



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0410963-5 B1



(22) Data do Depósito: 02/06/2004

(45) Data de Concessão: 03/09/2019

(54) Título: ANTICORPO QUE ESPECIFICAMENTE SE LIGA A UMA REGIÃO NO FATOR DE CRESCIMENTO DO TECIDO CONJUNTIVO HUMANO, ANTICORPO QUIMÉRICO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UM ANTICORPO, PAR DE POLINUCLEOTÍDEOS, POLINUCLEOTÍDEO RECOMBINANTE, E, MICRORGANISMO

(51) Int.Cl.: C07K 16/22; A61K 39/395; A61P 27/06; A61P 35/04; C12N 5/12.

(30) Prioridade Unionista: 01/06/2004 US 10/858,186; 04/06/2003 US 60/475,598.

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

(72) Inventor(es): AI Y. LIN; THOMAS B. NEFF; NOELYN A. OLIVER; WILLIAM R. USINGER; QINGJIAN WANG; DAVID A. YEOWELL.

(86) Pedido PCT: PCT US2004017080 de 02/06/2004

(87) Publicação PCT: WO 2004/108764 de 16/12/2004

(85) Data do Início da Fase Nacional: 02/12/2005

(57) Resumo: "ANTICORPO ISOLADO OU PORÇÃO BIOLOGICAMENTE ATIVA DESTA, LINHAGEM CELULAR, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODOS DE NEUTRALIZAR UMA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CTGF E DE TRATAR OU PREVENIR UM DISTÚRBO ASSOCIADO COM CTGF, ANTICORPO QUIMÉRICO, MEDICAMENTO, SEQUÊNCIA DE POLINUCLEOTÍDEO, POLINUCLEOTÍDEO RECOMBINANTE, E, CÉLULA HOSPEDEIRA". A presente invenção diz respeito aos anticorpos que se ligam ao CTGF. Os anticorpos são particularmente direcionados às regiões do CTGF envolvidas em atividades biológicas associadas com fibrose. A invenção também diz respeito aos métodos de usar os anticorpos para tratar os distúrbios associados com o CTGF incluindo os distúrbios fibróticos localizados e sistêmicos incluindo aqueles do pulmão, fígado, coração, pele, e rim.

“ANTICORPO QUE ESPECIFICAMENTE SE LIGA A UMA REGIÃO
NO FATOR DE CRESCIMENTO DO TECIDO CONJUNTIVO
HUMANO, ANTICORPO QUIMÉRICO, COMPOSIÇÃO
FARMACÊUTICA, USO DE UM ANTICORPO, PAR DE
5 POLINUCLEOTÍDEOS, POLINUCLEOTÍDEO RECOMBINANTE, E,
MICRORGANISMO”

Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório US
Serial Nº 60/475.598, depositado em 4 de Junho de 2003, incorporado em sua
totalidade aqui por referência.

10 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito aos anticorpos que se ligam
ao fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF). Os anticorpos são
particularmente direcionados às regiões de CTGF envolvidas em atividades
biológicas associadas com vários distúrbios.

15 FUNDAMENTOS

Fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF)

O CTGF é uma glicoproteína secretada 36kD, rica em cisteína,
de ligação de heparina, originalmente isolada dos meios de cultura de células
endoteliais da veia umbilical humana. (Ver por exemplo, Bradham *et al.*
20 (1991) J Cell Biol 114: 1285 a 1294; Grotendorst e Bradham, Patente US
Nº 5.408.040). O CTGF pertence à família CCN (CTFG, Cyr61, Nov)
de proteínas (glicoproteínas secretadas), que inclui o produto genético inicial
imediatamente induzido por soro Cyr61, o oncogene putativo Nov, a proteína FISP-
12 associada a ECM, o gene CEF-10 induzível por src, a proteína secretada
25 WISP-3 induzível por Wnt, e a proteína anti-proliferativa HICP/rCOP
(Brigstock (1999) Endocr Rev 20: 189 a 206; O'Brian *et al.* (1990) Mol Cell
Biol 10: 3569 a 3577; Joliot *et al.* (1992) Mol Cell Biol 12: 10 a 21; Ryseck
et al. (1990) Cell Growth and Diff 2: 225 a 233; Simmons *et al.* (1989) Proc

Natl Acad Sci USA 86: 1178 a 1182; Pennica *et al.* (1998) Proc Natl Acad Sci U S A, 95: 14717 a 14722; e Zhang *et al.* (1998) Mol Cell Biol 18: 6131 a 6141). As proteínas CCN são caracterizadas pela conservação de 38 resíduos de cisteína que constituem mais de 10% do teor de aminoácido total e produzem uma estrutura modular com os domínios de terminal N e C. A estrutura modular de CTGF inclui os motivos conservados para a proteína de ligação do fator de crescimento tipo insulina (IGF-BP) e o fator de von Willebrand (VWC) no domínio de terminal N, e trombospondina (TSP1) e um motivo do grupo da cisteína no domínio de terminal C.

A expressão de CTGF é induzida pelos membros da superfamília de Fator de Crescimento de Transformação beta (TGF β), que inclui TGF β -1, -2, e -3, proteína morfogenética óssea (BMP)-2, e activina, assim como uma variedade de outros moduladores reguladores incluindo dexametasona, trombina, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e angiotensina II; e estímulos ambientais incluindo hiperglicemia e hipertensão. (Ver, por exemplo, Franklin (1997) Int J Biochem Cell Biol 29: 79 a 89; Wunderlich (2000) Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 238: 910 a 915; Denton e Abraham (2001) Curr Opin Rheumatol 13: 505 a 511; e Riewald (2001) Blood 97: 3109 a 3116; Riser *et al.* (2000) J Am Soc Nephrol 11: 25 a 38; e Publicação Internacional Nº WO 00/13706). A estimulação de TGF β da expressão de CTGF é rápida e prolongada, e não requer a aplicação persistente. (Igarashi *et al.* (1993) Mol Biol Cell 4: 637 a 645.) A expressão realçada de CTGF por TGF β envolve a ativação transcricional por intermédio de elementos reguladores de DNA presentes no promotor de CTGF. (Grotendorst *et al.* (1996) Cell Growth Differ 7: 469 a 480; Grotendorst e Bradham, Patente US Nº 6.069.006; Holmes *et al.* (2001) J Biol Chem 276: 10594 a 10601.)

O CTGF foi mostrado aumentar a transcrição de estado constante de mRNAs de α 1(I) colágeno, α 5 integrina, e fibronectina, assim

como promover os processos celulares incluindo a proliferação e quimiotaxia de vários tipos celulares em cultura. (Ver por exemplo, Frazier *et al.* (1996) *J Invest Dermatol* 107: 406 a 411; Shi-wen *et al.* (2000) *Exp Cell Res* 259: 213 a 224; Klagsburn (1977) *Exp Cell Res* 105: 99 a 108; Gupta *et al.* (2000) *Kidney Int* 58: 1389 a 1399; Wahab *et al.* (2001) *Biochem J* 359 (Pt 1): 77 a 87; Uzel *et al.* (2001) *J Periodontol* 72: 921 a 931; e Riser e Cortes (2001) *Ren Fail* 23: 459 a 470). A injeção subcutânea de CTGF em camundongos neonatais resulta na deposição local do tecido de granulação. Similarmente, a injeção subcutânea de TGF β gera a formação do tecido de granulação e induz níveis altos de mRNA de CTGF em fibroblastos locais. Além disso, a combinação ou o tratamento seqüencial com TGF β e CTGF resulta no desenvolvimento de um granuloma mais persistente. (Mori *et al.* (1999) *J Cell Physiol* 181: 153 a 159). Assim, o CTGF parece mediar um subconjunto dos efeitos eliciados por TGF β , em particular, a produção e deposição da matriz extracelular (ECM). Além disso, a capacidade de responder ao CTGF, ou a extensão da resposta de CTGF, podem confiar em um estímulo de preparação fornecido pelo tratamento com TGF β que permite a “competência” celular. (Publicação Internacional Nº WO 96/08140).

Embora um excesso de fatores de interação fossem caracterizados que modulam a organização tecidual, um consenso agora está emergindo para o papel do CTGF em regular o desenvolvimento esquelético, cura do ferimento e remodelação da matriz extracelular (ECM), fibrose, tumorigênese, e angiogênese. Por exemplo, a expressão de CTGF elevada foi observada no fígado cirrótico, fibrose pulmonar, doença do intestino inflamatório, pele esclerótica e quelóides, desmoplasia, e placas ateroscleróticas. (Abraham *et al.* (2000) *J Biol Chem* 275: 15220 a 15225; Dammeier *et al.* (1998) *Int J Biochem Cell Biol* 30: 909 a 922; diMola *et al.* (1999) *Ann Surg* 230 (1): 63 a 71; Igarashi *et al.* (1996) *J Invest Dermatol* 106: 729 a 733; Ito *et al.* (1998) *Rim Int* 53: 853 a 861; Williams *et al.* (2000)

J Hepatol 32: 754 a 761; Clarkson *et al.* (1999) Curr Opin Nephrol Hipertens 8: 543 a 548; Hinton *et al.* (2002) Eye 16: 422 a 428; Gupta *et al.* (2000) Kidney Int 58: 1389 a 1399; Riser *et al.* (2000) J Am Soc Nephrol 11: 25 a 38).

5 O CTGF também é superregulado em glomerulonefrite, nefropatia de IgA, glomeruloesclerose focal e segmentar e nefropatia diabética. (Ver, por exemplo, Riser *et al.* (2000) J Am Soc Nephrol 11: 25 a 38). Um aumento no número de células que expressam CTGF também é observado nos sítios de dano tubulointersticial crônico, e os níveis de CTGF correlacionam com o grau do dano. (Ito *et al.* (1998) Kidney Int 53: 853 a 10 861). Além disso, a expressão de CTGF é aumentada nos glomérulos e tubulointerstício em uma variedade de doenças renais em associação com cicatrização e esclerose do parênquima renal. Os níveis elevados de CTGF também foram associados com a fibrose hepática, infartação miocárdica, e 15 fibrose pulmonar. Por exemplo, em pacientes com fibrose pulmonar idiopática (IPF), o CTGF é fortemente superregulado em biópsias e células fluidas de lavagem broncoalveolar. (Ujike *et al.* (2000) Biochem Biophys Res Commun 277: 448 a 454; Abou-Shady *et al.* (2000) Liver 20: 296 a 304; Williams *et al.* (2000) J Hepatol 32: 754 a 761; Ohnishi *et al.* (1998) J Mol 20 Cell Cardiol 30: 2411 a 2422; Lasky *et al.* (1998) Am J Physiol 275: L365 a 371; Pan *et al.* (2001) Eur Respir J 17: 1220 a 1227; e Allen *et al.* (1999) Am J Respir Cell Mol Biol 21: 693 a 700). Assim, o CTGF representa um alvo terapêutico válido em distúrbios, tais como aqueles descritos acima.

25 A associação de CTGF com vários aspectos destes distúrbios foi estabelecida; e os métodos para tratar os distúrbios através da modulação de CTGF foram descritos. (Ver, por exemplo, Grotendorst e Bradham, Patente US Nº 5.783.187; Publicação Internacional Nº WO 00/13706; e Publicação Internacional Nº WO 03/049773). A modulação dos fatores de crescimento, citocinas, e receptores da superfície celular podem ser realizadas usando

anticorpos monoclonais, e vários anticorpos monoclonais terapêuticos foram aprovados ou estão em subdesenvolvimento. (Ver, por exemplo, Infliximab (Remicade; Maini *et al.* (1998) *Arthritis Rheum* 41: 1552 a 1563; Targan *et al.* (1997) *N Engl J Med* 337: 1029 a 1035); Basiliximab (Simulect) e Daclizumab (Zenapax) (Bumgardner *et al.* (2001) *Transplantation* 72: 839 a 845; Kovarik *et al.* (1999) *Transplantation* 68: 1288 a 1294); e Trastuzumab (Herceptin; Baselga (2001) *Ann Oncol* 12 Suppl 1: S49 a 55)).

Os anticorpos foram gerados contra o CTGF, e têm provado eficácia *in vivo*, por exemplo, em inibir a angiogênese. (Ver, por exemplo, Grotendorst e Bradham, Patente US Nº 5.408.040; Publicação Internacional Nº WO 99/07407; e Shimo *et al.* (2001) *Oncology* 61: 315 a 322). Além disso, a natureza modular de CTGF parece distinguir os domínios envolvidos em atividades biológicas específicas. Por exemplo, a metade terminal N do CTGF foi mostrada estimular a diferenciação celular e a produção de ECM, ao passo que a metade terminal C estimula a proliferação celular. (Ver, por exemplo, as Publicações Internacionais Nºs WO 00/35936 e WO 00/35939; e Brigstock e Harding, Patente US Nº 5.876.70). Isto demonstra que os anticorpos direcionados às regiões diferentes da molécula de CTGF exibem efeitos diferentes com respeito às atividades biológicas de modulação do CTGF. (Ver, por exemplo, Publicações Internacionais Nºs WO 00/35936 e WO 00/35939). Correntemente, nenhuma distinção clara foi feita entre os anticorpos anti-CTGF que produzem um efeito desejado, e aqueles que produzem efeitos múltiplos ou são não-neutralizantes. (Ver, por exemplo, a Publicação Internacional Nº WO 99/33878).

Existe claramente uma necessidade na técnica para os agentes que neutralizam eficazmente a atividade do CTGF na doença. Os anticorpos, particularmente os anticorpos monoclonais, fornecem a especificidade e os perfis farmacocinéticos apropriados para um agente terapêutico, e os anticorpos neutralizantes alvejados às atividades específicas do CTGF

preencheriam uma necessidade na técnica e encontrariam uso no tratamento terapêutico de distúrbios associados com CTGF incluindo distúrbios pulmonares tais como fibrose pulmonar idiopática (IPF), etc.; distúrbios renais tais como nefropatia diabética, glomeruloesclerose, etc.; e distúrbios oculares tais como retinopatia, degeneração macular, etc.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece anticorpos, particularmente anticorpos monoclonais, e porções destes que especificamente se ligam a uma região no fragmento de terminal N de um polipeptídeo de CTGF.

Em um aspecto, um anticorpo da invenção especificamente se liga a uma região no CTGF humano (SEQ ID NO: 2) como apresentado de cerca do aminoácido 103 ao aminoácido 164 (SEQ ID NO: 21), mais especificamente de cerca do aminoácido 135 a cerca do aminoácido 157 (SEQ ID NO: 22); e ainda mais especificamente de cerca do aminoácido 142 a cerca do aminoácido 154 (SEQ ID NO: 25); ou uma região ortóloga no CTGF derivado de uma outra espécie. Em formas de realização particulares, o anticorpo tem a mesma especificidade como um anticorpo produzido pela linhagem celular identificada por N^o de Acesso ATCC _____. (Depositado com o ATCC em 19 de Maio de 2004). Em formas de realização específicas, o anticorpo é substancialmente idêntico a mAb1, como descrito *infra*. Mais preferivelmente, o anticorpo é substancialmente similar ao CLN1, como descrito *infra*. Ainda em uma outra forma de realização, um anticorpo da invenção competitivamente se liga com qualquer um dos anticorpos precedentes a um polipeptídeo de CTGF.

Em uma forma de realização, a presente invenção fornece um anticorpo monoclonal ou porção deste compreendendo pelo menos um membro do grupo que consiste de uma sequência de cadeia pesada de imunoglobulina compreendendo a SEQ ID NO: 14, uma sequência de cadeia pesada de imunoglobulina compreendendo o domínio variável da SEQ ID

NO: 14, uma seqüência de cadeia leve de imunoglobulina compreendendo a
SEQ ID NO: 20, uma seqüência de cadeia leve de imunoglobulina
compreendendo o domínio variável da SEQ ID NO: 20, ou as variantes
conservativas deste. Em uma forma de realização específica, o anticorpo
5 compreende o domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina do
resíduo de aminoácido 1 até o resíduo de aminoácido 167 da SEQ ID NO: 14.
Em uma outra forma de realização específica, o anticorpo compreende o
domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina do resíduo de aminoácido
1 até o resíduo de aminoácido 136 da SEQ ID NO: 20. Em uma forma de
10 realização particular, o anticorpo compreende a seqüência de cadeia pesada de
imunoglobulina da SEQ ID NO: 14 e a seqüência de cadeia leve de
imunoglobulina da SEQ ID NO: 20. Dentro desta forma de realização, a
presente invenção especificamente fornece o anticorpo CLN1 ou uma porção
deste compreendendo pelo menos os resíduos da região de ligação de
15 antígeno de CLN1.

Em certos aspectos, o anticorpo da invenção é um anticorpo
policlonal. Em outros aspectos, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Em
certas formas de realização, o anticorpo é um anticorpo monoclonal
humanizado; mais preferivelmente um anticorpo monoclonal humano.
20 Qualquer um dos anticorpos anteriormente mencionados pode conter
adicionalmente várias quantidades de glicosilação, incorporadas pela célula
que produz o anticorpo ou sinteticamente aplicadas e/ou modificadas; ou o
anticorpo pode ser isento de glicosilação. O anticorpo pode ser opcionalmente
peguilado e/ou similarmente modificado para aumentar a meia-vida do
25 plasma, etc. Em várias formas de realização, a invenção fornece fragmentos
do anticorpo, particularmente em que o fragmento é um fragmento Fab,
F(ab)₂, ou Fv.

Em certos aspectos, o anticorpo ou porção deste é produzido
por uma linhagem celular clonada. A linhagem celular pode ser derivada de

qualquer modelo animal usado para a produção de anticorpo monoclonal incluindo, mas não limitado a, camundongos, cabra, galinha, etc. Em particular, a linhagem celular pode ser derivada de camundongos. Os camundongos podem ser camundongos padrão usados para a produção de anticorpo, por exemplo, BALB/C, ou uma cepa de camundongo modificada, por exemplo, transgênica, otimizada ou desenvolvida para a produção de anticorpos monoclonais específicos de isótipo, idiótipo, ou espécie específicos. Em uma forma de realização, a linhagem celular é uma linhagem celular de hibridoma que produz e secreta mAb1. Em outras formas de realização, a linhagem celular produz e secreta um anticorpo ou porção deste que tem uma propriedade substancialmente equivalente ao mAb1. Ainda em outras formas de realização, a linhagem celular produz e secreta um anticorpo ou porção deste que tem uma propriedade substancialmente equivalente a CLN1. Em uma forma de realização particular, a invenção fornece uma linhagem celular identificada pelo N^o de Acesso ATCC _____. (Depositado em 19 de Maio de 2004.)

Em um outro aspecto, o anticorpo ou porção deste é derivado de um animal transgênico não humano, particularmente um mamífero transgênico não humano, capaz de produzir um anticorpo humano. O animal pode ser de qualquer espécie incluindo, mas não limitada a, camundongo, galinha, vaca, cabra, etc. Em particular, o animal pode ser o camundongo. Tais anticorpos podem ser obteníveis imunizando-se um mamífero transgênico não humano com um fragmento de CTGF humano, por exemplo, a SEQ ID NO: 21, ou, mais especificamente, a SEQ ID NO: 22, ou a uma região ortóloga no CTGF derivado de uma espécie não humana. Em certas formas de realização, os anticorpos são obtidos imunizando-se o mamífero transgênico não humano com um fragmento de CTGF selecionado do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 23 até 26 ou uma região ortóloga no CTGF derivada de uma espécie não humana. Em formas de realização específicas, os



anticorpos são obtidos imunizando-se um camundongo transgênico com qualquer um dos fragmentos de CTGF anteriormente mencionados. Em outras formas de realização, os anticorpos são obtidos imunizando-se um camundongo transgênico com equivalentes funcionais de qualquer um dos fragmentos de CTGF anteriormente mencionados.

Por “especificamente se liga a uma região no CTGF”, é significado que os anticorpos têm especificidade de ligação para uma região particular em CTGF, que pode ser definida por uma seqüência de aminoácido linear, ou por uma conformação terciária, isto é, tridimensional em parte do polipeptídeo de CTGF. Especificidade de ligação significa que a afinidade dos anticorpos pela porção de CTGF é substancialmente maior do que sua afinidade por outros polipeptídeos relacionados. Por “afinidade substancialmente maior” pretendemos que exista um aumento mensurável na afinidade pela porção de CTGF quando comparada com a afinidade por outros polipeptídeos relacionados. Preferivelmente, a afinidade é pelo menos 1,5 vez, 2 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 100 vezes, 10^3 vezes, 10^4 vezes, 10^5 vezes, 10^6 vezes ou maior pela porção particular do CTGF do que por outras proteínas. Preferivelmente, a especificidade de ligação é determinada pela cromatografia por afinidade, imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), ou por análise de separação celular ativada por fluorescência (FACS). Mais preferivelmente, a especificidade de ligação é obtida por RIA ou cromatografia por afinidade, como descrito *infra*.

Em formas de realização preferidas da invenção, os anticorpos têm uma afinidade que é igual a ou maior do que aquela de mAb1, descrito *infra*, como determinado, por exemplo, pela análise Scatchard de Munson e Pollard (1980, Anal Biochem 107: 220). A afinidade do anticorpo é definida como a força das interações não covalentes totais entre um único sítio de ligação de antígeno em um anticorpo e um único epítipo em um antígeno. A



afinidade é calculada medindo-se a constante de associação (K_a) tal que

$$\text{Afinidade} = K_a = \frac{[Ab \cdot Ag]}{[Ab][Ag]} = \frac{1}{K_d}$$

onde [Ab] é a concentração de sítio de ligação de antígeno livre no anticorpo, [Ag] é a concentração de antígeno livre, [Ab·Ag] é a concentração de sítio de ligação de antígeno no anticorpo ocupado pelo antígeno, e K_d é a constante de dissociação do complexo anticorpo-antígeno. Preferivelmente, os anticorpos da invenção têm uma afinidade por CTGF que é maior do que $K_d = 10^{-8}$, preferivelmente maior do que 10^{-9} , preferivelmente maior do que 10^{-10} , particularmente para o uso terapêutico. Vantajosamente, um anticorpo de acordo com a invenção tem uma afinidade similar a ou maior do que aquela de mAb1 (isto é, um $K_d \leq 10^{-9}$). Entretanto, os anticorpos que compartilham a ligação do epítipo com mAb1, mas que têm afinidade mais baixa (isto é, K_d mais alta) do que mAb1, também estão incorporados dentro da presente invenção e são potencialmente úteis em vários ensaios e aplicações de diagnóstico como descrito aqui. Tais anticorpos adicionalmente podem ser úteis em aplicações terapêuticas, especialmente se eles têm uma avides alta pelo antígeno, como descrito abaixo.

Os anticorpos de acordo com a invenção podem ser monovalentes, bivalentes ou eles podem ser multivalentes. Em certas formas de realização da invenção, é preferido que os anticorpos da invenção sejam bivalentes ou multivalentes. Qualquer um dos anticorpos da invenção pode ser manipulado para melhorar a avides, por exemplo, combinando-se os sítios de ligação de epítipo em uma única construção de anticorpo, por exemplo, um tricorpo, etc. Os anticorpos de acordo com a invenção podem ser anticorpos de cadeia simples.

Pode ser útil em algumas circunstâncias para os anticorpos da invenção apresentar afinidade adequada pelo CTGF de outra espécie, por exemplo, para o tratamento e prevenção de distúrbios nesta espécie. Por exemplo, um anticorpo da invenção que apresenta uma K_d adequada pelo



CTGF canino poderia ser usado para tratar um distúrbio associado com CTGF em cachorros. Os anticorpos da invenção que apresentam afinidade por espécie cruzada, tais como mAb1, também são úteis como ferramentas de pesquisa, para estudar os distúrbios associados com CTGF em vários modelos animais. Em um outro aspecto, o anticorpo ou porção deste é codificado pelo material genético originalmente derivado de um ser humano. O anticorpo pode ser gerado por células em cultura, por exemplo, usando técnicas de exibição de fago, ou pode ser produzido dentro de um animal, por exemplo, um animal transgênico não humano contendo genes de imunoglobulina derivados de um ser humano.

Adicionalmente, a invenção fornece construções recombinantes compreendendo as porções de qualquer um dos anticorpos da invenção, como descrito acima, e uma proteína derivada de uma outra fonte. Especificamente consideradas são as formas de realização que abrangem os anticorpos quiméricos compreendendo uma região variável derivada de um anticorpo monoclonal que especificamente se liga a uma região em um fragmento de terminal N de CTGF e uma região constante derivada de uma outra fonte. A região variável pode ser derivada de qualquer anticorpo definido pela invenção, e especificamente abrange os anticorpos que se ligam a uma região no CTGF humano de cerca do aminoácido 97 a cerca do aminoácido 180 da SEQ ID NO: 2, ou, mais especificamente, de cerca do aminoácido 103 a cerca do aminoácido 164 da SEQ ID NO: 2, ou, mais especificamente, de cerca do aminoácido 134 a cerca do aminoácido 158 da SEQ ID NO: 2, ou, ainda mais especificamente, de cerca do aminoácido 143 a cerca do aminoácido 154 da SEQ ID NO: 2, ou a uma região ortóloga no CTGF derivada de uma outra espécie. A região constante pode ser derivada de qualquer fonte. Em algumas formas de realização, a região constante é derivada de uma região constante de uma imunoglobulina humana.

A presente invenção também fornece qualquer um dos



anticorpos descritos acima em que o anticorpo adicionalmente compreende um agente de rotulação capaz de fornecer um sinal detectável por si só ou junto com outras substâncias. Tais agentes de rotulação podem ser selecionados de, mas não são limitados, ao grupo que consiste de uma
5 enzima, substância fluorescente, substância quimioiluminescente, biotina, avidina, e radioisótopo. A presente invenção também fornece qualquer um dos anticorpos descritos acima em que o anticorpo adicionalmente compreende um agente citotóxico ou enzima.

Em outras formas de realização, os anticorpos da invenção,
10 como descrito acima, neutralizam adicionalmente pelo menos uma atividade associada com CTGF. Tais atividades associadas com CTGF incluem, mas não são limitadas a, estímulo da migração celular, produção de matriz extracelular por uma célula *in vivo* ou *ex vivo*, e/ou redução na fibrose em um paciente. Em formas de realização particulares, a atividade biológica é
15 selecionada do grupo que consiste de crescimento celular, diferenciação de fibroblastos e/ou células endoteliais, e indução da expressão de proteínas envolvidas na formação e remodelação da matriz extracelular incluindo, por exemplo, os colágenos incluindo, mas não limitados, aos tipos I, II, III, e IV; e a fibronectina.

Em certas formas de realização, os anticorpos especificamente
20 inibem a migração celular em ensaios *ex vivo*. Preferivelmente, os anticorpos inibem a migração quimiotática estimulada por CTGF de células do músculo liso em um ensaio de câmara de Boyden. Por exemplo, em um ensaio de migração celular descrito *infra*, os anticorpos da invenção repetida e
25 reproduzivelmente inibem a migração induzida por CTGF. Em várias formas de realização, os anticorpos especificamente reduzem a fibrose em modelos animais. Preferivelmente, os anticorpos inibem o desenvolvimento de fibrose em modelos animais de fibrose pulmonar e renal. Por exemplo, os anticorpos atenuam a fibrose pulmonar induzida por bleomicina em camundongos em 60



a 70%, como determinado pela inibição do acúmulo de hidroxiprolina pulmonar (colágeno) e/ou examinação histológica de preparações teciduais, descritas *infra*. Além disso, os anticorpos reduzem o acúmulo de colágeno em um modelo de rim remanescente de rato (isto é, 5/6 de nefrectomia), e em camundongos seguindo a obstrução de ureter unilateral (UUO), como descrito *infra*.

Em outras formas de realização, os anticorpos da invenção modulam a interação entre um polipeptídeo de CTGF e um receptor celular, e/ou entre um polipeptídeo de CTGF e um cofator secretado ou associado à membrana, neutralizando desse modo uma atividade biológica de CTGF. O cofator pode ser qualquer proteína, carboidrato, e/ou lipídeo; em formas de realização particulares, o cofator é um membro da família de TGF- β dos fatores de crescimento, por exemplo, TGF- β , BMP-4, etc.

Em um outro aspecto, o anticorpo reduz a fibrose em um paciente. Em várias formas de realização, o paciente é um tecido ou órgão. Em outras formas de realização, o paciente é um animal, preferivelmente um mamífero, o mais preferivelmente um ser humano. Quando o objeto é um tecido, a invenção especificamente considera tanto os tecidos endógenos quanto os tecidos *ex vivo*, por exemplo, tecidos de transplante, tecidos desenvolvidos em cultura, etc. Em várias formas de realização, o tecido é selecionado do grupo que consiste de tecido epitelial, endotelial, e conjuntivo. Quando o objeto é um órgão, a invenção especificamente considera os órgãos selecionados do grupo que consiste de rim, pulmão, fígado, olho, coração, e pele. Em formas de realização preferidas, o paciente é um animal, particularmente, um animal da espécie mamífera incluindo espécie de rato, coelho, bovino, ovino, porcino, murino, eqüino, e primata. Em uma forma de realização mais preferida, o paciente é o ser humano.

