da ligação de equilíbrio é realizada utilizando parâmetros de ligação de sítio único com o software Prism (San Diego, CA). Os dados são analisados por regressão não linear utilizando uma dose-resposta sigmoidal (PRIZM™) e resultam no cálculo de uma EC50, que é utilizada para classificar os anticorpos para EC50 e 95% CI.

Em uma outra metodologia, os anticorpos monoclonais anti-BMP2/4 foram caracterizados por afinidade e cinética de ligação por análise Biacore (Biacore AB, Uppsala, Suécia). Os anticorpos anti-BMP-2/4 foram capturados num chip com um anticorpo Fc anti-humano covalente ligado a um chip CM5 (chip revestido com carboxi metil dextrana) por meio de aminas primárias, utilizando química de acoplamento de amina convencional e kit proporcionado pela Biacore. A ligação foi medida inundando BMP2 ou BMP4 em tampão HBS-EP (pH 7,4) a uma concentração de 10 nM a um caudal de 25 µL/min. A cinética da associação antígeno-anticorpo foi seguida por 2 minutos e a dissociação da cinética foi seguida por 8 minutos. As curvas de associação e dissociação foram ajustadas a um modelo de ligação Langmuir 1:1 utilizando o software BIAevaluation (Biacore, AB). Os valores K_d, k_{on} e k_{off} que foram determinados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Afinidade de ligação de anticorpos monoclonais (mAbs) anti BMP-2&4.

BMP-2				BMP-4			
mAb	K _d (nM)	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)	mAb	K _d (nM)	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)
1F6	0,02	4,65x10 ⁶	8,49x10 ⁻⁵	1F6	0,0003	4,97x10 ⁶	1,27x10 ⁻⁶
11F2	0,01	2,83x10 ⁶	3,09x10 ⁻⁵	11F2	0,0007	4,53x10 ⁴	3,04x10 ⁻⁸
16B7	0,08	3,70x10 ⁶	2,82x10 ⁻⁴	16B7	0,02	2,86x10 ⁶	6,12x10 ⁻⁵
12E3	0,02	3,39x10 ⁶	8,26x10 ⁻⁵	12E3	0,28	1,75x10 ⁶	4,82x10 ⁻⁴
10F6	0,19	2,04x10 ⁶	3,85x10 ⁻⁴	10F6	0,75	2,61x10 ⁶	1,97x10 ⁻³
6H4	0,10	1,42x10 ⁷	1,98x10 ⁻⁴	6H4	0,30	2,00x10 ⁶	4,97x10 ⁻⁴
7D6	0,28	4,00x10 ⁶	1,14x10 ⁻³	7D6	0,42	2,84x10 ⁶	1,20x10 ⁻³
8B3	0,19	3,02x10 ⁶	5,82x10 ⁻⁴	8B3	0,18	4,69x10 ⁶	8,27x10 ⁻⁴
15F3	0,03	7,96x10 ⁶	2,70x10 ⁻⁴	15F3	0,18	3,14x10 ⁶	5,60x10 ⁻⁴
33F7	0,12	5,71x10 ⁶	6,54x10 ⁻⁴	33F7	0,38	3,65x10 ⁶	1,40x10 ⁻³

Exemplo 6Reatividade Cruzada dos Anticorpos Monoclonais Anti-BMP2/4 com um painel de BMPs.

Os anticorpos monoclonais anti-BMP2/4 foram caracterizados quanto à reatividade cruzada pela família BMP medindo suas afinidades de ligação com BMP-3, 5, 6, 7 e 8b bem como com GDF-5 e 7 por análise Biacore. As BMPs e GDFs foram ligadas covalentemente a chips CM5 (chip revestido com carboxi metil dextrana) por meio de amins primárias, utilizando química de acoplamento de amina convencional e kit proporcionado pela Biacore. A ligação foi medida inundando os anticorpos em tampão HBS-EP (pH 7,4) a uma concentração de 20 ug/mL a um caudal de 20 µL/min. A cinética da associação antígeno-anticorpo foi seguida por 4 minutos e a dissociação da cinética foi seguida por 6 minutos. As curvas de associação e dissociação foram ajustadas a um modelo de ligação Langmuir 1:1 utilizando o software BIAevaluation (Biacore, AB). Os valores Kd que foram determinados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Reatividade cruzada dos anticorpos monoclonais humanos BMP-2&4 contra um painel de membros da família BMP.

	BMP2	BMP4	BMP5	BMP6	BMP7	BMP8b	BMP3	GDF5	GDF7
1F6	0,7	1,0	124	85800	71,7	não	não	17,7	8,8
11F2	0,6	0,4	26,3	77,0	20,0	não	104	16,3	3,5
16B7	0,5	0,5	18,1	30,0	8,9	não	não	80,0	2,8
12E3	1,4	2,2	132	não	106	não	não	não	não
10F6	17,5	76	20,1	103	18,8	195	não	não	não
6H4	3,7	104	5,9	40,3	1,1	159	246	0,8	1,1
7D6	4,6	7,7	não	não	não	não	não	493	1810
8B3	4,7	11,2	não	não	155	não	não	90,8	57,5
15F3	4,6	12,0	289	não	79900	não	não	64,8	57,7
33F7	4,3	271	não	não	579,0	não	não	não	não

Exemplo 7:25 Bloqueio do Receptor de BMP Tipo I & II

A capacidade dos anticorpos monoclonais anti-BMP2/4 de bloquear a ligação de BMP4 a receptores de BMP tipo I e tipo II (R&D Systems, Minneapolis, MN) foi determinada

utilizando Biacore.

Os receptores de BMP tipo I e tipo II foram ligados covalentemente a um chip CM5 (chip revestido com carboxi metil dextrana) por meio de aminas primárias, utilizando 5 química de acoplamento de amina convencional e kit proporcionado pela Biacore. Misturas do complexo anticorpo-antígeno foram inundadas pelos receptores imobilizados. As concentrações de anticorpo eram uma série de diluições duplas começando em 400 nM para o tipo 10 II e 200 nM para o tipo I. A concentração de BMP4 era entre 3 e 10 nM. Os anticorpos e a BMP-4 foram pré-incubados por, pelo menos, 1 hora antes da injeção. As misturas de anticorpo-antígeno foram injetadas a um caudal de 5 µL/min por 3 minutos. Os anticorpos que têm 15 epítomos que se sobrepõem serão cancelados (resposta diminuída com concentração aumentada de anticorpo) ao passo que aqueles com epítomos distintos se ligarão simultaneamente ao antígeno (resposta aumentada com concentração aumentada de anticorpo). Esta análise 20 demonstrou que 1F6, 11F2, 16B7, 12E3, 10F6, 6H4, 7D6, 8B3, 15F3 e 33F7 foram todos capazes de bloquear a ligação da BMP a um receptor tipo II variando de bloqueio forte a bloqueio fraco (Figura 10a). Além disso, alguns dos anticorpo monoclonais também foram capazes de 25 bloquear a ligação tipo I ao passo que outros só bloquearam a ligação do receptor tipo II (Figura 10b).

Anticorpos Monoclonais bloqueiam a ligação de BMP2 à Heparina

A capacidade dos anticorpos monoclonais anti-BMP2/4 de 30 bloquear a ligação de BMP-2 à heparina (Sigma) foi determinada utilizando um ensaio AlphaScreen (Berthold Technologies). Heparina biotinilada (Sigma) a uma concentração de 5 nM foi capturada por pérolas doadoras revestidas com estreptavidina (25 ug/mL) e os anticorpos 35 (5 nM) foram capturados utilizando pérolas receptoras revestidas com a proteína A. A BMP/2 foi titulada numa série de diluições duplas começando de 20 nM. Se os

anticorpos bloqueiam a ligação de heparina a BMP-2, então não seria formado um complexo entre a heparina, a BMP2 e os anticorpos monoclonais humanos e nenhum sinal seria observado. Se os anticorpos não bloqueiam a ligação de heparina a BMP2, então um complexo terciário seria formado e um sinal aumentaria com concentração aumentadas de BMP2. Neste ensaio, apenas o anticorpo monoclonal 33F7 bloqueou a ligação de heparina a BMP2. O 33F7 se liga tanto à heparina como à BMP2 e também bloqueia a interação entre a heparina e a BMP2.

