

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

(21) **PI 0613425-4 A2**

(22) Data de Depósito: 20/07/2006
(43) Data da Publicação: 30/10/2012
(RPI 2182)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/705
C07K 16/28
C12Q 1/68
G01N 33/53
A61K 39/00

(54) **Título:** PLEXINA D1, USO DE MOLÉCULAS, MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO DE PLEXINA D1, COMPOSIÇÃO DIAGNÓSTICA, COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA, E, MÉTODO PARA IDENTIFICAR MOLÉCULAS QUE SÃO CAPAZES DE SE LIGAR A PLEXINA DL

(30) **Prioridade Unionista:** 21/07/2005 EP 05076675.7

(73) **Titular(es):** Stichting Katholieke Universiteit

(72) **Inventor(es):** ILSE ROODINK, JOZEF MARIA HENDRIK RAATS, WILHELMUS PETRUS JOHANNES LEENDERS

(74) **Procurador(es):** Momsen, Leonardos & CIA.

(86) **Pedido Internacional:** PCT EP2006007241 de 20/07/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/009816de 25/01/2007

(57) **Resumo:** PLEXINA D1, USO DE MOLÉCULAS, MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO DE PLEXINA D1, COMPOSIÇÃO DIAGNÓSTICA, COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA, E, MÉTODO PARA IDENTIFICAR MOLÉCULAS QUE SÃO CAPAZES DE SE LIGAR A PLEXINA DL. A presente invenção se refere plexina D1 para uso como uma proteína marcável no tratamento ou diagnose de distúrbios que envolvem expressão de plexina D1. Diagnose é adequadamente efetuada detectando a presença de plexina D1 no corpo ou em um tecido ou fluido corporal, ao passo que tratamento é efetuado marcando plexina D1 para liberação de terapêuticos ao sítio onde tratamento é necessário. A invenção se refere adicionalmente ao uso de moléculas que se ligam a plexina D1, um ácido nucléico codificando plexina D1 ou um ligante de plexina D1 para a preparação de uma composição terapêutica para o tratamento ou diagnose de distúrbios que envolvem expressão de plexina D1. Os distúrbios compreendem distúrbios nos quais plexina D1 é expressa em células tumorosas, vasos sanguíneos de tumor ou macrófagos ativados.

“PLEXINA D1, USO DE MOLÉCULAS, MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO DE PLEXINA D1, COMPOSIÇÃO DIAGNÓSTICA, COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA, E, MÉTODO PARA IDENTIFICAR MOLÉCULAS QUE SÃO CAPAZES DE SE LIGAR A PLEXINA DL”

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere à identificação de uma nova proteína marcável que pode ser usada no tratamento e diagnose de tumores, em particular tumores sólidos, e desordens que envolvem inflamação, em particular artrite reumatóide, arteriosclerose e esclerose múltipla.

10 ARTE DE FUNDO DA INVENÇÃO

Para crescer além de um tamanho de 2-3 mm³, tumores têm que recrutar uma neovasculatura através de angiogênese. Tumores realizam isto através de expressão de Fator de Crescimento Endotelial Vascular-A (VEGF-A), ou induzida por hipoxia no centro de tumor ou como um resultado de mau funcionamento de produtos de gene supressor de tumor ou proto-oncogenes ativados. Diversos compostos que marcam a via de sinalização de VEGF-A foram desenvolvidos com o objetivo de inibir angiogênese e, conseqüentemente, crescimento de tumor.

Embora tais terapias anti-angiogênicas tenham sido efetivas em modelos de tumores de animais, tradução para o nível clínico até agora provou ser menos bem sucedida (Eichhorn, ME et al., Drug Resist Update 7:125-138 (2004)).

Para isto, existem diversas explicações possíveis.

Em situações clinicamente relevantes, tumores podem estar crescendo por meses ou mesmo anos no momento de diagnose, e uma proporção significativa da vasculatura pode estar mais ou menos madura e assim insensível à inibição de angiogênese. Esta situação está em acentuado contraste com aquela na maioria dos modelos animais nos quais, como uma regra, tumores agressivos de crescimento rápido são estudados. Além disso,

pacientes que são candidatos para terapia anti-angiogênica são tipicamente pacientes com câncer disseminado incontrolável e crescimento de metástase nem sempre é estritamente dependente de angiogênese. Devido à maioria das metástases ser de transmissão sanguínea, elas crescem em órgãos com densidades de vaso intrinsecamente altas como fígado, pulmão e cérebro onde elas podem crescer de uma maneira independente de angiogênese por co-opção de vasos pré-existentes.

De fato, um inibidor de angiogênese que inibe muito efetivamente crescimento de tumor em diversos modelos de tumor subcutâneo (Wedge, SR et al., *Cancer Res* 62:4645-4655 (2002)) não inibe crescimento de tumores infiltrantes em cérebro de camundongo. Além disso, com tratamento de camundongos carregando tumores cerebrais altamente angiogênicos, inibição de angiogênese não resultou em uma interrupção de progressão de tumor adicional, mas sim em uma progressão depois de uma mudança fenotípica para co-opção e infiltração (Leenders, WP et al., *Clin Cancer Res* 10:6222-6230 (2004)). Estes resultados implicam que terapia anti-angiogênica deve ser suplementada por terapias de marcação vascular nas quais a cama vascular de tumor existente é atacada, resultando em morte celular de tumor secundário devido à interrupção do abastecimento de sangue de tumor.

Para realizar terapia efetiva de marcação vascular, têm que ser identificados marcadores que têm especificidade para vasculatura de tumor. Muito esforço já foi posto nisto, mas com sucesso variado. Marcação efetiva de tumor vascular foi realizado usando anticorpos de cadeia única, marcados contra o domínio ED-B de fibronectina, que é seletivamente expresso e depositado na matriz extracelular de vasos recentemente formados em tumores angiogênicos (Santimaria, M et al., *Clin Cancer Res* 9:571-579 (2003)). Marcação de $\alpha v \beta 3$ -integrina (a expressão da qual é restrita a vasos imaturos) usando peptídeos RGD ou Vitaxina produziu resultado

decepcionante ao passo que expressão de endoglina não foi específica para vasos sanguíneos de tumor (Posey, JA et al., Cancer Biother Radiopharm 16:125-132 (2001); Balza, E et al., Int J Cancer 94:579-585 (2001)).

Em doenças inflamatórias tal como artrite reumatóide (RA) ou arteriosclerose, angiogênese e ativação da vasculatura também freqüentemente é parte da patologia. A vasculatura aqui facilita o caminho para que células inflamatórias extravasem e exerçam sua ação destrutiva. Tais doenças podem assim também se beneficiar de marcação para vasos sanguíneos.

10 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Portanto o objetivo da presente invenção é fornecer uma nova proteína marcável que pode ser usada no tratamento e diagnose de câncer e doenças inflamatórias ou doenças que envolvem inflamação.

Na pesquisa que levou à presente invenção foi encontrado que plexina D1 é expressa no lado luminal de células endoteliais em vasos sanguíneos de tumor, nas próprias células tumorosas e em macrófagos ativados que são encontrados em tumores, em inflamação e em placas ateroscleróticas.

A invenção assim se refere a plexina D1 para uso como uma proteína marcável no tratamento ou diagnose de desordens que envolvem expressão de plexina D1.

A família de receptores de plexina consiste de quatro classes (PLXNA-D) e nove membros em mamíferos. Plexinas compreendem uma família de grandes proteínas de membrana de passagem única com homologia para receptores de fator de dispersão, codificados pela família de gene MET. Membros da família de plexina compartilham domínios Sema, seqüências relacionadas a Met (MRS), uma região transmembrana e motivos intracelulares que são preditivos de sinalização de Rac/Rho GTPase (Figura 1).

Uma vez que sinalização através de GTPases resulta em rearranjos citoesqueléticos, eventos que estão criticamente envolvidos em formação de filopodia e lamelipodia e migração celular, plexinas podem ser consideradas como reguladores de migração.

5 Plexinas são receptores para as semaforinas, uma família de proteínas secretadas GPI-ancoradas ou transmembranas que é subdividida em sete subclasses. Cada plexina tem seus próprios (conjunto de) parceiros de ligação de semaforina, e cada combinação de plexina-semaforina resulta em uma resposta específica. Semaforinas de classe 3 são potentes repelentes de
10 axônio e como tal estão envolvidas em morfogênese do sistema nervoso (para revisão, veja (Pasterkamp, RJ et al., Curr Opin Neurobiol 13:79-89 (2003); Fujisawa, H, J Neurobiol 59:24-33 (2004)). Para ativação de plexinas pelas semaforinas, parceiros de ligação de plexina adicionais podem ser requeridos. Estes parceiros de ligação, neuropilina-1 e -2 (NP-1 e NP-2) não têm
15 nenhuma motivo de sinalização no domínio intracelular e são pensados como uns co-receptores passivos, possibilitando a interação entre semaforinas e plexinas.

Algumas plexinas formam ainda complexos maiores de membrana com e ativam receptores de sinalização como Off Track (Otk) e os
20 receptores de fator de dispersão Met e Ron. Uma interação direta entre plexinA1 e o receptor-2 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGFR2) angiogênico também foi demonstrada (Toyofuku, T et al., E-publication in Genes Dev 18:435-447 (2004)). Devido ao fato de NP-1 se ligar a membros da família de plexina mas também a VEGFR2, é concebível que existam
25 complexos multicomponentes de proteínas de membrana que abranjam VEGFR2, NP-1 e plexinas, estabelecendo uma ligação entre plexinas e angiogênese (veja também Weinstein, BM, Cell, 120:299-302 (2005)).

Neuropilinas também são co-receptores para o potente fator angiogênico Fator de Crescimento Endotelial Vascular-A (VEGF-A165) e

estimulam sua afinidade para VEGFR2.

Interessantemente, o sítio de ligação VEGF-A165 em NP-1 se sobrepõe com aquele para semaforina 3A (Miao, H Q et al., J Cell Biol 146:233-242 (1999)). Foi postulado que ligação de VEGF-A com NP-1 promove migração de células endoteliais competindo por ligação de semaforinas de classe 3, o que geralmente é seguido por despolimerização de F-actina e repulsão de extensões celulares (Bachelder, RE, Cancer Res 63:5230-5233 (2003)). Comportamento antagonístico similar de VEGF-A e semaforinas de classe 3 foi descrito em uma linhagem celular progenitora de neurônios (Bagnard, D et al., J Neurosci 21:3332-3341 (2001)) e células tumorosas (Bachelder (2003), acima). Uma vez que efeitos antagonísticos foram observados em células tumorosas que são desprovidas de receptores de VEGF, é concebível que o mecanismo de base envolva membros da família de plexina, estabelecendo uma ligação adicional entre plexinas e sinalização de VEGF-A.

Os presentes requerentes encontraram previamente que o membro da família plexina D1 (plxnd1) não é expresso apenas em células neuronais, mas também em células endoteliais da vasculatura durante estágios precoces de desenvolvimento (van der Zwaag, B et al., Dev Dyn 225:336-343 (2002)), uma observação que foi confirmada por dois outros grupos (Gitler, AD et al., Dev Cell 7:107-116 (2004); Torres-Vazquez, J et al., Dev Cell 7:117-123 (2004)). Em vasculatura adulta, plxnD1 é ausente. Camundongos nocaute P/xnd/- e peixe-zebra carregando mutações no gene de plxndl são caracterizados por mau desenvolvimento do sistema cardiovascular (Gitler, AD et al. (2004), acima; Torres-Vazquez, J et al., (2004), acima). Camundongos nocaute duplo Neuropilina-1 (NP-1) e NP-1/Neuropilina-2 (NP-2) também sofrem de defeitos letais em vascularização e má formações de arco aórtico durante desenvolvimento embrionário (Kawasaki, T et al., Development 126:4895-4902 (1999); Takashima, S et al., Proc Natl Acad Sci

USA 99:3657-3662 (2002); Gu, C et al., Dev Cell 5:45-57 (2003)).

Além disso, bloqueio local mediado por morfolino de NP-1 em peixe-zebra leva a mau desenvolvimento de vasos intersegmentares, e neste sistema de modelo foi estabelecida uma ligação clara entre NP-1 e VEGF-A165 (Lee, P et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:10470-10475 (2002)). A semelhança dos fenótipos de camundongos nocaute de *plxnd1*, neuropilina-1 e semaforina 3C (Feiner, L et al., Development 128:3061-3070 (2001)) é consistente com a observação de que Plexina D1 é um receptor dependente de neuropilina-1 para semaforina 3C (Gitler, AD et al. (2004), acima). Entretanto, PlxnD1 também é um receptor para semaforina 3E, e esta interação não requer neuropilinas para sinalização mediada por Semaforina 3E (Gu, C et al., Science 307:265-268 (2005)).

De acordo com a invenção foi agora encontrado que plexina D1 também está envolvida em angiogênese durante crescimento de tumor e é expressa no lado luminal de células endoteliais em vasos sanguíneos de tumor. Além disso, foi encontrado que plexina D1 é expressa por macrófagos ativados. Também, foi encontrado que plexina D1 é expressa em células tumorosas em uma ampla variedade de tipos de tumor.

A presente invenção assim se refere a plexina D1 para uso como uma proteína marcável no tratamento ou diagnose de desordens que envolvem expressão de plexina D1.

Diagnose é efetuada detectando a presença de plexina D1 ou uma plexina D1 codificando ácido nucléico no corpo ou um tecido ou fluido corporal.

Tratamento é efetuado marcando plexina D1 para liberação de terapêuticos para o sítio onde tratamento é necessário, interferindo na interação entre plexina D1 e seus ligantes, interferindo na expressão do gene de plexina D1 ou capturando ligantes de plexina D1 para inibir interação com plexina D1.

A invenção assim além disso se refere ao uso de moléculas que se ligam a plexina D1, um ácido nucléico codificando plexina D1 ou um ligante de plexina D1 para a preparação de uma composição terapêutica para o tratamento ou diagnose de desordens que envolvem expressão de plexina D1.

- 5 Todas estas moléculas serão identificadas neste lugar como "moléculas de ligação" ou "entidades de ligação".

As desordens compreendem em particular desordens nas quais plexina D1 é expressa em células tumorosas, vasos sanguíneos de tumor ou macrófagos ativados.

- 10 As células tumorosas nas quais plexina D1 é expressa compreendem tumores cerebrais, em particular astrocitomas, oligodendrogliomas e hemangioblastomas, carcinomas de cólon, em particular carcinomas ductais do cólon, carcinomas de próstata, carcinomas de célula renal, em particular carcinomas de célula clara renal, carcinomas de
15 mama, em particular carcinomas ductais da mama, carcinomas de ovário, carcinomas de célula esquamosa, melanomas, carcinomas de pulmão, em particular carcinomas de célula pequena de pulmão e carcinomas de célula não pequena de pulmão, sarcomas de tecido macio etc.

- Quando as desordens que são tratadas de acordo com a
20 invenção são doenças inflamatórias, elas são em particular doença autoimune, mais em particular artrite reumatóide, ou elas são arteriosclerose ou esclerose múltipla.

- Moléculas que se ligam a plexina D1 são por exemplo selecionadas a partir de anticorpos, fragmentos de anticorpos, proteínas,
25 domínios protéicos, peptídeos, moléculas pequenas. Estas moléculas podem ser usadas para marcar plexina.

Moléculas que se ligam ao ácido nucléico codificando plexina D1 são por exemplo oligonucleotídeos, tal como aptâmeros de RNA ou DNA, por exemplo selecionadas a partir de siRNA, RNA antisentido,

oligonucleotídeos fosfotio antisentido. Estas moléculas podem ser usadas para interferir na expressão de plexina D1.

Moléculas que se ligam a um ligante de plexina D1 são, por exemplo, selecionadas a partir de anticorpos contra ligantes, o ectodomínio solúvel de plexina D1 ou moléculas pequenas, tal como peptídeos, que se ligam a ligantes de plexina D1. Estas moléculas podem ser usadas para capturar ligante de plexina D1 circulante, prevenir ligação do ligante a plexina D1 células de vaso de tumor, células tumorosas ou macrófagos ativados e interferir na função de plexina D1 nestas células.

Para diagnose, a molécula de ligação é adequadamente marcada com um marcador detectável. Um tal marcador detectável é por exemplo selecionado a partir de um marcador radioativo, marcador paramagnético, um marcador fluorescente, um marcador quimioluminescente. Diagnose pode ser realizada em uma amostra de um fluido ou tecido corporal in vivo, in situ ou ex vivo. Exemplos de técnicas diagnósticas são hibridização in situ de por exemplo mRNA de plexina D1 ou imunohistoquímica em biópsias ou células tumorosas.