Em formas de realização específicas, o anticorpo é usado para tratar ou prevenir um distúrbio associado com CTGF em um paciente tendo

ou em risco de ter um distúrbio associado com CTGF. Tais distúrbios incluem, mas não são limitados a, vários cânceres incluindo leucemia linfoblástica aguda, dermatofibromas, câncer de mama, carcinoma de mama, glioma e glioblastoma, rabdomiossarcoma e fibrossarcoma, desmoplasia, angioliipoma, angioleiomioma, cânceres desmoplásticos, e câncer de próstata, ovariano, colorretal, pancreático, gastrointestinal, e hepático e outro desenvolvimento tumoral e metástases. Os distúrbios associados com CTGF também incluem vários distúrbios fibróticos incluindo, mas não limitados a, fibrose pulmonar idiopática, fibrose renal, glomeruloesclerose, fibrose ocular, osteoartrite, escleroderma, fibrose cardíaca, e fibrose hepática. A fibrose pode ocorrer em qualquer órgão ou tecido incluindo um órgão selecionado de, mas não limitado a, rim, pulmão, fígado, coração, e pele; ou um tecido selecionado de, mas não limitado a, tecido epitelial, endotelial, e conjuntivo. Em outras formas de realização, o distúrbio associado com CTGF pode ser causado por qualquer fator de iniciação incluindo, mas não limitado a, exposição a agentes químicos ou biológicos, resposta inflamatória, reação autoimune, trauma, procedimentos cirúrgicos, etc. Os distúrbios associados com CTGF também incluem, mas não são limitados a, distúrbios devido a hiperglicemia e hipertensão. Tais distúrbios podem ocorrer, por exemplo, devido a diabetes, obesidade, etc., e incluem nefropatia diabética, retinopatia, e doença cardiovascular.

Portanto, em várias formas de realização, a invenção fornece anticorpos que podem ser usados para tratar ou prevenir distúrbios associados com CTGF em um paciente. A presente invenção também fornece o uso de tais anticorpos na fabricação de um medicamento para o tratamento de distúrbios associados com CTGF.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de neutralizar uma atividade associada com CTGF compreendendo contatar um anticorpo da invenção e um polipeptídeo de CTGF, neutralizando desse modo

uma atividade biológica de CTGF, tal como aquela descrita acima. A atividade biológica pode ser qualquer atividade de CTGF incluindo, mas não limitada a, estímulo da migração celular e produção de matriz extracelular. Em várias formas de realização, a neutralização ocorre *in vitro*. Em outras formas de realização, a neutralização ocorre em um paciente *in vivo*.

Ainda em um outro aspecto, a invenção fornece métodos de usar um anticorpo como descrito acima para tratar um distúrbio associado com CTGF em um paciente em necessidade, o método compreendendo administrar o anticorpo ou uma formulação farmacêutica deste ao paciente, tratando desse modo o distúrbio. O paciente pode ser um paciente diagnosticado com ou suspeito de ter um distúrbio associado com CTGF, incluindo, por exemplo, um distúrbio que resulta na produção em excesso de matriz extracelular. Em aspectos particulares, o distúrbio associado com CTGF é selecionado de um distúrbio canceroso ou fibrótico. Os cânceres incluem, mas não são limitados a, leucemia linfoblástica aguda, dermatofibromas, câncer de mama, carcinoma de mama, glioma e glioblastoma, rabdomiossarcoma e fibrossarcoma, desmoplasia, angioliipoma, angioleiomioma, cânceres desmoplásticos, e câncer de próstata, ovariano, colorretal, pancreático, gastrointestinal, e hepático, e os distúrbios fibróticos incluem, mas não são limitados a, fibrose pulmonar idiopática, fibrose renal, glomeruloesclerose, fibrose ocular, degeneração macular, osteoartrite, escleroderma, insuficiência cardíaca crônica, fibrose cardíaca, e fibrose hepática. Em outras formas de realização, o distúrbio associado com CTGF pode ser causado por qualquer fator de iniciação incluindo, mas não limitado a, exposição a agentes químicos ou biológicos, resposta inflamatória, reação autoimune, trauma, procedimentos cirúrgicos, etc. Os distúrbios associados com CTGF também incluem, mas não são limitados a, distúrbios devido a hiperglicemia e hipertensão. Tais distúrbios podem ocorrer, por exemplo, devido a diabete, obesidade, etc., e incluem nefropatia diabética, retinopatia, e

doença cardiovascular.

Em um outro aspecto, a presente invenção fornece uma composição compreendendo um anticorpo como descrito acima e pelo menos um outro componente. Os componentes podem incluir qualquer composto, molécula, ou agente, incluindo, por exemplo, proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, etc. Adicionalmente, os componentes podem incluir vários solventes, sais, e outros veículos e/ou excipientes. Em algumas formas de realização, a composição é uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo como descrito acima e pelo menos um componente adicional selecionado de um solvente, um estabilizante, ou um excipiente. Em uma forma de realização particular, a composição farmacêutica compreende um anticorpo em mistura com um veículo farmaceuticamente aceitável. A composição farmacêutica pode conter adicionalmente um segundo agente terapêutico, por exemplo, um inibidor de enzima de conversão de angiotensina (ACE), uma clivagem de produto final de glicação avançada ou agente inibitório, etc. A invenção adicionalmente fornece medicamentos compreendendo um anticorpo como definido acima para tratar um paciente tendo um distúrbio associado com CTGF. Tais distúrbios incluem, mas não são limitados a, vários cânceres e distúrbios fibróticos; distúrbios que resultam de condições tais como infartação miocárdica, artrite, e inflamação; e distúrbios devido a diabete, obesidade, e outros, que podem incluir nefropatia diabética, retinopatia, e doença cardiovascular.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma sequência de polipeptídeo selecionada do grupo que consiste da SEQ ID NO: 14, aminoácido 1 até o aminoácido 167 da SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 20, e aminoácido 1 até o aminoácido 136 da SEQ ID NO: 20. A invenção também abrange as variantes conservativas dos polipeptídeos. Em uma outra forma de realização, a invenção fornece fragmentos específicos de CTGF humano selecionados do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 21 até 26, e fragmentos



de CTGF ortólogos obtida a partir de uma espécie não humana.

Os polipeptídeos referidos acima podem ser polipeptídeos “alterados”, como definido *infra*.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma
5 sequência de polinucleotídeo que codifica um anticorpo da invenção ou uma
porção deste. Em formas de realização particulares, a sequência de
polinucleotídeo é selecionada do grupo que consiste de uma sequência de
polinucleotídeo que codifica a SEQ ID NO: 14, uma sequência de
polinucleotídeo que codifica do aminoácido 1 até o aminoácido 167 da SEQ
10 ID NO: 14, a sequência de polinucleotídeo da SEQ ID NO: 13, e um
polinucleotídeo compreendendo o nucleotídeo 1 até o nucleotídeo 501 da
SEQ ID NO: 13. Em outras formas de realização, a sequência de
polinucleotídeo é selecionada do grupo que consiste de uma sequência de
polinucleotídeo que codifica a SEQ ID NO: 20, uma sequência de
15 polinucleotídeo que codifica do aminoácido 1 até o aminoácido 136 da SEQ
ID NO: 20, o polinucleotídeo da SEQ ID NO: 19, e um polinucleotídeo
compreendendo o nucleotídeo 1 até o nucleotídeo 408 da SEQ ID NO: 19.

Os polinucleotídeos referidos acima podem ser polinucleotídeos “alterados”, como definido *infra*.

20 A invenção fornece adicionalmente polinucleotídeos
recombinantes compreendendo qualquer uma das sequências de
polinucleotídeo descritas acima operavelmente ligadas a uma sequência
vetorial que contém sequências de replicação e de controle transcrional. Em
um aspecto, o polinucleotídeo recombinante codifica a sequência de
25 aminoácido da SEQ ID NO: 14 ou o domínio variável nesta. Em um outro
aspecto, o polinucleotídeo recombinante compreende a SEQ ID NO: 13.
Ainda em um outro aspecto, o polinucleotídeo recombinante codifica a
sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 20 ou o domínio variável nesta.
Ainda em um outro aspecto, o polinucleotídeo recombinante compreende a



SEQ ID NO: 19.

A invenção também fornece células hospedeiras transfectadas com pelo menos um dos polinucleotídeos recombinantes descritos acima. As células hospedeiras incluem qualquer célula hospedeira procariótica e eucariótica, incluindo, por exemplo, linhagens celulares clonadas mantidas por métodos de cultura conhecidos àqueles de habilidade na técnica. As células hospedeiras também incluem as plantas e animais transgênicos derivados de células transformadas, por exemplo, células tronco. Em uma forma de realização, a célula hospedeira compreende uma célula co-transfectada com um polinucleotídeo que codifica a SEQ ID NO: 14 e um polinucleotídeo que codifica a SEQ ID NO: 20, e que produz um anticorpo funcional com características substancialmente as mesmas como mAb1. Em formas de realização particulares, o anticorpo é CLN1. Em uma outra forma de realização particular, a célula hospedeira é identificada pelo N° de Acesso ATCC _____. (Depositado: 19 de Maio de 2004).

Estas e outras formas de realização da invenção objeto ocorrerão prontamente àqueles de habilidade na técnica na luz da divulgação aqui, e todas as tais formas de realização são especificamente consideradas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As Figuras 1A e 1B mostram a conservação de estrutura e sequência do Fator de crescimento do Tecido Conjuntivo. A Figura 1A mostra a estrutura de domínio modular do CTGF, que inclui os motivos conservados para a proteína de ligação do fator de crescimento tipo insulina (IGF-BP) e o fator de Von Willebrand (VWC) no fragmento de terminal N, e trombospondina (TSP1) e o motivo do grupo da cisteína (CT) no fragmento de terminal C. A Figura 1B mostra um alinhamento de sequência múltipla entre os fragmentos de terminal N de ortólogos de CTGF humano (hCTGF), bovino (bCTGF), porcino (pCTGF), de rato (rCTGF), e murino (FISP12). O alinhamento foi criado usando o programa CLUSTAL W (v. 1,74; Thompson



et al. (1994) *Nucleic Acids Res* 22: 4673 a 4680) usando parâmetros básicos. Na figura, um asterisco (*) indica a conservação completa do resíduo de aminoácido entre a espécie representada.

As Figuras 2A e 2B mostram os esquemas de Scatchard da
5 ligação competitiva entre o CTGF humano rotulado e não rotulado aos anticorpos anti-CTGF, mAb2 e mAb1, respectivamente. O mAb1 é um anticorpo exemplar da presente invenção.

A Figura 3A mostra o fragmento de anticorpo Fab (M_r 45kD) obtido seguindo a digestão de papaína do anticorpo de IgG correspondente
10 mAb1 e a cromatografia por afinidade de A-Sefarose de proteína subsequente (Linha 2), como apresentado por SDS-PAGE. A Figura 3B mostra a ligação de um fragmento Fab e de IgG correspondente ao CTGF sobre concentração em aumento de agente catotrópico (tiocianato).

As Figuras 4A e 4B mostram os esquemas de Scatchard de
15 ligação competitiva entre o CTGF humano recombinante rotulado e o CTGF de rato não rotulado aos anticorpos anti-CTGF, mAb2 e mAb1, respectivamente.

As Figuras 5A, 5B, e 5C mostram os benefícios terapêuticos de um anticorpo da invenção em um modelo de fibrose intersticial no pulmão.
20 A Figura 5A mostra o efeito do tratamento com anticorpo em aumento induzido por bleomicina em teor de hidroxiprolina de pulmões de camundongo. O número de animais em cada grupo é mostrado nos parênteses abaixo de cada barra e os grupos de tratamento são indicados entre o eixo x. SA: Solução salina; BL: Bleomicina; AbsJ: mistura de 3 anticorpos
25 monoclonais da invenção; mAb1, um anticorpo exemplar da invenção. Os valores são expressados como SE médio. As Figuras 5B e 5C mostram as seções de parafina tingidas com hematoxilina e eosina de ácinos proximais pulmonares de camundongos expostos à bleomicina por injeção intratraqueal e subsequentemente tratados com solução salina ou anticorpos da invenção,



respectivamente. Na Figura 5B, o ácino dos septos intraalveolares finos têm uma aparência anormal, e as células inflamatórias e a fibrose estão presentes. Na Figura 5C, o parênquima é basicamente normal e existe apenas o espessamento moderado dos septos interalveolares.

5 As Figuras 6A, 6B, e 6C mostram os benefícios terapêuticos
de um anticorpo da invenção em um modelo de fibrose tubulointersticial no
rim. A Figura 6A mostra a redução na fibrose devido à obstrução de ureter
unilateral (UUO) seguindo o tratamento com um anticorpo da invenção,
mAb1, ou um anticorpo direcionado ao término C de CTGF, mAb3. A
10 extensão da fibrose é expressada como a razão de hidroxiprolina para prolina
no rim obstruído comparado com o rim não obstruído contralateral (SE
médio). As Figuras 6B e 6C mostram as seções de parafina tingidas com
tricromo de rins obstruídos que recebem solução salina ou terapia de
anticorpo, respectivamente.

15 As Figuras 7A e 7B mostram o benefício terapêutico de um
anticorpo da invenção em um modelo de fibrose glomerular no rim. As
Figuras 7A e 7B mostram as fotomicrografias de tecido de rim remanescente
tingido com tricromo depois de receber solução salina ou terapia de anticorpo,
respectivamente.

20 As Figuras 8A, 8B, 8C, 8D, 8E, 8F, e 8G mostram a indução
de granulomas localizados subcutaneamente em camundongos recém-
nascidos. Na esquerda, as Figuras 8A e 8B mostram a formação de granuloma
no sítio da injeção subcutânea de TGF β sozinho ou TGF β e CTGF,
respectivamente. Na direita, as Figuras 8C até 8G mostram um painel
25 histológico que representa o sistema de contagem (de 0 [normal] a 4
[fibrótico]) usado para avaliar o benefício terapêutico do anticorpo.

A Figura 9 mostra o grau de fibrose em um modelo de
granuloma localizado subcutaneamente com e sem tratamento com anticorpos
anti-CTGF. O mAb1 é um anticorpo exemplar da invenção, ao passo que

mAb3 é um anticorpo anti-CTGF que especificamente se liga a um epítipo de CTGF de terminal C.

As Figuras 10A, 10B, 10C, e 10D mostram o benefício terapêutico de um anticorpo da invenção na fibrose de órgão usando um modelo de esclerose sistêmica. Cada um dos painéis mostra mudanças no acúmulo de colágeno nos órgãos respectivos seguindo o tratamento com solução salina (controle), TGF β e CTGF, ou tratamento com TGF β e CTGF concomitante com a terapia de anticorpo.

As Figuras 11A e 11B mostram uma representação diagramática da clonagem de cadeias de imunoglobulina pesadas e leves de um anticorpo exemplar da invenção, o mAb1. A Figura 11A mostra o alinhamento de fragmentos de PCR de cadeia pesada usados para determinar a sequência de codificação de cadeia pesada de mAb1 (CDS). A Figura 11B mostra o alinhamento de fragmentos de PCR de cadeia leve usados para determinar a sequência de codificação de cadeia leve de mAb1 (CDS).

As Figuras 12A e 12B mostram os estudos de ligação entre CTGF e TGF β . A Figura 12A mostra o grau de ligação entre o TGF β e cada CTGF, um fragmento de CTGF codificado por exon 3 (Exon 3), ou um fragmento de CTGF codificado por exon 5 (Exon 5) na presença ou ausência de anticorpo anti-CTGF. A Figura 12B mostra o grau ao qual os anticorpos anti-CTGF inibem a interação de TGF β e CTGF. Na figura, os anticorpos incluem os anticorpos exemplares da invenção, mAb1 e mAb4, e um anticorpo que especificamente se liga a um epítipo de CTGF de terminal C, o mAb3.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

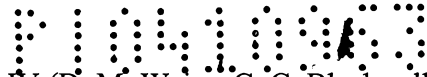
Antes que as presentes composições e métodos são descritos, deve ser entendido que a invenção não é limitada às metodologias, protocolos, linhagens celulares, ensaios, e reagentes particulares descritos, visto que estes podem variar. Também deve ser entendido que a terminologia usada aqui é

intencionada a descrever as formas de realização particulares da presente invenção, e não é de nenhum modo intencionada a limitar o escopo da presente invenção como apresentado nas reivindicações anexas.

5 Deve ser notado que como aqui usado e nas reivindicações anexas, as formas singulares “um”, “uma”, e “o/a” incluem as referências no plural a menos que o contexto dite claramente de outro modo. Assim, por exemplo, uma referência a “um fragmento” inclui uma pluralidade de tais fragmentos, uma referência a um “anticorpo” é uma referência a um ou mais anticorpos e aos equivalentes destes conhecidos àqueles habilitados na
10 técnica, e assim por diante.

A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm os mesmos significados como comumente entendido por uma pessoa de habilidade comum na técnica aos quais esta invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou
15 equivalentes àqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, os métodos, dispositivos, e materiais preferidos agora são descritos. Todas as publicações citadas nesta são aqui incorporadas por referência em sua totalidade para o propósito de descrever e divulgar as metodologias, reagentes, e ferramentas relatados nas publicações, que podem
20 ser usadas em conexão com a invenção. Nada aqui deve ser interpretado como uma admissão de que a invenção não é intitulada para antecipar tal divulgação em virtude da invenção anterior.

A prática da presente invenção utilizará, a menos que de outro modo indicado, os métodos convencionais de química, bioquímica, biologia
25 molecular, biologia celular, genética, imunologia e farmacologia, dentro da habilidade da técnica. Tais técnicas são completamente explicadas na literatura. Ver, por exemplo, Gennaro, A. R., ed. (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed., Mack Publishing Co.; Colowick, S. *et al.*, eds., Methods In Enzymology, Academic Press, Inc.; Handbook



of Experimental Immunology, Volumes I a IV (D. M. Weir e C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); Maniatis, T. *et al.*, eds. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edição, Volumes I a III, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. *et al.*, eds. (1999) Short
 5 Protocolos in Molecular Biology, 4ª edição, John Wiley & Sons; Ream *et al.*, eds. (1998) Molecular Biology Techniques: A Intensive Laboratory Course, Academic Press); PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag).

Definições

10 “Fator de crescimento do tecido conjuntivo” ou “CTGF” refere-se às seqüências de aminoácido de CTGF substancialmente purificado derivado de qualquer espécie, particularmente uma espécie mamífera, incluindo rato, coelho, bovino, ovino, porcino, murino, eqüino, e homínídeo, preferivelmente a espécie humana, e de qualquer fonte, se natural, sintética,
 15 semi-sintética, ou recombinante.

O termo “fragmento de terminal N” de CTGF refere-se a qualquer polipeptídeo compreendendo as seqüências derivadas da porção de terminal amino de um polipeptídeo de CTGF, ou a quaisquer variantes, ou fragmentos destes. Os fragmentos de terminal N podem incluir todo, nenhum,
 20 ou porções de CTGF do resíduo de metionina inicial através da região “da dobradiça” livre de cisteína como mostrado nas Figuras 1A e 1B. Além disso, os fragmentos de terminal N podem incluir todos, nenhum, ou porções do motivo de proteína de ligação do fator de crescimento de insulina e/ou o domínio de von Willebrand tipo C (SEQ ID NO: 21) como mostrado na
 25 Figura 1B. Os fragmentos de terminal N de CTGF também podem incluir toda, nenhuma, ou porções da região livre de cisteína. Além disso, os fragmentos de terminal N de CTGF podem ser quaisquer quinze aminoácidos ou mais contíguos contidos dentro de qualquer fragmento de terminal N precedente definido acima.

- Em um aspecto, “fragmento de terminal N” de CTGF refere-se às seqüências de polipeptídeo derivadas da porção de terminal amino de CTGF humano. Tais fragmentos podem abranger a região inteira do resíduo de aminoácido 1 até o resíduo de aminoácido 198 da SEQ ID NO: 2, ou de cerca do aminoácido 23 a cerca do aminoácido 198 da SEQ ID NO: 2. O limite do fragmento de terminal N dentro da região da dobradiça pode ser opcionalmente definido por um de vários sítios de clivagem de protease definidos na SEQ ID NO: 2, tais como os sítios de clivagem de quimiotripsina entre os resíduos 179 e 180, entre os resíduos 182 e 183, e entre os resíduos 188 e 189; sítios de clivagem de plasmina entre os resíduos 183 e 184, e entre os resíduos 196 e 197; e um sítio de clivagem de proteína morfogenética óssea-1 entre os resíduos 169 e 170. Adicionalmente, os fragmentos de terminal N de CTGF humano podem incluir toda, nenhuma, ou porções da região do aminoácido 27 ao aminoácido 97 da SEQ ID NO: 2, do aminoácido 103 ao aminoácido 166 da SEQ ID NO: 2, ou do aminoácido 167 ao aminoácido 198 da SEQ ID NO: 2. Além disso, os fragmentos de terminal N de CTGF humano podem ser quaisquer quinze aminoácidos ou mais contíguos contidos dentro de qualquer fragmento de terminal N precedente definido acima.
- Em formas de realização específicas, os fragmentos de terminal N de CTGF da presente invenção compreendem as seqüências selecionadas das regiões seguintes do CTGF humano (SEQ ID NO: 2) e os fragmentos ortólogos destes derivados de uma espécie diferente, particularmente uma espécie mamífera incluindo rato, coelho, bovino, ovino, porcino, murino, e eqüino: do resíduo de aminoácido 23 ao resíduo de aminoácido 96 (codificado pelo exon 2); do resíduo de aminoácido 27 ao resíduo de aminoácido 97 (motivo IGF-BP); do resíduo de aminoácido 97 ao resíduo de aminoácido 180 (codificado pelo exon 3); do resíduo de aminoácido 103 ao resíduo de aminoácido 166 (domínio VWC); do resíduo

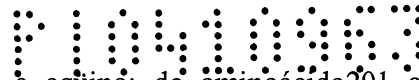
P I D U G E Y

de aminoácido 167 ao resíduo de aminoácido 198 (dobradiça isenta de cisteína); do resíduo de aminoácido 23 ao resíduo de aminoácido 180 (codificado pelos exons 2 e 3); do resíduo de aminoácido 27 ao resíduo de aminoácido 166 (IGF-BP e VWC); e do resíduo de aminoácido 23 ao resíduo de aminoácido 198. (Ver a Figura 1B).

O termo “fragmento de terminal C” de CTGF refere-se a qualquer polipeptídeo compreendendo as seqüências derivadas da porção de terminal carbóxi de uma seqüência de polipeptídeo de aminoácido de CTGF, ou a quaisquer variantes, ou fragmentos destes. Os fragmentos de terminal C de CTGF podem incluir toda, nenhuma, ou porções da região livre de cisteína do polipeptídeo de CTGF (do aminoácido 167 ao aminoácido 198 da SEQ ID NO: 2).

Os fragmentos de terminal C podem incluir todo, nenhum, ou porções do CTGF da região da dobradiça livre de cisteína à extremidade da proteína. Além disso, os fragmentos de terminal C podem incluir todo, nenhum, ou porções do motivo de trombospondina e/ou o motivo do grupo da cisteína. Além disso, os fragmentos de terminal C do CTGF podem ser quaisquer quinze aminoácidos ou mais contíguos contidos dentro de qualquer fragmento de terminal C precedente definido acima.

Em alguns aspectos, os fragmentos de terminal C podem abranger a região inteira do resíduo de aminoácido 181 a cerca do resíduo de aminoácido 349 da SEQ ID NO: 2. O limite do fragmento de terminal C dentro da região da dobradiça pode ser opcionalmente definido por um de vários sítios de clivagem de protease definidos na SEQ ID NO: 2, tais como os sítios de clivagem de quimiotripsina, plasmina, e proteína morfogenética óssea-1 definidos acima. Adicionalmente, os fragmentos de terminal C compreendem as seqüências selecionadas das regiões seguintes de CTGF humano (SEQ ID NO: 2) e os fragmentos ortólogos destes derivados de uma espécie diferente, particularmente uma espécie mamífera incluindo rato,



coelho, bovino, ovino, porcino, murino, e eqüino: do aminoácido 201 ao aminoácido 242 da SEQ ID NO: 2, do aminoácido 247 ao aminoácido 349 da SEQ ID NO: 2, do aminoácido 248 ao aminoácido 349 da SEQ ID NO: 2, ou do aminoácido 249 ao aminoácido 346 da SEQ ID NO: 2. Além disso, os

5 fragmentos de terminal C do CTGF humano podem ser quaisquer quinze aminoácidos ou mais contíguos contidos dentro de qualquer fragmento de terminal C precedente definido acima.

Os termos “região livre de cisteína” ou “região da dobradiça” do CTGF referem-se a qualquer polipeptídeo derivado de cerca do resíduo de aminoácido 167 a cerca do resíduo de aminoácido 198 do CTGF humano

10 (SEQ ID NO: 2) e os fragmentos ortólogos destes derivados de uma espécie diferente, particularmente uma espécie mamífera incluindo rato, coelho, bovino, ovino, porcino, murino, e eqüino.

Os termos “seqüência de aminoácido” ou “polipeptídeo” ou

15 “polipeptídeos” como aqui usado referem-se às seqüências de oligopeptídeo, peptídeo, polipeptídeo, ou proteína, e fragmentos destes, e às moléculas que ocorrem naturalmente ou sintéticas. Um fragmento de polipeptídeo ou aminoácido é qualquer porção de um polipeptídeo que mantém pelo menos uma característica estrutural e/ou funcional do polipeptídeo. Os fragmentos de

20 CTGF incluem qualquer porção de um polipeptídeo da seqüência de CTGF que mantém pelo menos uma característica estrutural ou funcional de CTGF. Onde “seqüência de aminoácido” é relatada para referir-se à seqüência de polipeptídeo de uma molécula de proteína que ocorre naturalmente, a “seqüência de aminoácido” e os termos semelhantes não são significados a

25 limitar a seqüência de aminoácido à seqüência natural completa associada com a molécula de proteína relatada.

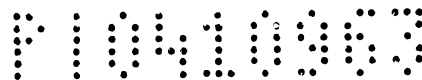
O termo “imunogenicidade” diz respeito à capacidade de uma substância, quando introduzida no corpo, para estimular a resposta imune e a produção de um anticorpo. Um agente que exhibe a propriedade de



imunogenicidade é referido como sendo imunogênico. Os agentes imunogênicos podem incluir, mas não são limitados a, uma variedade de macromoléculas tais como, por exemplo, proteínas, lipoproteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos, bactérias e componentes bacterianos, e vírus e componentes virais. Os agentes imunogênicos têm freqüentemente um peso molecular maior do que 10 kDa. Os fragmentos antigênicos referem-se aos fragmentos de polipeptídeo de CTGF, preferivelmente, os fragmentos de cerca de cinco a quinze aminoácidos em comprimento, que mantêm pelo menos um aspecto biológico ou imunológico de polipeptídeo de atividade de CTGF.

O termo “anticorpo” refere-se às moléculas intatas assim como aos fragmentos deste, tais como os fragmentos Fab, F(ab')₂, e Fv, que são capazes de se ligar ao determinante epitópico, e incluem os anticorpos policlonais e monoclonais. Os anticorpos que se ligam ao CTGF ou fragmentos de CTGF podem ser preparados usando os polipeptídeos intatos ou usando fragmentos contendo peptídeos pequenos de interesse como o antígeno imunizante. O polipeptídeo ou oligopeptídeo usado para imunizar um animal (por exemplo, um camundongo, rato, coelho, galinha, peru, cabra, etc.) pode ser derivado da tradução do RNA, ou quimicamente sintetizado, e pode ser conjugado a uma proteína veículo se desejado. Os veículos comumente usados quimicamente ligados aos peptídeos incluem, por exemplo, albumina sérica bovina, tiroglobulina, e hemocianina do lapa buraco de fechadura (KLH).

O termo “anticorpo monoclonal” como aqui usado refere-se a uma população substancialmente homogênea de anticorpos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos em especificidade e afinidade exceto para as mutações que ocorrem naturalmente possíveis que podem estar presentes em quantidades menores. Note que uma composição de anticorpo monoclonal pode conter mais do que um anticorpo



monoclonal.

Os anticorpos monoclonais incluídos dentro do escopo da invenção incluem os anticorpos híbridos e recombinantes (por exemplo, anticorpos “humanizados”) independente da espécie de origem ou da designação de classe ou subclasse de imunoglobulina, assim como os fragmentos de anticorpo (por exemplo, Fab, F(ab')₂, e Fv), tendo pelo menos uma das características distintas dos anticorpos aqui descritos. As formas de realização preferidas incluem os anticorpos capazes de se ligar a substancialmente o mesmo epítopo como aquele reconhecido pelo anticorpo monoclonal mAb1 e/ou têm afinidade para este epítopo que é maior do que ou igual à afinidade de mAb1.

O termo “monoclonal” indica o caráter do anticorpo como uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser interpretado como requerendo a produção do anticorpo por qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais da invenção podem ser fabricados usando o método de hibridoma primeiro descrito por Kohler e Milstein (1975, Nature 256: 495 a 497), ou pode ser fabricado pelos métodos de DNA recombinante. Por exemplo, ver Celltech Therapeutics Ltd., Patente Européia Nº EP-0 120 694; Cabilly *et al.*, Pat. US Nº 4.816.567; ou Mage e Lamoyi (1987; em: Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, páginas 79 a 97).

O termo “anticorpo neutralizante” como aqui usado refere-se a um anticorpo, preferivelmente um anticorpo monoclonal, que é capaz de inibir ou eliminar substancialmente uma atividade biológica de CTGF. Tipicamente, um anticorpo neutralizante inibirá a ligação de CTGF a um cofator tal como TGFβ, a um receptor específico de CTGF associado com uma célula alvo, ou a um outro alvo biológico. Em uma forma de realização particular, um anticorpo neutralizante inibirá uma atividade biológica de CTGF a um grau aproximadamente igual a ou maior do que mAb1.

Preferivelmente, um anticorpo neutralizante inibirá uma atividade biológica de CTGF a um grau aproximadamente igual a ou maior do que CLN1.

A frase “distúrbios associados com CTGF” como aqui usado refere-se às condições e doenças associadas com a expressão ou atividade anormal ou alterada de CTGF. A expressão anormal de CTGF foi associada com os distúrbios proliferativos celulares, tais como aqueles causados por proliferação celular endotelial; migração celular; crescimentos tipo tumor; cicatrização tecidual geral; e várias doenças caracterizadas pela deposição inapropriada da matriz extracelular.