Exemplo 8:

Estabilidade do Anticorpo

Termoestabilidade dos Anticorpos Monoclonais anti-BMP2/4

A estabilidade térmica dos anticorpos monoclonais anti-BMP2/4 foi determinada por análise calorimétrica da temperatura de fusão dos anticorpos. As medições caloriméricas das temperaturas de fusão (Tf) foram realizadas num microcalorímetro diferencial de varredura VP-Capillary DSC que é combinado com um amostrador automático (MicroCal LLC, Northampton, MA, EUA). O volume de amostras de células foi de 0,144 mL. Os dados de desnaturação sobre os anticorpos foram obtidos pelo aquecimento das amostras, a uma concentração de 0,25 mg/mL, de 30 a 95 °C a uma taxa de 1 °C/min. As amostras de anticorpos estavam presentes em soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS) a um pH 7,4. O mesmo tampão foi utilizado na célula de referência para obter a capacidade calorífica molar por comparação. Os termogramas observados foram corrigidos na linha de base e os dados normalizados analisados com base em um modelo de não-2 estados, utilizando o software Origin v7.0. Conforme ilustrado na Tabela 3, o 11F2 é o anticorpo anti-BMP2/4 mais estável. Apresenta o valor Tf mais alto para o seu pico maior.

Tabela 3. Dados de calorimetria diferencial de varredura para anticorpos monoclonais anti-BMP2/4.

	Tf (Maior)	Tf (menor)	Tf (menor)
11F2	81	71	

6H4	80	71	
15F3	80	72	
12E3	79	74	
1F6	78	71	85
8B3	75	83	
7D6	74	84	
10F6	73	68	
16B7	72	82	
33F7	72	82	

Estabilidade Química dos Anticorpos Monoclonais anti-BMP2/4

A estabilidade dos anticorpos monoclonais anti-BMP2/4 foi comparada medindo o ponto médio da sua desnaturação química por espectroscopia de fluorescência. As medições de fluorescência de desnaturação química foram realizadas num SPEX Fluorolog 3.22 equipado com leitor de placa Micromax (SPEX, Edison, NJ). As medições foram realizadas em amostras de anticorpos que tinham sido deixadas por 20 horas a equilibrar em 16 concentrações diferente de cloridrato de guanidina em tampão PBS. As medições foram feitas em placas de 384 poços de superfície não ligante, de baixo volume, pretas (Corning, Acton, MA) e necessitavam de 1 μ M de anticorpo num volume de poço de 12 μ L. A fluorescência foi excitada a 280 nm e os espectros de emissão foram medidos entre 300 e 400 nm. A velocidade de varredura foi de 1 segundo por nm e as fendas foram reguladas em faixa passante de 5 nm. Um tampão branco foi realizado utilizando PBS e automaticamente subtraído dos dados. Os dados se enquadraram num modelo de desnaturação de dois estados utilizando o software GraphPad Prism. Conforme apresentado na Tabela 4, o 15F3 é o anticorpo monoclonal anti-BMP2/4 mais estável. Tem o ponto médio de desdobramento mais alto (ponto médio).

Tabela 4: A desnaturação química dos anticorpos monoclonais anti BMP-2&4 determinada por espectroscopia de fluorescência.

	Ponto médio de desdobramento (M)
15F3	2,70

10F6	2,66
6H4	2,61
8B3	2,53
1F6	2,47
7D6	2,41
16B7	2,38
12E3	bifásico

Exemplo 9

Anticorpos Anti-BMP2/4 bloqueiam Sinalização de Células BMP

Os efeitos em sinalização celular pelos anticorpos monoclonais BMP2/4 foram determinados observando uma expressão de fosfatase alcalina em células C2C12. Para medir a capacidade dos anticorpos monoclonais de neutralizar a bioatividade de BMP2 e BMP4, células C2C12 foram plaqueadas a uma densidade de 8.000 células por poço numa placa de 96 poços de fundo plano em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e 1x pen/estrep e foram incubadas a 37° com CO₂ de um dia para o outro. Na manhã seguinte, o meio foi substituído por 100 uL de meio fresco contendo anticorpos monoclonais, seguido por 100 uL de meio contendo a proteína BMP2 humana recombinante (Medtronic) ou a proteína BMP4 (R&D, Cat N° 314-BP/CF) a uma concentração de 1,6 µg/mL. As placas foram incubadas a 37° com CO₂ por 2 dias.

No segundo dia, as células foram testadas quanto à atividade de fosfatase alcalina utilizando um método de permeabilização. Nesta altura, os meios foram removidos dos poços e as células foram fixadas com 100 µL de uma solução gelada de acetona/etanol (50:50 v/v). A solução de acetona/etanol foi removida imediatamente e foi substituída por 100 uL de substrato líquido de p-Nitrofenel fosfato (Sigma, Cat. N° N7653). As placas foram mantidas no escuro por 3 minutos à temperatura ambiente e a reação foi parada pela adição de 50 µL de NaOH 3N a cada poço. A clivagem do substrato resulta numa reação de cor que é proporcional à quantidade de fosfatase alcalina nas células. As placas foram lidas num

dispositivo SpectraMax 340 (Molecular Devices) a um comprimento de onda de 405 nm. O valor de ND₅₀ para os anticorpos monoclonais nestas condições eram entre 1-5 ug/mL.

- 5 Conforme ilustrado na Figura 11, a expressão da fosfatase alcalina por BMP2 (Figura 11a) e BMP4 (Figura 11b) foi inibida pelos anticorpos monoclonais BMP2/4. Deste modo, os anticorpos aqui revelados podem neutralizar as proteínas BMP.

10 Exemplo 10

Anticorpos Anti-BMP2/4 bloqueiam a ossificação heterotrópica induzida por BMP2 in vivo

- Este exemplo demonstra que os anticorpos monoclonais anti-BMP2/4 bloqueiam a formação óssea heterotrópica induzida por BMP2. A BMP2 induz a formação óssea heterotrópica quando é absorvida por um gel de colágeno e implantada subcutaneamente no membro posterior de um camundongo. A BMP2 recruta progenitores condrócitos e células vasculares para o sítio do implante para iniciar a formação óssea. Por um período de 3 semanas, o gel de colágeno tornar-se substituído por osso maduro (Nakamura, Y. et. al., J Bone Miner Res. 2003 Oct; 18(10):1854-62). Para demonstrar que os anticorpos anti-BMP2/4 podem bloquear a formação óssea heterotrópica in vivo, camundongos foram implantados com gel de colágeno impregnado com BMP2 e foram tratados, imediatamente, com anticorpos anti-BMP2/4 ou uma IgG irrelevante de controle (BD Pharmingen, cat N° A6618M).
- 30 Esponjas absorventes de colágeno (Helistat® Bone Graft, Integra Life Sciences cat N° 1690-ZZ) foram embebidas com 96 ug/mL de BMP2 (Medtronic, Infuse Bone graft) e foram cortadas em implantes com um peso final de 0,23 gramas cada. As esponjas de colágeno embebidas com BMP-2 foram implantadas subcutaneamente nos membros posteriores esquerdos e direitos de 36 camundongos C57BL6 machos, adultos. Para a cirurgia de implante os camundongos foram

anestesiados com cetamina/xilazina de acordo com protocolos convencionais. No membro posterior direito a pele sobre o músculo semitendinoso foi raspada utilizando um barbeador elétrico e preparada com fricção com clorexidina e álcool. O camundongo foi colocado em inclinação lateral. Utilizando um bisturi ou tesoura, foi feita uma incisão de 0,5 cm na pele alinhada ao osso longo. Uma bolsa de implante subcutânea foi preparada por dissecação romba. Utilizando técnica asséptica, cada amostra de implante (esponja de colágeno embebida com ~25 ug de BMP2) foi colocada na bolsa. O mesmo procedimento foi repetido para o implante no membro esquerdo posterior. O fechamento da ferida foi realizado utilizando clips cirúrgicos de aço inoxidável.