Para tratamento, a molécula de ligação é por exemplo fornecida com uma entidade que danifica ou mata a célula tumoral e/ou a célula endotelial de tumor, em particular uma entidade citotóxica, tal como um radionuclídeo, uma toxina, boro para Terapia por Captura de Nêutrons por Boro (BNCT), ou um pró-fármaco que é acoplado à entidade de ligação através de um ligante clivável, que é ativado em resposta a clivagem daquele ligante, ou peptídeos indutores de apoptose, um exemplo dos quais é a sequência (KLAKLAK)₂. Tais peptídeos são adicionados à entidade de ligação por técnicas moleculares de engenharia genética.

As entidades descritas acima podem ser diretamente conjugadas com a entidade de ligação, ou elas podem estar presentes em nanodispositivos, tal como lipossomos ou polimersomos, que estão

conjugados com a entidade de ligação.

Terapia por Captura de Nêutrons por Boro (BNCT) compreende irradiação de uma área doente, tal como um tumor ou uma inflamação, na qual boro acumulou depois de injeção intravenosa do conjugado lipossômico, com nêutrons, depois do que átomos de boro irão decair para lítio com emissão de partículas alfa destrutivas.

Alternativamente, terapia pode ser efetuada induzindo trombose local nos vasos de tumor para bloquear o abastecimento de sangue para o tumor e induzir morte celular. Um exemplo de tal molécula é Fator de Tecido (TF).

Vantajosamente, plexina D1 pode ser marcada com moléculas de ligação específicas mediante administração intravenosa uma vez que plexina D1 é expressa no lado luminal de células endoteliais em vasos sanguíneos de tumor. Compostos terapêuticos para danificar ou matar células tumorosas que estão acoplados à molécula de ligação podem atingir o tumor de dentro e compostos que induzem trombose são facilmente entregues ao seu sítio de ação.

Interferência na função de plexina D1 representa um meio para inibir angiogênese, para inibir migração de célula tumoral, e para inibir migração de macrófago. Assim, a invenção fornece métodos de tratar ou suprimir desordens nas quais plexina D1 está envolvida, usando a presença específica de plexina D1 para entregar terapêuticos localmente para tecidos doentes, e/ou por interferência na função de plexina D1 ou na interação entre plexina D1 e seus ligantes.

25 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção é assim baseada no fato de que plexina D1 pode ser usada como um marcador marcável em vasos sanguíneos de tumor, como uma proteína marcável envolvida em angiogênese de tumor, como um marcador marcável em células tumorosas e como uma proteína marcável envolvida em

migração celular.

A invenção assim também se refere ao uso de moléculas que se ligam a plexina D1, seu gene ou mRNA ou seus ligantes em diagnose e terapia. Todos os tipos de moléculas de ligação específicas, e derivados desta
5 podem ser usados na invenção, em particular compostos proteináceos, tal como, mas não limitado a, anticorpos, fragmentos de anticorpos, fragmentos de anticorpos de domínio único, outros domínios de ligação proteináceos, tal como, mas não limitado a, lipocalinas, e moléculas pequenas que se ligam especificamente a plexina D1 ou seus ligantes. Para ligação com o gene de
10 plexina D1 ou o mRNA transcrito a partir do gene de plexina D1 moléculas de ácido nucléico, tal como aptâmeros de DNA ou RNA podem ser usadas.

Em uma primeira forma de realização da invenção moléculas de ligação de plexina D1 ou ligante de plexina D1 são anticorpos, em particular anticorpos monoclonais, mais em particular anticorpos humanos ou
15 humanizados nos quais as regiões constantes do anticorpo original são substituídas com as regiões constantes de anticorpos humanos, ou fragmentos destes que ainda se ligam a plexina D1 ou seu ligante.

O anticorpo é preferivelmente um anticorpo humano IgG1. Entretanto, outros isotipos de anticorpo humano também são abrangidos pela
20 invenção, incluindo IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD e IgE. Também todos os anticorpos derivados de animais de vários isotipos podem ser usados na invenção.

Os anticorpos podem ser anticorpos de tamanho completo ou fragmentos de ligação de antígeno de anticorpos, incluindo fragmentos Fab,
25 F(ab')₂, Fv de cadeia única, ou VHH de domínio único, domínios únicos de VH ou VL.

Preferivelmente, anticorpos contra plexina D1 são anticorpos monoclonais humanos produzidos por uma célula de hibridoma que inclui uma célula B obtida a partir de um animal transgênico imunizado tendo um

genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humana e um transgene de cadeia leve humana, fundido a uma célula imortalizada, ou um anticorpo derivado de animal ou fragmento de anticorpo produzido por uma célula de hibridoma que inclui uma célula B obtida a partir de um animal
5 imunizado, fundido a uma célula imortalizada, ou anticorpos humanos e animais, produzidos por uma célula eucariótica transfectada com o cDNA ou DNA genômico codificando dito anticorpo ou fragmento de anticorpo.

Em uma forma de realização preferida da presente invenção, anticorpos de Lhama de domínio único (VHH) com afinidade para plexina D1
10 são fornecidos, mais especificamente anticorpos A12 de domínio único de Lhama (SEQ ID NO:1) e F8 (SEQ ID NO:2), apresentados ou não em bacteriófagos M13, também conhecidos por aqueles versados na arte como anticorpos VHH de apresentação em fago.

Um anticorpo de cadeia única preferido é derivado de anticorpo 11F5H6 e 17E9C12. A sequência do anticorpo de cadeia única é
15 mostrada em SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:4.

Os anticorpos para uso de acordo com a invenção podem ser anticorpos de alta afinidade que são evocados em animais de laboratório não transgênicos, ou em um animal transgênico no qual o locus de globulina
20 endógena foi substituído pelo locus de globulina humana, assim permitindo produção de anticorpos humanos em tais animais (Jakobovits, A. Curr Opin Biotechnol 6:561-566 (1995)).

A invenção adicionalmente se refere a um método de produzir os anticorpos da invenção, compreendendo imunizar um animal com plexina
25 D1, ou uma célula expressando plexina D1, ou um ácido nucléico codificando plexina D1, ou partes do domínio extracelular de plexina D1, de forma que anticorpos contra plexina D1 são produzidos pelas células B do animal, isolar as células B do animal e fundir as células B a uma linhagem celular de mieloma para obter células imortalizadas que secretam o anticorpo. O animal

preferivelmente é um animal transgênico tendo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humana e um transgene de cadeia leve humana de forma que o anticorpo resultante é humanizado.

Em uma forma de realização, o método inclui imunizar um animal de laboratório com um peptídeo sintético, escolhido a partir do domínio extracelular de plexina D1, por exemplo peptídeo 47-63 correspondendo ao término amino da sequência de aminoácidos de plexina D1 madura. Imunizações entretanto são preferivelmente feitas com domínios extracelulares recombinantes, preferivelmente uma região com baixa similaridade com outros membros da família das plexinas, por exemplo uma região compreendendo aminoácidos 47-546, carecendo das Sequências Relacionadas a Met. Ditos domínios extracelulares de plexina D1 recombinante podem ser produzidos em células de E.coli inserindo os ácidos nucléicos de codificação em um vetor de expressão procariótico adequado, por exemplo sob controle do promotor de β -galactosidase, transformação de células de E.coli com dito vetor, e isolamento das proteínas recombinantes de corpos de inclusão purificados. É preferido entretanto que anticorpos sejam evocados por imunização com dito domínio extracelular de plexina D1 recombinante que é produzido por células eucarióticas, portanto contendo modificações pós-traducionais que são muito similares àquelas presentes em plexina D1 nativa, por exemplo por células de ovário de hamster chinês (CHO) depois de transfecção com um vetor, contendo os ácidos nucléicos de codificação para ditos domínios extracelulares sob o controle de um promotor de citomegalovírus. Fragmentos de plexina D1 extracelular recombinante podem ou não estar fundido a etiquetas facilitando purificação, e.g. uma etiqueta VSV ou uma região constante de uma cadeia pesada de uma imunoglobulina.

O método de produzir o anticorpo também pode compreender clonar as regiões de codificação de anticorpo a partir de ditas células B

específicas para plexina D1 em um vetor de expressão e expressar a sequência de codificação. Em uma forma de realização preferida o vetor de expressão é pHENIXHISVSV, possibilitando expressão por células hospedeiras de E.coli do anticorpo, flanqueado na extremidade carboxiterminal por um Vírus de Estomatite Vesicular (VSV-etiqueta) e uma etiqueta His*8. A etiqueta VSV é pretendida para facilitar detecção imunohistoquímica, usando anticorpos específicos. A etiqueta His*8 é pretendida para facilitar purificação baseada em cromatografia de afinidade de Níquel. Outros vetores de expressão podem ser usados da mesma maneira.

10 Mais especificamente a invenção fornece um anticorpo A12 de domínio único isolado, tendo uma constante de dissociação de menos do que 2×10^{-8} M, que se liga ao término amino de plexina D1 e que detecta plexina D1 em corantes imunohistoquímicos e volta para vasos sanguíneos de tumor expressando plexina D1, e também a um anticorpo F8 de domínio único
15 isolado, tendo uma constante de dissociação de menos do que 3×10^{-8} M, que se liga ao término amino de plexina D1 e que detecta plexina D1 em corantes imunohistoquímicos e volta para vasos sanguíneos de tumor expressando plexina D1-. Ambos anticorpos de domínio único isolados podem ser fundidos à região constante de uma cadeia pesada de IgG1 humana ou à região
20 constante de uma cadeia pesada de IgG1 de camundongo.

Preferivelmente anticorpos completamente humanos são usados dentro do escopo da invenção. Em outra forma de realização, anticorpos humanizados ou derivados de animal de laboratório podem ser usados.

25 A invenção fornece adicionalmente anticorpos biespecíficos que têm uma especificidade de ligação para plexina D1, e uma especificidade de ligação para uma célula apresentando antígeno humano, ou para um receptor de Fc, caracterizados pelo fato de que o receptor de Fc é um receptor de Fc(gama)R1 ou de um Fc(alfa) humano.

A invenção também fornece moléculas de ácido nucléico codificando os anticorpos preferidos, ou porções de ligação de antígeno. Vetores de expressão recombinante que incluem ácidos nucléicos que codificam os anticorpos da invenção, assim como células hospedeiras transfectadas com tais vetores, também são abrangidos na invenção.

Outras moléculas de ligação para uso na invenção são moléculas pequenas que se ligam especificamente a Plexina D1. O termo "molécula pequena" freqüentemente se refere a moléculas com pesos moleculares de 500 ou abaixo. O termo é comumente usado atualmente e assim claro para a pessoa versada. Além disso, bibliotecas de molécula pequena já estão disponíveis ou estão sendo desenvolvidas. Um exemplo de tal biblioteca é a NIH Molecular Libraries Small Molecule Repository (MLSMR). Tais bibliotecas são sujeitas a Triagem de Alto Desempenho (HTS) para identificar moléculas que se ligam a to plexina D1. A invenção também se refere às moléculas pequenas que resultam de uma triagem de tais bibliotecas.

Outros compostos que podem ser usados de acordo com a invenção compreendem peptídeos ou aptâmeros (Ulrich, Med. Chem. 1(2):199-208 (2005)) que se ligam a domínios extracelulares de plexina D1 e com isso interferem em ligação de ligantes de plexina D1 a plexina D1. Reciprocamente, tais peptídeos ou aptâmeros também podem se ligar aos sítios de ligação de plexina D1 dos ligantes de plexina D1 e com isso interferir em ligação de ligante a plexina D1.

Para interferir na expressão do gene de plexina D1 outro tipo de molécula de ligação é usado, em particular siRNA, RNA antisentido ou fosfotio-nucleotídeos antisentido.

RNA (siRNA) de pequena interferência compreende pequenas fitas de RNA que interferem na tradução de RNA mensageiro. SiRNA se liga à porção complementar do RNA mensageiro alvo e marca ele para

degradação assim inibindo expressão gênica. Isto é comumente conhecido como "silenciamento" de gene. SiRNA normalmente é de 21 a 23 nucleotídeos de comprimento. RNA antisentido é uma molécula de RNA transcrita a partir da fita de codificação, ao invés do que do modelo, de DNA, de forma que ele é complementar ao mRNA sentido. Formação de um duplex entre as moléculas de RNA sentido e antisentido bloqueia tradução e também pode sujeitar ambas as moléculas a nucleases específicas de dupla fita assim inibindo expressão do gene. Inibição de expressão do gene pode ser usada para bloquear angiogênese e migração de células tumorosas e macrófagos.

10 Preferivelmente, as moléculas de ligação descritas acima se ligam a plexina D1, seu gene ou seu ligante em células eucarióticas. Ditas moléculas especificamente se acumulam em tumores com injeção intravenosa ou especificamente se acumulam em vasos sanguíneos de tumor mediante injeção intravenosa.

15 Os anticorpos, fragmentos destes, moléculas pequenas e outros compostos proteináceos que irão se ligar a plexina D1 podem ser usados de várias maneiras.

Em uma forma de realização, a invenção se refere a compostos que se ligam à parte extracelular de plexina D1 e cuja ligação resulta em interferência de função de plexina D1. Alternativamente, a invenção se refere a compostos que se ligam ao domínio intracelular de plexina D1 e que previnem sinalização por plexina D1.

25 Em uma forma de realização específica tais moléculas de ligação se ligam a plexina D1 para interferir na formação de complexos multicomponentes de membrana inibindo ligação de ligantes de plexina D1, em particular neuropilina-1, neuropilina-2, semaforina 3C, semaforina 3E, VEGF-receptor 1, VEGF-receptor-2 ou VEGF-A, com plexina D1. Tais moléculas de ligação levam a inibição de sinalização de GTPase induzida por ligante de plexina D1 ou a inibição de migração de células expressando

plexina D1, em particular células endoteliais associadas a tumor, células tumorosas ou macrófagos.

De acordo com outro aspecto desta invenção se refere a um método de induzir lise de uma célula expressando plexina D1, compreendendo
5 colocar em contato uma célula expressando plexina D1 com as moléculas de ligação, em particular os anticorpos, da invenção na presença de células efectoras humanas, de forma que lise da célula expressando plexina D1 ocorra.

Em uma forma de realização ainda adicional a molécula de ligação é combinada com ou acoplada a um composto efetor que pode
10 detectar a presença de plexina D1 para propósitos diagnósticos ou que pode realizar um efeito na célula expressando plexina D1. O composto efetor diagnóstico ou terapêutico pode ser diretamente acoplado à molécula de ligação ou pode estar presente em um veículo de transporte, tal como um nanodispositivo, em particular um lipossomo ou polimersomo, que está
15 acoplado à molécula de ligação. Alternativamente, a molécula de ligação pode ser um anticorpo biespecífico que se liga tanto a plexina D1 como ao composto efetor assim marcando o composto efetor para o sítio ou célula onde plexina D1 é expressa.

A invenção assim fornece em uma forma de realização
20 particular desta o uso de tais moléculas de ligação em um método de diagnosticar uma doença mediada por expressão de plexina D1, cujo método compreende liberação intravenosa das moléculas de ligação de plexina D1 proteináceas, aptaméricas ou de molécula pequena, conjugadas a um composto efetor permitindo detecção in vivo das moléculas de ligação.

25 Compostos efetores diagnósticos são por exemplo radioisótopos ou agentes de contraste para Formação de imagem por ressonância magnética (MRI), tal como gadolínio-DTPA, ou corantes fluorescentes.

Exemplos de substância radioativa compreendem, mas não são

limitados a tecnécio-99m (^{99m}Tc), iodo-123 (^{123}I), iodo-131 (^{131}I), rênio-186 ou -188 ($^{186/188}\text{Re}$), gálio-67 (^{67}Ga) as substâncias emitindo radiação beta ítrio-90 (^{90}Y) ou lutécio-177 (^{177}Lu), os isótopos emitindo positron Flúor-18 (^{18}F) e Carbono-11 (^{11}C). Tais radioisótopos podem ser usados ou para detectar ou danificar ou matar células expressando plexina D1. Normalmente isótopos diferentes são usados para diagnose e terapia. A pessoa versada é bem consciente de que isótopo usar para que tecido e para que tipo de uso.

Em outra forma de realização, as moléculas de ligação proteináceas, aptaméricas e moleculares pequenas para uso na invenção podem ser combinadas com ou acopladas a um agente tóxico, tal como agente quimioterápico ou diretamente ou em um veículo de transporte, em particular um nanodispositivo, tal como um lipossomo ou polímersomo.