Os distúrbios associados com CTGF incluem, mas não são limitados a, distúrbios que envolvem angiogênese e outros processos que desempenham um papel central em condições tais como a vitreorretinopatia proliferativa; câncer, incluindo leucemia linfoblástica aguda, dermatofibromas, câncer de mama, carcinoma de mama, glioma e glioblastoma, rabdomiossarcoma e fibrossarcoma, desmoplasia, angioliopoma, angioleiomioma, cânceres desmoplásticos, e câncer de próstata, ovariano, colorretal, pancreático, gastrointestinal, e hepático; outro desenvolvimento tumoral e metástases; etc.

Os distúrbios associados com CTGF também incluem os distúrbios fibróticos e as condições relacionadas, tais como cicatrização excessiva que resulta de fibrose localizada ou sistêmica, fibrose crônica ou aguda de órgãos tais como o rim, pulmões, fígado, olhos, coração, pele, etc.; ou um tecido selecionado de, mas não limitado ao, tecido epitelial, endotelial, e conjuntivo. A fibrose também pode ocorrer no olho e juntas. Tais distúrbios associados com CTGF incluem, por exemplo, fibrose cardíaca, incluindo fibrose reativa cardíaca ou remodelação cardíaca seguindo infartação miocárdica ou insuficiência cardíaca congestiva; distúrbios pulmonares, incluindo fibrose intersticial pulmonar, etc.; fibrose associada com diálise incluindo diálise peritoneal, por exemplo, diálise peritoneal de ambulatório

contínua (CAPD); fibrose peridural; fibrose renal; fibrose pulmonar; fibrose intersticial; fibrose cutânea; e fibrose que resulta de traumas agudos ou repetitivos, incluindo cirurgia, quimioterapia, tratamento com radiação, rejeição a aloenxerto, rejeição ao transplante crônica e aguda (por exemplo, rim, fígado, ou outros órgão); bronquiolite obliterante, por exemplo, seguindo transplante pulmonar; e inflamação e infecção, por exemplo, devido à doença ou dano.

Adicionalmente, os distúrbios associados com CTGF incluem, mas não são limitados a, condições escleróticas, incluindo esclerose sistêmica, escleroderma, quelóides, cicatrização hipertrófica, e outras doenças e condições dermatológicas; aterosclerose, tais como as condições que envolvem placas ateroscleróticas e aterosclerose associada com diabetes, diálise peritoneal, etc.; artrite, incluindo artrite reumatóide, osteoartrite, e outras condições inflamatórias da junta, etc.; doenças intersticiais, incluindo fibrose intersticial; doença de Crohn; doença do intestino inflamatório; retinopatias, incluindo, por exemplo, vitreorretinopatia proliferativa, retinopatia diabética não proliferativa, retinopatia diabética proliferativa, e degeneração macular (incluindo doença (de Stargardt) relacionada a idade e juvenil, e descolamento epitelial pigmentar); nefropatias, incluindo nefropatia diabética, nefropatia associada com IgA, nefropatia devido à toxicidade, doença de lupo renal, etc.; e condições associadas com destruição tubular com toxicidade química.

Os distúrbios associados com CTGF também incluem, mas não são limitados a, distúrbios devido a hiperglicemia, hipertensão, formação de produto final com glicação avançada (AGE), etc. Tais distúrbios podem ocorrer, por exemplo, devido a diabetes, obesidade, etc., e incluem nefropatia diabética, retinopatia, e doença cardiovascular. Além disso, os distúrbios associados com CTGF podem ser causados por qualquer fator de iniciação incluindo, mas não limitado a, exposição a agentes químicos ou biológicos,

resposta inflamatória, reação autoimune, trauma, procedimentos cirúrgicos, etc. Em algumas formas de realização, os métodos são usados para tratar um paciente predisposto a um distúrbio associado com CTGF devido a uma condição incluindo, mas não limitada a, infartação miocárdica, artrite, e inflamação local ou sistêmica.

Os processos e distúrbios “proliferativos” aqui referidos incluem os estados patológicos caracterizados pela multiplicação contínua de células que resultam em um crescimento excessivo de uma população de célula dentro de um tecido. As populações de célula não são necessariamente células transformadas, tumorigênicas ou malignas, mas podem incluir também as células normais. Por exemplo, o CTGF pode estar envolvido patologicamente induzindo-se uma lesão proliferativa na camada íntima de uma parede arterial, resultando em aterosclerose, ou estimulando-se a neovascularização.

“Câncer” refere-se a qualquer desenvolvimento autônomo de tecido, incluindo desenvolvimento não controlado, anormal de células, ou a qualquer tumor maligno de desenvolvimento potencialmente ilimitado que se expande localmente por invasão e sistemicamente por metástase. O câncer também refere-se a qualquer estado anormal marcado por um câncer.

O termo “fibrose” refere-se ao processamento anormal de tecido fibroso, ou degeneração fibróide ou fibrosa. A fibrose pode resultar de vários danos ou doenças, e freqüentemente pode resultar de rejeição a transplante crônica relativo à transplantação de vários órgãos. A fibrose envolve tipicamente a produção, acúmulo, ou deposição anormal de componentes da matriz extracelular, incluindo a superprodução e deposição aumentada de, por exemplo, colágeno e fibronectina. “Fibrose” é aqui usado em seu sentido mais amplo referindo-se a qualquer produção em excesso ou deposição das proteínas da matriz extracelular. Existem exemplos numerosos de fibrose, incluindo a formação de tecido conectivo que forma a cicatriz

POLINUCLEOTÍDEOS

seguindo um ataque cardíaco, que diminui a capacidade do coração bombear.

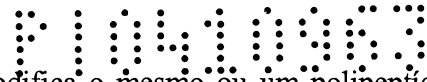
A diabetes frequentemente causa dano/cicatrização nos rins, que leva a uma perda progressiva da função renal; e nos olhos, que causa a perda da visão.

Depois da cirurgia, o tecido conectivo que forma a cicatriz pode se formar

5 entre os órgãos internos causando contratura, dor, e em alguns casos, infertilidade. Os órgãos principais tais como o coração, rim, fígado, olho, e pele estão propensos à cicatrização crônica, comumente associada com outras doenças. As cicatrizes hipertróficas (volume de tecido não maligno) são uma forma comum de fibrose causada por queimaduras e outro trauma. Além
10 disso, existem vários outros distúrbios fibroproliferativos, incluindo escleroderma, quelóides, e aterosclerose, que são associados respectivamente com a cicatrização tecidual geral, crescimentos tipo tumor na pele, ou cicatrização sustentada de vasos sanguíneos que diminui a capacidade de condução sanguínea.

15 Os termos “ácido nucleico” ou “polinucleotídeo” ou “polinucleotídeos” referem-se aos oligonucleotídeos, seqüências de nucleotídeo, ou polinucleotídeos, ou quaisquer fragmentos destes, e ao DNA ou RNA de origem natural ou sintética que podem ser de filamento único ou duplo e podem representar o filamento de sentido ou anti-sentido, ao ácido
20 nucleico de peptídeo (PNA), ou a qualquer material tipo DNA ou tipo RNA, natural ou sintético em origem. Os fragmentos de polinucleotídeo são qualquer porção de uma seqüência de polinucleotídeo que mantém pelo menos uma característica estrutural ou funcional do polinucleotídeo. Os fragmentos de polinucleotídeo podem ser de comprimento variável, por
25 exemplo, maior do que 60 nucleotídeos em comprimento, pelo menos 100 nucleotídeos em comprimento, pelo menos 1000 nucleotídeos em comprimento, ou pelo menos 10.000 nucleotídeos em comprimento.

Os polinucleotídeos “alterados” incluem aqueles com supressões, inserções, ou substituições de nucleotídeos diferentes que



resultam em um polinucleotídeo que codifica o mesmo ou um polipeptídeo funcionalmente equivalente. Incluídas dentro desta definição estão as seqüências que exibem polimorfismos que podem ou não ser facilmente detectáveis usando sondas de oligonucleotídeo particulares ou através de

5 deleção de hibridização imprópria ou inesperada a alelos, com um locus outro que não o locus cromossômico normal para a seqüência de polinucleotídeo objeto.

Os polipeptídeos “alterados” podem conter supressões, inserções, ou substituições de resíduos de aminoácido, que produzem uma

10 mudança silenciosa e resultam em um polipeptídeo funcionalmente equivalente. As substituições de aminoácido deliberadas podem ser feitas na base de similaridade em polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, e/ou a natureza anfipática dos resíduos contanto que a atividade biológica ou imunológica do polipeptídeo codificado é mantida. Por

15 exemplo, os aminoácidos negativamente carregados podem incluir o ácido aspártico e ácido glutâmico; os aminoácidos positivamente carregados podem incluir lisina e arginina; e os aminoácidos com grupos de cabeça polares não carregados tendo valores de hidrofiliabilidade similares podem incluir leucina, isoleucina, e valina, glicina e alanina, asparagina e glutamina, serina e

20 treonina, e fenilalanina e tirosina.

Uma “variante” de polipeptídeo ou aminoácido é uma seqüência de aminoácido que é alterada por um ou mais aminoácidos de uma seqüência de aminoácido particular. Uma variante de polipeptídeo pode ter mudanças conservativas, em que um aminoácido substituído tem propriedades

25 estruturais ou químicas similares aos aminoácido substituídos, por exemplo, substituição de leucina com isoleucina. Uma variante também pode ter mudanças não conservativas, em que o aminoácido substituído tem propriedades físicas diferentes daquelas do aminoácido substituído, por exemplo, substituição de uma glicina com um triptofano. As variações



menores análogas também podem incluir supressões ou inserções de aminoácido, ou ambas. Preferivelmente, as variantes de aminoácido mantêm certas características estruturais ou funcionais de um polipeptídeo particular. A orientação em determinar quais resíduos de aminoácido podem ser substituídos, inseridos, ou suprimidos pode ser encontrada, por exemplo, usando programas de computador bem conhecidos na técnica, tais como o software LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI).

Uma variante de polinucleotídeo é uma variante de uma sequência de polinucleotídeo particular que preferivelmente tem pelo menos cerca de 80%, mais preferivelmente pelo menos cerca de 90%, e o mais preferivelmente pelo menos cerca de 95% de similaridade de sequência de polinucleotídeo à sequência de polinucleotídeo particular. Deve ser avaliado por aqueles habilitados na técnica que como um resultado da degeneração do código genético, uma multidão de sequências de polinucleotídeo variantes que codificam uma proteína particular, algumas carregando homologia mínima às sequências de polinucleotídeo de qualquer gene conhecido e que ocorre naturalmente, pode ser produzida. Assim, a invenção considera cada e toda variação possível de sequência de polinucleotídeo que poderia ser feita selecionando-se as combinações com base em escolhas de códon possíveis. Estas combinações são feitas de acordo com o código genético de tripleto de códon padrão, e todas as tais variações devem ser consideradas como sendo especificamente divulgadas.

Uma “deleção” é uma mudança em uma sequência de aminoácido ou nucleotídeo que resulta na ausência de um ou mais resíduos de aminoácido ou nucleotídeos.

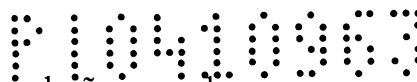
Os termos “inserção” ou “adição” referem-se a uma mudança em uma sequência de polipeptídeo ou polinucleotídeo que resulta na adição de um ou mais resíduos de aminoácido ou nucleotídeos, respectivamente, quando comparado à molécula que ocorre naturalmente.



O termo “equivalente funcional” como é aqui usado refere-se a um polipeptídeo ou polinucleotídeo que possui pelo menos uma característica funcional e/ou estrutural de um polipeptídeo ou polinucleotídeo particulares. Um equivalente funcional pode conter modificações que permitem o desempenho de uma função específica. O termo “equivalente funcional” é intencionado a incluir os fragmentos, mutantes, híbridos, variantes, análogos, ou derivados químicos de uma molécula.

O termo “microarranjo” refere-se a qualquer arranjo de ácidos nucleicos, aminoácidos, anticorpos, etc., em um substrato. O substrato pode ser qualquer suporte adequado, por exemplo, pérolas, vidro, papel, nitrocelulose, náilon, ou qualquer membrana apropriada, etc. Um substrato pode ser qualquer suporte rígido ou semi-rígido incluindo, mas não limitado a, membranas, filtros, pastilhas, lascas, lâminas, fibras, pérolas, incluindo pérolas magnéticas ou não magnéticas, géis, tubulação, placas, polímeros, micropartículas, capilares, etc. O substrato pode fornecer uma superfície para revestimento e/ou pode ter uma variedade de formas de superfície, tais como reservatórios, alfinetes, trincheiras, canais, e poros, aos quais os ácidos nucleicos, aminoácidos, etc., podem ser ligados.

O termo “amostra” é aqui usado em seu sentido mais amplo. As amostras podem ser derivadas de qualquer fonte, por exemplo, de fluidos corpóreos, secreções, tecidos, células, ou células em cultura incluindo, mas não limitadas a, saliva, sangue, urina, soro, plasma, vítreo, fluido sinovial, fluido espinal cerebral, fluido amniótico, e tecido do órgão (por exemplo, tecido submetido a biópsia); de cromossomos, organelas, ou outras membranas isoladas de uma célula; de DNA genômico, cDNA, RNA, mRNA, etc.; e de células ou tecidos claros, ou manchas ou impressões de tais células ou tecidos. As amostras podem ser derivadas de qualquer fonte, tal como, por exemplo, de um paciente humano, ou um paciente mamífero não humano, etc. Também consideradas são as amostras derivadas de qualquer modelo animal

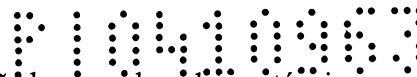


de doença. Uma amostra pode estar em solução ou pode ser, por exemplo, fixa ou ligada a um substrato. Uma amostra pode referir-se a qualquer material adequado para teste quanto à presença de CTGF ou de fragmentos de CTGF ou adequado para triagem para as moléculas que se ligam a CTGF ou aos fragmentos destas. Os métodos para se obter tais amostras estão dentro do nível de habilidade na técnica.

O termo “hibridização” refere-se ao processo pelo qual uma seqüência de ácido nucleico se liga a uma seqüência complementar através de par de base. As condições de hibridização podem ser definidas, por exemplo, pelas concentrações de sal ou formamida nas soluções de pré hibridização e hibridização, ou pela temperatura de hibridização, e são bem conhecidas na técnica. A hibridização pode ocorrer sob condições de estringência variada.

Em particular, a estringência pode ser aumentada reduzindo-se a concentração de sal, aumentando-se a concentração de formamida, ou elevando-se a temperatura de hibridização. Por exemplo, para os propósitos da presente invenção, a hibridização sob condições de estringência alta pode ocorrer em cerca de 50% de formamida a cerca de 37°C a 42°C, e sob condições de estringência reduzida em cerca de 35% a 25% de formamida a cerca de 30°C a 35°C. Em particular, a hibridização no geral ocorre em condições de estringência mais alta a 42°C em 50% de formamida, 5X de SSPE, 0,3% de SDS, e 200 µg/ml de DNA de esperma de salmão cisalhado e desnaturado.

A faixa de temperatura que corresponde a um nível particular de estringência pode ser ainda limitada por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, calculando-se a razão de purina para pirimidina do ácido nucleico de interesse e ajustando-se conformemente a temperatura. Para remover os sinais não específicos, as manchas podem ser seqüencialmente lavadas, por exemplo, na temperatura ambiente ou até e incluindo 60°C, sob condições crescentemente estritas de até 0,1X de SSC e 0,5% de SDS. As



variações nas faixas e condições acima são bem conhecidas na técnica.

Invenção

A presente invenção fornece anticorpos que especificamente se ligam ao Fator de Crescimento de Tecido Conjuntivo (CTGF). Os anticorpos são anticorpos policlonais ou monoclonais, preferivelmente anticorpos monoclonais, e mais preferivelmente anticorpos monoclonais humanos. Os anticorpos são direcionados para o fragmento de terminal N do CTGF, mostrado na Figura 1. Mais especificamente, os anticorpos são direcionados para um fragmento de CTGF que se estende de cerca do resíduo 97 a cerca do resíduo 180 da SEQ ID NO: 2. Em formas de realização particulares, os anticorpos são direcionados para um fragmento de CTGF que se estende de cerca do resíduo 103 a cerca do resíduo 164, e mais particularmente um fragmento de cerca do resíduo 134 a cerca do resíduo 158 da SEQ ID NO: 2. Mais especificamente, os anticorpos são direcionados para um fragmento de CTGF que se estende de cerca do resíduo 143 a cerca do resíduo 154 da SEQ ID NO: 2.

Em formas de realização particulares, os anticorpos neutralizam uma atividade biológica de CTGF. As atividades biológicas de CTGF incluem proliferação, diferenciação celular, expressão de gene, etc. Em formas de realização particulares, a atividade biológica é selecionada do grupo que consiste de diferenciação celular, por exemplo, diferenciação ou transdiferenciação de fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliais, etc., de várias células precursoras; a indução da expressão de proteínas envolvidas na formação e remodelação da matriz extracelular incluindo, por exemplo, colágeno tipo I, fibronectina, etc.; a indução cooperativa de cascatas de sinalização associadas com vários fatores incluindo, mas não limitados a, TGF- β , IGF, VEGF, angiotensina II, endotelina, etc.; e a resposta celular a vários estímulos ambientais incluindo, mas não limitados a, glicose aumentada (hiperglicemia), tensão mecânica aumentada (hipertensão), etc.



Embora a invenção não deva ser limitada pelo mecanismo pelo qual os anticorpos neutralizam a atividade de CTGF, os anticorpos podem ligar-se a e impedir o CTGF de interagir com os receptores celulares específicos. Os receptores podem ter afinidade de ligação alta por CTGF e, por ligação ao CTGF, estimular um sinal intracelular que leva à proliferação, diferenciação, indução da expressão de gene, e/ou mudança na morfologia ou função celular. A resposta biológica particular de uma célula ao CTGF depende da célula e do estado corrente do ambiente adjacente. Alternativamente, os receptores podem ter afinidade de ligação baixa por CTGF e, pela ligação ao CTGF, por exemplo, o CTGF de posição relativa aos receptores de afinidade alta pode facilitar o reconhecimento pelo e a resposta ao CTGF. Alternativamente, os anticorpos podem ligar-se ao CTGF dentro de tecidos ou órgãos e facilitar a titulação ou eliminação do CTGF do corpo.

Alternativamente ou em combinação com os mecanismos descritos acima, os anticorpos podem ligar-se a e impedir o CTGF de interagir com os cofatores secretados ou ligados a membrana. Tais cofatores incluem especificamente os membros da superfamília de TGF β incluindo, por exemplo, TGF β -1, -2, e -3; activina-A, -B, -C, e -E; BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -8a, -8b, -9, -10, -11, e -15; e GDF-3, -5, -6, -7, -9, e -10. Por exemplo, o CTGF foi mostrado ligar-se ao TGF β -1 e BMP-4 e modular sua atividade. (Abreu *et al.* (2002) Nat Cell Biol 4: 599 a 604). A presente invenção fornece evidência que a região de CTGF que se liga ao TGF β é codificada pelo exon 3 (Figura 1B; do nucleotídeo 418 ao nucleotídeo 669 da SEQ ID NO: 1) e os anticorpos que se ligam dentro desta região impedem a interação entre CTGF e TGF β . (Exemplo 12, *infra*). Além disso, os anticorpos que se ligam dentro desta região de CTGF foram mostrados neutralizar os processos associados ao CTGF específicos em modelos animais. Por exemplo, os anticorpos que se ligam dentro desta região de CTGF foram mostrados especificamente inibir a migração celular em ensaios *ex vivo*, e reduzem a fibrose em modelos

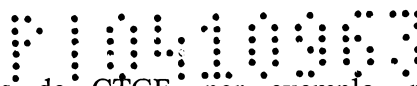


animais. Os anticorpos exemplares da invenção são mAb1 e CLN1; o anticorpo CLN1 é produzido pela linhagem celular definida pelo Nº de Acesso ATCC _____, depositado com the American Type Culture Collection (Manassus VA) em 19 de Maio de 2004.

5 Independente do mecanismo de ação, a presente invenção fornece os métodos de usar os anticorpos para tratar várias doenças e distúrbios associados com CTGF. As doenças e distúrbios associados com CTGF incluem, mas não são limitados a, nefropatias, fibroses pulmonares, retinopatias, escleroderma, fibroses hepáticas, insuficiência cardíaca, artrite, e
10 aterosclerose. Adicionalmente, os distúrbios associados com CTGF ocorrem devido a vários fatores incluindo, mas não limitados a, hiperglicemia, hipertensão, diabetes, obesidade, etc; e incluem nefropatia diabética, retinopatia, doença cardiovascular, e outros. Como o CTGF é superexpressado em uma variedade ampla de doenças incluindo aquelas
15 listadas acima, a invenção considera tratar os pacientes tendo um distúrbio associado com CTGF com um anticorpo de CTGF para melhorar ou estabilizar a patologia, manter ou restaurar a função do órgão, melhorar a qualidade de vida, e prolongar a sobrevivência.

 Por exemplo, os anticorpos são particularmente direcionados
20 às regiões de CTGF envolvidas em atividades biológicas associadas com aspectos tanto fibróticos quanto não fibróticos de vários distúrbios incluindo, por exemplo, fibrose intersticial pulmonar, nefropatia diabética e retinopatia, degeneração macular, etc. A invenção também diz respeito aos métodos de usar os anticorpos para tratar os distúrbios associados com CTGF incluindo os
25 distúrbios fibróticos localizados e sistêmicos, tais como aqueles do pulmão, fígado, coração, pele, e rim, etc.; e a formação de cicatriz localizada devido a, por exemplo, trauma, procedimentos cirúrgicos, etc.

 Os anticorpos da invenção também podem ser usados em qualquer método que envolva a ligação ao CTGF. Tais métodos incluem a



- purificação de CTGF ou fragmentos de CTGF, por exemplo, pela cromatografia por afinidade; detecção de CTGF ou fragmentos de CTGF em uma amostra, por exemplo, usando ELISA ou técnicas imunoistoquímicas; diagnosticar um distúrbio associado com CTGF usando-se o método de
- 5 detectar o CTGF para medir os níveis de CTGF em uma amostra de paciente e comparando o nível de CTGF na amostra a um padrão.

Anticorpos Direcionados ao CTGF

- A modulação da quantidade e/ou atividade de fatores celulares secretados usando, por exemplo, anticorpos monoclonais, foi apresentada, e
- 10 vários anticorpos terapêuticos foram aprovados ou estão sob desenvolvimento. (Ver, por exemplo, Abciximab (Reopro; Centocor, Inc., Malvern PA), Infliximab (Remicade; Maini *et al.* (1998) Artrite Rheum 41: 1552 a 1563; Targan *et al.* (1997) N Engl J Med 337: 1029 a 1035); Basiliximab (Simulect) e Daclizumab (Zenapax) (Bumgardner *et al.*
- 15 (2001) Transplantation 72: 839 a 845; Kovarik *et al.* (1999) Transplantation 68: 1288 a 1294); e Trastuzumab (Herceptin; Baselga (2001) Ann Oncol 12 Suppl 1: S49 a 55)). Os métodos numerosos dos quais produz anticorpos, incluindo a produção em animais, plantas, fungos, e bactérias; construção sintética; e cultura *ex vivo*; são conhecidos e estão disponíveis àqueles de
- 20 habilidade na técnica.

- Os anticorpos da invenção podem ser preparados usando qualquer técnica que forneça a produção de moléculas de anticorpo. As técnicas para a produção *in vivo* e *in vitro* de anticorpos monoclonais ou policlonais são bem conhecidas no ramo. (Ver, por exemplo, Pound (1998)
- 25 Immunochemical Protocolos, Humana Press, Totowa NJ; Harlow e Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque; Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2ª Edição, Academic Press; Schook (1987) Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc). A produção de anticorpos

- quiméricos também é bem conhecida na técnica, como é a produção dos anticorpos de cadeia simples. (Ver, por exemplo, Morrison *et al.* (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81: 6851 a 6855; Neuberger *et al.* (1984) Nature 312: 604 a 608; Takeda *et al.* (1985) Nature 314: 452 a 454). Os anticorpos com especificidade relacionada, mas de composição idiotípica distinta, podem ser gerados por uma variedade de meios disponíveis, por exemplo, por embaralhamento de cadeia a partir de bibliotecas de imunoglobulina combinatorial aleatórias. (Ver, por exemplo, Burton (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88: 11120 a 11123).
- Os anticorpos também podem ser produzidos induzindo-se a produção *in vivo* na população de linfócito ou triando-se as bibliotecas ou painéis de imunoglobulina de reagentes de ligação altamente específicos. (Ver, por exemplo, Orlandi *et al.* (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86: 3833 a 3837; Winter e Milstein (1991) Nature 349: 293 a 299). Os fragmentos de anticorpo que contém sítios de ligação específicos para o polipeptídeo alvo também podem ser gerados. Tais fragmentos de anticorpo incluem, mas não são limitados aos, fragmentos $F(ab')_2$, que podem ser produzidos por digestão de pepsina da molécula de anticorpo, e os fragmentos Fab, que podem ser gerados reduzindo-se as pontes de dissulfeto dos fragmentos $F(ab')_2$.
- Alternativamente, as bibliotecas de expressão de Fab podem ser interpretadas para permitir a identificação rápida e fácil de fragmentos Fab monoclonais com a especificidade desejada. (Ver, por exemplo, Huse *et al.* (1989) Science 254: 1275 a 1281).
- Os anticorpos monoclonais da invenção também podem ser preparados usando o método de hibridoma (ver, por exemplo, Kohler e Milstein (1975) Nature 256: 495 a 497) ou por métodos de DNA recombinante (ver, por exemplo, Celltech Therapeutics Ltd., Patente Européia Nº EP 0 120 694; Cabilly *et al.*, Patente US Nº 4.816.567; e Mage e Lamoyi (1987) em: Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,

Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, páginas 79 a 97).

No método de hibridoma, um camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado é imunizado com CTGF ou um fragmento deste pelas vias subcutânea, intraperitoneal, ou intramuscular para eliciar os linfócitos que produzem ou são capazes de produzir os anticorpos que se ligarão especificamente ao polipeptídeo usado para a imunização. Alternativamente, o animal hospedeiro pode ser um mamífero transgênico tendo transgenes que codificam os genes de imunoglobulina humana e tendo locos de imunoglobulina endógena inativos. O mamífero transgênico responde aos imunógenos produzindo-se anticorpos humanos. (Ver, por exemplo, Lonberg *et al.*, WO 93/12227 (1993), Patente US Nº 5.877.397, e Nature 148: 1547 a 1553 (1994); e Kucherlapati *et al.* (1991) WO 91/10741). Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro* e depois fundidos com células de mieloma usando um agente de fusão adequado, tal como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma. (Ver, por exemplo, Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2ª Edição, Academic Press, páginas 59 a 103). Alternativamente, as células somáticas humanas capazes de produzir o anticorpo, especificamente os linfócitos B, são adequadas para a fusão com linhagens celulares de mieloma. Enquanto que os linfócitos B de baços submetidos a biópsia, amídalas ou linfonodos de um indivíduo podem ser usados, os linfócitos B do sangue periférico mais facilmente acessíveis são preferidos. Além disso, as células B humanas podem ser diretamente imortalizadas pelo vírus Epstein-Barr. (Ver, por exemplo, Cole *et al.* (1995) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., páginas 77 a 96).

As linhagens celulares de mieloma preferidas para o uso em procedimentos de fusão de produção de hibridoma são aquelas que se fundem eficazmente, suportam a expressão de nível alto estável do anticorpo pela célula que produz anticorpo selecionado, têm insuficiências enzimáticas que

as tornam incapazes de desenvolver em certos meios seletivos que suportam o desenvolvimento dos hibridomas desejados, e que não produzem elas mesmas o anticorpo. Os exemplos de linhagens celulares de mieloma que podem ser usadas para a produção de hibridomas na presente invenção incluem

5 P3X63Ag8, P3X63Ag8-653, NS1/1.Ag4.1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7, S194/5XX0 Bul, todos derivados de camundongos; R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F e 4B210, todos derivados de ratos; e U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2, UC729-6, todos derivados de seres humanos. (Ver, por exemplo, Goding (1986) Monoclonal

10 Antibodies: Principles and Practice, 2ª Edição, Academic Press, páginas 65 a 66; e Campbell (1984) em: Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 13 (Burden e Von Knippenberg, eds). Amsterdam, Elsevier, páginas 75 a 83).

As células de hibridoma são semeadas e cultivadas em um

15 meio de cultura adequado que contém preferivelmente uma ou mais substâncias que inibem o desenvolvimento ou sobrevivência das células de mieloma não fundidas, parenterais. Por exemplo, se as células de mieloma parentais necessita da enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas tipicamente

20 incluirá uma substância tal como hipoxantina, aminopterina, e timidina (meio HAT) que impede o desenvolvimento das células deficientes de HGPRT.

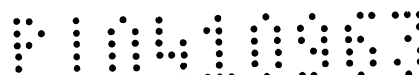
O meio de cultura no qual as células de hibridoma estão em desenvolvimento é ensaiado para a produção de anticorpos monoclonais direcionados contra CTGF ou fragmentos de CTGF. Preferivelmente, a

25 especificidade de ligação é determinada pela cromatografia por afinidade, imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), ou por análise de separação celular ativada por fluorescência (FACS). Os anticorpos monoclonais da invenção são aqueles que se ligam ao CTGF, e

adicionalmente aqueles que neutralizam uma atividade biológica de CTGF, como exemplificado *infra*.