Imediatamente após a cirurgia, os animais foram divididos em 6 grupos de tratamento (Tabela 5) e uma injeção em bolo em uma única dose de 300 uL do anticorpo apropriado a uma concentração de 1,25 mg/mL foi administrada à cavidade peritoneal de cada camundongo. O Grupo 1 foi tratado com uma IgG irrelevante de controle. Os Grupos 2-6 foram tratados com anticorpos monoclonais neutralizantes de BMP2/4 (Tabela 5).

Depois de 21 dias, os implantes e tecidos adjacentes foram extirpados e colocados em formalina tamponada neutra a 10%. Os implantes extirpados foram submetidos a densitometria de varredura (PIXI, GE Lunar, Madison, Wisconsin). A área mineral óssea (BMA) para cada implante foi tabulada. Conforme apresentado na Figura 12, todos os 5 anticorpos monoclonais foram eficaz na prevenção da formação óssea induzida por BMP-2 nos implantes.

Tabela 5.

Grupo	Implante (esquerdo e direito)	mAb (anticorpos monoclonais)	Concentração (dose única IP)	N
1	subcutâneo	IgG de controle	15 mg/Kg	6
2	subcutâneo	12 E3	15 mg/Kg	6
3	subcutâneo	1F6	15 mg/Kg	6

4	subcutâneo	11F2	15 mg/Kg	6
5	subcutâneo	10F6	15 mg/Kg	6
6	subcutâneo	6H4	15 mg/Kg	6

Exemplo 11

Internalização dos Anticorpos Monoclonais Anti-BMPR1A, Anti-BMPR1B, Anti-ACTR1 e/ou Anti-BMPR2

Este exemplo demonstra a metodologia para testar os anticorpos monoclonais humanos anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2/4 quando à capacidade de internalizar em células CHO que expressam BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 utilizando um ensaio de internalização Hum-Zap. O ensaio Hum-Zap testa quanto à internalização de um anticorpo humano primário por meio da ligação de um anticorpo secundário com afinidade para IgG humana conjugada à toxina saporina.

As células que expressam o antígeno são semeadas a $1,25 \times 10^4$ células/poço em poços de 100 μ L de um dia para o outro. Os respectivos anticorpos monoclonais humanos antígeno-específicos são adicionados aos poços a uma concentração de 10 pM. Um anticorpo de controlo isótopo que é não específico para qualquer dos antígenos é utilizado como controlo negativo. Hum-Zap (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, IT-22-25) é adicionado a uma concentração de 11 nM e as placas foram deixadas em incubação por 72 horas. As placas foram, então, pulsadas com 1,0 μ Ci de 3 H-timidina por 24 horas, colhidas e lidas num contador de cintilação Top Count Scintillation Counter (Packard Instruments, Meriden, CT).

A atividade de internalização dos conjugados de saporina e células CHO que expressam antígeno é medida com uma dose-resposta através de uma faixa de ~500 pM a 1 pM utilizando os anticorpos monoclonais humanos gerados conforme descrito no Exemplo 1. Uma linha celular precursora de CHO e Hu IgG-SAP são utilizadas como controlos negativos como medida de toxicidade de fundo ou internalização não específica.

Exemplo 12

Avaliação da Exterminação de Células de Anticorpos Conjugados com Toxina Anti-BMP2, Anti-BMP4, Anti-BMPR1A, Anti-BMPR1B, Anti-ACTR1, e/ou Anti-BMPR2 numa Linha Celular de Condrócitos

5 Este exemplo revela a metodologia para testar os anticorpos monoclonais anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2 conjugados a uma toxina quanto à sua capacidade para matar uma linha celular de condrócitos que expressa o antígeno num ensaio
10 de proliferação celular.

Os anticorpos HuMAb preparados pela metodologia do Exemplo 1 podem ser conjugados a uma toxina por meio de um ligante, como por exemplo, um ligante peptidil, hidrazona ou dissulfureto. Um condrócito que expressa
15 antígeno ou linha celular osteoblástica, tal como as células ATDC5 ou MC3T3, é semeado entre cerca de 1 e 3 x 10⁴ células/poço em poços de 100 μ L por 3 horas. Um conjugado de anticorpo-toxina é adicionado aos poços a uma concentração inicial de 30 nM e a titulação diminuída
20 em diluições em série 1:3. Um anticorpo de controle isótipo que é não específico para o antígeno é utilizado como controle negativo. As placas são deixadas em incubação por 69 horas. As placas, são, então, pulsadas com 1,0 μ Ci de ³H-timidina por 24 horas, colhidas e lidas
25 num contador de cintilação Top Count Scintillation Counter (Packard Instruments, Meriden, CT). A exterminação celular é demonstrada por uma diminuição dependente da concentração de anticorpo-toxina na incorporação de ³H-timidina em células condrócitos que
30 expressam o antígeno.

Exemplo 13

Avaliação da Atividade de ADCC dos Anticorpos Anti-BMP2, Anti-BMP4, Anti-BMPR1A, Anti-BMPR1B, Anti-ACTR1, e/ou Anti-BMPR2

35 Este exemplo revela a metodologia para testar anticorpos monoclonais anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACTR1, e/ou anti-BMPR2 quanto à capacidade

de matar linhas celulares do antígeno⁺ na presença de células efetoras por meio de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) num ensaio de citotoxicidade por técnica de fluorescência.

- 5 Células efetoras humanas são preparadas a partir de sangue inteiro como a seguir. Células mononucleares de sangue periférico humano são purificadas com sangue inteiro heparinizado por separação Ficoll-paque convencional. As células foram ressuspensas em meio
- 10 RPMI1640 contendo 10% de FBS e 200 U/mL de IL-2 humana e incubadas de um dia para o outro a 37 °C. No dia seguinte, as células foram colhidas e lavadas quatro vezes em meio de cultura e ressuspensas a 2×10^7 células/mL. As células alvo de antígeno⁺ são incubadas
- 15 com reagente BATDA (Perkin Elmer, Wellesley, MA) a 2,5 μ L de BATDA por 1×10^6 células alvo/mL por 20 minutos a 37 °C. As células alvo são lavadas quatro vezes, reduzidas por centrifugação e levadas a um volume final de 1×10^5 células/mL.
- 20 As linhas celulares de antígeno⁺ são testadas quanto a ADCC anticorpo-específico para os anticorpos monoclonais humanos utilizando a análise de emissão de fluorescência Delfia como a seguir. Cada linha de célula alvo (100 μ L de células alvo marcadas) é incubada com 50 μ L de células
- 25 efetoras e 50 μ L de anticorpo. Uma proporção de alvo para efetora de 1:50 é utilizada por toda a experiência. Em todos os estudos é utilizado um controle isótopo IgG1 humana como controle negativo. Depois de um pulso de centrifugação de 2000 rpm e uma hora de incubação a 37
- 30 °C, os sobrenadantes são colhidos, rapidamente centrifugadas outra vez e 20 μ L do sobrenadante são transferidos para uma placa de fundo plano, à qual 180 μ L de solução Eu (Perkin Elmer, Wellesley, MA) são adicionados e lidos num leitor RubyStar (BMG Labtech). A
- 35 % de lise é calculada como a seguir: (libertação de amostra - liberação espontânea * 100) / (libertação máxima - liberação espontânea), onde a liberação

espontânea é a fluorescência dos poços que só contêm células alvo e a liberação máxima é a fluorescência dos poços contendo células alvo que foram tratadas com Triton-X a 2%.