Em outra forma de realização, uma entidade de ligação de plexina D1 da invenção é acoplada a um ou mais agentes quimioterápicos selecionados a partir do grupo consistindo de mostardas de nitrogênio (e.g., ciclofosfamida e ifosfamida), aziridinas (e.g., tiotepa), alquil sulfonatos (e.g., busulfan), nitrosoureas (e.g., carmustina e estreptozocina), complexos de platina (e.g., carboplatina e cisplatina), agentes alquilantes não clássicos (e.g., dacarbazina e temozolamida), análogos de folato (e.g., metotrexato), análogos de purina (e.g., fludarabina e mercaptopurina), análogos de adenosina (e.g., cladribina e pentostatina), análogos de pirimidina (e.g., fluorouracil (sozinho ou em combinação com leucovorina) e gemcitabina), uréias substituídas (e.g., hidroxiuréia), antibióticos antitumor (e.g., bleomicina e doxorubicina), epipodofilotoxinas (e.g., etoposídeo e teniposídeo), agentes de microtúbulo (e.g., docetaxel e paclitaxel), análogos de camptotecina (e.g., irinotecano e topotecano), enzimas (e.g., asparaginase), citocinas (e.g., interleucina-2 e interferon-[alfa]), anticorpos monoclonais (e.g., trastuzumabe e bevacizumabe), toxinas e imunotoxinas recombinantes (e.g., toxina de cólera-

B recombinante e TP-38), terapias gênicas de câncer, e vacinas de câncer (e.g., vacina contra telomerase).

Agentes quimioterápicos preferivelmente são selecionados a partir do grupo consistindo de doxorubicina, cisplatina, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucil e ciclofosfamida hidroxauréia. Outros compostos são conhecidos pela pessoa versada na arte.

Um tumor também pode ser tratado bloqueando seu abastecimento de sangue induzindo trombose local na vasculatura de tumor. As moléculas de ligação da invenção podem ser, nesta forma de realização, usadas para marcar moléculas indutoras de trombose, tal como o co-fator TF de coagulação sanguínea (Fator de Tecido), uma entidade radioativa ou uma toxina, tal como ricina para o sítio do tumor. Compostos efetores podem ser acoplados com a molécula de ligação, em particular uma molécula de ligação de plexina D1, ou podem estar presentes em um nanodispositivo, tal como um lipossomo ou polimersomo, que é acoplado à molécula de ligação de plexina D1.

Um método alternativo de tratar câncer ou uma desordem inflamatória de acordo com a invenção é com boro. As moléculas de ligação da invenção podem ser conjugadas a veículos de transporte, em particular nanodispositivos, tal como lipossomos ou polimersomos, que são carregados com boro para obter uma composição terapêutica. Depois de liberação e acumulação desta composição na área doente, esta área é irradiada com nêutrons, resultando em emissão de partículas alfa radioativas e citotóxicas que danificam ou matam as células endoteliais de tumor, células tumorosas e/ou macrófagos ativados.

É desejável que para marcação de vaso sanguíneo de tumor anticorpos tenham altas afinidades para plexina D1, por exemplo maior do que 10^{-8} , preferivelmente maior do que 10^{-9} , mais preferivelmente maior do que 10^{-10} M. Alta afinidade e o alto peso molecular de anticorpos entretanto

irá restringir penetração em tecido de tumor. Portanto, os ácidos nucleicos que codificam ditos anticorpos monoclonais, obtidos através de clonagem por RT-PCR, podem ser usados para gerar derivados de anticorpos, por exemplo anticorpos que carecem da região constante e são monovalentes, ou
5 fragmentos de anticorpos que são adaptados a afinidades ótimas para marcação de vaso sanguíneo ou penetração em tumor por procedimentos mutagênicos. Estes derivados de anticorpos terão afinidades menores e pesos moleculares menores e terão propriedades melhoradas de marcação de célula tumoral.

10 Diferentes moléculas de ligação da invenção podem ser combinadas em uma mistura. Em uma forma de realização específica os membros da mistura têm uma afinidade variada. Um exemplo de uma tal combinação é uma mistura de anticorpos monoclonais e/ou fragmentos de anticorpos ou uma mistura de anticorpos com moléculas pequenas. Os
15 anticorpos monoclonais tendo alta afinidade podem ser usados para marcar vasos, ao passo que os fragmentos menores tendo uma afinidade inferior são mais capazes de penetrar e atingir as células tumorais. Alternativamente, uma mistura de moléculas de ligação de plexina D1 pode ser usada junto com moléculas de ligação de ligante de plexina D1 e/ou com moléculas que se
20 ligam a ácidos nucleicos codificando plexina D1. Ou moléculas de ligação de ligante de plexina D1 podem ser combinadas com moléculas que se ligam a ácidos nucleicos codificando plexina D1.

As moléculas de ligação de plexina D1 da invenção podem ser usadas em um método de tratar uma doença mediada por expressão de plexina
25 D1, compreendendo liberação intravenosa das moléculas de ligação da invenção em uma dose, efetiva para tratar aquela doença.

As moléculas de ligação também podem ser usadas em um método de diagnosticar uma doença mediada por expressão de plexina D1, compreendendo liberação intravenosa de conjugados de moléculas de ligação

de plexina D1 com um traçador paramagnético, fluorescente ou radioativo seguido por formação de imagem por ressonância magnética, formação de imagem ótica, SPECT ou PET.

As moléculas de ligação podem ser adicionalmente usadas em um método de tratar ou suprimir uma doença mediada por expressão de plexina D1, compreendendo liberação intravenosa das moléculas de ligação proteináceas e moleculares pequenas da invenção ou uma composição de moléculas de ligação proteináceas e moleculares pequenas.

A doença a ser tratada ou diagnosticada pode ser câncer, uma doença inflamatória, em particular uma doença autoimune, tal como artrite reumatóide, ou arteriosclerose, ou esclerose múltipla.

Diagnose pode ser realizada in vivo e in vitro. Um método in vivo é descrito acima e pode ser realizado com formação de imagem por ressonância magnética (MRI) ou com câmeras SPECT ou PET depois de acumulação da molécula de ligação radioativamente marcada no tecido doente.

Outro método diagnóstico compreende detectar a presença de plexina D1 em uma amostra in vitro ou ex vivo. Tal método compreende colocar em contato a amostra com moléculas de ligação de plexina D1, ou ácidos nucleicos que se ligam ao gene de plexina D1 ou seu mRNA ou um DNA de cópia derivada de seu mRNA, todos ligados a um marcador detectável, em condições que um complexo entre o anticorpo e plexina D1 se forma, e detectar a formação do complexo. O complexo pode ser detectado visualizando o marcador detectável. Amostras podem ser fluidos corporais, tal como sangue, soro, plasma, saliva, urina, sêmen, fezes, ou tecidos, tal como biópsias de células tumorosas.

A invenção adicionalmente se refere a um vetor de expressão, compreendendo a sequência de codificação para anticorpo de Lhama F8 ou A12, ou para o anticorpo de cadeia única derivado de anticorpo 11F5H6 e

seqüências reguladoras adequadas. A invenção também se refere a uma célula transfectada com o dito vetor de expressão. A invenção adicionalmente se refere à proteína recombinante viável expressando o vetor de expressão.

5 Outro aspecto da invenção se refere a um vetor de expressão, compreendendo a seqüência de codificação para o domínio extracelular de plexina D1, opcionalmente fundida a uma região constante de uma cadeia pesada humana e seqüências reguladoras adequadas. A invenção também se refere a uma célula transfectada com o dito vetor de expressão. A invenção adicionalmente se refere à proteína recombinante obténível expressando o
10 vetor de expressão.

 A proteína recombinante compreende o domínio extracelular de plexina D1, que se liga a ligantes de plexina D1 e assim previne ligação dos ligantes a plexina D1 associada à célula. Preferivelmente, a seqüência de codificação codifica para uma proteína recombinante compreendendo
15 aminoácidos 47-506 do domínio extracelular de plexina D1, que se liga a ligantes de plexina D1 e assim previne ligação dos ligantes a plexina D1 associada à célula, ou aminoácidos 507-1274 do domínio extracelular de plexina D1, que se liga a ligantes de plexina D1 e assim previne ligação dos ligantes a plexina D1 associada à célula. Tal proteína recombinante pode
20 carregar mutações que aumentam a afinidade para ligantes de plexina D1 e com isso tendo potência aumentada como receptor de atração. Tais mutações normalmente são induzidas fazendo mudanças na seqüência de codificação usada para produzir a proteína recombinante.

 A invenção adicionalmente se refere ao uso das moléculas de
25 ligação da invenção em um método de tratar ou suprimir uma doença mediada por plexina D1, compreendendo liberação intravenosa ou intratumoral de domínios extracelulares de plexina D1 de atração como descrito acima, ou em um método de tratar ou suprimir uma doença mediada por plexina D1, compreendendo liberação intravenosa de adenovírus ou lentivírus, contendo

os nucleotídeos de codificação para os domínios extracelulares recombinantes de plexina D1 ou partes destes como descrito acima.

Estes receptores antagonísticos de plexina D1 de atração interferem na interação entre plexina D1 e seus ligantes, em particular neuropilina-1, semaforina 3C e semaforina 3E, e com isso interferem em
5 função de plexina D1.

Preferivelmente, os receptores de plexina D1 de atração têm afinidade aumentada para ligantes de plexina D1, se comparados com plexina D1. Tal afinidade aumentada pode ser obtida criando uma biblioteca de
10 domínios extracelulares de plexina D1, carregando em mutações aleatórias introduzidas, e selecionando receptores de atração com o mais potente comportamento antagonístico em ensaios de migração celular.

A fim de produzir ditas moléculas proteináceas (incluindo peptídeos, polipeptídeos e polipeptídeos glicosilados ou polipeptídeos tendo
15 outras modificações pós- ou peritraducionais) é desejável inserir o ácido nucléico recombinante que codifica fragmentos do domínio extracelular de plexina D1 que compreendem os sítios de ligação para semaforina 3C, semaforina 3E e NP-1 em vetores de expressão. Os antagonistas de acordo com a invenção preferivelmente são produzidos a partir de um ácido nucléico
20 ou um vetor de expressão de acordo com a invenção, preferivelmente em uma célula hospedeira.

As moléculas da invenção também podem ser usadas em uma combinação de métodos de tratamento como descrito acima e/ou com terapias convencionais ou terapia anti-angiogênica para prevenir adicionalmente a
25 formação de uma neovasculatura de tumor, ou radioterapia e/ou quimioterapia adjuvante.

A invenção adicionalmente se refere a um método para identificar moléculas que são capazes de se ligar a plexina D1, cujo método compreende colocar em contato uma coleção de moléculas com plexina D1 e

selecionar as moléculas da coleção que mostram ligação com plexina D1 como moléculas de ligação de plexina D1. A coleção de moléculas pode por exemplo estar presente em bibliotecas de molécula pequena, em um arranjo protéico, etc. As técnicas para triar coleções de moléculas são conhecidas por si só. A invenção reside na identificação do alvo que deve ser ligado, que é plexina D1.

Neste pedido o termo "molécula de ligação" é usado para todos os tipos de moléculas de ligação, i.e. aquelas que se ligam a plexina D1, aquelas que se ligam a um ácido nucléico codificando o gene de plexina D1 e aquelas que se ligam a ligantes de plexina D1.

Todos estes tipos de moléculas podem ser acoplados a compostos efetores como descrito acima.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A presente invenção será adicionalmente ilustrada nos Exemplos que seguem e que não são de maneira alguma pretendidos para limitar a invenção. Nos Exemplos referência é feita às seguintes figuras:

Figura 1: Domínios estruturais de membros da família de plexina: quatro subfamílias foram identificadas, denominadas plexina A-D. Caixas hachuradas horizontalmente indicam domínios Sema, caixas hachuradas diagonalmente indicam motivos de seqüências relacionadas a Met (MRS), e a caixa clara indica o atípico motivo de MRS de PLXND1. Membros da subfamília B de Plexina têm um sítio proteolítico potencial tipo furina, marcado por uma banda cinza. A região transmembrana é marcada por uma caixa sombreada e é seguida por dois domínios intracelulares conservados, juntos compreendendo o domínio SP, marcado por duas ovas.

Figura 2: A) Análise de hibridização in situ de lesões cerebrais Me157- VEGF-A165 usando uma sonda de RNA plxndl específica de camundongo marcada com digoxigenina. Vasos de tumor são fortemente positivos (setas) ao passo que capilares cerebrais, distantes das lesões, são

negativos (compare o perfil de ISH com a marcação com CD34 em Figura 2B).

Figura 3: Análise ISH específica para PLXND1 humano de glioblastoma multiforme (A) metástases cerebrais de sarcoma (B), melanoma (C) e mamacarcinoma (D). Inserções mostram marcações com CD31 de seções em série. ISH de controle usando sondas sentido foram negativos (não mostrado). Observe que nestes tumores expressão de PLXND1 não é confinada aos vasos sanguíneos: também em células tumorosas altos níveis do transcrito de PLXND1 são encontrados. t=tumor, V=vaso.

Figura 4: Análise ISH usando uma sonda de RNA marcada com digoxigenina específica de humano (A) e marcação imunohistoquímica com CD31 (B) de cérebro normal. Observe que vasos estão abundantemente presentes mas estes não expressam o transcrito de plexina D1.

Figura 5: Especificidade de fagos (A) e anticorpos de domínio único correspondentes (sdabs) (B) A12 e F8 para peptídeo H2N-ALEIQRRFPSPTPTNC-CONH2. Em A, 101° fagos foram permitidos se ligarem a PLXND1-peptídeo, BSA, IgG humana ou peptídeo irrelevante como descrito no texto. Depois de rigorosa lavagem, fagos ligados foram detectados usando um anticorpo anti-M13. Em B, incubações similares foram realizadas mas agora com sdabs solúveis. Depois de lavagem, sdabs ligados foram detectados e semiquantificados através da VSV-G-etiqueta.

Figura 6: As constantes de dissociação (kd's) da ligação entre anticorpos A12 e F8 de domínio único foram determinadas usando o biosensor de Biacore 2000 (Uppsala, Sweden). O circuito integrado sensor e produtos químicos de acoplamento de proteína foram adquiridos a partir de Biacore AB. Conjugado PLXND1-peptídeo-KLH (27 pg/ml em Na-Acetato, pH 4,0) ou BSA (1 pg/ml em Na-Acetato, pH 5,0) foi acoplado a superfícies ativadas de CM5 usando N-etil-N'-(dimetilaminopropil) carbodiimida, N-hidroxissuccinimida, em condições recomendadas pelo fabricante. Grupos não

tratados foram inativados por 1 M de etanolamina, pH 8,5.

Medidas cinéticas foram realizadas a 25°C com uma vazão de 10 ml/min em tampão HBS-EP (10 mM de Hepes, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,005% de tensoativo P20). Seis concentrações de sdabs purificados por afinidade de Ni (no intervalo de 1 mM a 50pM) foram usadas para determinar as constantes de dissociação (K_{ds}) da interação com o PLXND1-peptídeo. Depois de cada experimento, regeneração da superfície de sensor foi realizada com 10 mM de NaOH.

Ligação específica, definida por ligação com uma superfície de PLXND1 menos ligação com uma superfície de BSA de controle, foi analisada usando o aplicativo computacional BLAevaluation 4.1 e um modelo de ligação de Langmuir 1:1. Afinidades de anticorpos A12 e F8 de domínio único foram $2,1 \times 10^{-8}$ M e $3,5 \times 10^{-8}$ M.

Figura 7: Avaliação de especificidade para plexina D1 de anticorpos de domínio único. Figura A mostra marcação imunohistoquímica da placa de crescimento de osso trabecular de um embrião de camundongo (E16.5) com anticorpo A12 de domínio único, utilizando a etiqueta VSV-G para detecção do anticorpo. A inserção mostra uma hibridização in situ de uma estrutura embriônica similar usando uma sonda de plexina D1 marcada com digoxigenina específica de camundongo. Observe a sobreposição de hibridização in situ de e imunomarcação de plexina D1. Figura 7B é um exemplo representativo de uma lesão Me157- VEGF-A165 em cérebro de um camundongo nu. A vasculatura que também é positiva em plexina D1 ISH (veja também figura 2) é imunopositiva com anticorpo F8 de cadeia única.

Figura 8: Imunomarcações com anticorpo Alt de cadeia única em uma seleção de tumores cerebrais humanos. Tumores mostrados são A) glioblastoma multiforme, metástases de B) melanoma C) mamacarcinoma e D) carcinoma de célula renal. As inserções em A e B consistem de marcações de controle com anticorpo anti-VSV apenas, e mostram que a marcação de

tumor é específica. Observe que vasos e células tumorosas são altamente reativos com o anticorpo.

Figura 9: Imunomarcações com anticorpo Al2 de domínio único em uma série de progressão de melanoma. Imunomarcações foram realizadas em um naevi, um naevi displásico e fases de crescimento horizontal e vertical de melanoma. Observe que apenas as células neoplásicas expressam plexina D1.

Figura 10: Imunomarcações com anticorpo Al2 de domínio único em seções de tumores cerebrais Me157-VEGF-A em camundongos, tratados com ZD6474. Em camundongos não tratados ou tratados com placebo, vasos de tumor marcam positivos com este anticorpo.