Os anticorpos produzidos, por exemplo, como descrito *supra*, são opcionalmente triados para detectar os anticorpos que se ligam substancialmente ao fragmento de terminal N de CTGF. Em uma forma de realização, os anticorpos são direcionados para um fragmento de CTGF que se estende de cerca do resíduo 24 a cerca do resíduo 180 da SEQ ID NO: 1. Em uma outra forma de realização, os anticorpos são direcionados para um fragmento de CTGF que se estende de cerca do resíduo 96 a cerca do resíduo 180 da SEQ ID NO: 1. Em um forma de realização particular, a triagem detecta os anticorpos que se ligam substancialmente ao mesmo epítipo reconhecido pelo anticorpo mAb1 como determinado, por exemplo, pelos ensaios de competição da classe descrita *infra*. Em uma outra forma de realização particular, a triagem detecta os anticorpos que se ligam substancialmente ao mesmo epítipo reconhecido pelo anticorpo CLN1 como determinado, por exemplo, pelos ensaios de competição da classe descrita *infra*. Deve ser lembrado que “o mesmo epítipo” não significa o aminoácido ou carboidrato exato ao qual o anticorpo de referência se liga, como pode ser determinado, por exemplo, pelo mapeamento de epítipo usando variantes de varredura de alanina do CTGF. O “mesmo epítipo” significa o domínio de CTGF que é bloqueado pela ligação ao CTGF do anticorpo de referência natural na forma intata. Naturalmente, o “mesmo epítipo” inclui os resíduos do domínio de CTGF ou o carboidrato que interage ou se liga estruturalmente às regiões que determinam complementaridade de referência (CDRs) de mAb1 ou CLN1.

Em uma forma de realização preferida da invenção, o anticorpo monoclonal terá uma afinidade que é igual a ou maior do que aquela de mAb1, como determinado, por exemplo, pela análise de Scatchard de Munson e Pollard (1980, Anal Biochem 107: 220).

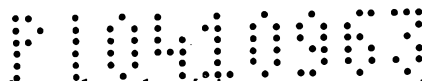


Depois que as células de hibridoma são identificadas produzindo anticorpos neutralizantes da especificidade e afinidade desejadas, os clones tipicamente são subclonados limitando-se os procedimentos de diluição e desenvolvidos por métodos padrão. (Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2ª Edição, Academic Press, páginas 59 a 104). Os meios de cultura adequados para este propósito incluem, por exemplo, meio de Eagle modificado por Dulbecco ou meio RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como tumores de acite em um animal.

Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido de ascite, ou soro por procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais tais como, por exemplo, proteína A-Sefarose, cromatografia por hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise, ou cromatografia por afinidade.

O DNA que codifica os anticorpos monoclonais da invenção é prontamente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais, por exemplo, usando-se sondas de oligonucleotídeo que são capazes de se ligar especificamente aos genes que codificam as cadeias pesadas e leves do anticorpo. Uma vez isolado, o DNA pode ser ligado em vetores de expressão ou de clonagem, que depois são transfectados em células hospedeiras tais como as células COS de símio, células ovarianas de Hamster Chinês (CHO), ou células de mieloma que não produzem de outro modo a proteína de imunoglobulina. As células assim transformadas são cultivadas sob condições adequadas para a síntese de anticorpos monoclonais na cultura de célula hospedeira recombinante. Uma linhagem celular exemplar é definida pelo N^o de Acesso ATCC _____, depositado com o ATCC em 19 de Maio de 2004.

O DNA opcionalmente é modificado de modo a alterar o caráter da imunoglobulina codificada. As variantes de imunoglobulinas são bem conhecidas. Por exemplo, os anticorpos quiméricos são fabricados



substituindo-se a sequência de codificação pelos domínios constantes de cadeia pesada e leve de uma espécie, por exemplo, camundongo, com as sequências homólogas de uma outra espécie, por exemplo, a humana. (Ver, por exemplo, Boss *et al.*, Publicação Internacional Nº WO 84/03712; Cabilly *et al.*, Patente US Nº 4.816.567; ou Morrison *et al.* (1984) Proc Nat Acad Sci 81: 6851). Em uma forma de realização particular, as formas humanizadas de anticorpos de murino podem ser fabricados substituindo-se as regiões que determinam complementaridade (CDRs), isto é, os domínios variáveis, de um anticorpos de camundongo em um domínio de estrutura, isto é, a região constante, de um anticorpo humano. (Ver, por exemplo, Publicação Internacional Nº WO 92/22653). Em algumas formas de realização, os resíduos de estrutura de murino selecionados também são substituídos na imunoglobulina do receptor humano. Além disso, o domínio Fc escolhido pode ser qualquer um de IgA, IgD, IgE, IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-4, ou IgM. O domínio Fc opcionalmente é capaz de efetuar as funções tais como ligação do complemento.

Os anticorpos anti-CTGF da presente invenção também podem ser fundidos às porções que fornecem capacidades adicionais, tais como detecção ou efeitos citotóxicos. As fusões das imunoglobulinas desta invenção e as porções citotóxicas são fabricadas, por exemplo, ligando-se à sequência de codificação de imunoglobulina toda ou parte da sequência de codificação por um polipeptídeo que não imunoglobulina citotóxico. Tais polipeptídeos que não imunoglobulina incluem as toxinas de polipeptídeo tais como ricina, toxina de difteria, ou exotoxina de *Pseudomonas*. Os conjugados também podem ser preparados por métodos *in vitro*. Por exemplo, as imunotoxinas podem ser interpretadas usando uma reação de troca de dissulfeto ou formando-se uma ligação de tioéter entre a imunoglobulina e o polipeptídeo de toxina. Os exemplos de reagentes adequados para este propósito incluem iminotiolato e metil-4-mercaptobutirimidato. Tipicamente



tais polipeptídeos de fusão de não imunoglobulina são substituídos pelos domínios constantes de um anticorpo da invenção. Alternativamente, eles são substituídos pelos domínios variáveis de um sítio de combinação de antígeno de um anticorpo da invenção.

5 A substituição do Fv ou CDRs de um anticorpo tendo especificidade por um antígeno que não-CTGF criará um anticorpo quimérico compreendendo um sítio de combinação de antígeno tendo especificidade por CTGF e um outro sítio de combinação de antígeno tendo especificidade por um antígeno diferente. Em tais formas de realização, a cadeia leve é suprimida e o Fv da cadeia pesada é substituído com o polipeptídeo desejado. Estes anticorpos são chamados bivalente ou polivalente, dependendo do número de “ramos” de imunoglobulina possuídos pelo domínio Fc utilizado; por exemplo, as IgGs serão bivalente e as IgMs serão polivalentes. Com exceção das não imunoglobulinas mencionadas acima, o anticorpo também é

10 tornado multivalente pela recombinação de anticorpos que têm mais do que uma especificidade. Por exemplo, o anticorpo em algumas formas de realização é capaz de se ligar ao CTGF como descrito em outra parte aqui, mas também é capaz de se ligar a um segundo fator de crescimento, por exemplo, TGF β , VEGF, FGF, outros membros da família CCN, por exemplo,

20 CYR61, e outros, ou uma citocina. Os anticorpos exemplares direcionados contra estes fatores são bem conhecidos. Os anticorpos multiespecíficos, multivalentes são fabricados cotransformando-se uma célula com DNA que codifica as cadeias pesadas e leves de ambos os anticorpos e a proporção dos anticorpos expressados tendo a estrutura desejada recuperada pela

25 imunocromatografia por afinidade ou coisa parecida. Alternativamente, tais anticorpos são fabricados a partir de anticorpos monovalentes que são recombinados *in vitro* na forma convencional.

Os anticorpos monovalentes também são fabricados por técnicas que são convencionais por si. A expressão recombinante da cadeia



leve e uma cadeia pesada modificada é adequada. A cadeia pesada é truncada no geral em qualquer ponto na região Fc de modo a impedir a reticulação da cadeia pesada. Alternativamente, as cisteínas relevantes são substituídas com um outro resíduo ou suprimidas de modo a impedir a reticulação. Os métodos *in vitro* também são usados para produzir os anticorpos monovalentes, por exemplo, os fragmentos Fab são preparados por clivagem enzimática do anticorpo intato.

Diagnósticos

Os anticorpos da presente invenção podem ser usados para detectar quantitativa e qualitativamente o CTGF em uma amostra. As amostras podem ser de qualquer fonte, incluindo os meios condicionados de células desenvolvidas em cultura; amostras de tecido, por exemplo, biópsias de tecido e transplantes de órgão; fluidos corporais incluindo sangue, urina, fluido vesicular, fluido cerebrospinal, vítreo, e fluido sinovial; etc. Em uma forma de realização, a detecção de CTGF é usada para diagnosticar o estado das células cultivadas em cultura, por exemplo, com respeito à diferenciação, produção de matriz, etc. O CTGF tem vários efeitos autócrino e parácrino nas células cultivadas, e o nível de CTGF associado com a camada celular ou presente nos meios condicionados pode ser indicativo do estado presente da célula ou profético do estado futuro da célula. (Ver, por exemplo, Publicação Internacional Nº WO96/38168). Em outras formas de realização, a detecção de CTGF é usada para determinar o estado de um tecido ou órgão. Por exemplo, um órgão destinado para o transplante pode ser avaliado medindo-se os níveis de CTGF, em que o nível de CTGF expressado pelas células no órgão indica a saúde relativa do órgão e a adequação para o transplante. Os níveis de CTGF também podem ser determinados no tecido submetido a biópsia para determinar o estado de um órgão, ou o estágio e o potencial metastático de um câncer.

Em formas de realização preferidas, os anticorpos são usados

para diagnosticar uma doença ou distúrbio associado com CTGF. (Ver, por exemplo, Publicação Internacional Nº WO 03/024308). Em um aspecto, a invenção fornece anticorpos para diagnosticar um distúrbio associado com CTGF obtendo-se uma amostra, detectando-se e quantificando-se o nível de

5 CTGF na amostra, e comparando-se o nível de CTGF na amostra àquela de uma quantidade padrão de CTGF, em que uma quantidade aumentada ou diminuída de CTGF na amostra é indicativo da presença de um distúrbio associado com CTGF. Os distúrbios associados com os níveis aberrantes (por exemplo, aumentados ou diminuídos) de CTGF incluem, mas não são

10 limitados aos, distúrbios associados com a expressão e deposição alteradas das proteínas associadas com a matriz celular. Tais distúrbios incluem, por exemplo, os cânceres tais como câncer de mama, pancreático, e gastrointestinal; aterosclerose, artrite, retinopatias tais como retinopatia diabética; nefropatias tais como nefropatia diabética; fibrose cardíaca,

15 pulmonar, hepática, e renal, e doenças associadas com inflamação e/ou infecção crônica. Os distúrbios associados com CTGF também são associados com as condições tais como infartação miocárdica, diabete, diálise peritoneal, rejeição ao transplante crônica e aguda, quimioterapia, terapia com radiação, e cirurgia.

20 Em um outro aspecto, a invenção fornece anticorpos para identificar se ou não um indivíduo tem uma predisposição para desenvolver um distúrbio associado com CTGF. Uma predisposição pode ser inicialmente indicada por hiperglicemia, hipertensão, ou obesidade em um paciente. Adicionalmente, uma predisposição pode ser suspeita devido a um evento, por

25 exemplo, uma infartação miocárdica, cirurgia, imobilização ortopédica ou paralítica, insuficiência cardíaca congestiva, gravidez, ou varicosidades no paciente.

Em um outro aspecto, a invenção fornece anticorpos para monitorar a progressão de um distúrbio associado com CTGF ou monitorar a

eficácia terapêutica de tratamento de um distúrbio associado com CTGF. Por exemplo, um método de usar os anticorpos pode compreender obter as amostras a partir de um paciente com o passar do tempo; detectar e quantificar o nível de CTGF em cada amostra; e comparar o nível de CTGF em amostras subseqüentes com os níveis de CTGF em amostras iniciais ou prévias. Uma mudança no nível de CTGF entre as amostras com o passar do tempo é indicativo da progressão do distúrbio associado com CTGF ou a eficácia terapêutica do tratamento do distúrbio associado com CTGF.

Para as aplicações de diagnóstico, os anticorpos da invenção tipicamente serão rotulados com uma porção detectável. A porção detectável pode ser qualquer porção capaz de produzir, direta ou indiretamente, um sinal detectável. Por exemplo, a porção detectável pode ser um radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ou ^{125}I , um composto fluorescente ou quimiluminescente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ou luciferina; ou uma enzima, tal como fosfatase alcalina, beta-galactosidase ou peroxidase de rábano.

Qualquer método conhecido na técnica para conjugar separadamente o anticorpo à porção detectável pode ser utilizado. (Ver, por exemplo, Hunter *et al.* (1962) *Nature* 144: 945; David *et al.* (1974) *Biochemistry* 13: 1014; Dor *et al.* (1981) *J Immunol Meth* 40: 219; e Nygren (1982) *J Histochem Cytochem* 30: 407). Os anticorpos da presente invenção podem ser utilizados em qualquer método de ensaio conhecido, tal como ensaios de ligação competitiva, ensaios sanduíche diretos e indiretos, e ensaios de imunoprecipitação. (Zola (1987) em: *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., páginas 147 a 158).

Os ensaios de ligação competitiva confiam na capacidade de um padrão rotulado (que pode ser CTGF ou uma porção imunologicamente reativa deste) para competir com o analito da amostra de teste (CTGF) para a ligação com uma quantidade limitada de anticorpo. A quantidade de CTGF na

amostra de teste é inversamente proporcional à quantidade de padrão que torna-se ligado aos anticorpos. Para facilitar a determinação da quantidade do padrão que torna-se ligado, os anticorpos no geral são insolubilizados antes ou depois da competição, de modo que o padrão e o analito que são ligados aos anticorpos podem ser convenientemente separados do padrão e analito que permanecem não ligados.

Os ensaios sanduíche envolvem o uso de dois anticorpos, cada um capaz de se ligar a uma porção imunogênica diferente, ou epítipo, da proteína a ser detectada. Em um ensaio sanduíche, o analito da amostra de teste é ligado por um primeiro anticorpo que é imobilizado em um suporte sólido, e conseqüentemente um segundo anticorpo se liga ao analito, formando assim um complexo de três partes insolúvel. (David e Greene, Patente US Nº 4.376.110). O segundo anticorpo pode ele mesmo ser rotulado com uma porção detectável (ensaios sanduíche diretos) ou pode ser medido usando um anticorpo anti-imunoglobulina que é rotulado com uma porção detectável (ensaio sanduíche indireto). Por exemplo, um tipo de ensaio sanduíche é um ensaio ELISA, caso em que a porção detectável é uma enzima. Um ensaio exemplar em que os anticorpos da invenção podem ser usado, por exemplo, é descrito na Publicação Internacional Nº WO 03/024308.

Os anticorpos da invenção também são úteis para a visualização *in vivo*, em que um anticorpo rotulado com uma porção detectável tal como um agente radio-opaco, radioisótopo, ou porção fluorescente tal como proteína fluorescente verde (GFP) é administrado a um hospedeiro, preferivelmente na corrente sanguínea, e a presença e local do anticorpo rotulado no hospedeiro são ensaiados. A técnica de visualização é útil no estágio e tratamento de distúrbios associados com CTGF tais como os distúrbios fibróticos. O anticorpo pode ser rotulado com qualquer porção que é detectável em um hospedeiro, se por ressonância magnética nuclear,

radiologia, ou outros meios de detecção conhecidos na técnica.

Terapêutica

A presente invenção fornece anticorpos para o tratamento de várias doenças e distúrbios associados com CTGF. Os anticorpos da invenção foram descobertos reduzir os efeitos deletérios da produção ou atividade de CTGF em vários distúrbios, como exemplificado abaixo. Além disso, os anticorpos mostram farmacocinéticas favoráveis os tornando agentes terapêuticos superiores para o tratamento de distúrbios associados com CTGF.

Os anticorpos anti-CTGF da presente invenção inibem o desenvolvimento de fibrose em modelos animais, por exemplo, de fibrose pulmonar e renal. Especificamente, os anticorpos atenuam a fibrose pulmonar induzida por bleomicina em camundongos em 60 a 70%, como determinado pelo acúmulo de inibição de hidroxiprolina pulmonar (colágeno) e exame histológico de preparações teciduais. Além disso, os anticorpos reduzem o acúmulo de colágeno em um modelo de rim remanescente de rato (isto é, 5/6 de nefrectomia), e em camundongos seguindo a obstrução de ureter unilateral (UUO). Os anticorpos também reduzem a fibrose induzida por infusão subcutânea ou intraperitoneal combinada de CTGF e TGF β em camundongos recém-nascidos. Adicionalmente, os anticorpos reduzem as complicações associadas com insuficiência do órgão, por exemplo, função renal melhorada em vários modelos de insuficiência renal crônica e aguda. Nenhuma toxicidade foi observada com estes anticorpos em animais. Como o CTGF é superexpressado em uma variedade ampla de doenças fibróticas incluindo escleroderma difuso e limitado, osteoartrite, nefropatia diabética e retinopatia, etc., a invenção considera tratar os pacientes com um distúrbio associado com CTGF com um anticorpo de CTGF para melhorar ou estabilizar a patologia, restaurar a função do órgão, melhorar a qualidade de vida, e prolongar a sobrevivência.

Portanto, os anticorpos da invenção são especialmente úteis

nas aplicações terapêuticas, para prevenir ou tratar os distúrbios associados com CTGF em um paciente. Tais distúrbios incluem, mas não são limitados a, angiogênese e outros processos que desempenham um papel central em condições tais como aterosclerose, glaucoma, etc.; e em câncer, incluindo leucemia linfoblástica aguda, dermatofibromas, câncer de mama, carcinoma de mama, glioma e glioblastoma, rhabdomyosarcoma e fibrossarcoma, desmoplasia, angiolipoma, angioleiomioma, cânceres desmoplásticos, e câncer de próstata, ovariano, colorretal, pancreático, gastrointestinal, e hepático e outro desenvolvimento tumoral e metástases.

Adicionalmente, os anticorpos da invenção são úteis nas aplicações terapêuticas para prevenir ou tratar os distúrbios associados com CTGF que envolvem fibrose. Em um aspecto, os anticorpos da invenção são administrados a um paciente para prevenir ou tratar um distúrbio associado com CTGF que incluem, mas não são limitados a, distúrbios que exibem expressão e deposição alterada de proteínas associadas com a matriz celular, por exemplo, distúrbios fibróticos. Em vários aspectos, a fibrose pode ser localizada a um tecido particular, tal como tecido epitelial, endotelial, ou conjuntivo; ou a um órgão, tal como rim, pulmão, ou fígado. A fibrose também pode ocorrer no olho e juntas. Em outros aspectos, a fibrose pode ser sistêmica e envolve os sistemas de órgão e tecido múltiplos. Os distúrbios associados com CTGF incluem, por exemplo, aterosclerose, artrite, retinopatias tais como retinopatia diabética; nefropatias tais como nefropatia diabética; fibrose cardíaca, pulmonar, hepática, e renal, e doenças associadas com inflamação e/ou infecção crônicas.

Em um outro aspecto, a invenção fornece anticorpos para prevenir um distúrbio associado com CTGF em um paciente tendo uma predisposição a desenvolver um tal distúrbio. Uma predisposição pode incluir, por exemplo, hiperglicemia, hipertensão, ou obesidade no paciente. Tais distúrbios podem ocorrer, por exemplo, devido à diabetes, obesidade, etc., e

incluem nefropatia diabética, retinopatia, e doença cardiovascular. Adicionalmente, uma predisposição pode ser suspeita devido a um evento, por exemplo, uma infartação miocárdica, cirurgia, diálise peritoneal, rejeição ao transplante crônica e aguda, quimioterapia, terapia com radiação, trauma, 5 imobilização ortopédica ou paralítica, insuficiência cardíaca congestiva, gravidez, ou varicosidades no paciente.

Em formas de realização particulares, como exemplificado aqui, os anticorpos da presente invenção são administrados a um paciente para tratar a fibrose de um órgão, por exemplo, pulmão ou rim. Os anticorpos são 10 mostrados aqui fornecer benefício em vários modelos de fibrose pulmonar e renal. (Ver, por exemplo, os Exemplos 7 a 9). Em uma outra forma de realização particular, os anticorpos da presente invenção são administrados a um paciente para reduzir a esclerose local ou sistêmica. (Ver, por exemplo, os Exemplos 11 e 12). Em formas de realização adicionais, os anticorpos são 15 administrados a um paciente para tratar ou prevenir os distúrbios oculares tais como vitreorretinopatia proliferativa, retinopatia diabética, degeneração macular, etc. Como o CTGF está implicado em uma variedade ampla de distúrbios, a invenção considera ainda tratar os pacientes tendo um distúrbio associado com CTGF usando um anticorpo da invenção para melhorar ou 20 estabilizar a patologia e função do órgão, melhorar a qualidade de vida, e prolongar a sobrevivência.

Para as aplicações terapêuticas, os anticorpos da invenção são administrados a um mamífero, preferivelmente um ser humano, em uma forma de dosagem farmaceuticamente aceitável. Os anticorpos podem ser 25 administrados intravenosamente como um bolo ou por infusão contínua durante um período de tempo, e/ou pelas vias intramuscular, subcutânea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, intravitreal, intracranial, oral, tópica, ou por inalação. Quando o anticorpo possui a atividade adequada, as vias intratumoral, peritumoral, intralesional, ou perilesional de administração

também podem ser utilizadas para exercer efeitos terapêuticos locais assim como sistêmicos.

Tais formas de dosagem abrangem os veículos farmacêuticamente aceitáveis que são inerentemente não tóxicos e não terapêuticos. Os exemplos de tais veículos incluem os trocadores de íon, alumina, estearato de alumínio, lecitina; proteínas do soro tais como albumina sérica humana; tampões tais como fosfato ou glicina; ácido sórbico, sorbato de potássio, misturas de glicerídeo parcial de ácidos graxos vegetais saturados, água, sais; ou eletrólitos tais como sulfato de protamina, cloreto de sódio, sais metálicos, sílica coloidal, trisilicato de magnésio, polivinil pirrolidona, polímeros celulósicos, e polietileno glicol. Os veículos para as formas tópicas ou com base em gel de anticorpo incluem os polissacarídeos tais como carboximetilcelulose de sódio ou metilcelulose, polivinilpirrolidona, poliacrilatos, polímeros de bloco de polioxietileno-polioxipropileno, polietileno glicol, e álcoois de cera de madeira. As formas de depósito convencionais incluem, por exemplo, microcápsulas, nanocápsulas, lipossomas, emplastos, tabletes sublinguais, e matrizes poliméricas tais como copolímeros de polilactida:poliglicolida. Quando presente em uma forma de dosagem aquosa, ao invés de ser liofilizado, o anticorpo tipicamente será formulado em uma concentração de cerca de 0,1 mg/ml a 100 mg/ml, embora a variação ampla fora destas faixas seja permitida.

Para a prevenção ou tratamento da doença, a dosagem apropriada de anticorpo dependerá do tipo da doença a ser tratado, como definido acima, da estridência e curso da doença, se os anticorpos são administrados para propósitos preventivos ou terapêuticos, do curso da terapia prévia, da história clínica do paciente e da resposta ao anticorpo, e da discricão do médico atendente. O anticorpo é adequadamente administrado ao paciente em um tempo ou em uma série de tratamentos.

Dependendo do tipo e severidade da doença, cerca de 0,015 a

15 mg de anticorpo/kg de peso do paciente é uma dosagem candidata inicial para a administração ao paciente, se, por exemplo, por um ou mais administrações separadas, ou por infusão contínua. Para as administrações repetidas durante vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é repetido até que uma deleção desejada dos sintomas da doença ocorra. Entretanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis e não são excluídos da presente invenção.

De acordo com uma outra forma de realização da invenção, a efetividade do anticorpo em prevenir ou tratar a doença pode ser melhorada administrando-se o anticorpo periodicamente ou em combinação com um outro agente que é eficaz para o mesmo objetivo clínico, tal como um outro anticorpo direcionado contra um epítipo diferente que não o anticorpo principal, ou um ou mais agentes terapêuticos convencionais conhecido para a indicação terapêutica intencionada, por exemplo prevenção ou tratamento de condições associadas com a produção de matriz extracelular excessiva tal como fibrose ou esclerose, inibição de crescimento celular de tumor ou metástase, inibição de neovascularização, ou redução de inflamação. Tais agentes podem melhorar os sintomas ou melhorar o resultado por intermédio de um mecanismo similar de ação, por exemplo, anticorpos anti-TGF β , ou por um mecanismo diferente, por exemplo, interferon- γ . Tais agentes adicionalmente podem melhorar os sintomas direta ou indiretamente associados com um distúrbio associado com CTGF ou uma predisposição de desenvolver um distúrbio associado com CTGF, por exemplo, inibidores da enzima de conversão de angiotensina (ACE) e bloqueadores do receptor de angiotensina (Arbs).

Por exemplo, os pacientes com escleroderma que recebem as infusões do Iloprost do agonista de prostaciclina estável frequentemente relatam uma melhora na impermeabilidade da pele consistente com um efeito inibitório na formação de tecido conectivo que forma a cicatriz pelos

fibroblastos cutâneos. Os prostanóides foram mostrados exercer um efeito inibitório na síntese do colágeno, e várias linhas de evidência demonstram que o Iloprost bloqueiam a indução de CTGF no escleroderma. (Korn *et al.* (1980) J Clin Invest 65: 543 a 554; Goldstein e Polger (1982) J Biol Chem 257: 8630 a 633; e Stratton *et al.* (2001) J Clin Invest 108: 241 a 250). O CTGF é elevado sete vezes no fluido vesicular em pacientes com escleroderma comparado com os controles saudáveis, entretanto os pacientes que recebem administração intravenosa de Iloprost mostram uma diminuição marcante no CTGF no fluido vesicular. (Stratton *et al.* (2001) J Clin Invest 108: 241 a 250). Tomados juntos, estes resultados sugerem que alguns dos benefícios da terapia com Iloprost no escleroderma pode derivar de efeitos antifibróticos mediados por intermédio da redução nos níveis de CTGF. Como existem interesses com respeito ao uso de um análogo de prostaciclina vasodilatador e anti-plaqueta potente na administração sistêmica crônica em pacientes com escleroderma, uma terapia que utiliza um anticorpo anti-CTGF sozinho ou em combinação com níveis reduzidos de Iloprost poderia fornecer um tratamento seguro e eficaz para o escleroderma.

Usos Adicionais

Os anticorpos da invenção também são úteis como agentes de purificação de afinidade. Neste processo, os anticorpos contra CTGF são imobilizados em um suporte adequado, tal como resina de Sephadex ou papel de filtro, usando métodos bem conhecidos na técnica. O anticorpo imobilizado depois é contatado com uma amostra contendo o CTGF a ser purificado, e conseqüentemente o suporte é lavado com um solvente adequado que removerá substancialmente todo o material na amostra exceto o CTGF que está ligado ao anticorpo imobilizado. Finalmente, o suporte é lavado com um outro solvente adequado, tal como tampão de glicina (pH 5,0), que liberará o CTGF do anticorpo.

EXEMPLOS

A invenção será mais entendida por referência aos exemplos seguintes, que são intencionados a serem puramente exemplares da invenção. Estes exemplos são fornecidos somente para ilustrar a invenção reivindicada. A presente invenção não é limitado em escopo pelas formas de realização exemplificadas, que são intencionadas como ilustrações de aspectos únicos da invenção apenas. Quaisquer métodos que são funcionalmente equivalentes estão dentro do escopo da invenção. Várias modificações da invenção além daquelas aqui descritas tornar-se-ão evidentes àqueles habilitados na técnica a partir da descrição precedente e figuras que acompanham. Tais modificações são intencionadas a cair dentro do escopo das reivindicações anexas.

Exemplo 1. Produção de CTGF humano recombinante

Uma construção de baculovírus de CTGF humano recombinante foi produzida como descrito em Segarini *et al.*((2001) J Biol Chem 276: 40659 a 40667). Brevemente, um cDNA de CTGF compreendendo apenas a estrutura de leitura aberta foi gerado por PCR usando DB60R32 (Bradham *et al.* (1991) J Cell Biol 114: 1285 a 1294) como modelo e os iniciadores 5'-gctccgcccgcagtgggatccATGaccgccgcc-3' e 5'-ggatccggatccTCA tgccatgtctccgta-3', que adicionam os sítios enzimáticos de restrição de BamHI às extremidades do produto amplificado. Os códons de começo e fim naturais são indicados em letras maiúsculas.

O fragmento de DNA amplificado resultante foi digerido com BamHI, purificado por eletroforese em um gel de agarose, e subclonado diretamente no sítio de BamHI do plasmídeo de expressão de baculovírus PFASTBAC1 (Invitrogen Corp., Carlsbad CA). A seqüência e a orientação do cassete de expressão foi verificado pelo seqüenciamento de DNA. O cassete de expressão de CTGF resultante depois foi transferido ao DNA de bacmídeo pela recombinação específica de sítio em bactérias. Este bacmídeo depois foi usado para gerar um baculovírus de CTGF completamente recombinante em células de inseto *Spodoptera frugiperda* SF9 de acordo com protocolos

fornecidos pelo fabricante (BAC-TO-BAC Expression System manual; Invitrogen). A expansão dos títulos de baculovírus recombinante em células de inseto Sf9 foi realizada usando os procedimentos padrão conhecidos na técnica.

5 As células de inseto Hi5 foram adaptadas para o desenvolvimento em suspensão pela passagem serial de células em cultura em frasco de agitação acompanhada pelo enriquecimento em cada passagem pelas células separadas. As células Hi5 em suspensão foram cultivadas em 1 L de meio SF900II SFM (Invitrogen) suplementado com 20 µg/ml de gentamicina (Mediatech, Inc., Herndon VA) e 1 x de lipídeo (Invitrogen) em 10 frascos de cultura Fernbach de 2,8 L descartáveis (Corning Inc., Acton MA) em uma plataforma agitadora a 110 rpm a 27°C. Uma vez que as células atingiram uma densidade de 1,0 a 1,5 x 10⁶ células/ml com um viabilidade de > 95%, elas foram infectadas com baculovírus recombinante em uma 15 multiplicidade de infecção (MOI) de 10. As culturas depois foram incubadas a 27°C durante um adicional de 40 a 44 horas. Os meios condicionados, que contêm rhCTGF, foram coletados, resfriados em gelo, e centrifugados a 5000 x g. O sobrenadante depois foi passado através de um filtro de 0,45 mm.