5 Exemplo 14

Tratamento In vivo de Modelo de Xenoenxerto de Tumor utilizando Anticorpos

Anti-BMP2, Anti-BMP4, Anti-BMPR1A, Anti-BMPR1B, Anti-ACR1,

10 e/ou Anti-BMPR2 Despídos e conjugados com Citotoxina

Este exemplo revela a metodologia para o tratamento in vivo de camundongos implantados com uma célula tumoral de carcinoma com anticorpos conjugados com toxina para examinar o efeito in vivo dos anticorpos sobre o crescimento do tumor.

Células de carcinoma são expandidas in vitro utilizando procedimentos laboratoriais convencionais. Camundongos nus atímicos Ncr machos (Taconic, Hudson, NY) entre 6-8 semanas de idade são implantados subcutaneamente no flanco direito com $7,5 \times 10^6$ células em 0,2 mL de PBS/Matrigel (1:1) por camundongo. Os camundongos são pesados e medidos tridimensionalmente quanto a tumores utilizando um paquímetro eletrônico duas vezes por semana depois do implante. Os volumes dos tumores são calculados como altura x largura x comprimento. Os camundongos com tumores médios de 110-270 mm³ são separados aleatoriamente em grupos de tratamento. Os camundongos são dosados intraperitonealmente com veículo PBS, anticorpo de controle isótopo conjugado com toxina ou

25 como altura x largura x comprimento. Os camundongos com tumores médios de 110-270 mm³ são separados aleatoriamente em grupos de tratamento. Os camundongos são dosados intraperitonealmente com veículo PBS, anticorpo de controle isótopo conjugado com toxina ou

30 HuMab anti-BMP2, anti-BMP4, anti-BMPR1A, anti-BMPR1B, anti-ACR1, e/ou anti-BMPR2 HuMab conjugado com toxina no Dia 0. Exemplos de compostos de toxina que podem ser conjugados aos anticorpos da presente invenção são descritos na Publicação do Pedido PCT N° WO2005/112919.

35 Os camundongos que receberam os anticorpos monoclonais humanos específicos de antígeno são testados com três compostos de toxinas diferentes. Os camundongos são

monitorizados quanto ao crescimento do tumor por 60 dias depois da dosagem. Os camundongos são sacrificados quando os tumores atingem o ponto final do tumor (2000 mm³). Anticorpos específicos para antígeno adequados conjugados a uma toxina prolongam o tempo médio para alcançar o volume do ponto final do tumor (2000 mm³) e atrasam o progresso de crescimento do tumor. Deste modo, o tratamento com este conjugado de anticorpo-toxina tem um efeito inibidor direto in vivo sobre o crescimento do tumor.

Exemplo 15

Produção de Anticorpos Monoclonais Humanos Desfucosilados

Este exemplo revela a metodologia para produzir anticorpos monoclonais humanos que não têm resíduos fucosil. Demonstrou-se que os anticorpos com quantidades reduzidas de resíduos fucosil aumentam a capacidade de ADCC do anticorpo. A linha celular CHO Ms704-PF, que não tem o gene fucosiltransferase FUT 8 (Biowa, Inc., Princeton, NJ), é eletroporada com um vetor que expressa as cadeias pesadas e leves de um HuMAb específico de antígeno. Os clones resistentes a droga são selecionados por crescimento em meio Ex-Cell CHO 325-PF (JRH Biosciences, Lenexa, KS) com 6 mM de L-glutamina e 500 µg/mL de G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os clones são rastreados quanto à expressão de IgG por ensaio ELISA convencional. São produzidos dois clones separados, B8A6 e B8C11, cujas taxas de produção variam de 1,0 a 3,8 picogramas/células/dia.

Exemplo 16

Avaliação da Atividade ADCC de Anticorpos Desfucosilados

Este exemplo revela o teste de anticorpos monoclonais desfucosilados e não desfucosilados quanto à capacidade de matar células BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2⁺ na presença de células efetoras por meio de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) num ensaio de citotoxicidade por fluorescência.

Os anticorpos monoclonais humanos específicos de antígeno

são desfucosilados conforme descrito acima. Células efetoras humanas são preparadas a partir de sangue inteiro como a seguir. Células mononucleares de sangue periférico são purificadas a partir de sangue inteiro
 5 heparinizado por separação Ficoll-paque convencional. As células são ressuspensas em meio RPMI1640 contendo 10% de FBS (meio de cultura) e 200 U/mL de IL-2 humana e incubadas de um dia para o outro a 37 °C. No dia seguinte, as células foram colhidas e lavadas uma vez no
 10 meio de cultura e ressuspensas a 2×10^7 células/mL. As células alvo de antígeno⁺ são incubadas com reagente BATDA (Perkin Elmer, Wellesley, MA) a 2,5 μ L de BATDA por 1×10^6 células alvo/mL em meio de cultura suplementado com 2,5 mM de probenecid (meio de ensaio) por 20 minutos
 15 a 37° C. As células alvo são lavadas quatro vezes em PBS com 20mM de HEPES e 2,5 de mM probenecid, reduzidas por centrifugação e levadas a um volume final de 1×10^5 células/mL em meio de ensaio.

Uma proporção de alvo para efetora de 1:100 é utilizada
 20 por toda a experiência. É utilizado um controle isótopo de IgG1 humana como controle negativo. Depois de um pulso de centrifugação de 2100 rpm e uma hora de incubação a 37° C, os sobrenadantes são colhidos, rapidamente centrifugadas outra vez e 20 μ L do sobrenadante são
 25 transferidos para uma placa de fundo plano, à qual 180 μ L de solução Eu (Perkin Elmer, Wellesley, MA) são adicionados e lidos num leitor Fusion Alpha TRF (Perkin Elmer). A % de lise é calculada como a seguir:
 30
$$\frac{(\text{libertação de amostra} - \text{libertação espontânea} * 100)}{(\text{libertação máxima} - \text{libertação espontânea})}$$
, onde a liberação espontânea é a fluorescência dos poços que só contêm células alvo e a liberação máxima é a fluorescência dos poços contendo células alvo que foram tratadas com Lisol a 3%. A linha celular que expressa o
 35 antígeno⁺ apresentará uma citotoxicidade mediada por anticorpo com os anticorpos antígenos-específicos HuMAb e uma percentagem aumentada de lise específica associada

com a forma desfucosilada do anticorpo antígeno-específico. Deste modo, os anticorpos HuMAb desfucosilados aumentam a citotoxicidade específica contra as células que expressam o antígeno.

- 5 A presente invenção não é limitada em âmbito pelas modalidades aqui descritas. Na realidade, várias modificações da invenção, além daquelas aqui descritas, ficarão evidentes aos especialistas na técnica a partir da descrição acima e das figuras associadas. Estas
- 10 modificações se destinam a se enquadrar no âmbito das reivindicações apensas.

Patentes, pedidos de patentes, publicações, descrições de produto e protocolos são citados ao longo de toda esta memória descritiva, cujas revelações são aqui

15 integralmente incorporadas por citação para todas as finalidades.