Entretanto, em camundongos tratados com ZD6474, existe uma diminuição dose-dependente de expressão de plexina D1. ZD6474 foi dado oralmente, uma vez por dia, na dosagem como indicado.

Figura 11: Imunomarcações duplas com o marcador de macrófago CD68 (colorido azul) e anticorpo Al2 de cadeia única (colorido vermelho) em mamacarcinoma. Uma subpopulação de macrófagos expressa plexina D1 como revelado por proteína de marcação roxa.

Figura 12: Rastreamento in vivo de fago Al2, F8 ou um fago irrelevante para lesões cerebrais Me157-VEGF165. Camundongos portando tumor foram injetados com 10¹² fagos na veia caudal e depois de 5 minutos camundongos foram anestesiados e sujeitos a perfusão cardíaca com 15 ml de salina tamponada com fosfato. Camundongos foram sacrificados, cérebros removidos e seções congeladas foram analisadas para teor e distribuição de fagos. A) Marcação com M13 de uma seção congelada de lesões cerebrais Me157-VEGF165. Fagos são claramente associados a vaso, como evidenciado pela imunomarcação com anti-CD34 em uma seção serial, mostrada em B). O ponto de setas em um vaso positivo para CD34, distante da lesão, que não é destacado por marcação com anti-M13. A inserção em (A)

mostra um experimento de controle onde um fago irrelevante foi injetado. C) Distribuição de sdab F8 depois de injeção intravenosa em camundongos portando tumor. Sdabs são visualizados por imunohistoquímica usando um anticorpo anti-VSV. Observe que o sdab é detectado em vasos de tumor mas não em capilares cerebrais normais. A inserção mostra o experimento de controle onde um sdab irrelevante foi injetado. Uma localização intersticial foi observada, consistente com a natureza vazada dos vasos nestes tumores. D) Quantificação de rastreamento de fagos. Tecido de tumor foi dissecado a partir de seções congeladas de 10 µm usando microscópio de dissecação por captura a laser. Número de fagos formadores de colônia (cfp) foi contado depois de infecção de células TG1. Vinte vezes mais fagos F8 foram eluídos de tumores do que de áreas comparáveis de tecido cerebral não afetado.

Figura 13: Anticorpo de domínio único volta para vasos de tumor que não são recentemente formados por si. Camundongos nus foram inoculados com uma suspensão celular de $1,5 \times 10^5$ células do xenotransplante de glioma humano E98, que foi obtida a partir de um tumor E98 subcutâneo. Depois de 3 semanas, fagos carregando anticorpo F8 de domínio único foram injetados na veia caudal, e depois de 5 minutos camundongos foram anestesiados e sujeitos a perfusão cardíaca usando 15 ml de salina tamponada com fosfato. Camundongos foram então sacrificados, cérebros removidos e fixados em formalina. Seções seriais foram marcadas com anticorpos contra proteína M13 p8 (A), o marcador endotelial CD34 (B) e glut-1 (C, um marcador para capilares cerebrais pré-existentes). Comparação de A, B e C revela que não apenas vasos de tumor recentemente formados acumulam fago F8, mas também vasos cerebrais não dilatados que expressam glut-1 e que portanto são considerados vasos cerebrais pré-existentes que foram incorporados no tumor.

Figura 14: Efeitos de domínios extracelulares de plexina D1 no desenvolvimento de vasculatura de tumor. Transfectantes duplos da linhagem

celular Me157 de melanoma humano, expressando VEGF-A165 e o domínio extracelular de plexina D1 compreendendo aminoácidos 1-850, foram injetados na artéria carótida interna direita de camundongos nus. Depois de três semanas os camundongos foram sujeitos a formação de imagem por ressonância magnética estimulado por Gadolínio-DTPA. Figura 14A mostra imagens MR de dois camundongos de controle carregando tumores cerebrais Me157 que expressam VEGF-A165 apenas, Figura 14B mostra imagens MR de cérebros de dois camundongos carregando o transfectante duplo. Extravasamento vascular, como ensaiado por extravasamento com Gd-DTPA, tende a ser menor nos transfectantes duplos, sugerindo que extravasamento vascular induzido por VEGF-A é contrabalançado pelo ectodomínio de plexina D1. Mais importante, vasos sanguíneos nos tumores duplamente transfectados são ativados, como indicado por aumento de CD34, ainda que eles expressem glut-1, sugerindo fortemente que estes vasos são vasos pré-existent que estão incorporados no tumor pelo fenômeno de co-opção. Observe que os vasos sanguíneos nos tumores expressando VEGF-A165 apenas, são negativos para glut-1 e portanto podem ser considerados como sendo recentemente formados.

Figura 15: Western blots foram gerados com ectodomínios de plexina D1 recombinante, expressos em E.coli e abrangendo aminoácidos 47-506 (linhas 1) ou 225-388 (linhas 2). Soro de camundongo foi testado antes de (painel A) e depois de (painel B) imunização com região 47-506 de plexina D1. Como mostrado em figura 15B, o soro imune de camundongo reconheceu especificamente proteína recombinante 47-506 de E.coli (52 kDa, linha 1) e a proteína abrangendo resíduos 225-388 de plexina D1 (uma proteína de 18 kDa que fica completamente dentro da sequência que foi usada para imunização, linha 2). O soro pré-imune não mostrou uma tal reatividade (painel A). Quando testado em corantes imunohistoquímicos em uma metástase cerebral de um sarcoma de tecido macio alveolar, o soro imune de

camundongo (painel D), mas não o soro pré-imune (painel C), mostrou positividade para vasos sanguíneos e células tumorosas, um padrão de marcação que foi similar àquele de anticorpo A12 de domínio único.

Figura 16: Imunohistoquímica com anticorpos monoclonais IgM, obtidos a partir de linfócitos B de camundongo. Anticorpos 11F5H6 e 17E9C12 foram selecionados baseado em reatividade contra proteína 47-506 em ELISA, e foram analisados para seu potencial de detectar plexina D1 em seções congeladas de tumores humanos. Estes anticorpos mostraram forte positividade em metástases cerebrais de sarcoma e melanoma, como ilustrado na figura. De importância, as inserções em painéis C-F representam marcações de controle nas quais o anticorpo primário foi omitido. Painéis A e B mostram que estes anticorpos não reconhecem particularmente estruturas de vasos em tecido cerebral normal.

Figura 17: Rastreamento de tumor de anticorpo 11F5H6

Para avaliar adicionalmente se anticorpo monoclonal 11F5H6 é capaz de reconhecer vasos sanguíneos de tumor, tumores angiogênicos Me157-VEGF-A foram crescidos em cérebros de camundongos nus, essencialmente como descrito em exemplo 10. Anticorpo 11F5H6 (1 mg) foi injetado em uma veia caudal lateral e permitido para circular por 15 minutos. Depois deste período, os camundongos foram anestesiados com 1,3% de isoflurano e o tórax foi aberto, com o qual uma perfusão cardíaca foi realizada com 20 ml salina tamponada com fosfato. Depois deste procedimento, camundongos foram decapitados, e cérebros removidos e imediatamente congelados ou fixados em formalina. Seções congeladas de 4 μ m foram marcadas com anticorpo anti-IgM. Em figura 17A é mostrado que anticorpo 11F5H6 volta para e se acumula em vasos de tumor mas não em vasos normais (compare marcação com anti-IgM em figura 17A com a marcação com CD31 anti-endotelial em figura 17B). Tal marcação não é vista quando realizando marcação com anti-IgM em camundongos não injetados. Assim,

11F5H6 é um anticorpo promissor que permite marcação de tumor.

Figura 18: Expressão de Plexina D1 em macrófagos em um modelo de camundongo de artrite reumatóide. Marcações foram realizadas com anticorpo A12 de domínio único

5 Figura 19: Expressão de Plexina D1 em arteriosclerose. Um subconjunto de macrófagos em placas ateroscleróticas humanas expressa plexina D1. Marcações foram realizadas com anticorpo A12 de domínio único. Uma marcação dupla foi realizada, apresentando plexina D1 em vermelho e o marcador de macrófago CD68 em azul. Uma cor roxa indica co-expressão.

10 As tabelas mostram o seguinte:

Tabela I: Análise de diferentes patologias para expressão de plexina D1.

Tabela II: Expressão de plexina D1 em lesões melanocíticas aumenta de lesões benignas para malignas

15 EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Expressão específica de plexina D1 em vasos sanguíneos associados a tumor

20 Plexina D1 é expressa em neurônios mas também células endoteliais em vasos angiogênicos durante embriogênese. A presente invenção demonstra que plexina D1 é expressa em vasos sanguíneos associados a tumor mas não em vasos sanguíneos normais. Isto foi mostrado por hibridização in situ de cérebros de camundongo, contendo lesões angiogênicas de melanoma humano (Figura 2). O modelo de tumor de animal é descrito em (Kusters, B et al., Cancer Res 63:5408-5413 (2003)). Em resumo, células tumorosas são injetadas através de um procedimento microcirúrgico na artéria carótida direita, resultando em crescimento de tumor no parênquima do hemisfério cerebral direito. Depois de três semanas, no início de sintomas neurológicos, camundongos são

25

sacrificados e cérebros removidos e fixados em formalina.

Seções de 4 pm foram sujeitas à hibridização in situ com fragmentos de RNA sentido e antisentido marcados com digoxigenina. Sondas de RNA foram geradas por transcrição usando RNA polimerase T3 e T7, respectivamente, a partir de um produto de PCR, abrangendo 600 bases na região 3' não traduzida, e que foi flanqueado por promotores de T7 e T3 (Van der Zwaag et al. (2002), acima).

Hibridizações in situ usando sondas de RNA antisentido e sondas de RNA sentido como controles negativos, foram realizadas usando protocolos padrão. Seções foram desparafinadas por parafina derretida a 60°C e tratamentos subsequentes com xileno e etanol. Depois de reidratação em salina tamponada com fosfato (PBS) uma digestão com proteinase K foi realizada (10 pg/ml PBS em 20 mM de Tris-HCl pH7,4/5 mM de EDTA) por 15 minutos a 37°C. Seções foram pós-fixadas em 4% de formaldeído tamponado por 10 minutos, e acetiladas em 0,1 M de anidrido de ácido acético. Lâminas foram lavadas subsequentemente em 2xSSC (citrato de sódio/cloreto de sódio) e milliQ. Depois de secagem, lâminas foram hibridizadas com sondas de RNA marcadas com digoxigenina durante a noite a 65°C em 50% de formamida/2xSSC.

Altos níveis de plexina D1 RNA foram observados em vasos de tumores angiogênicos Me157 (Figura 2) usando uma sonda de RNA de plexina D1 específica de camundongo. Células tumorosas também foram positivas para o transcrito. A homologia não perfeita entre plexina D1 de camundongo e humana resulta em um sinal mais fraco nas células tumorosas humanas usando a sonda de camundongo.

EXEMPLO 2

Expressão de plexina D1 em tumores

Para investigar expressão de RNA de plexina D1 RNA em amostras de tumores humanos, foram realizadas hibridizações in situ com

uma sonda de RNA de plexina D1 específica de humano. Altos níveis de expressão de RNA de plexina D1 foram encontrados em diversos tumores humanos, dos quais (glioblastoma multiforme, metástases cerebrais de sarcoma, carcinoma de célula renal, adenocarcinoma do cólon e da mama), tanto em vasculatura de tumor como células tumorosas. Um resumo de tipos de tumores expressando plexina D1 é dado em Tabela 1. Figura 3 mostra alguns exemplos de hibridizações in situ, e.g. um glioblastoma, uma metástase cerebral de melanoma e uma metástase cerebral de carcinoma de cólon. RNA de plexina D1 foi encontrado não apenas na vasculatura de tumor, mas também excessivamente nas próprias células tumorosas. Importaneamente como em figura 4A, nenhuma expressão de RNA de plexina D1 é observada em vasculatura de cérebro normal. Em figura 4B uma marcação com CD31 é mostrada, demonstrando que vasos abundantes estão presentes nestas seções.

EXEMPLO 3

Preparação de anticorpos contra plexina D1

Para detectar proteína plexina D1, anticorpos foram selecionados com afinidade para plexina D1. Para este fim, uma biblioteca de fago M13 pHENIX foi construída expressando anticorpos de Lhama V-H de domínio único, construídos por RT-PCR a partir de linfócitos B de Lhama como descrito (van Koningsbruggen, S et al., J Immunol Methods 279:149-161 (2003)). A população de cDNAs resultantes codificando fragmentos de anticorpo de domínio único (sdab) V-H foi ligada em fagomídeo vetor pHENIXHis8VSV (resultados não mostrados), resultando em um produto de fusão com uma etiqueta 8*His e uma etiqueta VSV-G no término C. Depois de eletroporação em células TG1 de E. coli, colônias resistentes a ampicilina foram coletadas e combinadas.

A biblioteca resultante teve uma complexidade de 8×10^8 clones. Oitenta por cento de plasmídeos tiveram inserto de sdab de

comprimento completo como determinado por análise de PCR e detecção imunológica dot-blot da etiqueta VSV-G em sdabs (veja abaixo). A biblioteca de fago foi propagada como fagomídeos em bactérias *E. coli* TG1. Partículas de fagomídeos foram resgatadas por infecção com fago ajudante sensível a tripsina M13K07 (50). Fagos foram purificados e concentrados a partir do sobrenadante de cultura por precipitação com 20% de Polietilenoglicol/2,5 M de NaCl através de metodologia padrão.

Para selecionar por fagos, anticorpos apresentados com afinidade para plexina D1, imunotubos (Nunc, Roskilde, Denmark) foram revestidos durante a noite a 4°C com 5 pg/ml de peptídeo conjugado de KLH (H2N-ALEIQRRFPSPTPTNC-CONH2), correspondendo a aminoácidos 1-16 da proteína PLXND1 humana madura (no. de acesso AY116661) em 50 mM de NaHCO3 (pH 9,6). De importância, o ácido glutâmico em posição 3 neste peptídeo é uma lisina na sequência de camundongo, os aminoácidos remanescentes são homólogos a *plxndl* de camundongo.

Depois de rigorosa lavagem com PBS/0,05% de Tween 20 (PBST), sítios de ligação não específicos foram bloqueados com 5% de maravilha em PBST (MPBST, 1 h em temperatura ambiente (RT)) e 1013 partículas de fagos do estoque de biblioteca foram incubadas com o peptídeo imobilizado por 90 min em RT. Depois de rigorosa lavagem com PBST e PBS, fagos ligados foram eluídos por tratamento com tripsina (10 mg/ml, 30 min RT).

Depois de inativação com tripsina com 1% de soro de bezerro recém-nascido, o eluato foi usado para infectar células TG1 em fase log para amplificar fagos de ligação de PLXND1 e calcular número de ligantes.

Para enriquecer para fagos de ligação, quatro ciclos de seleção foram realizados. A partir do segundo ciclo, seleções foram realizadas contra peptídeos não conjugados, imobilizados em placas de ligação de DNA (Costar) para prevenir seleção de ligantes de KLH.

Fagos de ligação de PLXND1 individuais com insertos de sdab de comprimento completo confirmados por PCR foram testados para especificidade para plexina D1. Poços de placas de ligação de DNA ou imunoplaças (Nunc) foram revestidos durante a noite a 4°C com PLXND1-peptídeo ou um peptídeo irrelevante (1 pg/poço em PBS/0,5 M de NaCl pH 9,0), Albumina de soro bovino (1 pg/poço em 50 mM de NaHCO₃ pH 9,6) ou imunoglobulina G humana (1 pg/poço em 50 mM de NaHCO₃ pH 9,6). Depois de bloquear sítios de ligação não específicos com MPBST, poços foram incubados com fagos em MPBST por 1 h em RT e fagos não ligados removidos por lavagem rigorosa. Fagos ligados foram detectados usando anti-M13 conjugado a HRP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) e tetrametilbenzidina (TMB; bioMerieux B.V., Netherlands). A reação foi interrompida com 2M de H₂SO₄ e atividade enzimática quantificada medindo absorbância em 450 nm usando um leitor de ELISA.

Usando este procedimento de seleção, fagos apresentando anticorpos A12 e F8 de domínio único V-H em suas superfícies foram identificados como ligantes específicos. Figura 5A mostra que anticorpos A12 e F8 associados a fago M13 se ligam especificamente a peptídeo plexina D1, mas não a albumina de soro bovino, imunoglobulinas ou um peptídeo irrelevante.