 Alternativamente, o CTGF de rato recombinante foi produzido 20 inserindo-se o clone 2-4-7, que codifica o CTGF de rato (Schmidt *et al.*, US Pat Nº 6.348.329), em vetor de expressão pMK33 (interpretado por Michael Koelle, Stanford University Ph. D. dissertation, 1992). A construção da expressão de CTGF de rato foi transfectada em células Schneider 2 (American Type Culture Collection, Manassas VA; Schneider (1972) J 25 Embryol Exp Morphol 27: 353 a 365) usando o reagente CELLECTIN (Invitrogen Corp., Carlsbad CA). As células foram cultivadas em meios contendo 300 µg/ml de higromicina B durante 6 semanas, e depois foram cultivadas sem seleção durante três dias. A expressão de CTGF foi induzida pela adição de 500 µM de CuSO₄ e 100 µM de ZnSO₄, e depois de quatro dias



o meio foi colhido e clarificado por centrifugação e filtração como acima.

O CTGF produzido por cada método descrito acima foi purificado como segue. Quatro litros de meios condicionados foram carregados em uma coluna de heparina HI-TRAP de 5 ml (Amersham Biosciences Corp., Piscataway NJ) pré equilibrado com 50 mM de Tris (pH 7,5), 150 mM de NaCl. A coluna foi lavada com 10 volumes de coluna de 350 mM de NaCl, 50 mM de Tris (pH 7,5). O CTGF foi eluído da coluna com um gradiente de sal de NaCl aumentando. As frações eluídas foram triadas por SDS-PAGE, e aquelas contendo CTGF foram misturadas.

O CTGF purificado com heparina foi diluído a uma condutividade final de 5,7 mS com água duplamente destilada não pirogênica e o pH foi ajustado a 8,0. Uma coluna de troca de ânion forte Q-SEFAROSE (Amersham Biosciences) contendo aproximadamente 23 ml de resina conectada em arranjo com uma coluna de poliestireno POROS de carboximetila (CM) (Applied Biosystems) contendo aproximadamente 7 ml de resina foi utilizada para a remoção de endotoxina, e captura e eluição de rhCTGF purificado. Antes da carga da amostra, a coluna em arranjo foi lavada com 0,5 M de NaOH, seguido por 0,1 M de NaOH, e finalmente tampão de equilíbrio. A amostra de carga foi passada sobre a coluna em arranjo, a coluna de Q-Sefarose foi removida, e o CTGF foi eluído da coluna CM POROS (Applied Biosystems) com um aumento de 350 mM a 1200 mM de gradiente de NaCl. A pureza das frações eluídas contendo CTGF foi avaliada pela análise SDS-PAGE antes de formar uma mistura de amostra final.

Exemplo 2. Produção de fragmento de terminal N e terminal C de CTGF

Os fragmentos de terminal N e os fragmentos de terminal C de CTGF foram preparados como segue. O CTGF humano recombinante, preparado e purificado como descrito acima, foi digerido na temperatura ambiente durante 6 horas por tratamento com pérolas de quimotripsina



(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) à 1,5 mg de CTGF por unidade de quimotripsina. A mistura foi centrifugada, as pérolas de quimotripsina foram descartadas, e o sobrenadante, contendo o rhCTGF enzimaticamente clivado, foi diluído 1:5 com 50 mM de Tris, pH 7,5. O sobrenadante diluído foi aplicado a uma coluna de heparina Hi-Trap. O fluxo direto, contendo os fragmentos de terminal N de CTGF, foi coletado. A coluna de heparina foi lavada com 350 mM de NaCl, e os fragmentos de terminal C ligados de CTGF foram eluídos com um gradiente linear de 350 mM a 1200 mM de NaCl, como descrito acima. As frações foram analisadas por SDS-PAGE, e as frações contendo os fragmentos de terminal C de CTGF foram misturadas.

O fluxo direto da coluna de heparina, que conteve os fragmentos de terminal N de CTGF, foi ajustado para sulfato de amônio 0,5 M/Tris 50 mM, pH 7,5 e depois carregado em uma coluna HP de fenil sefaroze de 15 ml (Amersham-Pharmacia), que foi pré equilibrada com sulfato de amônio 0,5 M/Tris 50 mM, pH 7,5. A coluna foi lavada com 15 volumes de coluna de sulfato de amônio 0,5 M/Tris 50 mM, pH 7,5, e os fragmentos de terminal N ligados de CTGF foram eluídos com um gradiente linear de sulfato de amônio 0,5 M a 0 M/Tris 50 mM, pH 7,5, sobre aproximadamente 15 volumes de coluna. As frações foram analisadas por SDS-PAGE, e as frações contendo os fragmentos de terminal N de CTGF foram misturadas. A solução misturada foi concentrada e o tampão trocado com Tris 50 mM, NaCl 400 mM (pH 7,2), usando uma membrana de ultrafiltração ULTRACEL AMICON YM10 (Millipore Corp., Bedford MA).

Exemplo 3. Produção de Anticorpos monoclonais anti-CTGF humanos

Os anticorpos monoclonais completamente humanos para o CTGF humano foram preparados usando cepas de camundongo HUMAB HCo7, HCo12 e HCo7 + HCo12 (Medarex, Inc., PrincetonNJ). Os camundongos foram imunizados por até 10 injeções intraperitoneais (IP) ou subcutâneas (Sc) de 25 a 50 mg de CTGF humano recombinante em

adjuvante de Freund completo durante um período de 2 a 4 semanas. A resposta imune foi monitorada por sangramentos retroorbitais. O plasma foi triado por ELISA (como descrito abaixo), e os camundongos com títulos suficientes de imunoglobulina anti-CTGF foram usados para as fusões. Os camundongos foram impulsionados intravenosamente com antígeno 3 e 2 dias antes do sacrifício e remoção do baço.

As suspensões de célula única de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados foram fundidas a um quarto do número de células de mieloma de camundongo que não secretam P3X63-Ag8.653 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas VA) com 50% de PEG (Sigma, St. Louis MO). As células foram plaqueadas a aproximadamente 1×10^5 células/reservatório em placa microtituladora de fundo plano e incubadas durante cerca de duas semanas em DMEM de glicose alta (Mediatech, Herndon VA) contendo L-glutamina e piruvato de sódio, 10% de soro bovino fetal, 10% de meio condicionado com P388D1 (ATCC), 3 a 5% de origem (Igen International, Gaithersburg MD), 5 mM de HEPES, 0,055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 mg/ml de gentamicina, e 1 x de HAT (Sigma). Depois de 1 a 2 semanas, as células foram cultivadas em meio em que o HAT foi substituído com HT. Os reservatórios individuais depois foram triados por ELISA (descrito abaixo). Os hibridomas que secretam o anticorpo foram replaqueados, triados novamente, e, se ainda positivos para os anticorpos anti-CTGF, foram subclonados pelo menos duas vezes limitando-se à diluição. Os subclones estáveis depois foram cultivados *in vitro* para gerar quantidades pequenas de anticorpo em meio de cultura de tecido para a caracterização. Um clone de cada hibridoma que manteve a reatividade das células precursoras foi usado para gerar 5 a 10 bancos de célula do frasco armazenados em nitrogênio líquido.

Os ensaios ELISA foram realizados como descrito por Fishwild *et al.* (1996, Nature Biotech 14: 845 a 851). Brevemente, as placas

microtituladoras foram revestidas com 1 a 2 $\mu\text{g/ml}$ de CTGF recombinante purificado em PBS a 50 $\mu\text{l/reservatório}$, incubadas a 4°C durante a noite, depois bloqueadas com 200 $\mu\text{l/reservatório}$ de soro de galinha a 5% em PBS/Tween (0,05%). As diluições de plasma dos camundongos imunizados com CTGF ou os sobrenadantes em cultura de hibridoma foram adicionados a cada reservatório e incubados durante 1 a 2 horas na temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS/Tween e depois incubadas com um anticorpo policlonal Fc de IgG anti-humana de cabra conjugado com peroxidase de rábano (HRP) durante 1 hora na temperatura ambiente. Depois da lavagem, as placas foram cultivadas com 0,22 mg/ml de substrato ABTS (Sigma) e analisadas pelo espectrofotômetro a 415 a 495 nm.

Exemplo 4: Caracterização do Anticorpo

Os hibridomas que produziram os anticorpos para o CTGF humano foram preparados como descrito no Exemplo 3. As células de hibridoma clonadas foram cultivadas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco-Glicose Alta/RPMI 1640 (50: 50) com 8 mM de L-Glutamina, $\frac{1}{2}$ x de Aminoácidos não essenciais, e 10% de Soro bovino fetal. As células expandidas para a preparação do anticorpo foram cultivadas nos mesmos meios com 1,5% de Soro bovino fetal com IgG baixa durante 4 a 9 dias a 37°C e 6% de CO₂. Os meios condicionados resultantes foram limpos das células e concentrados usando um sistema de filtração/concentração de fluxo tangencial. O concentrado foi passado em uma coluna de proteína-A e os anticorpos monoclonais ligados eluídos com 100 mM de glicina, pH 3. O eluato foi neutralizado com 1 M de Tris, pH 8,0, e dialisado contra PBS.

4.1 *Mapeamento de Epítopo*

O mapeamento de epítopo dos anticorpos por experimentos de ligação competitiva é bem conhecido por aqueles habilitados no campo da imunologia. (Ver, por exemplo, Van Der Geld *et al.* (1999) Clinical and Experimental Immunology 118: 487 a 96). Cada população de anticorpo

isolada das células propagadas de uma única célula de híbridoma clonada foi mapeada e designada a um domínio de ligação específico no CTGF humano usando experimentos de ligação e bloqueio padrão. (Ver, por exemplo, Antibodies: A Laboratory Manual (1988) Harlow e Lane (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press; Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 2ª ed., (1994) Capítulo 10 (Immunochemical Techniques), Sasobs; e Clinical Chemistry: Theory Analysis. Correlation (1984) Capítulo 10 (Immunochemical Techniques) e Capítulo 11 (Competitive binding Assays), C. V. Mosby, St. Louis). Os domínios de ligação independentes foram inicialmente definidos pelos experimentos de competição de anticorpo nos quais dois anticorpos diferentes foram incubados em ordem seqüencial nas placas revestidas com CTGF. Se o impedimento estérico do primeiro anticorpo impediu o segundo anticorpo de se ligar ao CTGF, então os dois anticorpos foram designados ao mesmo domínio de ligação. Deve ser entendido, entretanto, que dois anticorpos podem ter epítomos distintos também estar pertos o bastante um do outro para serem designados como membros do mesmo domínio de ligação.

Os domínios de ligação que se estendem sobre todos os quatro exons de CTGF humano foram identificados. Todos dos domínios de ligação são conformacionalmente definidos, tal que os anticorpos se ligam ao CTGF sob condições de não redução em ensaios de western blot. Alguns dos anticorpos também ligados ao CTGF sob condições de redução nos ensaios de western blot, sugerindo que cada um destes anticorpos ligados a um epítopo linear na proteína de CTGF. Também, os anticorpos que representam um subconjunto dos domínios de ligação mostram reatividade cruzada para o CTGF de camundongo na análise de western blot. O anticorpo de cada grupo tendo a afinidade mais alta para o CTGF total foi usado para outra caracterização e análise.

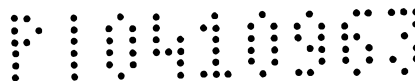
O mapeamento de epítopo mais refinado foi realizado por análise de ELISA usando fragmentos recombinantemente expressados

O grupo de epítopo definido por mAb1 se liga a um epítopo linear no fragmento de terminal N de CTGF codificado pelo exon 3. Uma série de peptídeos sintéticos truncados que revestem as regiões codificadas pelo polinucleotídeo de exon 3 foi gerada, e os testes de ELISA usando estes peptídeos foram conduzidos para definir ainda o epítopo de mAb1. Os resultados são resumidos na Tabela 1; um “+” indica a ligação entre o peptídeo e mAb1, ao passo que um “-” indica que o mAb1 não se liga ao peptídeo. Um “**C**” itálico em negrito indica um resíduo de cisteína no peptídeo que foi essencial para a ligação de mAb1. Um “C” sublinhado indica um resíduo de cisteína adicionado à extremidade e não uma parte da sequência de CTGF natural.

Tabela 1. Ligação de mAb1 à série de peptídeo truncada codificadas pelo exon 3.

Peptídeo	Sequência	Ligação de mAb1	SEQ ID NO:
N-CTGF		+	
Exon 3		+	
Pep135	<u>C</u> PLCSMDVRLPSPDCPFPRRVKLP	+	22
PC5444	PLSSMDVRLPSPDS	-	
PC5445	RLPSPDSPFPRRVKLP GK	+	23
PEP5	RLPSPDCPFPRRVKL	+	24
P40340	RLSPDCPFPRRV	+	25
P40341	RLSPDSPFPRRV	-	
P40342	LSPSPDCPFPRRVKL	+	26

Tabela 1. Ligação de mAb1 à série de peptídeo truncada codificadas pelo



exon 3.

Peptídeo	Seqüência	Ligação de mAb1	SEQ ID NO:
10MER	SPDSPFPRRV	-	
10MER2	SPDCFPFRRV	-	
9MER	PDSPFPFRRV	-	
9MER2	C'F'RRVKL	-	
8MER	DSPFPFRRV	-	
8MER2	CFPFRVKL	-	
7MER	CPFRVKL	-	
6MER	CRVKL	-	
5MER	CRVKL	-	

Portanto, mAb1 é um membro de uma classe de anticorpo que se liga à região de terminal N de CTGF. O epítipo linear em CTGF necessário e suficiente para a ligação de mAb1 é definido pelo resíduo de aminoácido L143 a V154 de CTGF humano (SEQ ID NO: 2). Outra confirmação de especificidade de ligação de mAb1 para este peptídeo foi obtida por RIA e cromatografia por afinidade. Os anticorpos que compartilham este epítipo, em parte ou em totalidade, estão especificamente incluídos na presente invenção. Adicionalmente, os anticorpos que competem com mAb1 pela ligação ao CTGF ou um fragmento deste também estão especificamente incluídos na presente invenção.

4.2 Afinidade do anticorpo por CTGF

A afinidade do anticorpo é definida como a força das interações não covalentes totais entre um único sítio de ligação de antígeno em um anticorpo e um único epítipo em um antígeno. A afinidade é calculada medindo-se a constante de associação (K_a), tal que:

$$Afinidade = K_a = \frac{[Ab \cdot Ag]}{[Ab][Ag]} = \frac{1}{K_d}$$

onde [Ab] é a concentração de sítio de ligação de antígeno livre no anticorpo, [Ag] é a concentração de antígeno livre, [Ab·Ag] é a concentração de sítio de ligação de antígeno no anticorpo ocupado pelo antígeno, e K_d é a constante de dissociação do complexo anticorpo-antígeno.

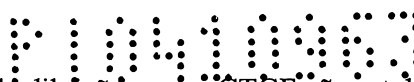
A afinidade de cada população de anticorpo identificada pelo mapeamento de epítipo foi medida usando RIA, em que o rhCTGF total foi

radio-iodado e adicionado aos reservatórios contendo o anticorpo monoclonal imobilizado, como segue. O CTGF humano recombinante foi radiorrotulado com ^{125}I usando o método de cloramina-T. (Ver, Greenwood *et al.* (1963) Biochem J 89: 114 a 123). Tipicamente, pelo menos 60% do ^{125}I foram incorporados e a atividade específica do CTGF rotulado foi pelo menos 1×10^5 cpm/ng, embora o CTGF rotulado de atividade específica mais baixa pudesse ser usado no radioimunoensaio. O anticorpo de captura específico de γFc , de IgG anti-humana de cabra (Jackson ImmunoResearch) em DBPS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} (Mediatech, Herndon VA) foi adicionado aos reservatórios de uma placa microtituladora MAXISORP BREAKAPART (Nalge Nunc International, Rochester NY) e deixado ligar-se durante a noite a 4°C . Os reservatórios depois foram bloqueados com 1% de BSA em DPBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} durante pelo menos 4 horas a 4°C . A solução de bloqueio foi removida e 100 μl de anticorpo de teste a 2 a 50 ng/ml em DPBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} foi adicionado e deixado ligar-se durante a noite a 4°C . As misturas de diluições seriais de CTGF não rotulado em uma quantidade constante de $[\text{}^{125}\text{I}]\text{rhCTGF}$ foram adicionadas aos reservatórios e incubadas na temperatura ambiente durante 4 a 8 horas. Os reservatórios depois foram lavados quatro vezes com 0,1% de Tween 20 em PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} (Mediatech), e os reservatórios da placa microtituladora foram separados e contados em um contador gama.

A afinidade foi estimada graficamente pelo método de Scatchard (1948, Ann NY Acad Sci 51: 660 a 672). A concentração total de CTGF rotulado aplicado à placa foi calculada como

$$[\text{CTGF}]_{\text{total}} = \frac{\text{cpm_aplicado}}{\text{cpm_fmol}} \cdot \frac{1}{0,1_ml} + \frac{[\text{CTGF}]_{\text{frio_estoque}}}{\text{diluição}}$$

onde cpm_aplicado são contagens obtidas de frascos de controle, que são carregados com misturas de CTGF em paralelo com os reservatórios da placa microtituladora; cpm/fmol é a atividade específica do $[\text{}^{125}\text{I}]\text{CTGF}$, $[\text{CTGF}]_{\text{frio_estoque}}$ é a concentração de CTGF não rotulado adicionado a



cada reservatório, e a diluição é o fator de diluição para o CTGF não rotulado.

A concentração de CTGF ligado ao anticorpo é calculada a partir da proporção de contagens ligadas aos reservatórios e a concentração total de CTGF aplicado aos reservatórios.

$$[CTGF]_{ligado} = \frac{(cpm_{ligado} - cpm_{branco})}{cpm_{total}} \cdot [CTGF]_{total}$$

5 A concentração de CTGF livre (não ligado) é a diferença entre a concentração total de CTGF aplicado e a concentração de CTGF ligado.

$$[CTGF]_{livre} = [CTGF]_{total} - [CTGF]_{ligado}$$

Os esquemas de Scatchard de determinações de afinidade para os anticorpos da invenção são mostrados na Figura 2. A Figura 2A representa graficamente a ligação de um anticorpo da invenção, mAb2, ao [¹²⁵I]rhCTGF na presença de concentrações em aumento de rhCTGF não rotulado. A Figura 2B representa graficamente a ligação de um anticorpo exemplar da invenção, mAb1, ao [¹²⁵I]rhCTGF na presença de concentrações em aumento de rhCTGF não rotulado. O peso maior são os pontos dados com proporções similares de CTGF ligado e não ligado, porque estes pontos terão contagens ligadas em excesso substancial dos espaços vazios (conseqüentemente, contagens ligadas bem determinadas), mas ainda substancialmente menos do que as contagens totais aplicadas (conseqüentemente, contagens livres bem determinadas). A ligação máxima (B_{max}) e K_d são representados como a intercepção x e a intercepção y, respectivamente.

20 A afinidade (K_d) de mAb1 para CTGF é menos do que 10⁻⁹ M, a afinidade tipicamente encontrada na terapêutica do anticorpo comercialmente bem sucedida. (Ver, por exemplo, Maini *et al.* (1998) Artrite Rheum 41: 1552 a 1563; Targan *et al.* (1997) N Engl J Med 337: 1029 a 1035; Bumgardner *et al.* (2001) Transplantation 72: 839 a 845; e Kovarik *et al.* (1999) Transplantation 68: 1288 a 1294). Assim, mAb1 é um candidato
25 adequado para o uso terapêutico, e os anticorpos que compartilham a ligação do epítipo com mAb1, como descrito acima, e têm um afinidade por CTGF



que é similar a ou maior do que mAb1 (isto é, um $K_d < 10^{-9}$) são do mesmo modo candidatos adequados para o uso terapêutico. Os anticorpos que compartilham a ligação do epítipo com mAb1, mas que têm afinidade mais baixa (isto é, K_d mais alto) do que mAb1, também são incorporados dentro da presente invenção e são potencialmente úteis em vários ensaios e aplicações de diagnóstico como aqui descrito. Tais anticorpos adicionalmente podem ser úteis em aplicações terapêuticas, especialmente se eles têm um aversez alta para antígeno, como descrito abaixo.

4.3 Aversez do Anticorpo

Para os anticorpos com mais do que um sítio de ligação de antígeno (multivalência), a afinidade em um sítio de ligação nem sempre reflete a força verdadeira da interação anticorpo-antígeno. Quando um anticorpo multivalente se liga a um antígeno tendo epítopos de repetição múltiplos, a interação de uma interação de antígeno em um sítio de ligação no anticorpo aumenta a chance da interação de antígeno com os sítios de ligação adicionais. A aversez mede a força de combinação funcional de um anticorpo com seu antígeno, que está relacionado tanto à afinidade da reação entre os epítopos quanto os parátomos, e as valências do anticorpo e antígeno. Assim, a aversez fornece uma medida mais exata de uma tendência do anticorpo de dissociar.

A aversez alta pode compensar pela afinidade baixa. Por exemplo, os sítios de ligação de antígenos de IgM no geral são de afinidade mais baixa do que IgG, mas a multivalência de IgM os fornece uma aversez alta, permitindo assim, que ele se ligue ao antígeno eficazmente.

Para determinar a aversez dos anticorpos da invenção, os fragmentos Fab foram primeiro preparados por digestão de papaína convencional da imunoglobulina correspondente. A Proteína A Imobilizada depois foi usada para separar os fragmentos Fab de Fc e anticorpo não digerido.

Aproximadamente 1 ml de pasta de papaína imobilizada contendo 0,5 ml de gel estabelecido, 250 µg de papaína, e 3,5 unidades de BAEE foram lavados 3 x 1 ml e 1 x 10 ml com Tampão de Digestão (DB; 20 mM de fosfato de sódio, 10 mM de EDTA, 20 mM de cisteína, pH 7,0). A pasta depois foi recolocada em suspensão com 0,3 ml de DB, misturada com 1,1 ml de anticorpo (aproximadamente 5 mg, pH 7), e agitada durante a noite a 37°C. A digestão de anticorpo depois foi separado da resina, e os fragmentos Fab foram separados dos fragmentos Fc e do anticorpo não digerido por cromatografia por afinidade usando a Proteína A. A pureza do fragmento Fab foi monitorada por SDS-PAGE (Figura 3A).

A ligação monovalente foi distinguida da ligação bivalente eluindo-se os anticorpos ligados a antígeno com concentrações variantes de tiocianato. Aumentando-se a concentração do íon catotrópico (tiocianato) na solução, as associações de afinidade mais baixa (por exemplo, ligação monovalente de Fab ao antígeno) são rompidas primeiro, enquanto que as associações de afinidade mais alta (por exemplo, ligação bivalente de IgG ao ligando) permanecem inalterada. Assim, aumentando-se a concentração de tiocianato, duas ligações diferentes podem ser distinguidas.

As placas foram revestidas com 10 µg/ml de CTGF ou peptídeos de CTGF em 50 mM de tampão de bicarbonato (pH 8,5) a 4°C durante a noite, bloqueadas com o bloqueador caseína/TBS a 4°C durante a noite, e depois incubadas com 100 µg/ml de anticorpo ou Fab correspondente no bloqueador caseína/TBS na temperatura ambiente durante a noite com agitação. As placas depois foram incubadas com diluições (1:1) de tiocianato (0 a 7,6 M) em 100 mM de tampão de fosfato (pH 6,0) durante 15 minutos na temperatura ambiente com agitação, seguido por um conjugado de (Fab')₂ anti-humano de camundongo de fosfatase alcalina (diluição 1:1000) na temperatura ambiente durante 45 minutos. O substrato de fosfatase alcalina (1 mg/ml; Sigma) em 1 M de dietanolamina, 0,5 mM de MgCl₂ (pH 9,8) foram

adicionados, as placas foram incubadas na temperatura ambiente, e a absorbância a 405 nm foi determinada depois de 2, 10, 20, e 60 minutos.

O índice de afinidade é a concentração de agente catotrópico (tiocianato) que produz uma redução de 50% na absorbância inicial. Para um anticorpo exemplar da invenção, mAb1, o índice de afinidade para a dissociação de Fab a partir de CTGF foi de 0,46 M, ao passo que o índice de afinidade para a dissociação de IgG intata de CTGF foi de 1,8 M (Figura 3B). Assim, o mAb1 se liga ao antígeno predominantemente bivalente (avidez), e dissocia do antígeno muito mais lentamente do que um anticorpo que se liga monovalentemente. Os anticorpos adicionais da invenção, que compartilham os parâmetros de ligação de epítipo com mAb1, podem ser similarmente bivalentes ou eles podem ser mono- ou multivalentes. Qualquer um dos anticorpos da invenção pode ser manipulado para melhorar a avidez, por exemplo, combinando-se os sítios de ligação de epítipo em uma única construção de anticorpo, por exemplo, um tricorpo, etc. (Ver, por exemplo, Schoonjans *et al.* (2000) J Immunol 165: 7050 a 7057).

4.4 Reatividade Cruzada

O radioimunoensaio descrito acima (Exemplo 4.2) foi usado para determinar a reatividade cruzada dos anticorpos, exceto que o rhCTGF não rotulado foi substituído com um outro competidor não rotulado, CTGF de rato derivado de células renais de rato normais (NRK). As células NRK foram cultivadas até confluentes e depois os meios de cultura foram alterados para os meios isentos de soro contendo 2 ng/ml de TGF- β 2, 50 μ g/ml de heparina, e 250 μ g/ml de BSA. O meio condicionado foi coletado depois de dois dias de cultura, centrifugado para remover os fragmentos, e incubado com pérolas de heprina-sefarose (suspensão de pérola:meio 1/100 v/v) durante 2 horas a 4°C com agitação. A mistura depois foi centrifugada; as pérolas foram coletadas e lavadas com PBS, e depois lisadas em tampão de SDS.

Uma representação gráfica de Scatchard da ligação de mAb2

ao [^{125} I]CTGF na presença de concentrações em aumento de CTGF de rato não rotulado é mostrada na Figura 4A; e uma representação gráfica de Scatchard da ligação de mAb1 ao [^{125} I]rhCTGF na presença de concentrações em aumento de CTGF de rato não rotulado é mostrada na Figura 4B. Como
5 pode ser visto na figura, o mAb1 se liga tanto ao CTGF humano quanto de rato, enquanto que o mAb2 se liga ao CTGF humano mas não se liga ao de rato.

Para mAb1, os esquemas de Scatchard para a competição com CTGF de rato (Figura 4B) têm poças mais rasas, afinidade evidente mais
10 baixa, e $B_{\max}$ evidente mais alto do que a representação gráfica para a competição com rhCTGF (Figura 2B). Assim, embora o CTGF de rato seja capaz de competir com o CTGF humano quanto a ligação ao mAb1, o anticorpo tem afinidade mais alta pelo CTGF humano recombinante do que pelo CTGF de rato recombinante. O mAb1 também reage cruzado com o
15 CTGF de camundongo e macaco (dados não mostrados). Os anticorpos que apresentam afinidade adequada pelo CTGF de outra espécie podem ser usados no tratamento e prevenção de distúrbios desta espécie. Por exemplo, um anticorpo da invenção que mostra uma K_d adequada para o CTGF canino poderia ser usado para tratar um distúrbio associado com CTGF em
20 cachorros. Os anticorpos da invenção que mostram afinidade de espécie cruzada, tal como mAb1, também são úteis como ferramentas de pesquisa, para estudar os distúrbios associados com CTGF em vários modelos animais.

4.5 Glicosilação

O radioimunoensaio descrito acima (Exemplo 4.2) foi usado
25 para determinar o efeito da glicosilação de anticorpo na afinidade de ligação de antígeno. O anticorpo mAb1 foi tratado durante 8 dias a 37°C em PBS, 0,5 M de EDTA, pH 8,0, com peptídeo N-glicosidase F (PNGase F), que cliva os oligossacarídeos de glicoproteínas ligadas a N. Depois da incubação, a solução de reação foi usada diretamente ou fracionada em uma proteína a

coluna de A-SEFAROSE FASTFLOW (Amersham Bioscience, Piscataway NJ) e eluída com 0,1 M de glicina-HCl, pH 2,5. A recuperação do anticorpo depois do fracionamento foi de aproximadamente 87%, e o nível de endotoxina foi de 0,30 EU/mg. A desglicosilação foi confirmada por SDS-PAGE. A atividade de ligação do anticorpo desglicosilado ao CTGF recombinante humano foi idêntico dentro do erro experimental para a atividade de ligação da forma glicosilada do anticorpo.

Como várias células produzem padrões de glicosilação diferentes, a produção de proteínas recombinantes, por exemplo, anticorpos, em células cultivadas ou espécie não homóloga podem gerar a glicosilação não natural. Algumas proteínas requerem a glicosilação específica para a atividade, e a glicosilação alterada reduz a atividade; por exemplo, no caso dos anticorpos, a afinidade pelo antígeno é reduzida. A produção de proteína em certos sistemas, por exemplo, plantas e ovos de galinha, também pode produzir padrões de glicosilação que são imunogênicos, reduzindo assim a capacidade de usar as proteínas em certas aplicações. A capacidade dos presentes anticorpos de apresentar a mesma atividade em uma forma glicosilada e não glicosilada demonstra que a invenção não é limitada pela presença de glicosilação, particularmente uma glicosilação específica de espécie.