SUMÁRIO DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

SEQ ID NO:	SEQUÊNCIA	SEQ ID NO:	SEQUÊNCIA
1	BMP2 n.t.	48	a.a. linha germinal V _K A27
2	BMP2 a.a.	49	a.a. linha germinal V _K L15
3	BMP4 n.t.	50	a.a. linha germinal J _K JK4
4	BMP4 a.a.	51	a.a. linha germinal V _H 4-34
5	BMPR1A n.t.	52	a.a. linha germinal D _H 3-10
6	BMPR1A a.a.	53	a.a. linha germinal J _H JH1
7	BMPR1B n.t.	54	a.a. linha germinal V _K L6
8	BMPR1B a.a.	55	a.a. linha germinal J _K JK2
9	ACTR1 n.t.	56	V _H a.a. 10F6
10	ACTR1 a.a.	57	V _H a.a. 10H6
11	BMPR2 n.t.	58	V _H a.a. 16B7
12	BMPR2 a.a.	59	V _H a.a. 1F6
13	V _H CDR1 a.a. 6H4	60	V _H a.a. 7D6
14	V _H CDR1 a.a. 11F2	61	V _H a.a. 8B3
15	V _H CDR1 a.a. 12E3	62	V _H a.a. 15F3
16	V _H CDR2 a.a. 6H4	63	V _H a.a. 33F7
17	V _H CDR2 a.a. 11F2	64	V _K a.a. 10F6
18	V _H CDR2 a.a. 12E3	65	V _K a.a. 10H6
19	V _H CDR3 a.a. 6H4	66	V _K a.a. 16B7
20	V _H CDR3 a.a. 11F2	67	V _K a.a. 1F6
21	V _H CDR3 a.a. 12E3	68	V _K a.a. 7D6
22	V _K CDR1 a.a. 6H4	69	V _K a.a. 8B3
23	V _K CDR1 a.a. 11F2	70	V _K a.a. 15F3
24	V _K CDR1 a.a. 12E3	71	V _K a.a. 33F7
25	V _K CDR2 a.a. 6H4	72	V _H n.t. 10F6
26	V _K CDR2 a.a. 11F2	73	V _H n.t. 10H6

SEQ ID NO:	SEQUÊNCIA	SEQ ID NO:	SEQUÊNCIA
27	V _K CDR2 a.a. 12E3	74	V _H n.t. 16B7
28	V _K CDR3 a.a. 6H4	75	V _K n.t. 1F6
29	V _K CDR3 a.a. 11F2	76	V _H n.t. 7D6
30	V _K CDR3 a.a. 12E3	77	V _H n.t. 8B3
31	V _H a.a. 6H4	78	V _H n.t. 15F3
32	V _H a.a. 11F2	79	V _H n.t. 33F7
33	V _H a.a. 12E3	80	V _K n.t. 10F6
34	V _K a.a. 6H4	81	V _K n.t. 10H6
35	V _K a.a. 11F2	82	V _K n.t. 16B7
36	V _K a.a. 12E3	83	V _K n.t. 1F6
37	V _H n.t. 6H4	84	V _K n.t. 7D6
38	V _H n.t. 11F2	85	V _K n.t. 8B3
39	V _H n.t. 12E3	86	V _K n.t. 15F3
40	V _K n.t. 6H4	87	V _K n.t. 33F7
41	V _K n.t. 11F2	88	a.a. linha germinal J _H JH4b
42	V _K n.t. 12E3	89	a.a. linha germinal J _H JH2
43	a.a. linha germinal V _H 4-59	90	a.a. linha germinal J _H JH3b
44	a.a. linha germinal V _H 3-33	91	a.a. linha germinal V _H 1-69
45	a.a. linha germinal D _H 2-2	92	epítoto de BMP2
46	a.a. linha germinal J _H JH5b	93	epítoto de BMP2
47	a.a. linha germinal J _H JH6b		

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao seu antígeno, um fragmento de anticorpo, ou um anticorpo mimético, caracterizado pelo fato de se ligar a um epítopo em BMP2 ou BMP4 humana reconhecida por um anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada contendo a seqüência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:32 e uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:35.
2. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do referido anticorpo ser um anticorpo de comprimento total de um isótopo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4.
3. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do referido anticorpo ser selecionado do grupo que consiste de: um anticorpo inteiro, um fragmento de anticorpo, um anticorpo humanizado, um anticorpo de cadeia simples, um imunoconjugado, um anticorpo desfucosilado e um anticorpo biespecífico.
4. Fragmento de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do referido fragmento ser selecionado do grupo que consiste de: um UniBody, um anticorpo de domínio e um Nanocorpo.
5. Anticorpo mimético, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser selecionado do grupo que consiste de: um Affibody, um DARPin, uma Anticalina, um Avimer, um Versabody e uma Duocalina.
6. Imunoconjugado, conforme definido na reivindicação 3, caracterizado pelo fato do referido imunoconjugado compreender um agente terapêutico.
7. Imunoconjugado, conforme definido na reivindicação 3, caracterizado pelo fato do agente terapêutico ser uma citotoxina ou um isótopo radioativo.
8. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do referido anticorpo se ligar a

- BMP2 ou BMP4 humana com uma K_D de $5,5 \times 10^{-9}$ M ou menor.
9. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do referido anticorpo se ligar a BMP2 ou BMP4 humana com uma K_D de 3×10^{-9} M ou menor.
- 5 10. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do referido anticorpo se ligar a BMP2 ou BMP4 humana com uma K_D de 2×10^{-9} M ou menor.
11. Composição, caracterizada pelo fato de compreender o anticorpo isolado ou porção de ligação ao seu antígeno
- 10 conforme definido na reivindicação 1 e um veículo farmacologicamente aceitável.
12. Molécula de ácido nucléico isolada, caracterizada pelo fato de codificar a cadeia pesada ou leve do anticorpo isolado ou seu antígeno conforme definido na
- 15 reivindicação 1.
13. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de compreender a molécula de ácido nucléico conforme definida na reivindicação 12.
14. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de
- 20 compreender o vetor de expressão conforme definido na reivindicação 13.
15. Método para preparar um anticorpo anti-BMP2 ou anti-BMP4, caracterizado pelo fato de compreender os passos de:
- 25 a) obter uma célula hospedeira que contém uma ou mais moléculas de ácido nucléico que codificam a anticorpo de acordo com a reivindicação 1;
- b) desenvolver a célula hospedeira numa cultura de células hospedeiras;
- 30 c) proporcionar condições de cultura da célula hospedeira onde a uma ou mais moléculas de ácido nucléico são expressas; e
- d) recuperar o anticorpo da célula hospedeira ou da cultura de células hospedeiras.
- 35 16. Método para tratar ou prevenir uma doença associada com a formação óssea anormal e ossificação, caracterizado pelo fato do referido método compreender o passo de

administrar a um indivíduo um anticorpo anti-BMP2 ou anti-BMP4 ou porção de ligação ao seu antígeno, numa quantidade eficaz para tratar ou prevenir a doença.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato da referida doença ser selecionada do grupo que consiste de: fibrodisplasia ossificante progressiva (FOP), heteroplasia óssea progressiva (POH), lesão da medula espinhal, hematoma intramuscular, complicações de cirurgia ortopédica, artrite psoriática, osteoartrite, espondilite anquilosante (AS), antropatias seronegativas, hiperostose esquelética, otosclerose, anquilose do estribo, câncer ósseo, câncer da próstata, exotose, arterosclerose, doença cardíaca valvular.

18. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato da referida doença ser um câncer selecionado do grupo que consiste de: câncer ósseo, câncer da próstata, câncer do pulmão, melanoma, câncer hemotopoiético, câncer renal e câncer da mama.

19. Anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao seu antígeno, um fragmento de anticorpo, ou um anticorpo mimético, caracterizado pelo fato de se ligar a um epítopo em BMP2 ou BMP4 humana reconhecido por um anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve selecionada do grupo consistindo de:

(a) a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada apresentada na SEQ ID NO: 33 e a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve apresentada na SEQ ID NO: 36;

(b) a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada apresentada na SEQ ID NO: 34 e a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve apresentada na SEQ ID NO: 37;

(c) a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada apresentada na SEQ ID NO: 56 e a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve

apresentada na SEQ ID NO: 64;

(d) a seqüência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada apresentada na SEQ ID NO: 57 e a seqüência de aminoácidos da região variável de cadeia leve
5 apresentada na SEQ ID NO: 65;

(e) a seqüência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada apresentada na in SEQ ID NO: 58 e a seqüência de aminoácidos da região variável de cadeia leve apresentada na SEQ ID NO: 66;

10 (f) a seqüência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada apresentada na SEQ ID NO: 59 e a seqüência de aminoácidos da região variável de cadeia leve apresentada na SEQ ID NO: 67;

(g) a seqüência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada apresentada na SEQ ID NO: 60 e a seqüência de aminoácidos da região variável de cadeia leve
15 apresentada na SEQ ID NO: 68;

(h) a seqüência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada apresentada na SEQ ID NO: 61 e a seqüência de aminoácidos da região variável de cadeia leve
20 apresentada na SEQ ID NO: 69;

(i) a seqüência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada apresentada na SEQ ID NO: 62 e a seqüência de aminoácidos da região variável de cadeia leve
25 apresentada na SEQ ID NO: 70; a

(j) a seqüência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada apresentada na SEQ ID NO: 63 e a seqüência de aminoácidos da região variável de cadeia leve apresentada na SEQ ID NO: 71.

30 20. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato do referido anticorpo ser selecionado do grupo que consiste de: um anticorpo inteiro, um fragmento de anticorpo, um anticorpo humanizado, um anticorpo de cadeia simples, um
35 imunoconjugado, um anticorpo desfucosilado e um anticorpo biespecífico.

21. Fragmento de anticorpo, de acordo com a

reivindicação 19, caracterizado pelo fato do fragmento ser selecionado do grupo que consiste de: um UniBody, um anticorpo de domínio e um Nanocorpo.

22. Anticorpo mimético, de acordo com a reivindicação 5 19, caracterizado pelo fato do mimético ser selecionado do grupo que consiste em: um Affibody, um DARPin, uma Anticalina, um Avimer, um Versabody e uma Duocalina.

23. Composição, caracterizada pelo fato de compreender o anticorpo isolado ou porção de ligação ao seu antígeno 10 conforme definido na reivindicação 19 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

24. Molécula de ácido nucléico isolada, caracterizada pelo fato de codificar a cadeia pesada ou leve do anticorpo isolado ou a porção de ligação ao seu antígeno 15 conforme definido na reivindicação 19.

25. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de compreender a molécula de ácido nucléico conforme definido na reivindicação 24.

26. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de 20 compreender o vetor de expressão conforme definido na reivindicação 25.

27. Hibridoma, caracterizado pelo fato de expressar o anticorpo ou porção de ligação ao seu antígeno conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 ou 19.

25 28. Método para preparar o anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 ou 19, caracterizado pelo fato de compreender os passos de:

(a) imunizar um animal transgênico compreendendo genes de imunoglobulina humana com um peptídeo BMP2 ou BMP4;

30 (b) recuperar células B do referido animal transgênico;

(c) fazer hibridomas a partir das referidas células B;

(d) selecionar os hibridomas que expressam anticorpos que se ligam a BMP2 ou BMP4; e

(e) recuperar os referidos anticorpos que se ligam a 35 BMP2 ou BMP4 a partir dos referidos hibridomas selecionados.

29. Método para preparar os anticorpos anti-BMP2 ou

anti-BMP4, caracterizado pelo fato de compreender os passos de:

- (a) imunizar um animal transgênico compreendendo genes de imunoglobulina humana com um peptídeo BMP2 ou BMP4;
- 5 (b) recuperar mARN das células B do referido animal transgênico;
- (c) converter o referido mARN em cADN;
- (d) expressar o referido cADN em fagos de tal modo que os anticorpos anti-BMP2 ou anti-BMP4 codificados pelo
- 10 referido cADN sejam apresentados na superfície dos referidos fagos;
- (e) selecionar os fagos que apresentam anticorpos anti-BMP2 ou anti-BMP4;
- (f) recuperar as moléculas de ácido nucléico dos
- 15 referidos fagos selecionados que codificam as referidas imunoglobulinas anti-BMP2 ou anti-BMP4;
- (g) expressar as referidas moléculas de ácido nucléico recuperadas numa célula hospedeira; e recuperar os anticorpos da referida célula que se ligam a BMP2 ou
- 20 BMP4.

1/15

```

      Q   V   H   L   Q   Q   W   G   A   G   L   L   K   P   S   E   T   L
1  CAG GTG CAC CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                CDR1
                                -----
      S   L   T   C   A   V   Y   G   G   S   F   S   G   Y   Y   W   S   W
55  TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC TGG AGC TGG

                                CDR2
                                -----
      I   R   Q   P   P   G   K   G   L   E   W   I   G   E   I   N   H   S
109 ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT AGT

                                CDR2
                                -----
      G   S   T   N   Y   N   P   S   L   K   S   R   V   T   I   S   V   D
163 GGA AGC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC

      T   S   K   N   Q   F   S   L   K   L   S   S   V   T   A   A   D   T
217 ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

                                CDR3
                                -----
      A   V   Y   Y   C   A   R   E   Y   Y   Y   G   S   E   S   E   Y   F
271 GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG TAT TAT TAT GGT TCG GAG AGT GAA TAC TTC

                                CDR3
                                -----
      Q   H   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
325 CAG CAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

FIG.1a

2/15

-
E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR1

A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

CDR2

Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

CDR2

A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

CDR3

L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

CDR3

R S N W P H T F G Q G T K L E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCT CAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

FIG.1b

3/15

```

      Q   V   Q   L   Q   E   S   G   P   G   L   V   K   P   S   E   T   L
1  CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
      S   L   T   C   T   V   S   G   D   S   I   R   S   Y   Y   W   S   W
55  TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GAC TCC ATC AGG AGT TAC TAC TGG AGC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
      I   R   Q   P   P   G   K   G   L   E   W   I   G   Y   I   Y   Y   R
109 ATC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT GGA TAT ATC TAT TAC AGA

                                CDR2
                                ~~~~~
      G   S   T   H   Y   N   P   S   L   K   S   R   V   T   I   S   V   D
163 GGG AGC ACC CAC TAC AAC CCC TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC

      T   S   K   N   Q   F   S   L   K   M   S   S   V   T   A   A   D   T
217 ACG TCC AAG AAT CAG TTC TCC CTG AAG ATG AGC TCT GTG ACC GCT GCG GAC ACG

                                CDR3
                                ~~~~~
      A   V   Y   Y   C   A   R   I   C   S   S   I   S   C   W   G   W   F
271 GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGG ATT TGT AGT AGT ATC AGC TGT TGG GCG TGG TTC

                                CDR3
                                ~~~~~
      D   P   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
325 GAC CCC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

FIG.2a

4/15

-
E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
1 GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR1

A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

CDR2

Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

CDR2

R A T G I P D R F S G S G S G T D F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

CDR3

T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

CDR3

Q Y G S S P L T F G G G T K V E I K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

FIG.2b

5/15

```

      Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S   L
1  CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
                                -----
      R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   Y   G   M   H   W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGT TAT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
                                -----
      V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   I   W   D   D
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG GAT GAT

                                CDR2
                                -----
      G   R   K   K   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R
163 GGA AGA AAG AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTT ACC ATC TCC AGA

      D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D
217 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
                                -----
      T   A   V   Y   Y   C   A   R   E   P   A   G   V   W   G   M   D   V
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG CCG GCG GGG GTT TGG GGT ATG GAC GTC

      W   G   Q   G   T   T   V   T   V   S   S
325 TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
```