Expressão de anticorpos de domínio único solúveis foi induzida em células TG1 em fase log de E.coli cultivando a 30°C em 2x meio TYA /1 mM de IPTG. Sdabs foram coletados por lise osmótica usando tampão TES congelado (200mM de TrisHCl, 0,5 mM de EDTA, 500 mM de sucrose) contendo um coquetel inibidor de protease (Roche, Basel, Switzerland). Concentrações de sdab foram estimadas através de análise dot-blot usando o anti-VSV-G P5D4 monoclonal de camundongo, imunoglobulina de coelho anti-camundongo conjugada a fosfatase alcalina (Dako, Denmark) e marcação com NBT/BCIP. Sdabs foram testados em

ELISA para especificidade de PLXND1-peptídeo. Anticorpos Al2 e F8 de domínio único não se ligaram a peptídeo irrelevante, não a albumina de soro bovino, e não a imunoglobina G humana (Figura 5B). As constantes de dissociação (kd's) da ligação entre anticorpos Al2 e F8 de domínio único foram determinadas usando o biosensor de Biacore 2000 (Uppsala, Sweden). Os circuitos integrados de sensor e produtos químicos de acoplamento de proteína foram adquiridos a partir de Biacore AB. Conjugado PLXND1-peptídeo-KLH (27 pg/ml em Na-Acetato, pH 4,0) ou BSA (1 pg/ml em Na-Acetato, pH 5,0) foi acoplado a superfícies ativadas de CM5 usando N-etil-N'-(dimetilaminopropil) carbodiimida, N-hidroxisuccinimida, em condições recomendadas pelo fabricante. Grupos não tratados foram inativados por 1 M de etanolamina, pH 8,5.

Medidas cinéticas foram realizadas a 25°C com uma vazão de 10 ml/min em tampão HBS-EP (10 mM de Hepes, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,005% de tensoativo P20).

Seis concentrações de sdabs purificados por afinidade de Ni (no intervalo de 1 mM a 50pM) foram usadas para determinar as constantes de dissociação (Kds) da interação com o PLXND1-peptídeo. Depois de cada experimento, regeneração da superfície de sensor foi realizada com 10 mM de NaOH.

Ligação específica, definida por ligação com uma superfície de PLXND1 menos ligação com uma superfície de BSA de controle, foi analisada usando o aplicativo computacional BIAevaluation 4.1 e um modelo de ligação Langmuir 1:1.

Afinidades de anticorpos Al2 e F8 de domínio único foram $2,1 \times 10^{-8}$ M e $3,5 \times 10^{-8}$ M, respectivamente (Figura 6).

EXEMPLO 4

Marcações imunohistoquímicas com anticorpos Al2 e F8 de domínio único

Os anticorpos de domínio único são etiquetados na extremidade carboxiterminal com uma etiqueta VSV-His, possibilitando marcações imunohistoquímicas usando um anticorpo anti-VSV. O protocolo seguinte foi seguido para marcações imunohistoquímicas com anticorpos Al2 e F8 domínio único. Seguindo desparafinização, atividade de peroxidase endógena foi bloqueada por incubação com 0,03% de H2O2. Recuperação de antígeno foi realizada por tratamento com pronase de acordo com protocolos padrão. Subseqüentemente, lâminas foram pré-incubadas com soro normal de cavalo ou cabra (para bloquear sítios de ligação não específicos em seções de tecidos humanos e de camundongo, respectivamente), seguido por incubação com sdabs por 1 hr. Sdabs foram detectados por incubações seqüenciais em 1 h com um antisoro anti-VSV-G de camundongo ou coelho (Sigma-Aldrich Chemie B.V., Zwijndrecht, The Netherlands), anticorpo biotinilado anti-camundongo ou anti-coelho como apropriado (Vector, Burlingame, CA), e complexo de avidina-biotina peroxidase (Vector, Burlingame, CA). Finalmente, peroxidase foi visualizada pela reação de 3-amino-9-etilcarbazol (ScyTek, Utah, USA) peroxidase com hematoxilina como contra corante. Todas as etapas foram realizadas em RT.

A especificidade do anticorpo Al2 e F8 para plexina D1 em corantes imunohistoquímicos foi primeiro examinada marcando embriões de camundongo nos quais padrões de expressão de plexina D1 no nível de RNA foram bem caracterizados (Van der Zwaag et al. (2002), acima), e comparando perfis com imunomarcações com anticorpo anti-endotelial anti-CD31 (DAKO, Glostrup, Denmark). Em placa de crescimento de osso trabecular de embriões de camundongos em E16.5, imunomarcção foi observada em vasos sanguíneos CD31-positivos. O perfil de marcação se correlacionou bem com hibridização in situ para o transcrito de plexina D1 (figura 7A). A origem de vaso sanguíneo de expressão de PLXND1 foi adicionalmente confirmada realizando marcações em seções seriais com sdabs

e anticorpo anti-CD31 anti-humano (CD31 anti-humano).

EXEMPLO 5

Marcação de células tumorosas com F8

Xenotransplantes cerebrais de camundongo de seções de
5 quatro pm da linhagem celular de melanoma humano Me157-VEGF-A
(Kusters et al. (2003), acima) foram marcadas com anticorpo F8 de domínio
único, de acordo com o protocolo exemplificado em Exemplo 4. O anticorpo
claramente reconheceu plexina D1 em vasos sanguíneos de tumor (Figura
7B). Para investigar adicionalmente expressão de proteína plexina D1 em
10 tumores, tecido embebido em parafina do arquivo ou tumor de origem
diferente (glioblastoma multiforme (Figura 8A), metástases cerebrais de
melanoma (Figura 8B) carcinoma de cólon (Figura 8C) e carcinoma de célula
renal (Figura 8D)) foram imunomarcados com sdabs anti-PLXND1.
Imunohistoquímica usando anticorpo A12 e comparação com marcações de
15 CD31 anti-humano em seções seriais, mostrou expressão em todos os tumores
examinados e confirmou expressão de plexina D1 no nível protéico em
células tumorosas e em vasos sanguíneos de tumor.

EXEMPLO 6

Programação de expressão de plexina em células malignas

20 Para investigar se expressão de plexina D1 ocorre em células
pré-malignas, foi colorida uma série de progressão de melanoma, consistindo
de naevis benignos, naevis displásicos, melanoma de fase de crescimento
radial, melanoma invasivo e melanoma disseminado. Melanócitos em naevis
benignos e naevis displásicos não expressam a proteína, ao passo que células
25 transformadas malignamente, tanto em tumores em fase de crescimento radial
como em fase de crescimento vertical são positivos para a proteína (Figura 9 e
Tabela II).

EXEMPLO 7

Estado de ativação de células expressando plexina D1

Expressão de plexina D1 é relacionada com o estado de ativação das células endoteliais em vasos sanguíneos de tumor. Tratamento com ZD6474, um inibidor de VEGFR2 e EGFR, foi previamente mostrado bloqueando angiogênese em um modelo de tumor cerebral de camundongo, resultando em uma mudança fenotípica de um fenótipo co-optante de vaso angiogênico para não angiogênico (43). Tratamento com ZD6474 resultou em uma diminuição de expressão de plexina D1 em vasos sanguíneos associados a tumor de uma maneira dose dependente (Figura 10). Assim, expressão de plexina D1 é uma característica de células endoteliais ativadas.

EXEMPLO 8

Imunohistoquímica com A12 em tecidos normais

Expressão de plexina D1 em cérebro normal, coração, pele, rim, baço, intestino, endométrio foi examinada por imunohistoquímica usando anticorpo A12. Vasos em miométrio proliferativo expressaram plexina D1, mostrando que plexina D1 está associada não apenas com angiogênese patológica, mas também com angiogênese fisiológica (não mostrado).

Em algumas instâncias, co-imunomarcações foram realizadas com o marcador de macrófago CD68. Estas marcações revelaram que uma subpopulação de macrófagos expressou a proteína (figura 11). Também fibroblastos em pele e algumas células epiteliais intestinais proliferantes foram encontradas expressando plexina D1 (não mostrado).

EXEMPLO 9

Marcação de macrófagos em doenças inflamatórias

Para examinar adicionalmente o envolvimento de plexina D1 em doenças com envolvimento proeminente de macrófago, marcações imunohistoquímicas foram realizadas em placas ateroscleróticas, esclerose múltipla e artrite reumatóide. Macrófagos expressam plexina D1.

EXEMPLO 10

Acesso em plexina D1 em vasos de tumor através de injeção

intravenosa

A expressão de proteína plexina D1 em vasos sanguíneos de tumor sugere que plexina D1 é acessível através de injeção intravenosa. Para testar isto, 2×10^5 células Me157 estavelmente transfectadas expressando a isoforma VEGF-A165 foram microcirurgicamente injetadas na artéria carótida interna direita de camundongos nus BALB/C. Depois de 18 dias, quando animais mostraram sintomas neurológicos (Kusters et al., (2003), acima), 1012 fagos de ligação PLXND/- de clones A12, F8 ou fagos não relevantes foram injetados na veia caudal de camundongos nus, carregando metástases cerebrais Me157-VEGF-A165 estabelecidas (n=2 para A12, n=4 para F8, n=3 para fago de controle).

Em dois outros grupos de camundongos, foram injetados intravenosamente 30 pg de sdab F8 ou um sdab de controle (n=2 para cada grupo). Depois de 5 minutos, camundongos foram anestesiados usando isoflurano, os tórax foram abertos, e fagos não ligados foram lavados do sistema por perfusão cardíaca com 15 ml de salina tamponada com fosfato (PBS). Então, camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, e partes de cérebros, corações, pulmões, fígados, baços e rins foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido.

Outras partes foram fixadas em formalina para serem embebidas em parafina. Depois de curta marcação com hematoxilina, tumores foram dissecados a partir de seções cerebrais de 10 μ m usando microscopia de dissecação por captura a laser (microscópio de dissecação a laser de Leica). Áreas equivalentes foram dissecadas a partir de cérebro não afetado, contralateral ao tumor.

Subseqüentemente, fagos foram eluídos a partir de amostras de tecido dissecado usando tratamento com tripsina e usados para infectar células TG1. Números de fagos formadores de colônia foram contados e usados como uma medida de rastreamento de tumor. Para verificar qualitativamente

5 rastreamento de tumor por fagos ou sdabs, seções de 4 µm, seriais para as seções usadas para dissecação a laser, foram marcadas com anticorpo anti-M13 p8 (Abcam Limited, Cambridge, UK) para detectar fagos ligados, ou anticorpos anti-VSV-G (Sigma-Aldrich) para detectar anticorpos de domínio único.

10 Injeção intravenosa de fagos M13 apresentando anticorpo F8 de domínio único anti-PLXND1, mas não fagos carregando anticorpos de domínio único irrelevantes, em camundongos carregando lesões angiogênicas de melanoma resultou em acumulação de fagos em vasos de tumor mas não a presença específica detectável de fagos em vasos cerebrais normais, nem vasos sanguíneos em fígado, baço, rim (Figura 12A,D e não mostrado). Isto indica que plexina D1 é expressa no lado luminal da célula endotelial especificamente em vasos sanguíneos de tumor e assim pode ser usada como um marcador marcável.

15 Injeção do anticorpo de domínio único parcialmente purificado por conseguinte levou a localização preferencial de tumor (Figura 12C). Na última situação deve ser considerado que o baixo peso molecular de 20 kDa dos anticorpos de domínio único permite extravasamento dos vasos de tumor altamente permeáveis e acumulação no interstício de tumor. Este último efeito não é específico e também é observado com anticorpos de domínio único não relevantes. É previsto que anticorpos de baixo peso molecular e afinidades relativamente baixas tenham maior penetrabilidade através de tumores e sejam mais adequados para marcar o compartimento de célula tumoral.

EXEMPLO 11

25 Acumulação de F8 em vasos sanguíneos de tumor

Camundongos foram injetados transcranialmente com E98, uma linhagem de xenotransplante de glioma. Tumores E98 são mantidos como tumores subcutâneos. Um camundongo atímico Balbc/c nu/nu carregando um tumor E98 subcutâneo foi morto e o tumor removido. O tumor

foi moído com um bisturi estéril e o homogenado foi passado através de um filtro de náilon estéril de malha de 70 µm. Vinte µl da suspensão celular resultante, contendo 150.000 células, foi injetado transcranialmente no cérebro de camundongos nus. Depois de 3 semanas, M13 fagos apresentando anticorpo F8 de domínio único foram injetados intravenosamente, e depois de cinco minutos o camundongo foi sujeito à perfusão cardíaca com 15 ml de salina tamponada com fosfato.

Os camundongos foram mortos, cérebros removidos e fixados em formalina. Seções de quatro µm foram sujeitas a imunohistoquímica com anticorpo anti-M13, e seções seriais foram marcadas imunohistoquimicamente com anticorpos contra CD34 (marcador endotelial) e glut-1 (um marcador para células endoteliais pré-existentes de cérebro (Kusters, B et al., Cancer Res 62:341-345 (2002))).

Fagos carregando anticorpos de domínio único anti-plexina D1 se acumularam especificamente em vasos sanguíneos associados a tumor, mas não em vasos normais (Figura 13). Importaneamente, fagos também se acumularam em vasos sanguíneos de tumor que foram positivos para glut-1, e que portanto podem ser considerados como vasos sanguíneos pré-existentes, ao invés de vasos sanguíneos recentemente formados. Isto indica que não apenas vasos sanguíneos angiogênicos são sujeitos a marcação com anticorpos anti-plexina D1, mas também vasos sanguíneos não angiogênicos, ainda ativados em tumores.

EXEMPLO 12

Ectodomínios recombinantes de plexina D1 inibem angiogênese

Células Me157 de melanoma humano foram transfectadas com a sequência de codificação de VEGF-A165 em vetor pIRESHyg. Células estavelmente transfectadas foram selecionadas cultivando em 200 µg/ml de higromicina em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)

suplementado com 10% de soro fetal de bezerro (FCS) e penicilina/estreptomicina. Devido ao fato de expressão do gene de resistência a higromicina estar ligada com aquela do cDNA de VEGF-A através do sítio de entrada ribossômico interno (IRES), todas as células resistentes a

5 higromicina irão produzir a proteína VEGF-A também. Células Me157-VEGF estavelmente transfectadas foram subsequentemente transfectadas com pIRESneo-PlexinD1 ED. O vetor contém o cDNA codificando o domínio extracelular de nucleotídeos 1-2745, ligado através do IRES a expressão do gene de resistência a neomicina.

10 Transfectantes duplos foram injetados na artéria carótida direita de camundongos nus, e tumores foram permitidos para desenvolver. No início de sintomas neurológicos (aproximadamente 18 dias) camundongos foram sujeitos a formação de imagem por ressonância magnética estimulado por Gadolínio-DTPA. Subsequentemente, camundongos foram sacrificados,

15 cérebros fixados em formalina e sujeitos a marcações imunohistoquímicas para examinar a vasculatura de tumor.

Quando comparado com controles, consistindo de tumores expressando VEGF-A apenas, estimulação por Gd-DTPA em formação de imagem por ressonância magnética (MRI) sobrecarregado com T1 foi menor

20 (compare Figura 14A, representando dois exemplos de tumores Me157-VEGF-A165, com 14B representando dois exemplos de tumores Me157-VEGF-A165/PLEXIND1-ED). Nos tumores expressando VEGF-A165 e ectodomínio de Plexina D1, vasculatura mostra aumento do marcador endotelial CD34, (um carimbo de ativação endotelial por VEGF-A165). A

25 vasculatura em tumores expressando VEGF-A165 apenas, é negativa para o marcador de célula endotelial de cérebro glut-1, o que é consistente com o fato de que estes vasos são recentemente feitos e portanto carecem de marcadores específicos de célula endotelial de cérebro. Como pode ser visto em figura 12B, os vasos que estão associados com tumores que também

expressam o ectodomínio de plexina D1, expressam glut-1. Isto é uma forte indicação de que estes vasos são de fato pré-existent. Assim, o ectodomínio de plexina D1 não previne ativação de células endoteliais por VEGF-A165, mas previne a formação de neovascularura.

5

EXEMPLO 13

Anticorpos de alta afinidade contra plexina D1

Uma seqüência protéica, correspondendo a aminoácidos 47-506 (os 459 aminoácidos mais amino terminais da proteína madura), foi expressa em células M15 pREP4 de E.coli, usando o vetor de expressão pQE16 (Qiagen). A proteína recombinante, que foi produzida nas células bacterianas como corpos de inclusão, foi dissolvida em tampão desnaturante, contendo 4M de uréia e 1 mM de ditioneitol (DTT) e depois disso gradualmente dialisada contra PBS. A proteína foi usada para imunizar camundongo BALB c/c de acordo com procedimentos padrão.

15

Figura 15 mostra as características do soro de camundongo. Como mostrado em Figura 15B, o soro imune de camundongo reconhece especificamente proteína recombinante 47-506 (52 kDa, linha 1) de E.coli, e uma segunda seqüência de plexina D1 recombinante de 18 kDa, compreendendo aminoácidos 225-388 (assim estando completamente dentro da seqüência que foi usada para imunização, linha 2). O soro pré-imune não mostrou uma tal reatividade (painel A).