Exemplo 5. Ensaio de migração celular

A migração celular é um evento celular normal e importante, por exemplo, durante o desenvolvimento e cura do ferimento. A migração celular também é um fator na patologia de distúrbios tais como formação de lesões fibróticas, e as células isoladas de lesões fibróticas são mais responsivas aos estímulos quimiotáticos do que as células do tecido normal correspondente.

Os anticorpos da presente invenção foram analisados quanto a sua capacidade de inibir a migração quimiotática estimulada por CTGF de

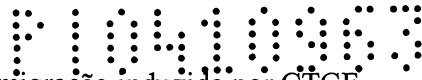
células do músculo liso usando um ensaio de câmara de Boyden como segue. As células do músculo liso arteriais de rato (ASMCs) em meios contendo 0,1% de soro de bezerro fetal (FCS) foram adicionadas ao compartimento superior de uma câmara de Boyden, e os meios contendo 300 ng/ml de rhCTGF, 10% de FCS, ou 0,1% de FCS sozinho foram adicionados ao compartimento inferior. Um filtro revestido com colágeno tendo poros com um diâmetro de 8 μ m separou a câmara superior da câmara inferior. As células foram deixadas aderir a e migrar através do filtro durante 2 a 3 horas. O filtro depois foi removido, as células no filtro foram fixadas e tingidas, e as células que migraram através do filtro foram contadas. A incubação com 300 ng/ml de rhCTGF aumentou o número de células que migra através do filtro aproximadamente 5 vezes relativo a 0,1% de controles de FCS. O aumento na migração estimulada por CTGF foi aproximadamente 27% do efeito quimiotático visto com 10% de FCS, que contém fatores quimiotáticos múltiplos.

Os anticorpos da invenção foram testados quanto a sua capacidade de inibir a migração celular mediada por CTGF usando o ensaio descrito acima, exceto o anticorpo anti-CTGF (a 30 e 300 mg/ml) ou a IgG humana misturada também foi adicionada à câmara inferior. Quatro campos de células de cada um dos 3 filtros separados foram contados para cada amostra em cada ensaio. Os resultados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Inibição da migração celular mediada por CTGF.

Anticorpo	Migração celular (%)	
	Média	SD
hIgG	100	10
7 (30 μ g/ml)	77	13
19 (30 μ g/ml)	71	14
19 (300 μ g/ml)	43	12

Como pode ser visto na Tabela 2, os anticorpos que se ligam ao CTGF dentro do epítipo definido por mAb1 inibem a migração celular mediada por CTGF em uma maneira dependente de dose. Os anticorpos destes grupo de epítipo foram os únicos anticorpos anti-CTGF testados que



inibiram repetida e reproduzivelmente a migração induzida por CTGF.

Vários processos, tais como angiogênese, condrogênese, e oncogênese requerem alterações na adesão e migração celular. O CTGF foi associado tanto com a adesão quanto a migração celular, e a capacidade dos anticorpos direcionados contra CTGF de afetar diferencialmente uma atividade *versus* um outro fornece um repertório diverso de agentes terapêuticos para o tratamento de condições associadas com CTGF. Os anticorpos fornecidos pela presente invenção demonstram claramente a atividade diferencial relativa à neutralização das atividades de CTGF. Como exemplificado abaixo, estas capacidades fornecem potencial terapêutico único nesta classe de anticorpo anti-CTGF.

Exemplo 6. Distúrbios pulmonares

A instilação intratraqueal (IT) de bleomicina em camundongos é um sistema modelo amplamente usado para estudar a fibrose pulmonar e para triar os agentes antifibróticos potencialmente desejáveis. Os anticorpos da invenção foram testados quanto a sua capacidade de reduzir a fibrose pulmonar induzida por bleomicina *in vivo* usando o procedimento descrito por Wang *et al.* (2000) Biochem Pharmacol 60: 1949 a 1958, como segue.

Os camundongos C57BL/6 machos foram aleatoriamente divididos em dois grupos. Os camundongos foram anestesiados com isoflurano, e depois injetados intratraquealmente com um dose única de bleomicina em 0,9% de solução salina a 0,1 de unidade/50 µl/camundongo ou 0,9% de solução salina sozinha. Cada grupo foi dividido e tratado imediatamente e conseqüentemente uma vez todos os outros dias durante um total de sete doses com solução salina ou anticorpo administrados intraperitonealmente (IP). Quatorze dias depois da instilação IT, os camundongos foram submetidos a eutanásia por exsanguinação da aorta abdominal descendente sob anestesia e o tecido pulmonar foi colhido.

O teor de colágeno pulmonar foi analisado medindo-se o nível

de hidroxiprolina e prolina usando o método de Palmerini *et al.* (1985; J Chromatogr 339: 285 a 292), exceto que o ácido 2-carboxílico de L-azetidina (Aldrich) foi substituído por 3,4-desidroprolina como o padrão interno. Brevemente, as amostras de tecido foram hidrolisadas em HCl 6 N durante 22 horas a 105°C. As amostras passaram por derivatização de pré coluna com o-ftalaldeído e depois 4-cloro-7-nitrobenzofurano (Aldrich) para formar adutos fluorescentes de prolina e hidroxiprolina. Os adutos fluorescentes foram separados por HPLC de fase reversa seguido por detecção fluorométrica.

A Figura 5 mostra o resultado da administração terapêutica da solução salina (SA), um anticorpo exemplar da invenção, mAb1, e uma mistura de anticorpos específicos de CTGF (AbsJ) foram comparados quanto a sua capacidade de suprimir a fibrose pulmonar seguindo o tratamento com bleomicina. Como pode ser visto na Figura 5A, o tratamento com bleomicina (BL+SA) significativamente aumentou o teor de hidroxiprolina pulmonar em 168% sobre o grupo de controle (SA + SA; 220 + 15 µg/pulmão). Entretanto, o tratamento subsequente com anticorpos misturados da invenção (BL+AbsJ) apresentou uma diminuição de 60% na hidroxiprolina pulmonar comparado ao tratamento com bleomicina sozinha. Similarmente, o tratamento subsequente com mAb1 (BL+ mAb1) apresentou uma diminuição de 70% na hidroxiprolina pulmonar comparado à bleomicina sozinha.

A examinação histológica dos pulmões de camundongo revelou o tecido parenquimal pulmonar normal no grupo de controle (não mostrado). Nos pulmões tratados com bleomicina, entretanto, um aumento nas regiões de fibrose foi claramente visto (Figura 5B; setas). A administração terapêutica de um anticorpo da invenção subsequente ao tratamento com bleomicina apresentou uma redução clara em fibrose (Figura 5C), embora alguns lóbulos ainda apresentaram um grau suave de fibrose intersticial. Assim, os anticorpos da invenção fornecem benefício terapêutico quando administrados aos pacientes em risco para ou que sofrem de um distúrbio

pulmonar tal como fibrose pulmonar idiopática (IPF).

Exemplo 7. Distúrbios renais

7.1. Insuficiência renal

5 A fibrose tubulointersticial é um componente principal de
várias doenças renais associadas com a progressão à insuficiência renal de
estágio final. (Sharma *et al.* (1993) *Kidney Int* 44: 774 a 788). A obstrução
ureteral unilateral (UUO), caracterizada por função renal diminuída e fibrose
intersticial aumentada, foi usada como um modelo experimental para induzir
o dano e fibrose tubulointersticial. (Fern *et al.* (1999) *J Clin Invest* 103: 39 a
10 46).

Os camundongos foram anestesiados com isoflurano, e
depois a ligação do ureter esquerdo foi realizada de acordo com o método
descrito por Moriyama *et al.* (1998; *Kidney Int* 54: 110 a 119). Os
camundongos foram tratados imediatamente seguindo a cirurgia e
15 conseqüentemente uma vez todos os outros dias durante um total de sete
doses com solução salina ou anticorpo administrado intraperitoneamente (IP).
Quatorze dias depois de UUO, os animais foram anestesiados e sacrificados
por exsanguinação da aorta abdominal descendente. Tanto os rins direito e
esquerdo foram separadamente descapsulados e pesados. Metade de cada rim
20 foi fixada em 10% de formalina para a histologia (corante de tricromo) e a
outra metade foi pesada e armazenada a -70°C para a determinação de
hidroxiprolina. A hidroxiprolina e a prolina foram determinadas como
descrito acima.

Como pode ser visto na Figura 6A, a UUO aumentou o teor de
25 colágeno renal aproximadamente em 4 vezes, como medido pela razão de
hidroxiprolina para prolina do rim esquerdo obstruído relativo ao rim direito
não obstruído em cada camundongo. O tratamento com um anticorpo da
invenção, mAb1, resultou em uma redução dependente de dose
estatisticamente significativa na fibrose do rim obstruído (Figura 6A).

Alternativamente, a fibrose renal pode ser estudada no modelo de rim remanescente de rato de insuficiência renal progressiva. O modelo, que envolve 2/3 de nefrectomia unilateral combinado com ablação renal completa contralateralmente (5/6 de nefrectomia total), induz as mudanças parenquimais degenerativas associadas com insuficiência renal crônica no rim remanescente renal, e os animais tornam-se urêmicos e exibem albuminúria, glomeruloesclerose, fibrose intersticial e atrofia tubular marcantes. (Ver, por exemplo, Frazier *et al.* (2000) Vet Pathol 37: 328 a 335; e Gandhi *et al.* (1998) Kidney Int 54: 1157 a 1165).

Os 5/6 de nefrectomia foram realizados de acordo com Frazier *et al.* (2000, Vet Pathol 37: 328 a 335). Os ratos Sprague-Dawley machos de cinco semanas de idade (Harlan, Indianapolis IN) pesando 120 g foram anestesiados com cetamina e xilazina, e o 1/3 cranial e 1/3 caudal do rim esquerdo foi incisada. Uma esponja de névoa foi brevemente aplicada para fornecer a hemostase, o abdome foi enxaguado com solução salina, 0,2 ml de butorfenol, e o animal foi suturado. Uma semana depois da cirurgia inicial, o rim contralateral foi removido completamente.

Os ratos foram divididos em solução salina e os grupos tratados com anticorpo com tratamento iniciado em 2 semanas seguindo 5/6 de nefrectomia. A solução salina ou anticorpo em uma dosagem de 5 mg/kg foi administrada por injeção IP (0,5 ml cada) a cada 3 dias durante 15 dias (um total de 5 injeções). As amostras de sangue e urina foram tomadas semanalmente dos ratos nefrectomizados aleatórios para seguir o

desenvolvimento de doença renal e para correlacionar o distúrbio funcional renal com mudanças histológicas. Os resultados dos ensaios da análise de fibrose renal, análise da urina e da química do soro foram comparados entre os grupos em 18 e 28 dias depois do início do tratamento.

5 A fibrose renal foi avaliada independentemente por dois patologistas em uma forma blindada; três seções histológicas de cada rim foram examinadas usando três corantes morfológicos distintos: hematoxilina/eosina, tricromo de Masson e vermelho sírio de ácido pícrico. Além disso, a imunoistoquímica foi realizada em seções congeladas para
10 avaliar o tipo de deposição de colágeno em cada local no rim. A avaliação de colágeno quantitativa (razão de hidroxiprolina/prolina) foi realizada e a função renal foi avaliada usando tanto a análise da urina quanto a química do soro das amostras coletadas no tempo da eutanásia.

Histologicamente, as diferenças moderadas em fibrose foram
15 notadas entre os rins remanescentes não tratados com anticorpo e tratados com anticorpo (Figura 7). Nos 3 dias de pós tratamento, a avaliação subjetiva blindada resultou em uma contagem de fibrose média de 12,6 no grupo tratado com solução salina *versus* 10,7 no grupo tratado com anticorpo ($p < 0,05$). As diferenças estatisticamente significantes no grau de fibrose
20 histológica entre os ratos tratados com anticorpo e solução salina foram mantidas em 14 dias de pós tratamento, com uma contagem de fibrose média de 16,9 nos grupos tratados com solução salina *versus* 14,4 no grupo tratado com anticorpo ($p < 0,05$). A análise do teor de hidroxiprolina quantitativa de colágeno também demonstrou uma tendência para a fibrose diminuída no
25 grupo tratado com anticorpo relativo ao grupo tratado com solução salina, mas a diferença não foi estatisticamente significativa.

As diferenças qualitativas também foram notadas entre grupos de tratamento. Enquanto a maioria da deposição colágeno nos grupos tratados com anticorpo foi limitada ao interstício corticomedular e medular, a fibrose

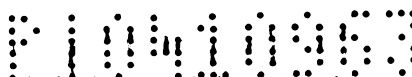
nos ratos tratados com solução salina foi multifocal para distribuir difusamente por todo o córtex e medula. As diferenças histopatológicas mais marcantes foram na quantidade de fibrose glomerular. Muitos dos grupos tratados com solução salina tiveram glomeruloesclerose moderada a severa com fibrose pericapsular, membrana de Bowman espessa, sinéquia, e obsolescência glomerular. Estas mudanças foram mínimas a suaves nos outros grupos, incluindo os rins de rato tratado com anticorpo. O acúmulo de colágeno foi visualizado com os corantes de tricromo de Masson e vermelho sírio de ácido pícrico.

Em ambos os modelos de insuficiência renal progressiva, o anticorpo da invenção reduziu a degradação tecidual e melhorou a função renal. Assim, os anticorpos da invenção fornecem benefício terapêutico quando administrados aos pacientes em risco para ou que sofrem de um distúrbio renal tal como glomerulonefrite, nefropatia de IgA, glomeruloesclerose; e insuficiência renal e destruição tubular devido a toxinas, etc.

7.2. Nefropatia Diabética

A diabetes leva à insuficiência de órgãos múltiplos incluindo, mas não limitados a, rim, coração, e olho. Um componente principal da progressão patológica da insuficiência do órgão diabético é a fibrose. Um modelo estabelecido de nefropatia diabética é um camundongo que carrega uma mutação de perda de função no receptor de leptina (Ob-R; codificado pelo gene db). Os aspectos chave em comum entre a nefropatia diabética de camundongo db/db e humana incluem hipertrofia renal, dilatação glomerular, albuminúria, e expansão da matriz mesangial.

Os anticorpos da invenção foram testados usando o modelo de camundongo db/db de nefropatia diabética como segue. Os camundongos db/db de oito semanas de idade (Harlan, Indianapolis IN) e seus parceiros de ninhada db/+ heterozigóticos foram tratados por injeção intraperitoneal com



cada anticorpo da invenção (CLN1; ver abaixo) ou IgG humana de controle (cIgG). Em todos os animais, uma injeção inicial de 300 µg de anticorpo foi seguida por doses de 100 µg administradas 3 vezes por semana durante 60 dias. As amostras de sangue foram coletadas e os pesos corporais foram medidos no começo de e periodicamente por todo o período de tratamento. O consumo de alimento também foi registrado.

Por 11 semanas, a distinção clara existiu entre os animais diabéticos (db/db) e os animais não diabético (db/+) com respeito ao peso corporal, níveis de glicose no sangue, e consumo de alimento. O tratamento com cada anticorpo da invenção ou anticorpo de controle não afetou significativamente nenhum destes parâmetros. Entretanto, várias medições da função renal demonstraram uma diferença clara entre os camundongos diabéticos e não diabético. Como pode ser visto na Tabela 3, os camundongos diabéticos apresentaram um peso do rim aumentado, liberação de creatinina, e taxa de excreção de albumina (AER) relativa aos camundongos não diabéticos. Entretanto, os animais diabéticos tratado com o anticorpo da invenção apresentaram valores normalizados para todos os parâmetros. Todos os dados são expressados como Média ± SEM. O número de camundongos por grupo (n) variou de 9 a 15.

Tabela 3. Função renal em camundongos db/db e db/+.

Grupo de animal	Tratamento	Peso do rim (mg)	Creatinina (ml/h)	AER (µg/24 h)
db/+	cIgG	133,8 ± 5,1	2,17 ± 0,29	0,30 ± 0,02
db/+	mAb1	141,0 ± 4,3	2,37 ± 0,19	0,23 ± 0,04
db/db	cIgG	207,8 ± 3,9**	5,39 ± 0,36**	2,52 ± 0,20**
db/db	mAb1	177,4 ± 4,5*	2,76 ± 0,31 ^Δ	0,98 ± 0,09 [□]

**P < 0,01 vs. camundongos db/+. *P < 0,01 vs. camundongos db/+ e P < 0,05 de camundongos db/db tratados com cIgG.

^ΔP < 0,01 vs. camundongos db/db tratados com cIgG. [□]P < 0,01 vs. camundongos db/+ e camundongos db/db tratados com cIgG.

Como o CTGF é induzido por glicose alta e medeia várias atividades incluindo a produção de ECM nos tecidos como um resultado de

dano, por exemplo, devido a formação e acúmulo de produto final de glicação avançada (AGE), etc., as patologias associadas com diabetes, tais como nefropatia diabética, podem ser prevenidas usando os anticorpos da invenção.

Exemplo 8. Distúrbios oculares

- 5 A expressão aumentada de CTGF foi associada com vários distúrbios oculares incluindo vitreorretinopatia proliferativa (PVR), degeneração macular, e retinopatia diabética. (Ver, por exemplo, Hinton *et al.* (2002) *Eye* 16: 422 a 428; He *et al.* (2003) *Arch Ophthalmol* 121: 1283 a 1288; e Tikellis *et al.* (2004) *Endocrinology* 145: 860 a 866). O papel de
- 10 CTGF e o uso da terapêutica de anti-CTGF foi proposto. (Ver a Publicação Internacional N^o WO 03/049773). Os anticorpos da presente invenção representam uma classe terapeuticamente eficaz, única de produto terapêutico anti-CTGF para o uso em tais distúrbios oculares. A capacidade dos anticorpos da presente invenção de melhorar as complicações nos distúrbios
- 15 oculares é testada em modelos de doença ocular como segue.

8.1. Retinopatia Diabética

- Os modelos animais de diabetes, por exemplo, os camundongos db/db, são descritos no Exemplo 7.2, acima. Qualquer um destes modelos pode ser usado para demonstrar a eficácia do tratamento da retinopatia
- 20 diabética usando os anticorpos da invenção. Um modelo particular para retinopatia diabética é fornecido abaixo, em que os animais são injetados com estreptozotocina (STZ), uma toxina conhecida das células da ilhota pancreática que secretam insulina.

- A diabetes é induzida em ratos (por exemplo, Long-Evans,
- 25 Sprague-Dawley, etc). por injeção, por exemplo, intraperitoneamente, de estreptozotocina (STZ), por exemplo, em cerca de 60 a 85 mg/kg de peso corporal. Para melhorar a sobrevivência, os ratos podem ser concedidos com água com açúcar a 10% durante 24 horas e/ou 2 a 4 unidades de insulina por dia seguindo a injeção de STZ. Vários fatores incluindo, por exemplo, peso

corporal, taxa de excreção de albumina urinária, glicose sanguínea, hemoglobina glicada, pressão sanguínea, etc., são medidos depois de, por exemplo, 4, 8, e 12 semanas. Os animais de controle injetados com o tampão sozinho estão seguindo concorrentemente. Uma metade dos ratos tratados com STZ e de controle é adicionalmente tratada com o anticorpo da invenção injetado, por exemplo, intravenosamente, intraperitoneamente, ou intraocularmente. Por todo o estudo aos animais são dados acesso ao alimento e água *ad libitum*. Os animais são sacrificados em 12 semanas, e os olhos são colhidos e examinados quanto às mudanças histológicas.

Uma redução nas mudanças patológicas nos animais tratados com anticorpo relativa aos controles não tratados é indicativa da eficácia terapêutica na retinopatia diabética. Como o CTGF é induzido por glicose alta e media várias atividades incluindo produção de ECM nos tecidos como um resultado de dano, por exemplo, devido à formação e acúmulo de produto final de glicação (AGE) avançada, etc., as patologias associadas com a diabete, tais como retinopatia diabética, podem ser prevenidas usando a terapêutica anti-CTGF. (Ver, por exemplo, Publicação Internacional Nº WO 03/049773). Os anticorpos da presente invenção representam uma classe terapeuticamente eficaz, única de produto terapêutico anti-CTGF para o uso em distúrbios oculares, por exemplo, retinopatia diabética.

8.2. *PVR*

As células epiteliais pigmentadas retínicas de coelho (RPE) são isoladas dos olhos de coelho adulto e cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal. As culturas subconfluentes (tipicamente na passagem 2 a 3) são usadas para todas as injeções subseqüentes. No tempo da injeção, as células de RPE cultivadas são coletadas e colocadas em suspensão em PBS a aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células/ml. Aproximadamente 0,2 mls de humor aquoso é removido de cada olho de coelho receptor usando uma agulha de calibre 25, e depois as células RPE são injetadas através da



esclerótica a um ponto três milímetros posterior ao limbo exatamente sobre e acima do disco óptico usando uma agulha de calibre 27. Seguindo a injeção das células RPE, 0,1 ml de PDGF BB (50 a 150 ng), CTGF (200 a 400 ng), ou PDGF e CTGF em PBS é injetado através do mesmo local de entrada. O olho não injetado de cada animal serve como um controle. Opcionalmente, o CTGF adicionalmente pode ser injetado no dia 7 e/ou dia 14 seguindo a primeira injeção. Uma metade dos animais é adicionalmente tratada com o anticorpo da invenção injetado, por exemplo, intravenosamente, intraperitonealmente, ou intraocularmente. Dependendo do local de administração, o anticorpo pode ser fornecido diariamente ou administrado menos freqüentemente, por exemplo, nos dias 7, 10, 14, etc.

Os animais são examinados usando os procedimentos oftalmoscópicos indiretos para monitorar o desenvolvimento e extensão de PVR, que é classificado de acordo com os parâmetros descritos por Fastenberg. (Fastenberg *et al.* (1982) *Am J Ophthalmol* 93: 565 a 572). Os animais depois são sacrificados e os olhos são analisados por examinação histológica tanto para a extensão da formação da membrana quanto da fibrose. Adicionalmente, a retina e a membrana fibrótica podem ser coletada para a medição do teor de colágeno.

Alternativamente, o PVR é induzido nos olhos do coelho usando a injeção subretínica de dispase, usando o modelo e um procedimento adaptado de Frenzel *et al.* (1998, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 2157 a 2164). Uma bolha subretínica é formada usando 50 µl (0,05 U) de Dispase (Sigma Chemical Co). em PBS. Uma metade dos animais é adicionalmente tratada com o anticorpo da invenção injetado, por exemplo, intravenosamente, intraperitonealmente, ou intraocularmente. A separação retínica é induzida em aproximadamente 75% dos coelhos injetados que não recebem o anticorpo da invenção uma semana depois da cirurgia, e em aproximadamente 100% destes animais duas semanas seguindo a cirurgia. As membranas epiretínicas são



examinadas quanto a extensão da fibrose.

Uma redução nas mudanças patológicas em animais tratados com anticorpo relativa aos controles não tratados é indicativa da eficácia terapêutica em PVR. Como o CTGF foi associado com o dano tecidual em modelos de PVR, os agentes anti-CTGF foram propostos como terapêutica para o uso em tais distúrbios. (Ver, por exemplo, a Publicação Internacional Nº WO 03/049773). Os anticorpos da presente invenção representam uma classe terapeuticamente eficaz, única de produto terapêutico anti-CTGF para o uso em distúrbios oculares, por exemplo, PVR.

10 Exemplo 9. Esclerose

A esclerose no geral é caracterizada por fibrose difusa, mudanças degenerativas, e anormalidades vasculares na pele (escleroderma), articulações, e órgãos internos, especialmente o esôfago, trato GI, pulmão, coração, e rim.

15 9.1. *Indução de Granuloma Localizada*

Os camundongos recém-nascidos desenvolvem uma fibrose localizada persistente quando administrados uma combinação de TGFβ-2 e CTGF derivados do ser humano por injeção subcutânea durante 7 dias consecutivos. (Mori *et al.* (1999) J Cell Physiol 181: 153 a 159; Shinozald *et al.* (1997) Biochem Biophys Res Commun 237: 292 a 297).

Um dia depois do nascimento, os camundongos foram divididos em três grupos de tratamento e administrados com 40 µl de albumina sérica de camundongo a 1% (MSA), PBS contendo 800 ng de TGFβ-2, 400 ng de CTGF, ou tanto TGF-β2 quanto CTGF por injeção subcutânea na região subescapular durante 7 dias consecutivos. O grupo de TGFβ-2 e CTGF de combinação foi dividido ainda em dois grupos, com um grupo adicionalmente recebendo 40 µg do anticorpo da invenção, o mAb1. No dia 11, os animais foram sacrificados e as seções dos locais da injeção foram processadas e tingidas com tricromo de Mason para a avaliação

histológica. As lâminas foram tornadas aleatórias e avaliadas qualitativamente em uma forma blindada por três cientistas; a contagem variou de 0 (nenhuma mudança) a 4 (tecido fibrótico) com base no grau de fibrose ou expansão de tecido conjuntivo (ver Figura 8). As contagens cumulativas de cada lâmina de todos os revisores individuais depois foram calculadas e o valor médio comparado entre os grupos usando o teste de ANOVA.

As contagens médias do grupo para o controle do veículo, TGF β -2, e a combinação de TGF β -2 e CTGF foram de 0,75, 6,83 e 9,00, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Contagem histológica do granuloma em camundongos neonatais

Tratamento	Contagem média	Erro Padrão	Tamanho do grupo
Veículo	0,75	0,48	4
TGF- β 2	6,83	0,65	6
TGF- β 2 + rhCTGF	9,00	0,72	7
TGF- β 2 + CTGF + mAb1	6,17	1,40	6
TGF- β 2 + CTGF + FG-3025	7,50	1,50	4

¹ Contagem do grupo de lâminas de 3 leitores diferentes.

A contagem média do grupo para o tratamento com o anticorpo foi de 6,17, uma redução estatisticamente significativa quando comparada com a combinação de TGF β -2 e CTGF correspondente ($p < 0,05$), enquanto que o tratamento com um anticorpo anti-CTGF não neutralizante, direcionado terminalmente em C, mAb3, não reduziram a fibrose. Assim, os anticorpos da presente invenção são particularmente eficazes em reduzir o dano esclerótico local aos tecidos.

9.2. Fibrose Sistêmica Neonatal

Os camundongos recém-nascidos foram divididos em grupos e administrados com injeções intraperitoneais diárias durante 21 dias consecutivos com 300 μ g/kg/dia de TGF, 300 μ g/kg/dia de CTGF, uma combinação de 300 μ g/kg/dia de cada TGF β e CTGF, ou a combinação de TGF β e CTGF precedida pela administração IP de 5 mg/kg do anticorpo da invenção, mAb1, 30 min antes do tratamento com fator de crescimento. Os



filhotes permaneceram com suas mães durante o curso do tratamento. No dia 21, os animais foram sacrificados, os órgãos principais foram removidos, e a prolina e hidroxiprolina totais foram medidas como acima.

As injeções diárias de TGF β induziu a fibrose sistêmica menor, ao passo que o CTGF sozinho não produziu nenhuma resposta. A combinação de TGF β e CTGF induziu a fibrose sistêmica com a deposição de colágeno extensiva em vários órgãos (Figura 10) incluindo fígado, pulmão, coração, trato GI, diafragma e rim; adesões intestinais extensivas; e um aumento de 25% na mortalidade. A administração do anticorpo da invenção em combinação com o tratamento com fator de crescimento reduziu ou impediu a fibrose de órgão (Figura 10) e as adesões intestinais, e impediu a mortalidade. Assim, os anticorpos da presente invenção são adicionalmente eficazes quando administrados sistemicamente em reduzir o dano esclerótico aos vários tecidos e órgãos. Os resultados apresentados nos Exemplos 10.1 e 10.2 demonstram claramente que os anticorpos da invenção, quando administrados local ou sistemicamente, são terapeuticamente eficazes para o tratamento de condições escleróticas.

9.3. Escleroderma

Os anticorpos da invenção podem ser usados para melhorar a fibrose associada com escleroderma. Os métodos que medem a extensão e a estringência da doença de pele no escleroderma são conhecidos dentro da técnica. (Ver, por exemplo, Rodnan *et al.* (1979) *Arthritis Rheum* 22: 130 a 140; Aghassi *et al.* (1995) *Arch Dermatol* 131: 1160 a 1166; Brennan *et al.* (1982) *Br J Rheumatol* 31: 457 a 460; Kahaleh *et al.* (1986) *Clin Exp Rheumatol* 4: 367 a 369; Falanga e Bucalo (1993) *J Am Acad Derm* 29: 47 a 51; Seyger *et al.* (1997) *J Am Acad Derm* 37: 793 a 796; Seyger *et al.* (1998) *J Am Acad Dermatol* 39: 220 a 225; Black (1969) *Br J Dermatol* 81: 661 a 666; Ballou *et al.* (1990) *J Rheumatol* 17: 790 a 794; e Enomoto *et al.* (1996) *J Am Acad Dermatol* 35: 381 a 387).

Por exemplo, a contagem de pele de Rodnan modificada mede a firmeza da pele usando um durômetro digital do Tipo OO Rex DD-3 (Rex Gauge Company, Buffalo Grove IL) em unidades durométricas padronizadas com resolução de 0,1 de unidade. As medições durométricas são realizadas em todos os mesmos locais da pele como medido pela contagem de pele de Rodnan. As contagens de pele e as leituras durométricas são realizadas na triagem de valor básico, antes da administração de um anticorpo da invenção, e a cada três meses por todos os períodos de dosagem e acompanhamento. Cada medição é repetida quatro vezes, e uma análise estruturada de variância e cálculo de coeficientes de correlação de intraclasses é usada para determinar entre a variabilidade de repetição em relação à variabilidade de sítio e paciente. (Fleiss (1971) Psychol Bull 76: 378 a 382). As técnicas de correlação também são usadas para avaliar a concordância entre as contagens da pele e as contagens durométricas, ambas para as contagens globais e para as contagens de sub-grupo, em um ponto dado no tempo. As análises de correlação retardadas (por exemplo, relativo às contagens durométricas na entrada às contagens da pele no tempo $t + 3$ meses, ou $t + 6$ meses de tratamento com anticorpo) também são realizadas. A informação da atividade da doença e do estado funcional também pode ser coletada, incluindo os dados da síntese de colágeno (medições de PIIINP). A redução nos sintomas e/ou complicações de escleroderma como medido usando qualquer um dos métodos descritos acima demonstra a terapêutica eficaz dos anticorpos da presente invenção.