FIG.3a

6/15

```

      D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R
1  GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
      -----
      V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A   W   Y
55  GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
      -----
      Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A   S   S   L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
      -----
      Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

      L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   Y   C   Q   Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR3
      -----
      Y   N   S   Y   P   L   T   F   G   G   G   T   K   V   E   I   K
271 TAT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
```

FIG.3b

7/15

4-34 linha germinal 6H4 VH	Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S - - H - - - - - - - - - - - - -
4-34 linha germinal 6H4 VH	L T C A V Y G G S F S <u>CDR1</u> - - - - - - - - - - G Y Y W S W I R
4-34 linha germinal 6H4 VH	Q P P G K G L E W I G E <u>CDR2</u> - - - - - - - - - - I N H S G S T
4-34 linha germinal 6H4 VH	<u>N Y N P S L K S R V T I S V D T S K N</u> - - - - - - - - - - - - - - - - -
4-34 linha germinal 6H4 VH	Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C - - - - - - - - - - - - - - - - -
4-34 linha germinal JH1 linha germinal 6H4 VH	A R <u>CDR3</u> - - E Y Y Y G S E S - - - - - E Y F Q H W G Q G
JH1 linha germinal 6H4 VH	T L V T V S S - - - - - - -

FIG.4

8/15

4-59 linha germinal	Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L
11F2 VH	- - - - - - - - - - - - - - -
4-59 linha germinal	S L T C T V S G G S I S <u>CDR1</u> S Y Y W S W
11F2 VH	- - - - - - - D - - R - - - - -
4-59 linha germinal	I R Q P P G K G L E W I G <u>CDR2</u> Y I Y Y S
11F2 VH	- - - - - - - - - - - - - - R
4-59 linha germinal	<u>G S T N Y N P S L K S R V T I S V D</u>
11F2 VH	- - - H - - - - - - - - - - -
4-59 linha germinal	T S K N Q F S L K L S S V T A A D T
11F2 VH	- - - - - - - M - - - - - - -
4-59 linha germinal	A V Y Y C A R <u>CDR3</u>
JH5b linha germinal	- - - - - - - I C S S I S C W G W F
11F2 VH	- - - - - - - - - - - - - - -
JH5b linha germinal	<u>D P W G Q G T L V T V S S</u>
11F2 VH	- - - - - - - - - - - - - - -

FIG.5

[illegible]

FIG. 6

L6 linha germinal	E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S
6H4 VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L6 linha germinal	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	D	A	S	N	R	A	T	G	I	P	A	R	F
6H4 VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L6 linha germinal	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	R	S	N
6H4 VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L6 linha germinal	W	P																													
JK2 linha germinal																															
6H4 VK	-	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FIG.7

A27 linha germinal E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
11F2 VK -

CDR1
A T L S C R A S Q S V S S Y L A W
A27 linha germinal -
11F2 VK -

CDR
Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
A27 linha germinal -
11F2 VK -

2
R A T G I P D R F S G S G S G T D F
A27 linha germinal -
11F2 VK -

T L T I S R L E P E D F A V Y C Q
A27 linha germinal -
11F2 VK -

CDR3
Q Y G S S P L T F G G G T K V E I K
A27 linha germinal -
JK4 linha germinal -
11F2 VK -

FIG.8

L15 linha germinal	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S	
12E3 VK	- - - - -	- - - - -
L15 linha germinal	W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A S S L Q S G V P S R F	CDR2
12E3 VK	- - - - -	- - - - -
L15 linha germinal	S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S	CDR3
12E3 VK	- - - - -	- - - - -
L15 linha germinal	Y P	
JK4 linha germinal	L T F G G G T K V E I K	
12E3 VK	- - - - -	- - - - -

FIG. 9

13/15

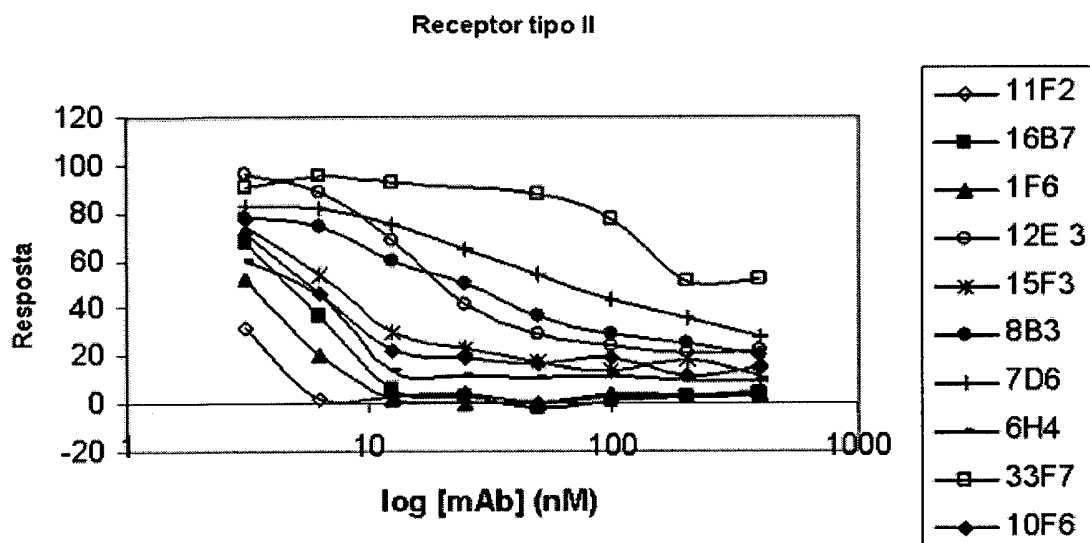


FIG.10a

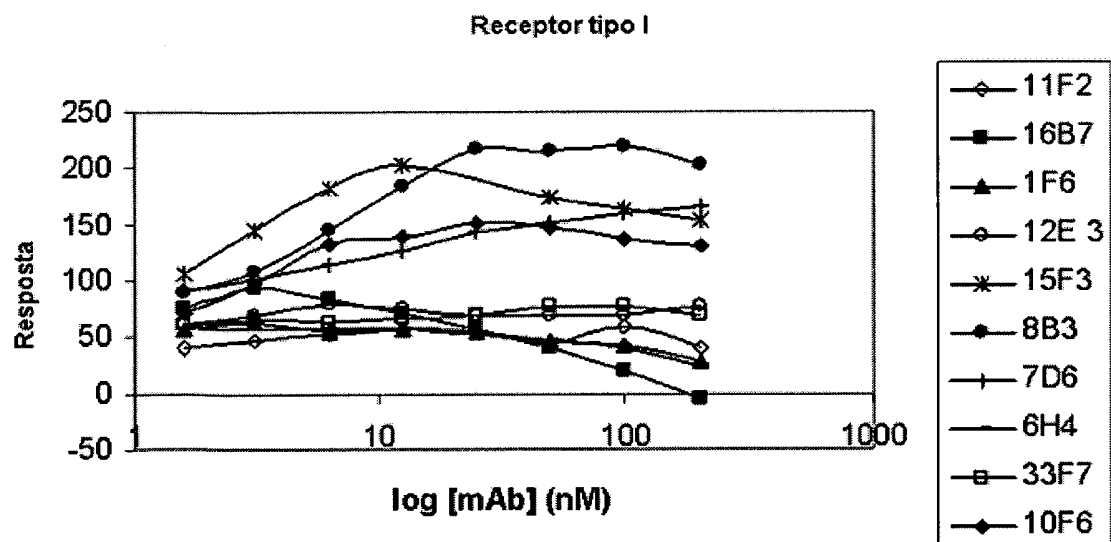


FIG.10b

14/15

hmAbs anti-BMP 2/4 bloqueiam a expressão da fosfatase alcalina induzida por BMP2 em células C2C12