20

Quando testado em corantes imunohistoquímicos em uma metástase cerebral de um sarcoma de tecido macio alveolar, o soro imune de camundongo (painel D), mas não o soro pré-imune (painel C), mostrou positividade para vasos sanguíneos e células tumorosas, um padrão de marcação que foi similar àquele de anticorpo A12 de domínio único. Assim, os linfócitos B deste camundongo foram considerados adequados para gerar hibridomas de linfócitos B de baço com linhagem celular de mieloma SP2/0.

25

A partir destes hibridomas a diversas linhagens celulares

produtoras de anticorpos foram selecionadas baseado em reatividade contra proteína 47-506 em ELISA, e foram analisadas para seu potencial de detectar plexina D1 em seções congeladas de tumores humanos. Destas, 11F5H6 e 17E9C12, ambos os anticorpos do subtipo IgM, mostraram forte positividade em metástases cerebrais de sarcoma e melanoma, como ilustrado em Figura 16. As inserções em painéis C-F representam marcações de controle nas quais o anticorpo primário foi omitido. Painéis A e B mostram que estes anticorpos não reconhecem particularmente estruturas de vasos em tecido cerebral normal.

EXEMPLO 14

Anticorpo monoclonal 11F5H6 é capaz de reconhecer vasos sanguíneos de tumor

Para avaliar adicionalmente se anticorpo monoclonal 11F5H6 é capaz de reconhecer vasos sanguíneos de tumor, tumores angiogênicos Me157-VEGF-A foram crescidos em cérebros de camundongos nus, essencialmente como descrito em Exemplo 10. Anticorpo 11F5H6 (1 mg) foi injetado em uma veia caudal lateral e permitido para circular por 15 minutos. Depois deste período, os camundongos foram anestesiados com 1,3% de isoflurano e o tórax foi aberto, com o qual uma perfusão cardíaca foi realizada com 20 ml salina tamponada com fosfato.

Depois deste procedimento camundongos foram decapitados, e cérebros removidos e imediatamente congelados ou fixados em formalina. Seções congeladas de 4 Tim foram marcadas com anticorpo com anti-IgM. Em Figura 17A é mostrado que anticorpo 11F5H6 volta para e se acumula em vasos de tumor mas não em vasos normais (compare marcação com anti-IgM em Figura 17A com a marcação com CD31 anti-endotelial em Figura 17B). Tal marcação não é vista ao realizar marcação com anti-IgM em camundongos não injetados. Assim, 11F5H6 é um anticorpo promissor que permite marcação de tumor.

EXEMPLO 15

Expressão de plexina D1 em artrite reumatóide

Plexina D1 é expressa em macrófagos em modelos de camundongo de artrite reumatóide (Figura 18). Um subconjunto de macrófagos em placas ateroscleróticas humanas também expressa plexina D1 (Figura 19). Marcações foram realizadas com anticorpo A12 de domínio único. em Figura 19, uma marcação dupla foi realizada, apresentando plexina D1 em vermelho e o marcador de macrófago CD68 em azul. Uma cor roxa indica co-expressão.

10 SEQUÊNCIAS

A12 (SEQ ID NO:1):

ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCC
 ATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTG
 AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCAGTATCAGTATCAATAACTGGGGCTGGTACCGC
 CAGGCTCCAGGAAAACAGCGCGAGCGGGTTCGCAGCTATATCTGGTGGTGGTAAAACAGTC
 TATGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTG
 TATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGATACGGCCGTCTATTACTGTAGAGCAGTC
 CGGAAAAGTACGGGTTGGCTTAGGGGGCTTGACGTCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACC
 GTCTCCGCAGAACCCAAGACACCAAAACCACAACCAGCGGCCGCACATCATCACCATCAT
 CACCATCATTATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGAAGGGGGCCGCATAG

MKYLPTAAAGLLLLAAQPA

MAQVQLQESGGGLVQPGGSL

RLSCAASGSSISINNWGWYR

QAPGKQRERVA AISGGGKTV

YADSVKGRFTISRDNKNTV

YLQMNSLKPEDTAVYYCRAV

RKSTGWLRLGLDVWGQGTQVT

VSAEPKTPKPQPAAAHHHHH

HHHYTDIEMNRLGKGAA@

FB (SEQ ID NO:2):

ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGGCCAGCCGGCC
 ATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGAGACTCTCTG
 AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTCAGTACTTTGATTATGGCCTGGTTCCGC
 CAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAATTTGTAGCGGCGATTAGCCGGGGTGGCGGTAGCACA
 AGCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACGCG
 GTGTATCTACAAATGAACAGCCTGAAACCTGATGACACGGCCGTCTATTACTGTAATGCC
 CGGTACGGTAGCCGAATTTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAGAACCC
 AAGACACCAAAACCACAACCAGCGGCCGCACATCATCACCATCATCACCATCATTATACA
 GACATAGAGATGAACCGACTTGGAAGGGGGCCGCATAG

MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPA

MAQVQLQESGGGLVQAGDSL

RLSCAASGRTFSTLIMAWFR

QAPGKEREFVAAISRGGGST

SYADSVKGRFTISRDNKNA

VYLOMNSLKPDDTAVYYCNA

RYGSRIYWGGTQVTVSSEP

KTPKPQPAAHHHHHHHHHYT

DIEMNRLGKGAA@

Seqüência de anticorpo de cadeia única, derivado de anticorpo

11F5H6 (SEQ ID NO:3)

MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMADYKDIVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNT
 YLEWYLQKPGQSPKLLIYKVFNRLSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGS
 HVPLTFGAGTKLELKRGGGGSGGGGSGGGGRAPGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCK
 ASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELL
 SLTSEDSAVYYCARAITTDGWFAYWGQGLVTVSAAAHHHHHHHHHYTDIEMNRLGKGAA

Seqüência de anticorpo de cadeia única, derivado de anticorpo

17E9C12 (SEQ ID NO:4)

MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMADYKDIVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNT
 YLEWYLQKPGQSPKLLIYKVFNRLSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGS
 HVPLTFGAGTKLELKRGGGGSGGGGSGGGGRAPGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCK
 ASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELL
 SLTSEDSAVYYCARAITTDGWFAYWGQGLVTVSAAAHHHHHHHHHYTDIEMNRLGKGAA

Tabela 1

EXPRESSÃO DE PLXND1 EM TECIDOS HUMANOS

| Tecido | Expressão de PLXND1 |
|--|--|
| <p>Maligno</p> <p>Adenocarcinoma de esôfago (n=1) Adenocarcinoma de reto (n=5)</p> <p>Adenocarcinoma de próstata (n=1)</p> <p>Sarcoma de parte mole alveolar de fêmur (n=1) Astrocitoma (n=1)</p> <p>Tumor carcinóide de pulmão (n=1)</p> <p>Carcinoma ductal in situ de mama (n=5) Linfoma folicular (n=8)</p> <p>Glioblastoma Multiforme (n=3)</p> <p>Metástase cerebral de adenocarcinoma (n=4) (mama, pulmão, reto) Metástase cerebral de sarcoma de parte mole alveolar (n=1) Metástase cerebral de carcinoma de célula renal (n=1)</p> <p>Metástase de fígado de adenocarcinoma de cólon (n=2) Carcinoma lobular in situ de mama (n=3)</p> <p>Metástase de linfonodo de carcinoma ductal de mama (n=1)</p> <p>Metástase de ovário de adenocarcinoma de cólon (n=1) Carcinoma de célula renal (n=1)</p> <p>Carcinoma de célula urotelial de próstata (n=2)</p> <p>Não maligno</p> <p>Bexiga (n=1)</p> <p>Vaso sanguíneo, arteriosclerose (n=6)</p> <p>Medula óssea (n=2) Córtex cerebral (n=1)</p> <p>Cérebro, Alzheimer + CAA (n=1)</p> <p>Endométrio</p> <p>Fase de proliferação (n=5)</p> <p>Fase de secreção (n=4)</p> <p>Fase de secreção/menstruação (n=1)</p> <p>Endometriose interna (n=1)</p> <p>Coração (n=1)</p> <p>Intestino grosso (n=1)</p> <p>Fígado (n=1)</p> <p>Pulmão (n=2)</p> <p>Mama (n=2)</p> <p>Mama, hiperplasia ductal (n=1)</p> <p>Esôfago (n=1)</p> <p>Intestino delgado (n=1)</p> <p>Baço (n=1)</p> | <p>Vasos de tumor e células tumorosas</p> <p>Vasos de tumor, células tumorosas e macrófagos</p> <p>Vasos de tumor e células tumorosas</p> <p>Vasos de tumor e células tumorosas</p> <p>Vasos de tumor</p> <p>Vasos de tumor, células tumorosas e macrófagos</p> <p>Vaso de tumor, células tumorosas, macrófagos, fibroblastos</p> <p>Vasos de tumor</p> <p>Vasos de tumor e células tumorosas</p> <p>Vasos de tumor e células tumorosas</p> <p>Vasos de tumor e células tumorosas</p> <p>Vasos de tumor e células tumorosas</p> <p>Vasos de tumor e células tumorosas</p> <p>Vasos de tumor, células tumorosas e macrófagos</p> <p>Vasos de tumor e células tumorosas fracamente positivas, macrófagos e fibroblastos</p> <p>Células tumorosas e alguns vasos de tumor</p> <p>Células tumorosas e miofibroblastos Vasculatura de tumor e células tumorosas</p> <p>Vaso de tumor, células tumorosas e macrófagos</p> <p>Macrófagos</p> <p>Macrófagos</p> <p>Alguns neurônios perinucleares</p> <p>Macrófagos</p> <p>Macrófagos</p> <p>Macrófagos</p> <p>Macrófagos</p> <p>Algumas células de músculo perinuclear</p> <p>Algum manchamento luminal de epitélio, macrófagos, fibroblastos</p> <p>Células do fígado perinuclear granular, macrófagos</p> <p>Macrófagos</p> <p>Algumas células epiteliais perinucleares</p> <p>Células epiteliais focais perinucleares, macrófagos</p> <p>Macrófagos</p> <p>Alguma marcação luminal de epitélio, macrófagos, fibroblastos</p> <p>Macrófagos</p> |

Tabela 2

Expressão de PLXND1 em séries de progressão de melanoma

| | Ausente | Moderada | Abundante |
|------------------------------|---------|----------|-----------|
| Naevus naevicelulares (n=18) | 18 | | |
| Naevus atípicos (n=14) | 14 | | |
| Melanomas in situ (n=5) | 5 | | |
| Melanomas primários (n=26) | 4 | 2 | 20 |
| Metástases de melanoma | | | |
| Linfonodo (n=9) | 1 | 2 | 6 |
| Pele (n=5) | 1 | 1 | 3 |
| Cérebro (n=5) | | | 5 |
| Pulmão (n=1) | | | 1 |

REIVINDICAÇÕES

1. Plexina D1, caracterizada por ser para uso como uma proteína marcável no tratamento ou diagnose de desordens que envolvem expressão de plexina D1.

5 2. Plexina D1 de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a diagnose é efetuada detectando a presença de plexina D1 no corpo ou em um tecido ou fluido corporal.

 3. Plexina D1 de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o tratamento é efetuado marcando plexina D1 para liberação
10 de terapêuticos ao sítio onde tratamento é necessário.

 4. Plexina D1 de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o tratamento é efetuado interferindo na interação of plexina D1 e seus ligantes.

 5. Plexina D1 de acordo com a reivindicação 1, caracterizada
15 pelo fato de que o tratamento é efetuado interferindo na função de plexina D1.

 6. Plexina D1 de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o tratamento é efetuado interferindo na expressão do gene codificando plexina D1.

 7. Uso de moléculas que se ligam a plexina D1, um ácido
20 nucléico codificando plexina D1 ou um ligante de plexina D1, caracterizado por ser para a preparação de uma composição terapêutica para o tratamento ou diagnose de desordens que envolvem expressão de plexina D1.

 8. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo
25 fato de que os distúrbios compreendem distúrbios nos quais plexina D1 é expressa em células tumorosas, vasos sanguíneos de tumor ou macrófagos ativados.

 9. Uso de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que os distúrbios são selecionados a partir de tumores cerebrais, em particular astrocitomas, oligodendrogliomas e hemangioblastomas,

carcinomas de cólon, em particular carcinomas ductais do cólon, carcinomas de próstata, carcinomas de célula renal, em particular carcinomas de célula clara renal, carcinomas de mama, em particular carcinomas ductais da mama, carcinomas de ovário, carcinomas de célula esquamosa, melanomas, carcinomas de pulmão, em particular carcinomas de célula pequena de pulmão e carcinomas de célula não pequena de pulmão, sarcomas de tecido macio.

10. Uso de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que os distúrbios são doenças inflamatórias.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a doença inflamatória é uma doença autoimune.

12. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a doença autoimune é artrite reumatóide.

13. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a doença inflamatória é arteriosclerose ou esclerose múltipla.

14. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que moléculas que se ligam a plexina D1 são selecionadas a partir de anticorpos, fragmentos de anticorpos, domínios protéicos, peptídeos, moléculas pequenas, aptâmeros de DNA ou RNA.

15. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que moléculas que se ligam ao ácido nucléico codificando plexina D1 são selecionadas a partir de siRNA, RNA antisentido, oligonucleotídeos fosfotio antisentido.

16. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que moléculas que se ligam a um ligante de plexina D1 são selecionadas a partir de anticorpos contra o ligante, o ectodomínio solúvel de plexina D1, peptídeos com afinidade para o sítio de ligação de plexina D1.

17. Uso de acordo com o reivindicado em qualquer uma das reivindicações 7 a 16, caracterizado pelo fato de que a molécula de ligação é

marcada com um marcador detectável.

18. Uso de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o marcador detectável é selecionado a partir de um marcador radioativo, um marcador paramagnético, marcador fluorescente, um marcador quimioluminescente.

19. Uso de acordo com o reivindicado em qualquer uma das reivindicações 7 a 18, caracterizado pelo fato de que a molécula de ligação é fornecida com um composto efetor ou um nanodispositivo compreendendo um composto efetor.

20. Uso de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o composto efetor é uma toxina, um composto indutor de trombose, um agente quimioterápico, uma unidade radioativa, um peptídeo indutor de apoptose, em particular (KLAKLAK)₂.

21. Uso de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a toxina danifica ou mata células endoteliais para induzir trombose, e é em particular ricina.

22. Uso de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o composto indutor de trombose é fator de tecido trancado.

23. Uso de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o agente quimioterápico é selecionado a partir de doxorubicina, cisplatina, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucil e ciclofosfamida hidroxiuréia.

24. Uso de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a entidade radioativa é selecionada a partir de: tecnécio 99m, iodo-123, iodo-131, rênio-186 ou -188, gálio-67, ítrio-90, lutécio-177.

25. Uso de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que os nanodispositivos são lipossomos, polimersomos, em particular polimersomos compostos de copolímeros de bloco.

26. Moléculas de ligação de plexina D1.

27. Moléculas de ligação de plexina D1 de acordo com a reivindicação 26, caracterizadas pelo fato de compreenderem a parte de ligação de plexina D1 de A12 (SEQ ID NO:1), F8 (SEQ ID NO:2), 11F5H6 (SEQ ID NO:3) ou 17E9C12 (SEQ ID NO:4).

5 29. Moléculas de ligação de plexina de acordo com a reivindicação 26 ou 27, caracterizadas pelo fato de serem acopladas a um marcador detectável como definido na reivindicação 18.

10 30. Moléculas de ligação de plexina de acordo com a reivindicação 26 ou 27, caracterizadas pelo fato de serem acopladas a uma molécula efetora ou um nanodispositivo compreendendo um composto efetor, e o composto efetor é como definida no definido em qualquer uma das reivindicações 20 a 24.

15 31. Moléculas de ligação de plexina de acordo com a reivindicação 26 ou 27, caracterizadas pelo fato de que o nanodispositivo é como definido na reivindicação 25.

32. Composição diagnóstica, caracterizada pelo fato de compreender uma molécula de ligação de plexina como definida na reivindicação 29.

20 33. Composição terapêutica, caracterizada pelo fato de compreender uma molécula de ligação de plexina como definida em qualquer uma das reivindicações 30 a 32.

34. Anticorpo de cadeia única A12 (SEQ ID NO:1).

35. Anticorpo de cadeia única F8 (SEQ ID NO:2).

36. Anticorpo de cadeia única 11F5H6 (SEQ ID NO:3).

25 37. Anticorpo de cadeia única 17E9C12 (SEQ ID NO:4).

38. Método para identificar moléculas que são capazes de se ligar a plexina D1, caracterizado pelo fato de que compreende colocar em contato uma coleção de moléculas com plexina D1 e selecionar as moléculas da coleção que mostram ligação com plexina D1 como moléculas de ligação de plexina D1.