Exemplo 10. Osteoartrite

Os anticorpos da presente invenção são testados em um dos modelos seguintes para demonstrar a terapêutica eficaz na osteoartrite. Para os exemplos seguintes, a concentração de anticorpo usado está na faixa de cerca de 0,015 a 15 mg de anticorpo por quilograma de peso corporal do paciente; por exemplo, uma dosagem de cerca de 5 mg de anticorpo por

quilograma de peso corporal, é considerada apropriada.

Os animais, por exemplo, camundongos C57BL/6 machos de 12 semanas de idade, são abrigados em gaiolas padrão e alimentados em uma dieta padrão com água de torneira *ad libitum*.

5 10.1 *Injeção intra-articular de AdCTGF em articulações do joelho de murino*

Uma construção de vetor de expressão de adenovírus contendo CTGF (AdCTGF) é preparada usando o sistema de ADEASY (Qbiogene, Carlsbad CA) de acordo com procedimentos fornecidos pelo fabricante.

10 Brevemente, um polinucleotídeo que codifica o CTGF humano de tamanho natural é inserido usando técnicas de clonagem molecular padrão em um plasmídeo PSHUTTLE-CMV (Qbiogene). A construção de pShuttle-CMV-CTGF depois é tornada linear e co-transfectada com o plasmídeo PADEASY-1 (Qbiogene) no competente das células BJ-5183 de *E. coli* por eletroporação.

15 O AdCTGF é amplificado e purificado usando procedimentos descritos por Kim *et al.* (2001, J Biol Chem 276: 38781 a 38786); um vetor adenoviral nulo é usado como um controle. As unidades que formam placa (faixa de 1,0 a 2,1 x 10¹⁰/ml) e partículas virais (faixa de 0,9 a 1,5 x 10¹²/ml) são similares quanto ao AdCTGF e vírus de controle.

20 O AdCTGF ou o adenovírus de controle (1 x 10⁷ de unidades que formam placa) é injetado intra-articularmente; e os anticorpos da invenção são administrados por injeção intra-articular, intravenosa, intraperitoneal, ou subcutânea. O anticorpo pode ser injetado ao mesmo tempo como a administração adenoviral ou, alternativamente, a terapia pode

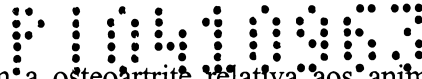
25 começar antes ou depois da injeção de AdCTGF. Os animais que recebem o adenovírus de controle são similarmente injetados com anticorpo anti-CTGF ou anticorpo de controle. As articulações do joelho não injetadas servem como controles para os efeitos do anticorpo.

As articulações do joelho são isoladas em vários dias, por

exemplo, 1, 3, 7, 14, e/ou 28 dias, depois da injeção de AdCTGF, descalcificadas durante 14 dias em EDTA/polivinilpirrolidona, e armazenadas a -20°C usando o procedimento descrito em Stoop *et al.* (2001, Osteoartrite Cartilage 9: 308 a 315). A histologia das articulações é analisada para medir a espessura sinovial e a depleção de proteoglicano; a hibridização e imunoistoquímica *in situ* são realizadas para identificar a expressão de CTGF, assim como a expressão de fatores adicionais incluindo colágeno (tipo I e/ou III), etc. O fluido sinovial é coletado para determinar os níveis de CTGF, metaloproteinases, etc. A eficácia de terapia usando os anticorpos anti-CTGF é confirmada por uma redução nos parâmetros associados com osteoartrite relativa aos animais injetados com AdCTGF e tratados com o anticorpo de controle.

10.2 Injeção intra-articular de AdTGF β nas articulações do joelho de murino

Alternativamente, os anticorpos podem ser testados no modelo animal de osteoartrite descrito por Bakker *et al.* (2001, Osteoartrite Cartilage 9: 128 a 136). Por exemplo, o anticorpo da invenção ou o anticorpo de controle podem ser injetados ao mesmo tempo como, subsequente a, ou no avanço da injeção intra-articular de 1×10^7 pfu de construção de anednovírus que expressam TGF β (AdTGF β). As articulações do joelho não injetadas servem como controles para os efeitos do anticorpo. Em vários dias, por exemplo, o dia 3, 7, 14, etc., os animais de cada grupo são sacrificados e os tecidos são isolados e processados. A histologia das articulações é analisada para medir a espessura sinovial, a depleção de proteoglicano, e a formação de osteófito, etc.; a hibridização e imunoistoquímica *in situ* são realizadas para identificar a expressão de CTGF, assim como a expressão de fatores adicionais incluindo colágeno (tipo I e/ou III), etc. O fluido sinovial é coletado para determinar os níveis de TGF β , CTGF, metaloproteinases, etc. A eficácia da terapia usando os anticorpos da invenção é confirmada por uma



redução em parâmetros associados com a osteoartrite relativa aos animais injetados com AdTGF β e tratados com o anticorpo de controle.

10.3 *Injeção intra-articular de papaína em articulações do joelho de murino*

Alternativamente, os anticorpos podem ser testados usando o procedimento descrito em van der Kraan *et al.* (1989, Am J Pathol 135: 1001 a 1014). A injeção intra-articular de papaína induz a formação de osteófito, fibrose, e depleção de proteoglicano a partir da cartilagem articular. O modelo de papaína é iniciado injetando-se 1 unidade de solução de papaína (Sigma, St. Louis, MO) na articulação do joelho direita dos camundongos. A articulação do joelho esquerda de cada animal serve como um controle interno. Os anticorpos da invenção são administrados por injeção intra-articular, intravenosa, intraperitoneal, ou subcutânea ao mesmo tempo como, subsequente a, ou em avanço de injeção intra-articular de papaína (0,5%/joelho). Em vários dias, por exemplo, o dia 3, 7, 14, etc., os animais de cada grupo são sacrificados e os tecidos são isolados e processados. A histologia das articulações é analisada para medir a espessura sinovial, depleção de proteoglicano, e formação de osteófito, etc.; a hibridização e imunoistoquímica *in situ* são realizadas para identificar a expressão de CTGF, assim como a expressão de fatores adicionais incluindo o colágeno (tipo I e/ou III), etc. O fluido sinovial é coletado para determinar os níveis de TGF β , CTGF, metaloproteinases, etc. A eficácia da terapia usando os anticorpos anti-CTGF é confirmada por uma redução nos parâmetros associados com a osteoartrite relativa aos animais injetados com papaína e tratados com o anticorpo de controle.

25 Exemplo 11. Clonagem e Expressão

Embora o exemplo seguinte ilustre a clonagem e expressão de um anticorpo particular da invenção, os métodos são no geral aplicáveis a todos dos anticorpos descritos e reivindicados aqui.

Um anticorpo exemplar da invenção, mAb1, foi primeiro



identificado como parte de um anticorpo humano complexo secretado por uma linhagem celular de hibridoma (8C12-F10; preparada como descrito no Exemplo 3).

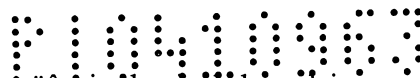
11.1 *Clonagem e seqüenciamento de cadeia pesada de mAb1*

5 O RNA mensageiro foi isolado a partir de uma cultura de células 8C12-F10 usando um kit MICRO-FAST TRACK (Invitrogen) seguindo os protocolos fornecido pelo fabricante. Duas misturas de cDNA depois foram produzidas segundo a síntese padrão usando um kit de ciclo de célula de cDNA (Invitrogen) seguindo os protocolos fornecidos pelo
10 fabricante e um dos iniciadores anti-sentido de cadeia pesada seguintes:

AB90 (TGCCAGGGGGAAGACCGATGG; SEQ ID NO: 3)

m19H1504R (GCTGGGCGCCCGGGAAGTATGTA; SEQ ID NO: 4)

As seqüências da região variável de cadeia pesada foram clonadas por amplificação de PCR da mistura de cDNA iniciada por AB90 usando o iniciador AB90 e um de uma série de iniciadores da região V, incluindo os iniciadores que correspondem às seqüências de sinal secretório
15 conservado, que codificam a extremidade 5' das regiões de codificação respectivas, e as seqüências da região de estrutura 1, que codificam o início das imunoglobulinas maduras. A Pfu DNA polimerase (Stratagene) foi usada de acordo com os protocolos do fabricante recomendados, com as variações seguintes: As reações foram tipicamente realizadas em 50 µl de volume total,
20 contendo 1 µl de cDNA, 0,75 µM de cada iniciador anterior e reverso, 200 µM de cada dNTP, e 1 µl de Pfu polimerase (2,5 unidades por µl). Um programa de ciclo término de contagem regressiva foi usado com uma incubação inicial a 94°C durante 2 min antes da adição de enzima. Os parâmetros do ciclo seguintes depois foram usado: Dez ciclos de 94°C
25 durante 45 segundos, 65°C durante 45 segundos, e 72°C durante 1 minuto; trinta ciclos de 94°C durante 45 segundos, 55°C durante 45 segundos, e 72°C durante 1 minuto; e depois um ciclo a 72°C durante dez 10 minutos.



Apenas um iniciador de sequência de sinal de cadeia pesada, AB87 (ATGGAGTTTGGRCTGAGCTG; SEQ ID NO: 5), que se liga às regiões V de cadeia pesada da família VH3, produziu o produto significativo. O produto de PCR do nucleotídeo 453 foi clonado no vetor BLUNT II-TOPO de PCR (Invitrogen), os clones foram triados quanto ao tamanho de inserção correto, e os três clones que correspondem aos produtos de PCR foram seqüenciados. As seqüências idênticas foram obtidas por todos os três clones.

As seqüências de região constante e de UTR de cadeia pesada foram clonadas pela amplificação de PCR da mistura de cDNA iniciada por m19 H1504R. Um fragmento de PCR do nucleotídeo 601 correspondendo à extremidade 5' do segmento de cadeia pesada foi amplificado usando o iniciador de sentido VH3-33 29-51F (CGGCGGTGTTTCCATTCGGTGAT; SEQ ID NO: 6) e o iniciador de anti-sentido de região constante de cadeia pesada m19 H553R (GGGCGCCTGAGTTCCACGACAC; SEQ ID NO: 7).

A clonagem mediada por topoisomerase foi usada para clonar os produtos de PCR no vetor PCR-BLUNT II (Invitrogen), como direcionado pelo fabricante, e a inserção depois foi seqüenciada. Similarmente, um fragmento de PCR do nucleotídeo 505 foi amplificado usando o iniciador de sentido m19 H439F (GTCTTCCCCCTGGCACCTCCTC; SEQ ID NO: 8) e o iniciador de anti-sentido m19 H943R (CCCGCGGCTTTGTCTTGGCATTAT; SEQ ID NO: 9), e um fragmento de PCR do nucleotídeo 503 foi amplificado usando o iniciador de sentido m19 H1002F (CTGGCTGAATGGCAAGGAGTA; SEQ ID NO: 10) e o iniciador de anti-sentido m19 H1504R. Ambos os fragmentos foram clonados separadamente no vetor PCR-BLUNT II (Invitrogen) e seqüenciados como descrito acima. Um quarto fragmento de PCR de cadeia pesada de 586 nucleotídeos foi amplificado usando o iniciador de sentido m19 H645F (GGGCACCCAGACCTACATC; SEQ ID NO: 11) e o iniciador de anti-sentido m19 H1230R (CTCCGGCTGCCCATGCTCTCC; SEQ ID NO: 12) e seqüenciado diretamente.



A Figura 11A mostra um diagrama do alinhamento dos fragmentos de PCR clonados que forneceram a sequência de nucleotídeo de tamanho natural (SEQ ID NO: 13) que codifica a cadeia pesada de mAb1 (SEQ ID NO: 14). A sequência de aminoácido da região variável de cadeia pesada o mais rigorosamente assemelha-se ao gene DP-44 da linha germinativa de VH3. Embora não foi possível dizer qual segmento D foi usado, a sequência de mAb1 o mais rigorosamente assemelha-se à família de DH4. A região JH o mais rigorosamente iguala-se ao JH4 e JH5 da linha germinativa. A região constante de cadeia pesada de mAb1 iguala-se ao N° de Acesso de GenBank BC016381, indicando um alótipo de G1m (3).

11.2 *Clonagem e seqüenciamento de cadeia leve de mAb1*

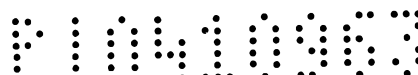
O RNA mensageiro foi isolado de uma cultura de células 8C12-F10 usando um kit MICRO-FAST TRACK (Invitrogen) seguindo os protocolos fornecidos pelo fabricante. Duas misturas de cDNA depois foram produzidas pela segunda síntese padrão usando um kit de ciclo de célula de cDNA (Invitrogen) seguindo os protocolos fornecidos pelo fabricante e um dos iniciadores de cDNA de anti-sentido de cadeia leve seguintes:

AB16 (CGGGAAGATGAAGACAGATG; SEQ ID NO: 15)

Ck-760R (AAGGATGGGAGGGGGTCAGG; SEQ ID NO: 16)

As seqüências variáveis de região de cadeia leve foram clonadas pela amplificação de PCR da mistura de cDNA iniciada por AB16 usando o iniciador AB16 e um de uma série de iniciadores da região V incluindo os iniciadores que correspondem às seqüências de sinal secretório conservada, que codificam a extremidade 5' das regiões de codificação respectivas, e as seqüências da região de estrutura 1, que codificam o início das imunoglobulinas maduras. A Pfu DNA polimerase (Stratagene) foi usada de acordo com os protocolos do fabricante recomendados com as variações e parâmetros de ciclo descritos acima.

Apenas um iniciador de seqüência de sinal de cadeia leve,



AB123 (CCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTG; SEQ ID NO: 17), que se
liga às regiões V de cadeia pesada da família VK1, produziu o produto
significante. O produto de PCR do nucleotídeo 408 foi clonado no vetor
BLUNT II-TOPO de PCR (Invitrogen), os clones foram triados quanto ao
5 tamanho de inserção correto, e os três clones que correspondem aos produtos
de PCR foram seqüenciados. As seqüências idênticas foram obtidas para
todos os três clones.

As seqüências constantes de região de cadeia leve foram
clonadas pela amplificação de PCR da mistura de cDNA iniciada por Ck-
10 760R. A seqüência de codificação inteira e a região de UTR 5' da cadeia leve
foram amplificadas usando o iniciador de sentido de cadeia leve L15 22m
(TCAGWCYCAGTCAGGACACAGC; SEQ ID NO: 18) e Ck-760R. O
fragmento do nucleotídeo 788 foi clonado no vetor BLUNT II de PCR
(Invitrogen) e seqüenciado. O plasmídeo resultante foi designado 41m6.

15 A Figura 11B mostra um diagrama do alinhamento dos
fragmentos de PCR clonados que forneceram a seqüência de nucleotídeo de
tamanho natural (SEQ ID NO: 19) que codifica a cadeia leve de mAb1 (SEQ
ID NO: 20). A seqüência de aminoácido da região variável de cadeia leve o
mais rigorosamente iguala-se às regiões codificadas pelas seqüências de
20 nucleotídeo Vk L15 e Jk2 de linha germinativa. A região constante de cadeia
leve de mAb1 é idêntica à seqüência de gene de imunoglobulina de cadeia
leve kappa de linha germinativa humana relatada. (Whitehurst *et al.* (1992)
Nucleic Acids Res 20: 4929 a 4930).

11.3 *Produção de construções de expressão de cadeia pesada e leve de* 25 *mAb1*

O cDNA de cadeia pesada de mAb1 de tamanho natural foi
gerado pela PCR de extensão de sobreposição em duas etapas dos produtos de
PCR de cadeia pesada descritos acima e mostrados na Figura 11A. Os dois
produtos de PCR 5' foram combinado com os iniciadores distais VH3-3329-

51F e m19 H943R em uma reação de extensão de sobreposição de PCR para produzir um único fragmento de 991 nucleotídeos. Similarmente, os dois produtos de PCR 3' foram combinados com os iniciadores distais VH3-3329-51F e m19 H943R em uma reação de extensão de sobreposição de PCR para
5 produzir um fragmento de 860 nucleotídeos. Estes dois produtos de reação de extensão de PCR depois foram purificados em gel e amplificados juntos usando os iniciadores distais VH3-3329-51F e m19 H1504R para gerar a sequência de codificação de cDNA de 1407 nucleotídeos (dos resíduos 441 ao 1847 da SEQ ID NO: 13) da cadeia pesada de mAb1 de tamanho natural.

10 O cDNA de cadeia pesada depois foi clonado no vetor PCR-BLUNT II TOPO (Invitrogen) para produzir o plasmídeo 43a4. A região de codificação de cadeia pesada de mAb1 depois foi subclonada pela digestão do plasmídeo 43a4 com as endonucleases de restrição de BamHI e XbaI, seguido pela ligação da inserção extirpada no vetor de expressão PCDNA5-FRT
15 (Invitrogen), que foi pré digerido com as endonucleases de restrição de BamHI e Nhe. A inserção do plasmídeo de expressão resultante, 44a1, foi verificada pela sequência antes de ser similarmente subclonado em orientação reversa no vetor PBK-CMV (Clontech) para produzir o plasmídeo 47a4, e no vetor pCEP-Pu (E. Kohfeldt, Max-Planck-Institut für Biochemie), um vetor
20 derivado do vetor pCEP4 (Invitrogen), para produzir o plasmídeo 49a1.

O cDNA de 708 nucleotídeos (resíduo 415 a 1122 da SEQ ID NO: 19) que codifica a cadeia leve de mAb1 de tamanho natural foi extirpado do plasmídeo 41m6, descrito acima, usando as endonucleases de restrição HindIII e XhoI, e ligado no vetor PCDNA5-FRT (Invitrogen), que foi pré
25 digerido com as endonucleases de restrição HindIII e XhoI, para produzir o plasmídeo de expressão mamífero 42b2. A inserção do plasmídeo 42b2 foi verificada em sequência antes de ser similarmente subclonado em orientação reversa no vetor PBK-CMV (Clontech) para produzir o plasmídeo 47b3, e no vetor pCEP-Pu (E. Kohfeldt, Max-Planck-Institut für Biochemie) para



produzir o plasmídeo 49b1.

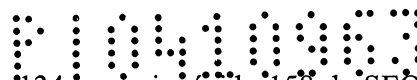
11.4 *Transfecção e expressão das construções de cadeia de anticorpo*

As células COS7 foram transfectadas com os plasmídeos 44a1 (cadeia pesada de mAb1) e 42b2 (cadeia leve de mAb1) tanto em separado quanto co-transfecções usando procedimentos padrão. Os meios de cultura condicionados foram ensaiados quanto à presença de anticorpo como descrito no Exemplo 4 (*supra*). Apenas o meio das células co-transfectadas tanto com 44a1 quanto 42b2 expressou o anticorpo humano tendo atividade de ligação de CTGF como medido por ELISA usando os procedimentos como descrito acima. O anticorpo, aqui identificado como CLN1, produzido pelas células COS7 co-transfectadas, se liga à metade de terminal N do CTGF com uma afinidade de 0,8 nM.

O CLN1 também foi expressado em células ovarianas de Hamster Chinês geneticamente modificadas (CHO). Uma linhagem celular de CHO que expressa o anticorpo exemplar CLN1 foi depositada com the American Type Culture Collection (Manassas VA) em 19 de Maio de 2004 e é identificada pelo Nº de Acesso de ATCC _____. As linhagens celulares podem ser otimizada e a expressão do anticorpo pode ser realçada usando várias técnicas conhecidas no ramo, por exemplo, por amplificação de gene como descrito por Wigler *et al.* (1980; Proc Natl Acad Sci USA 77: 3567 a 3570) com modificações como descrito por Ringold *et al.* (1981; J Mol Appl Genet 1: 165 a 175), Gasser *et al.* (1982; Proc Natl Acad Sci USA 79: 6522 a 6526), e Kaufman *et al.* (1985; Mol Cell Biol 5: 1750 a 1759).

Exemplo 12: Interação de CTGF com TGFβ

Os anticorpos da invenção especificamente se ligam às regiões de CTGF definidas pelos resíduos codificados pelo exon 3 (Figura 1B; do nucleotídeo 418 ao nucleotídeo 669 da SEQ ID NO: 1). Esta região abrange o aminoácido 97 ao aminoácido 180 da SEQ ID NO: 2, e inclui o domínio Tipo C de von Willebrand (do aminoácido 103 ao aminoácido 164 da SEQ ID NO:



2) e o epítipo de mAb1 (do aminoácido 134 ao aminoácido 158 da SEQ ID NO: 2). Abreu *et al.* (2002, Nat Cell Biol 4: 599 a 604) relatam que um domínio que corresponde ao domínio de VWC de CTGF é importante para a interação entre CTGF e TGF β ou BMP-4, e que a dita interação modula a atividade de TGF β e BMP-4. Os experimentos seguintes demonstram que as regiões codificadas pelo exon 3 são necessárias e suficientes para a ligação de CTGF ao TGF β , e que os anticorpos da invenção podem bloquear a interação entre CTGF e TGF β .

A Interação entre CTGF e TGF β foi ensaiada usando o procedimento seguinte. Os reservatórios de uma placa MAXISORP ELISA de 96 reservatórios (Nalge Nunc) foram revestidos durante a noite a 4°C com 10 μ g/ml de CTGF, o fragmento de CTGF codificado pelo exon 3, ou o fragmento de CTGF codificado pelo exon 5, em PBS; ou com PBS sozinho. Todos os reservatórios depois foram bloqueados com 1% de BSA em PBS, seguido por incubação durante 1 hora na temperatura ambiente em 50 μ l de solução contendo TGF β a 0, 1, 3,3, 10, 33, 100, 333, ou 1000 ng/ml, e anticorpo monoclonal anti-TGF β de camundongo MAB612 ou MAB1835 (R & D Sistemas, Minneapolis MN) a 100, 300, ou 1000 ng/ml em PBS, 0,05% de Tween-20. O MAB1835 reconhece o TGF β -1 e β -2 bovino, de camundongo, e humano, e bloqueia a ligação de TGF aos timócitos de camundongo. O MAB612 reconhece o TGF β -2, mas não inibe as atividades do TGF β . Os reservatórios foram lavados com PBS, 0,05% de Tween-20, e depois incubados durante 1 hora na temperatura ambiente em uma solução contendo um anticorpo de IgG anti-camundongo de cabra conjugado à fosfatase alcalina diluído em PBS, 0,05% de Tween-20. As placas foram novamente lavadas, e fosfato de p-nitrofenila (PNPP) em 1 M de etanolamina, 1 mM de MgSO₄, pH 9,8 foi adicionado, os reservatórios foram incubados durante um tempo adequado para desenvolver, e a reação depois foi concluída pela adição de NaOH. A absorbância em λ de 405 nm foi medida usando um



espectrofotômetro.

A Figura 12 mostra que o CTGF e o fragmento de CTGF codificado pelo exon 3 são capazes de interagir com o TGF β a um grau equivalente, ao passo que o fragmento de CTGF codificado pelo exon 5 não mostrou qualquer atividade de ligação para TGF β . De maneira interessante, o anticorpo anti-TGF β MAB612 foi capaz de detectar o TGF β ligado ao CTGF em uma maneira dependente de dose, mas o anticorpo neutralizante, MAB1835, não foi capaz de detectar o TGF β ligado ao CTGF em qualquer concentração testada (dados não mostrados). Isto sugere que o CTGF compete com MAB1835 pela ligação ao TGF β .

Os anticorpos anti-CTGF foram testados quanto a sua capacidade de bloquear a ligação entre CTGF e TGF β . Como mostrado na Figura 12, os anticorpos da invenção, exemplificados por mAb4 e mAb1, bloquearam a ligação de TGF β tanto de CTGF quanto do fragmento de CTGF codificado pelo exon 3, ao passo que um anticorpo anti-CTGF direcionado a um fragmento de terminal C de CTGF não bloqueou a ligação. Estes resultados fornecem suporte para um mecanismo de ação em que os anticorpos da invenção especificamente bloqueiam uma interação entre CTGF e TGF β , e potencialmente entre CTGF e outros membros da superfamília de TGF β .

Várias modificações da invenção, além daqueles mostradas e aqui descritas, tornar-se-ão evidentes àqueles habilitados na técnica da descrição precedente. Tais modificações são intencionadas a cair dentro do escopo das reivindicações anexas.

Todas as referências aqui citadas são aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo que especificamente se liga a uma região no fator de crescimento do tecido conjuntivo humano (CTGF) apresentada como os aminoácidos 143 a 154 da SEQ ID NO: 2 ou a uma região ortóloga no CTGF derivado de uma outra espécie, e que é capaz de neutralizar uma atividade biológica do CTGF, caracterizado pelo fato de que o anticorpo possui a mesma sequência de aminoácidos que o anticorpo produzido pela linhagem celular identificada pelo N° de Acesso ATCC PTA-6006.

2. Anticorpo que especificamente se liga a uma região no fator de crescimento do tecido conjuntivo humano (CTGF) apresentada como os aminoácidos 143 a 154 da SEQ ID NO: 2 ou a uma região ortóloga no CTGF derivado de uma outra espécie, e que é capaz de neutralizar uma atividade biológica do CTGF, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é produzido pela linhagem celular identificada pelo N° de Acesso ATCC PTA-6006.

3. Anticorpo caracterizado pelo fato de que compreende um primeiro polipeptídeo selecionado do grupo que consiste em:

(a) uma sequência de cadeia pesada de imunoglobulina compreendendo a SEQ ID NO: 14; e

(b) uma sequência de cadeia pesada de imunoglobulina compreendendo o domínio variável da SEQ ID NO: 14;

e um segundo polipeptídeo selecionado do grupo que consistem em:

(c) uma sequência de cadeia leve de imunoglobulina compreendendo a SEQ ID NO: 20; e

(d) uma sequência da cadeia leve de imunoglobulina compreendendo o domínio variável da SEQ ID NO: 20.

4. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o domínio variável do primeiro polipeptídeo compreende o domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina contido nos

aminoácidos 1 a 167 da SEQ ID NO: 14.

5 5. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que o domínio variável do segundo polipeptídeo compreende o domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina contido nos aminoácidos 1 a 136 da SEQ ID NO: 20.

6. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 5, caracterizado pelo fato de que compreende o domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina contido na SEQ ID NO: 14, e o domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina contido na SEQ ID NO: 20.

10 7. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é capaz de neutralizar uma atividade biológica do polipeptídeo CTGF.

15 8. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 7, caracterizado pelo fato de que a atividade biológica compreende a produção de matriz extracelular por uma célula.

9. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 7, caracterizado pelo fato de que a atividade biológica compreende o estímulo da migração celular.

20 10. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a produção da matriz extracelular é *in vivo* ou *ex vivo*.

11. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o anticorpo modula a interação entre o polipeptídeo CTGF e um receptor celular, neutralizando desse modo a atividade biológica.

25 12. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o anticorpo modula a interação entre o polipeptídeo CTGF e um cofator secretado ou de membrana, neutralizando desse modo a atividade biológica.

13. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 12,

caracterizado pelo fato de que o cofator é um membro da família de TGF- β .

14. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o cofator é o TGF- β ou BMP-4.

5 15. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que o anticorpo reduz a fibrose em um paciente.

16. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a fibrose ocorre dentro de um tecido selecionado do grupo que consiste de tecido epitelial, endotelial e conjuntivo.

10 17. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a fibrose ocorre dentro de um órgão selecionado do grupo que consiste de rim, pulmão, fígado, coração e pele.

18. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 17, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo de cadeia simples.

15 19. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 18, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo quimérico.

20. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 19, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo multivalente.

20 21. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 20, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

22. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é glicosilado ou não glicosilado.

25 23. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é conjugado a um agente citotóxico ou enzima.

24. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é detectavelmente rotulado.

25. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 24,

caracterizado pelo fato de que o rótulo detectável é uma enzima, porção fluorescente, porção quimiluminescente, biotina, avidina ou radioisótopo.

26. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, caracterizado pelo fato de que o anticorpo, ou porção deste, é codificado por material genético originalmente derivado de um ser humano.

27. Anticorpo quimérico caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável derivada de um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 25 e uma região constante derivada de uma outra fonte.

28. Anticorpo quimérico, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a região constante é derivada de uma região constante de uma imunoglobulina humana.

29. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade eficaz de um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28 em mistura com um veículo farmaceuticamente aceitável.

30. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um segundo agente terapêutico

31. Uso de um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 18 caracterizado pelo fato de ser para a manufatura de um medicamento para tratar ou prevenir um distúrbio associado com CTGF.

32. Uso, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o distúrbio é angiogênese ou câncer.

33. Uso, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que dito câncer inclui leucemia linfoblástica aguda, dermatofibromas, câncer de mama, desmoplasia de carcinoma de mama, angioliipoma, angioleiomioma, câncer desmoplástico, câncer de próstata, câncer ovariano, câncer colorretal, câncer pancreático, câncer gastrointestinal, ou câncer

hepático.

34. Uso, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o distúrbio é um distúrbio fibrótico.

5 35. Uso, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o distúrbio fibrótico é fibrose pulmonar idiopática, nefropatia diabética, retinopatia diabética, osteoartrite, escleroderma, insuficiência cardíaca crônica, ou fígado cirrótico

10 36. Par de polinucleotídeos caracterizado pelo fato de que compreende uma primeira sequência de polinucleotídeos selecionada do grupo que consiste de:

(a) uma sequência de polinucleotídeo de SEQ ID NO: 13; e

(b) uma sequência de polinucleotídeo do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 501 da SEQ ID NO: 13;

15 e uma segunda sequência de polinucleotídeos selecionada do grupo consistindo de:

(a') uma sequência de polinucleotídeo de SEQ ID NO: 19; e

(b') uma sequência de polinucleotídeo do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 408 da SEQ ID NO: 19.