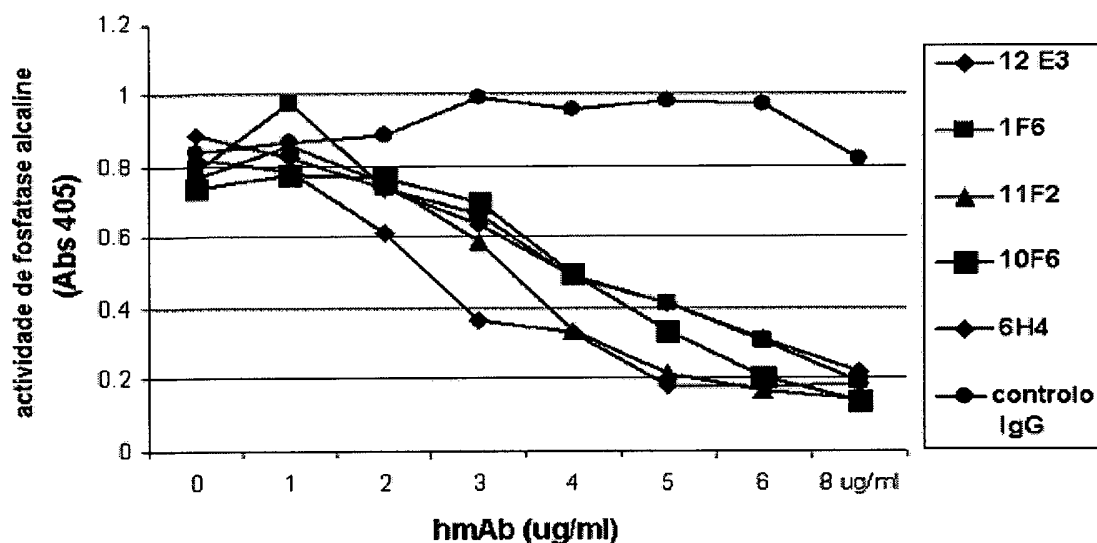


FIG.11a

hmAbs anti-BMP 2/4 bloqueiam a expressão da fosfatase alcalina induzida por BMP4 em células C2C12

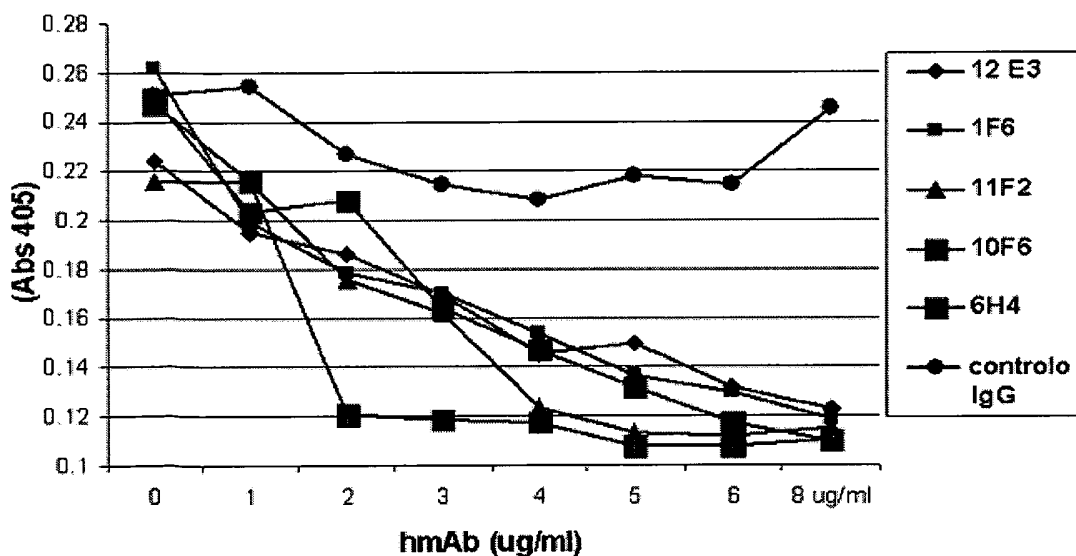


FIG.11b

15/15

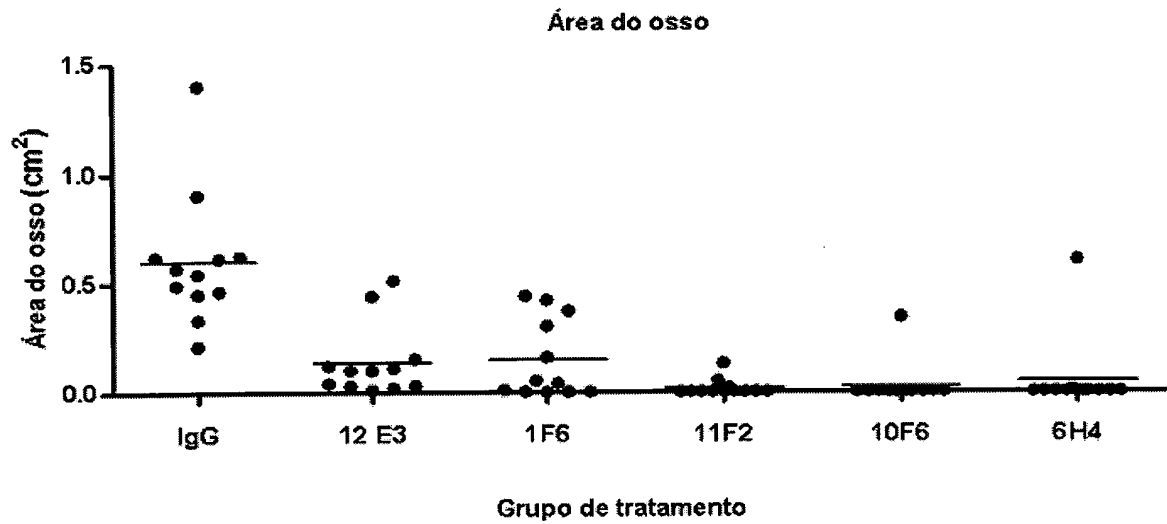


FIG.12

RESUMO

“ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO OU UMA PORÇÃO DE LIGAÇÃO AO SEU ANTÍGENO, UM FRAGMENTO DE ANTICORPO, UM ANTICORPO MIMÉTICO, IMUNOCONJUGADO, COMPOSIÇÃO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA PREPARAR UM ANTICORPO ANTI-BMP2 OU ANTI-BMP4, 5 MÉTODO PARA TRATAR OU PREVENIR UMA DOENÇA ASSOCIADA COM A FORMAÇÃO ÓSSEA ANORMAL E OSSIFICAÇÃO, HIBRIDOMA E MÉTODO PARA PREPARAR O ANTICORPO”.

10 A presente invenção proporciona anticorpos monoclonais isolados, particularmente anticorpos monoclonais humanos, que especificamente se ligam a BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2 com alta afinidade. São também proporcionadas moléculas de ácido nucléico que codificam os anticorpos da invenção, vetores de expressão, células hospedeiras e métodos para expressar os anticorpos da invenção. São também proporcionados imunoconjugados, 15 moléculas biespecíficas e composições farmacêuticas que compreendem os anticorpos da invenção e, opcionalmente, um ou mais agente terapêutico adicional. A invenção também proporciona métodos para tratar doenças associadas com a formação óssea anormal e ossificações mediadas por BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, e/ou BMPR2. 20