Figura 1

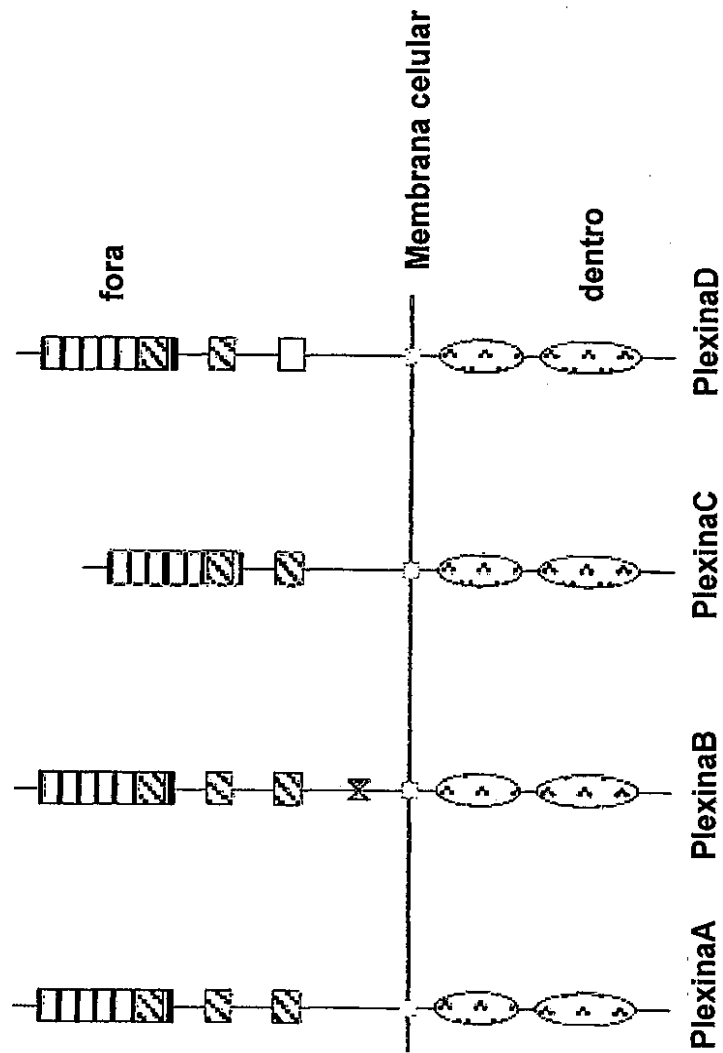


Figura 2



Figura 3

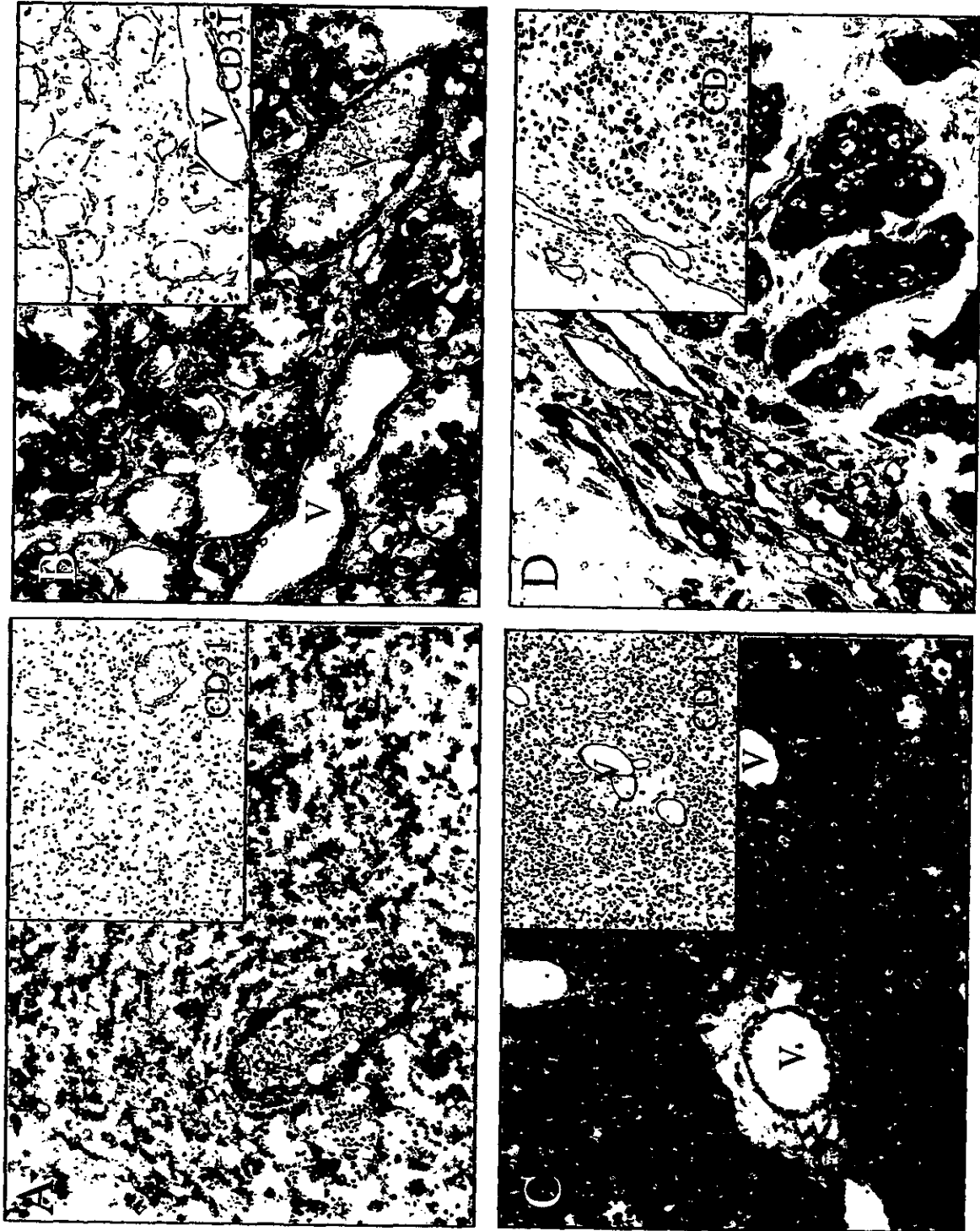
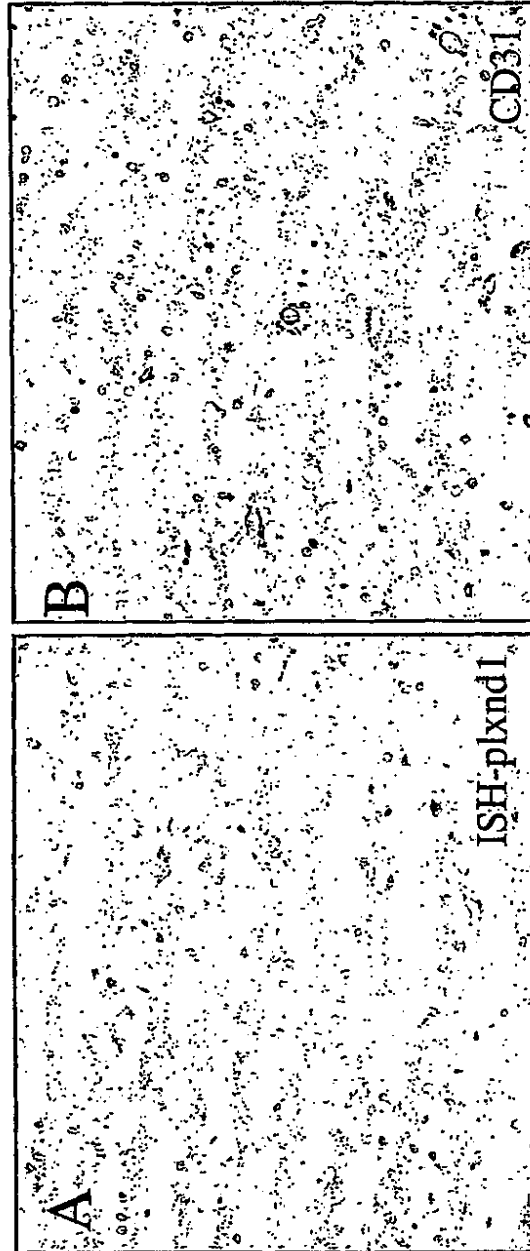


Figura 4



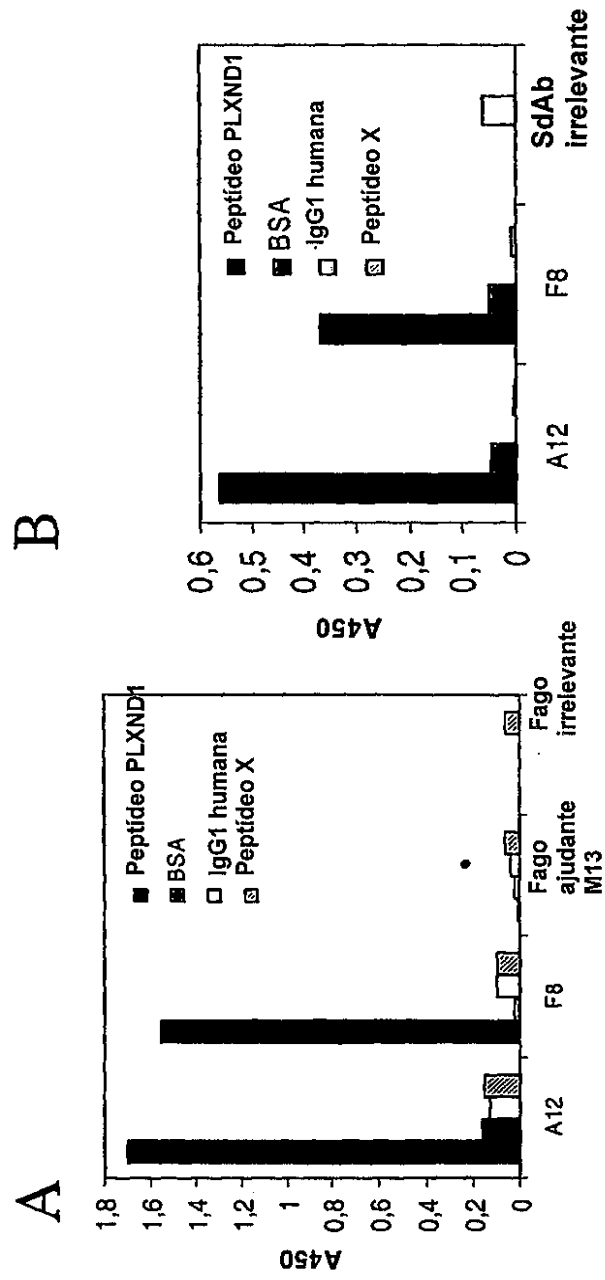


Figura 5

Figura 6

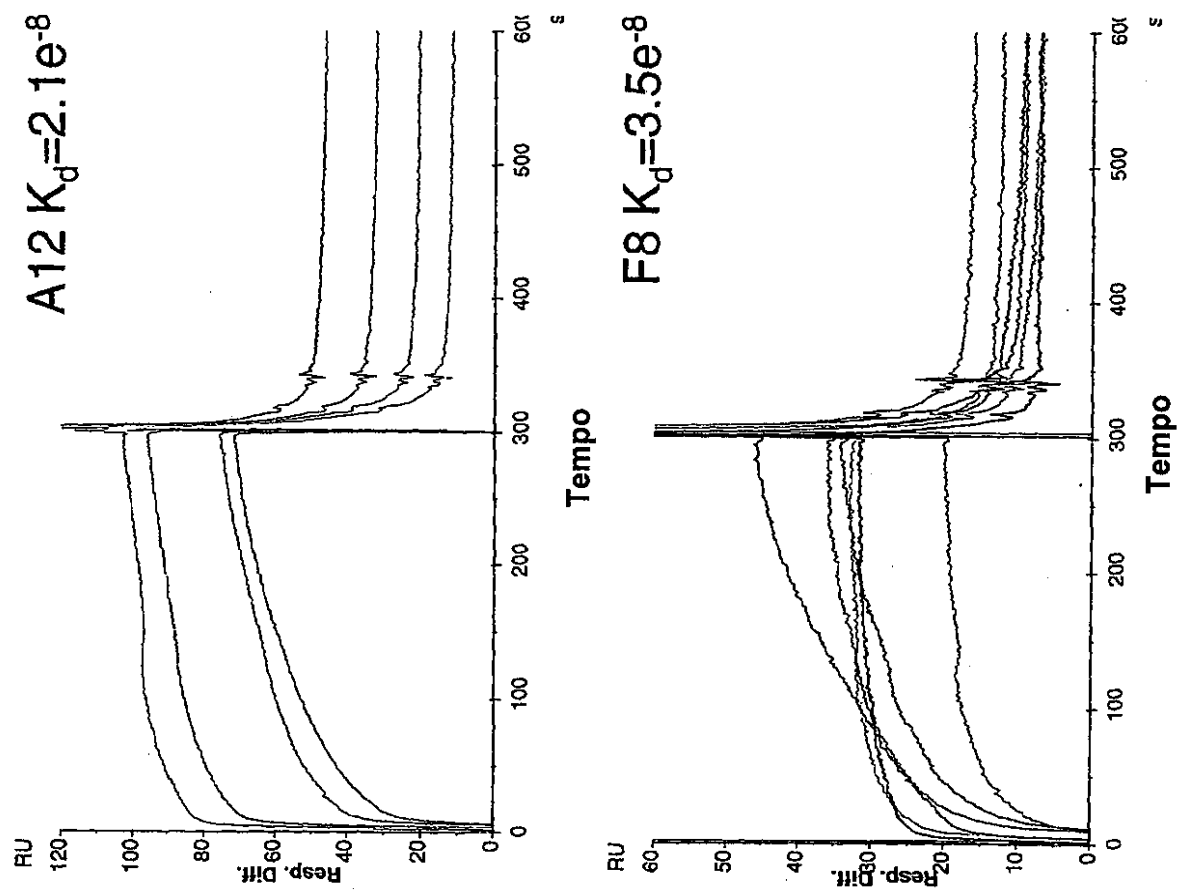


Figura 7

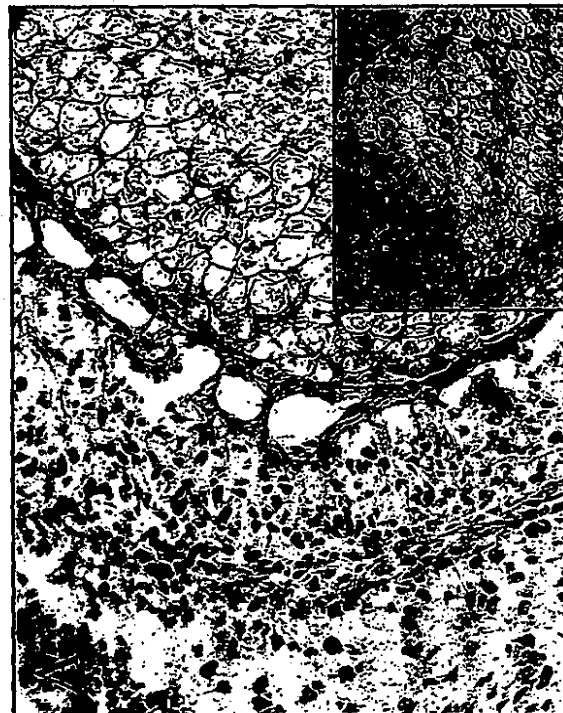
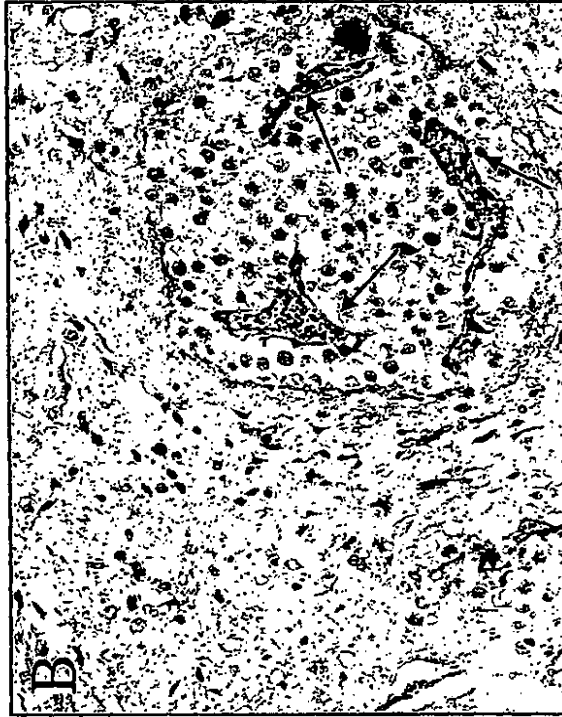