20 37. Par de polinucleotídeos recombinantes caracterizado pelo fato de que compreende um primeiro nucleotídeo recombinante compreendendo a primeira sequência de polinucleotídeos como definida na reivindicação 36 operavelmente ligada a uma sequência vetorial que contém sequências de controle transcricional e de replicação; e um segundo nucleotídeo recombinante compreendendo a segunda sequência de
25 polinucleotídeos como definida na reivindicação 36 operavelmente ligada a uma sequência vetorial que contém sequências de controle transcricional e de replicação.

38. Polinucleotídeo recombinante, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o primeiro polinucleotídeo

codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 14 e o segundo polinucleotídeo codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 20.

5 39. Polinucleotídeo recombinante, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo compreende a sequência de polinucleotídeo da SEQ ID NO: 13 ou a sequência de polinucleotídeo da SEQ ID NO: 19.

 40. Microrganismo caracterizado pelo fato de que é transfectado com o polinucleotídeo recombinante como definido na reivindicação 39.

10 41. Microrganismo caracterizado pelo fato de que compreende uma célula co-transfectada com um polinucleotídeo que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 14 e um polinucleotídeo que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 20, e que produz um anticorpo funcional que se liga aos aminoácidos 143 a 154 da SEQ ID NO: 2.

Fator de crescimento de tecido conjuntivo

Estrutura modular

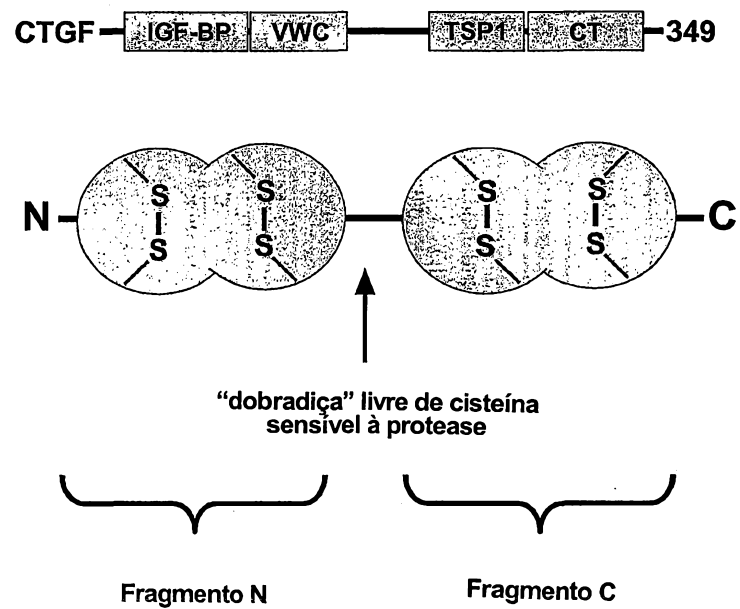
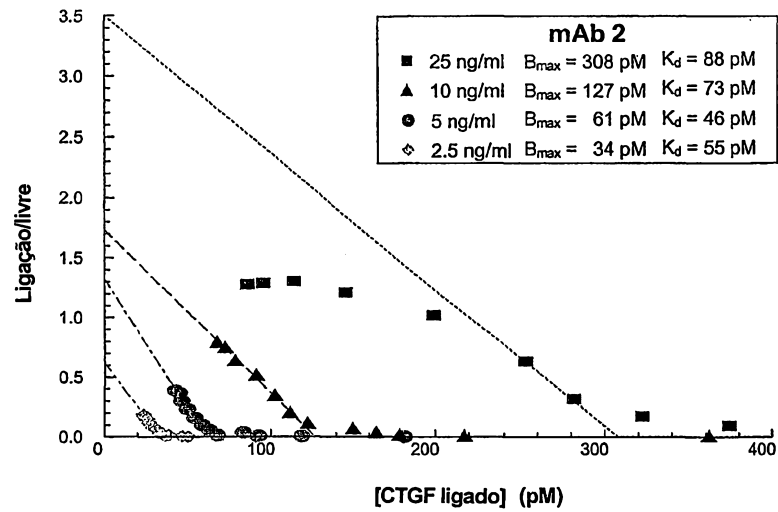


Figura 1a



A.



B.

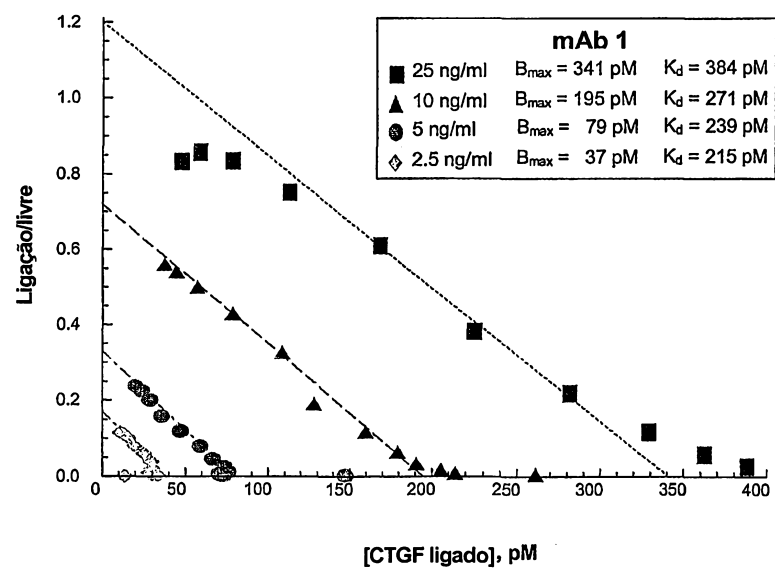


Figura 2

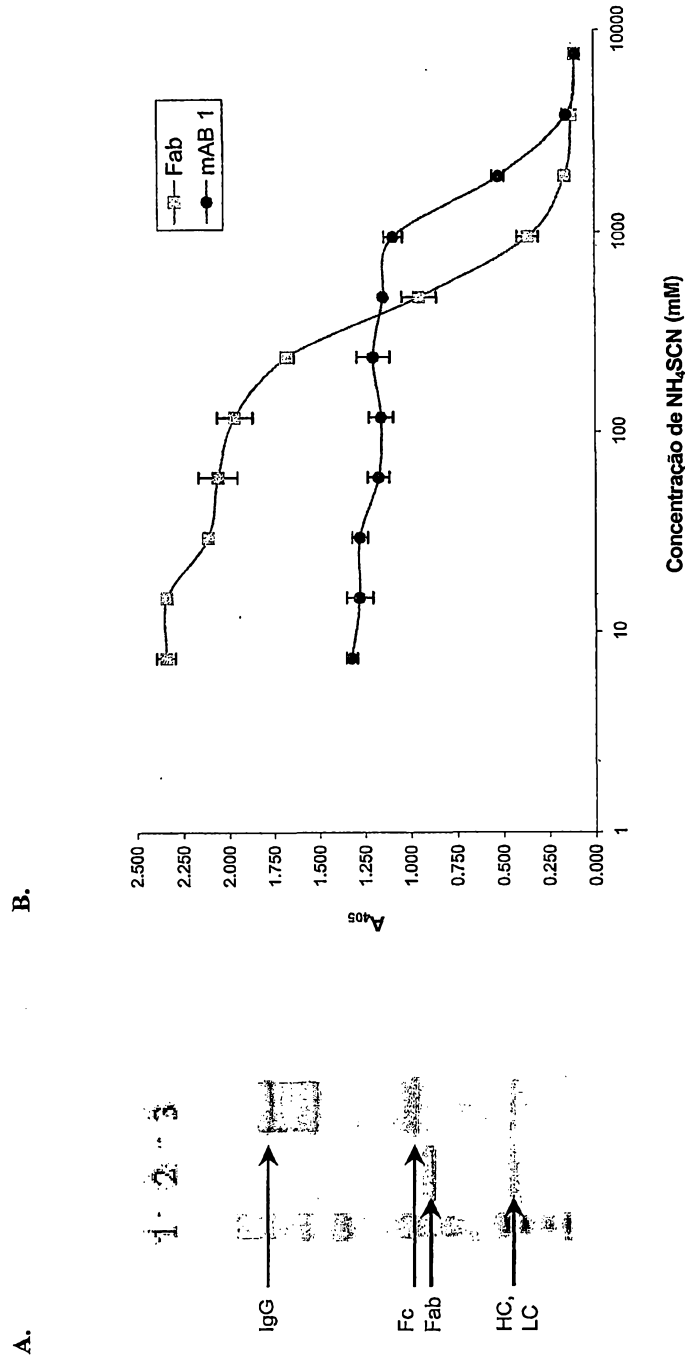
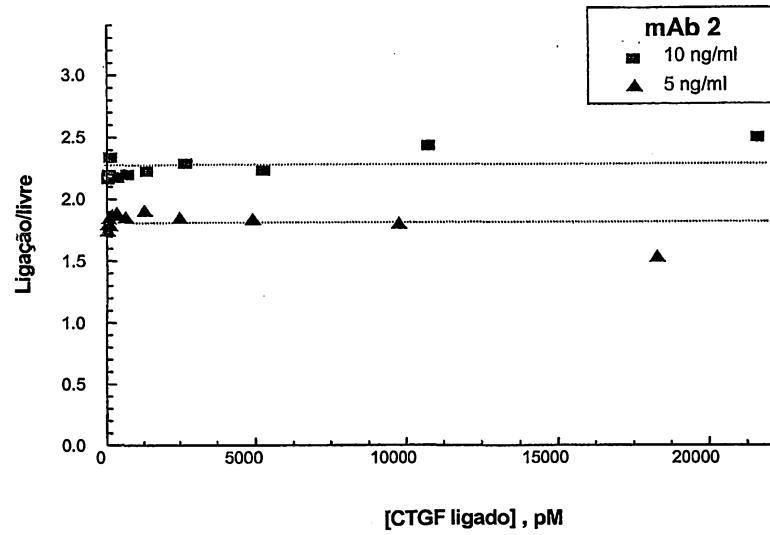


Figura 3

A.



B.

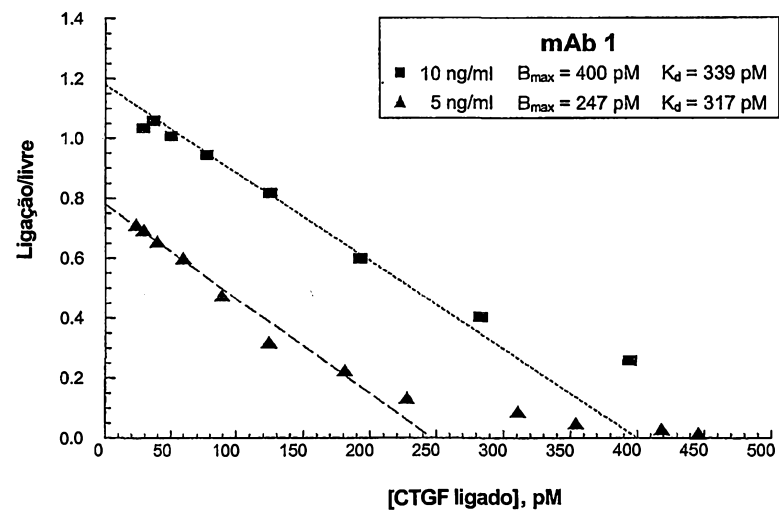


Figura 4

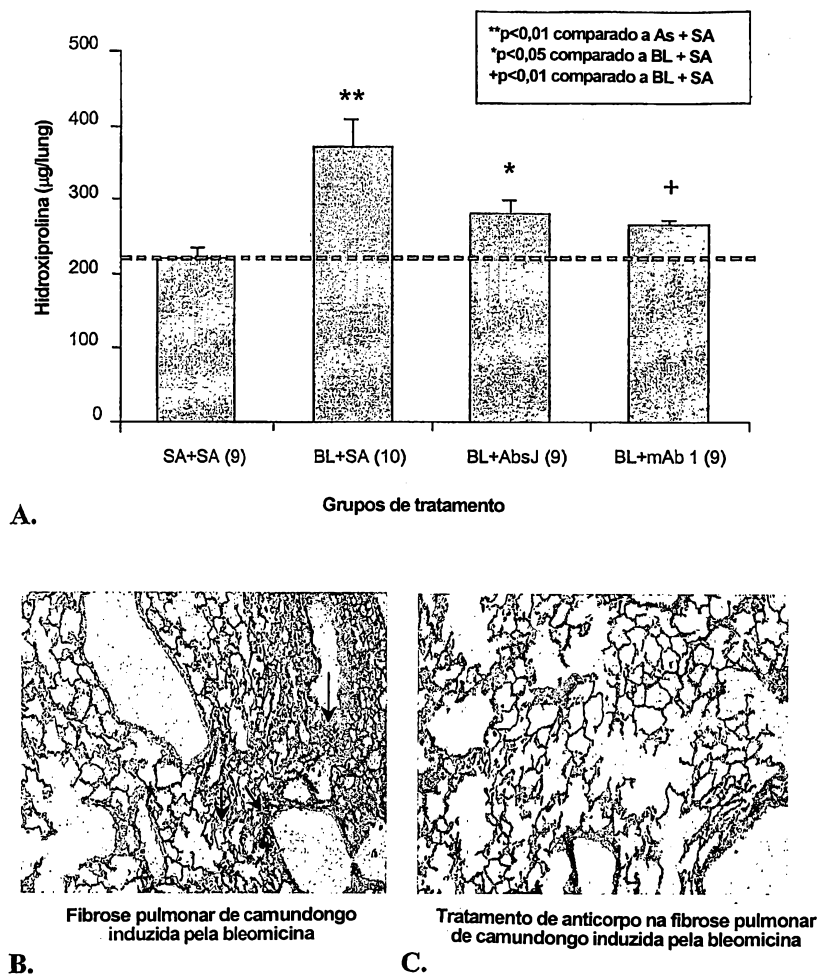
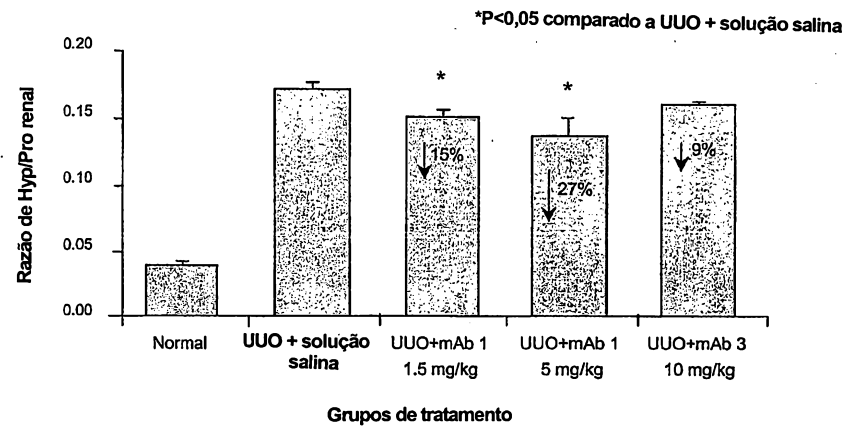
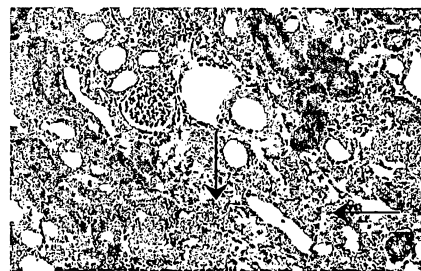


Figura 5

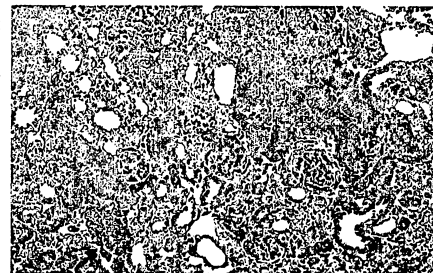


A



Controle de veículo de fibrose renal induzida por UUO

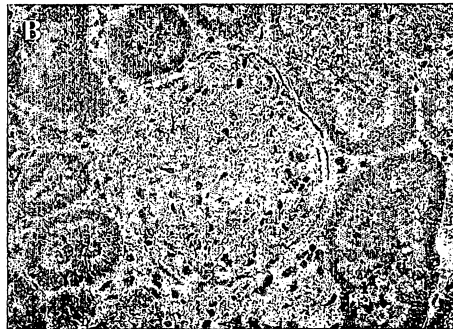
B



Tratamento de anticorpo da fibrose renal induzida por UUO

C

Figura 6

5/6 Nephrectomia**Tratado com solução salina (dia 18)****Tratado com anticorpo (dia 18)****Figura 7**

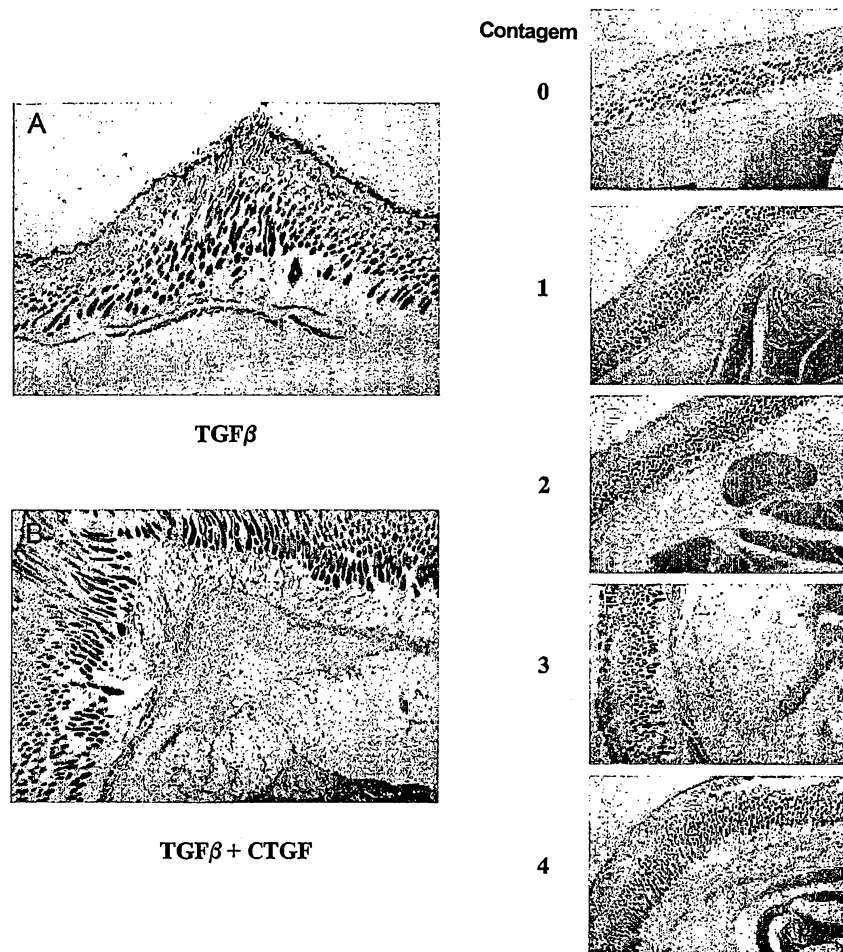


Figura 8

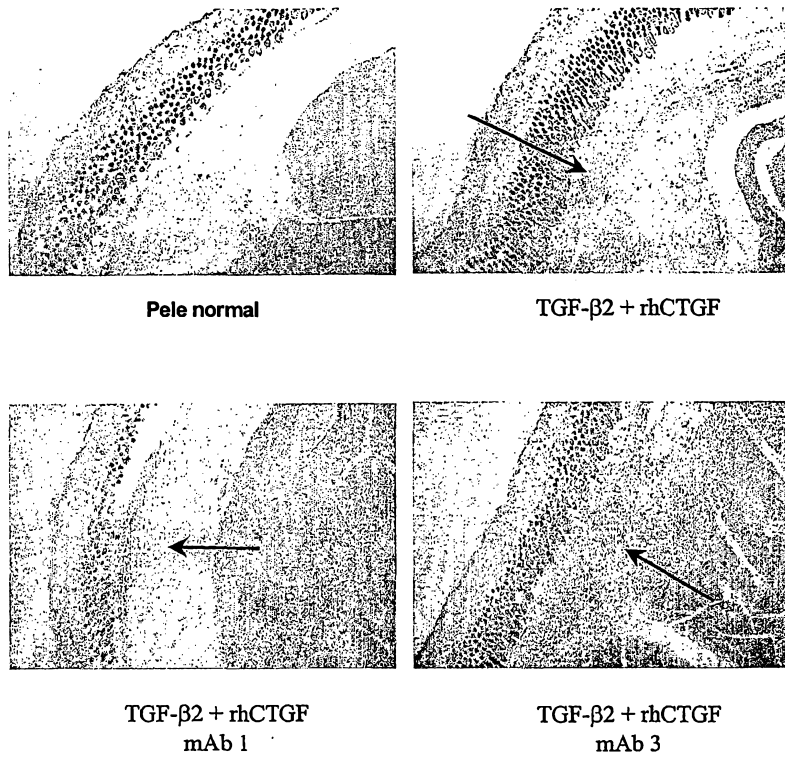


Figura 9

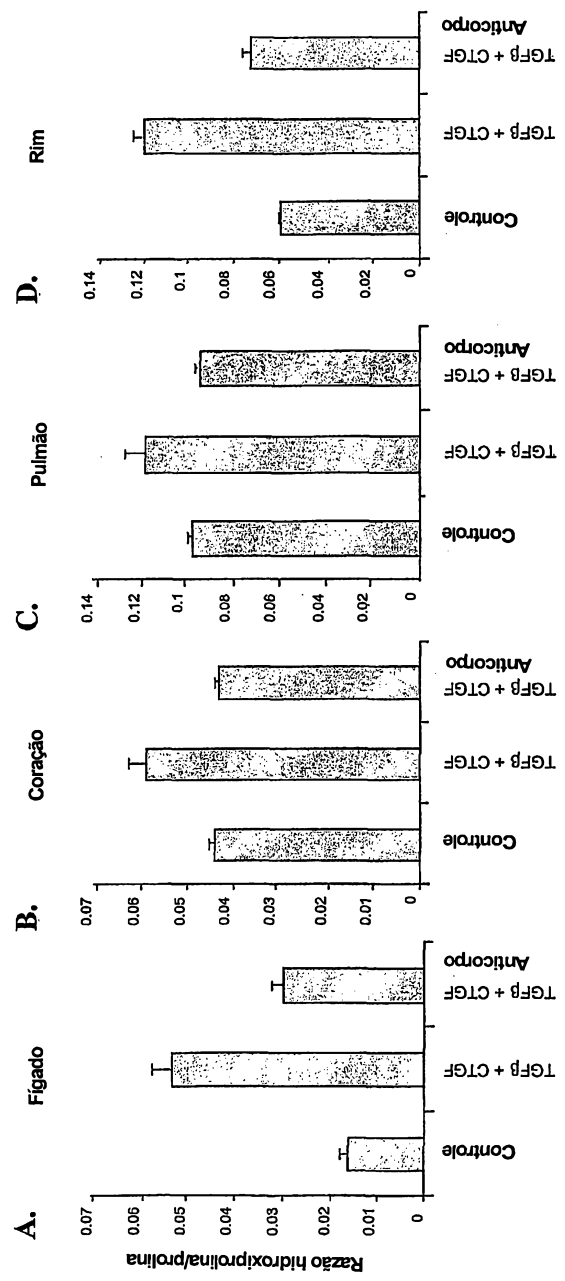


Figura 10

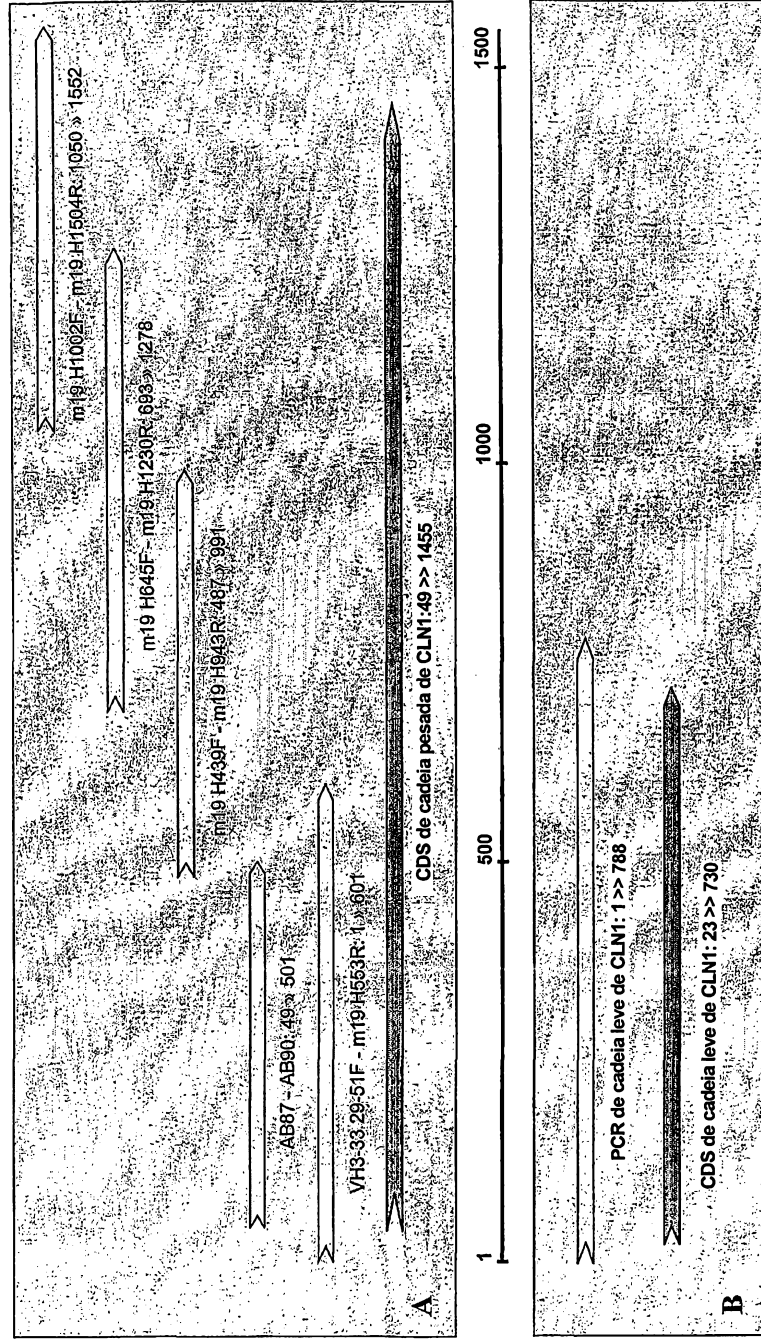
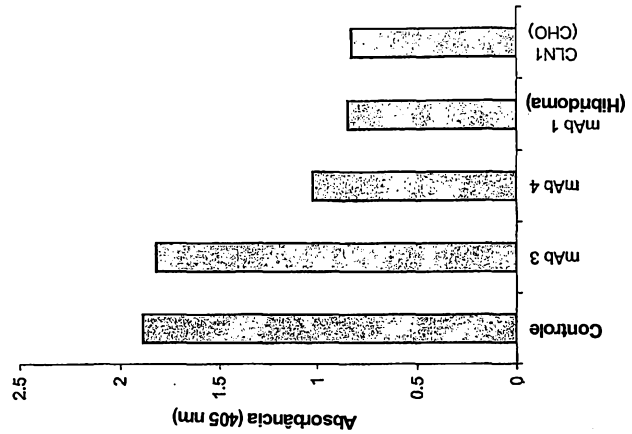
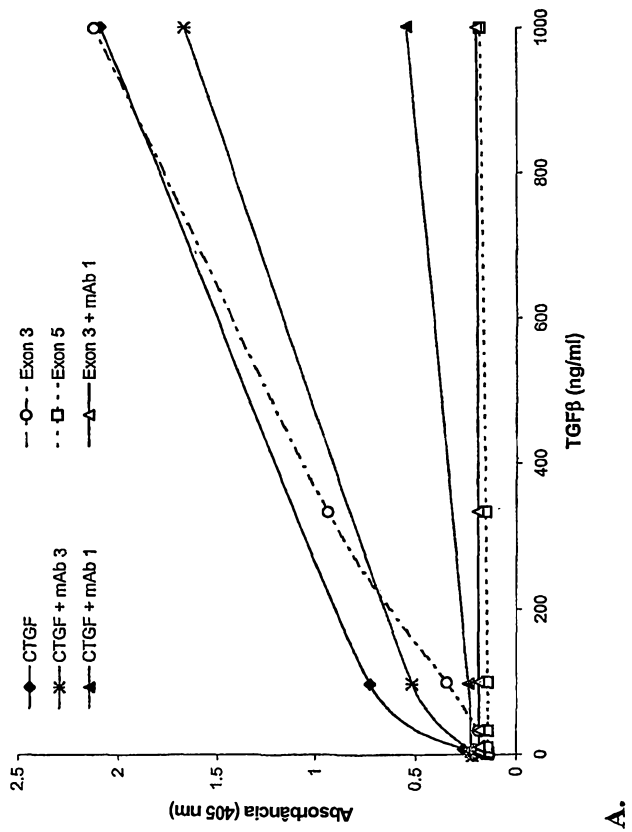


Figura 11



B.



A.

Figura 12