Figura 8

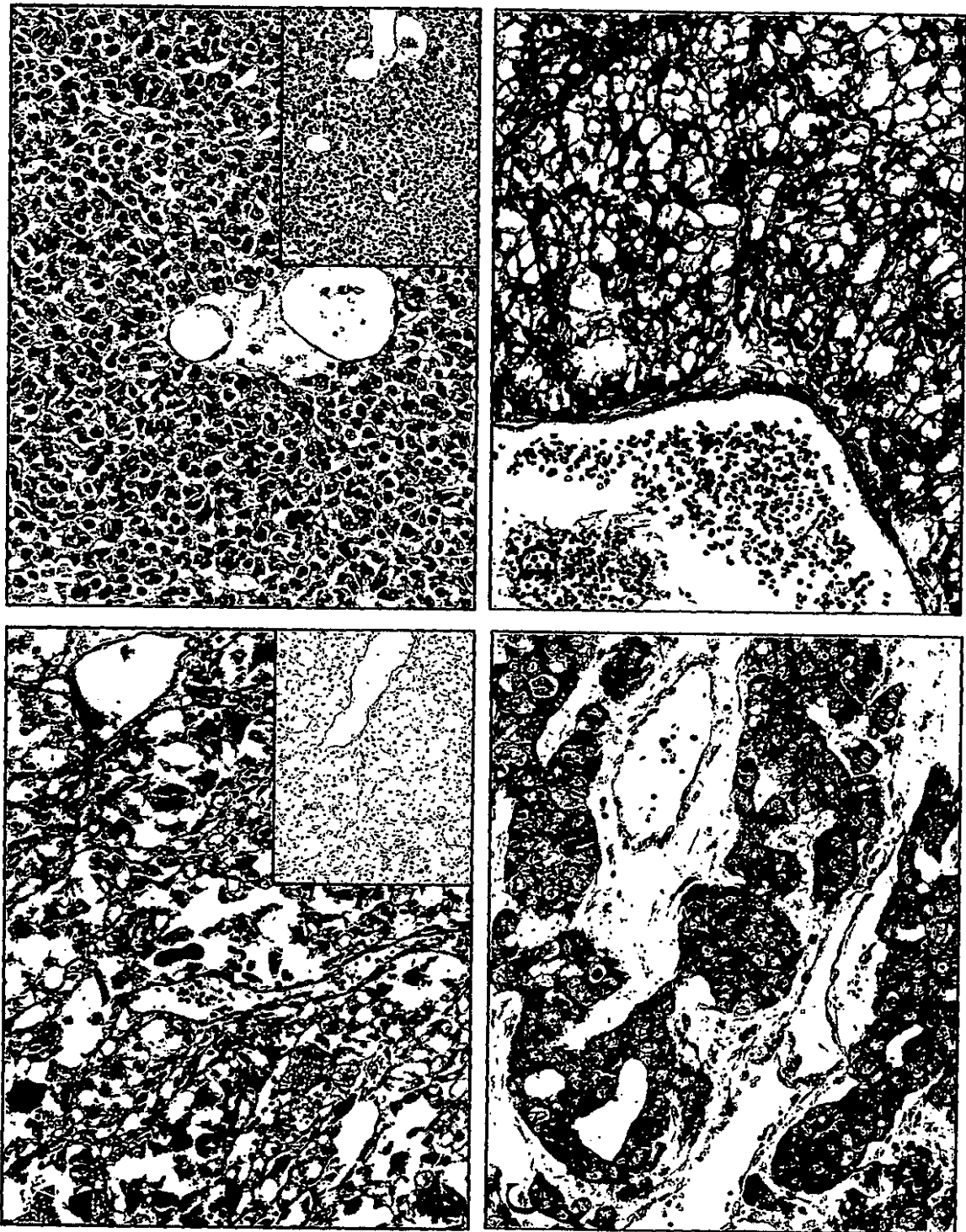


Figura 9

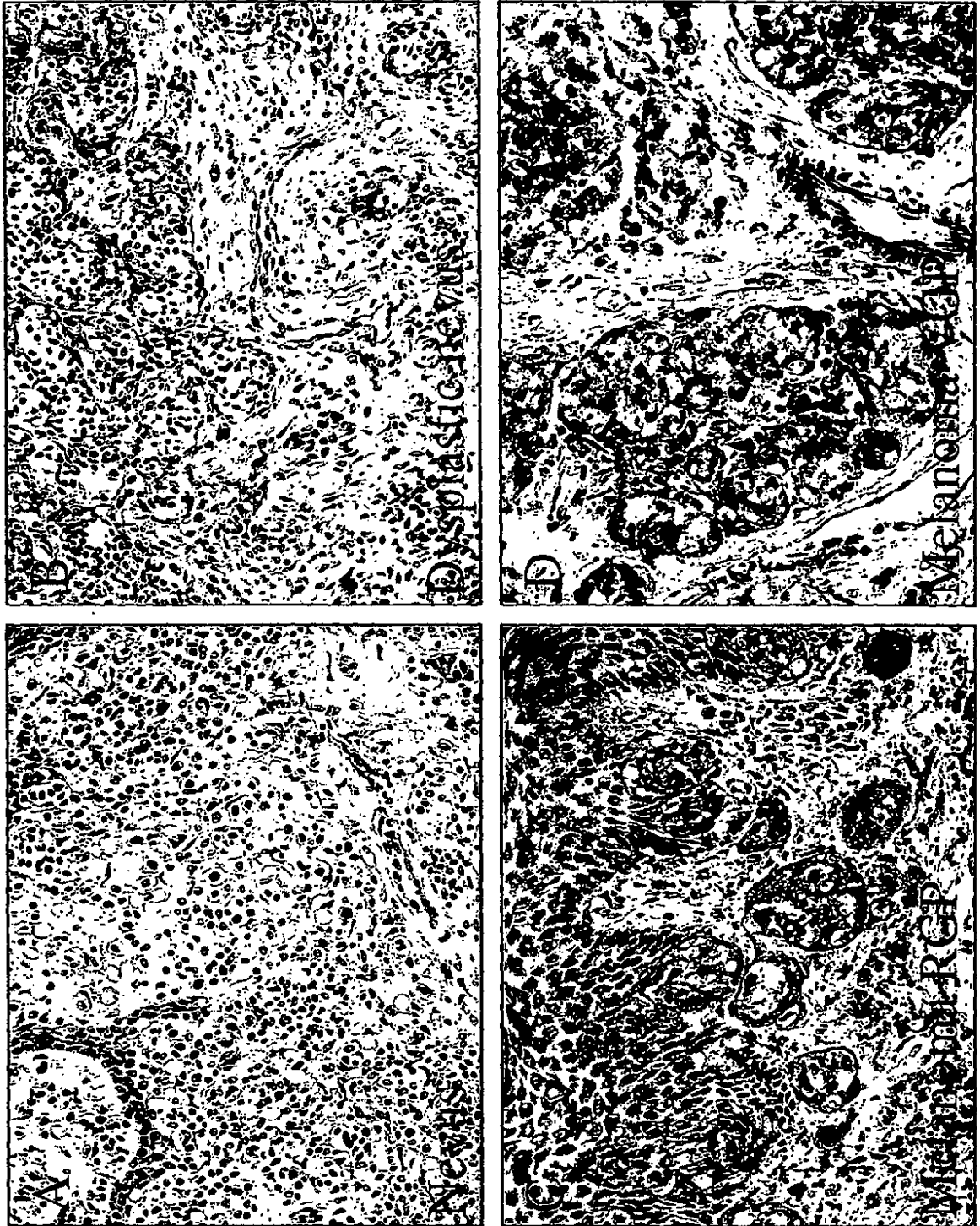


Figura 10

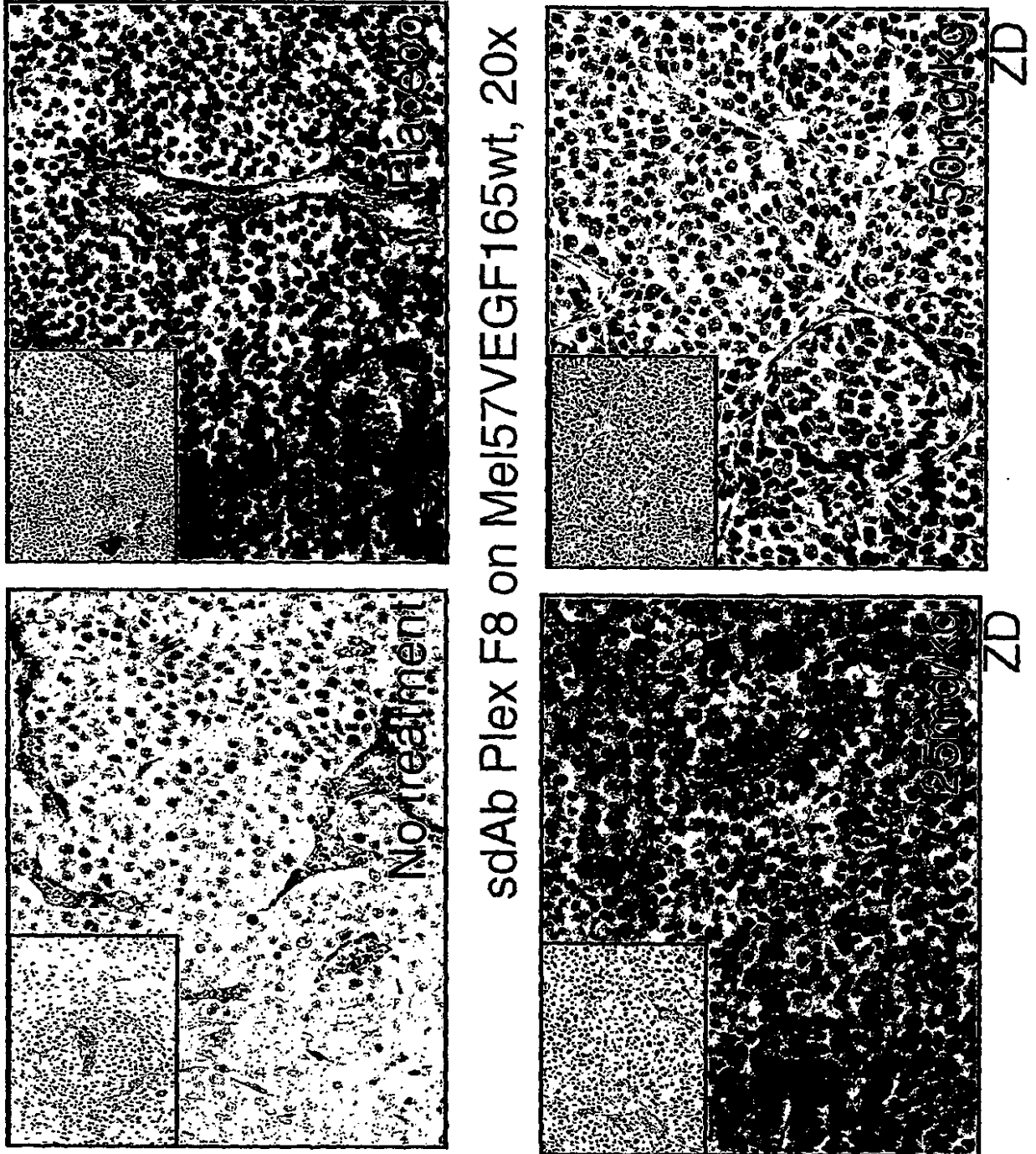


Figura 11

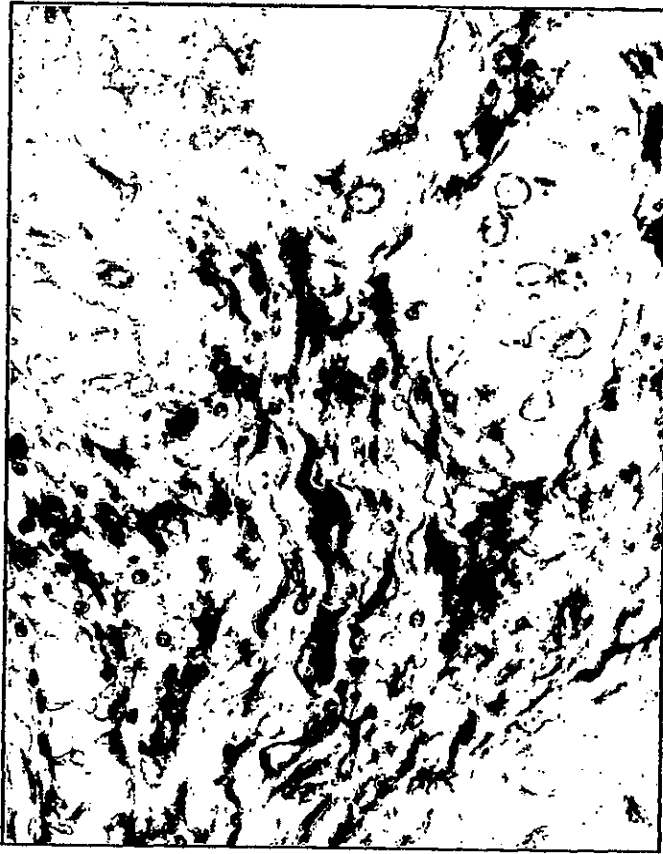


Figura 12

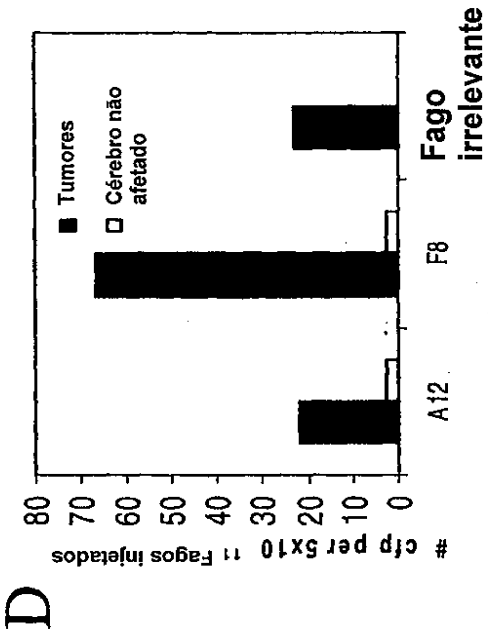
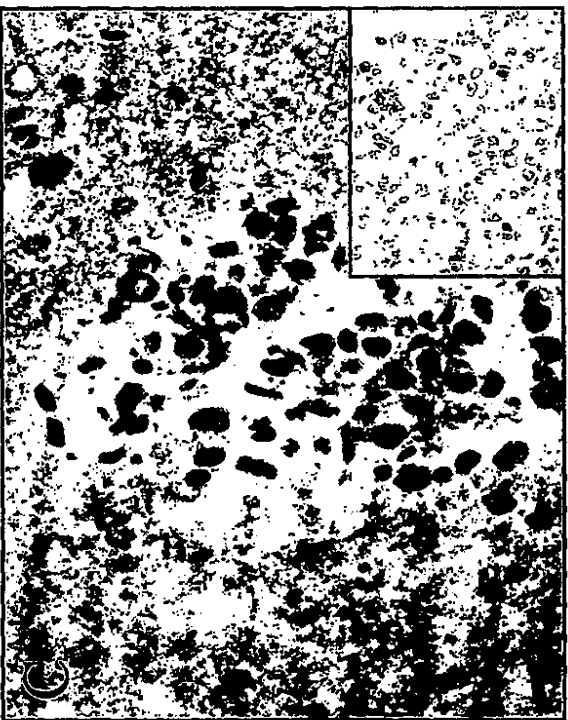
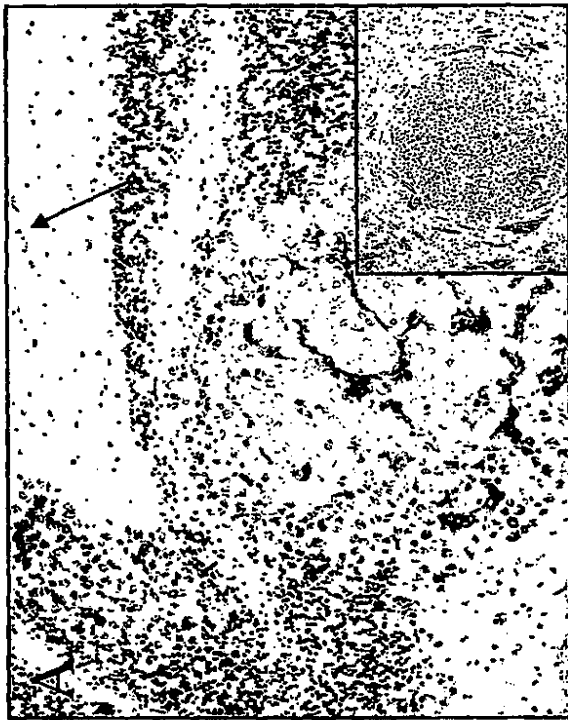


Figura 13

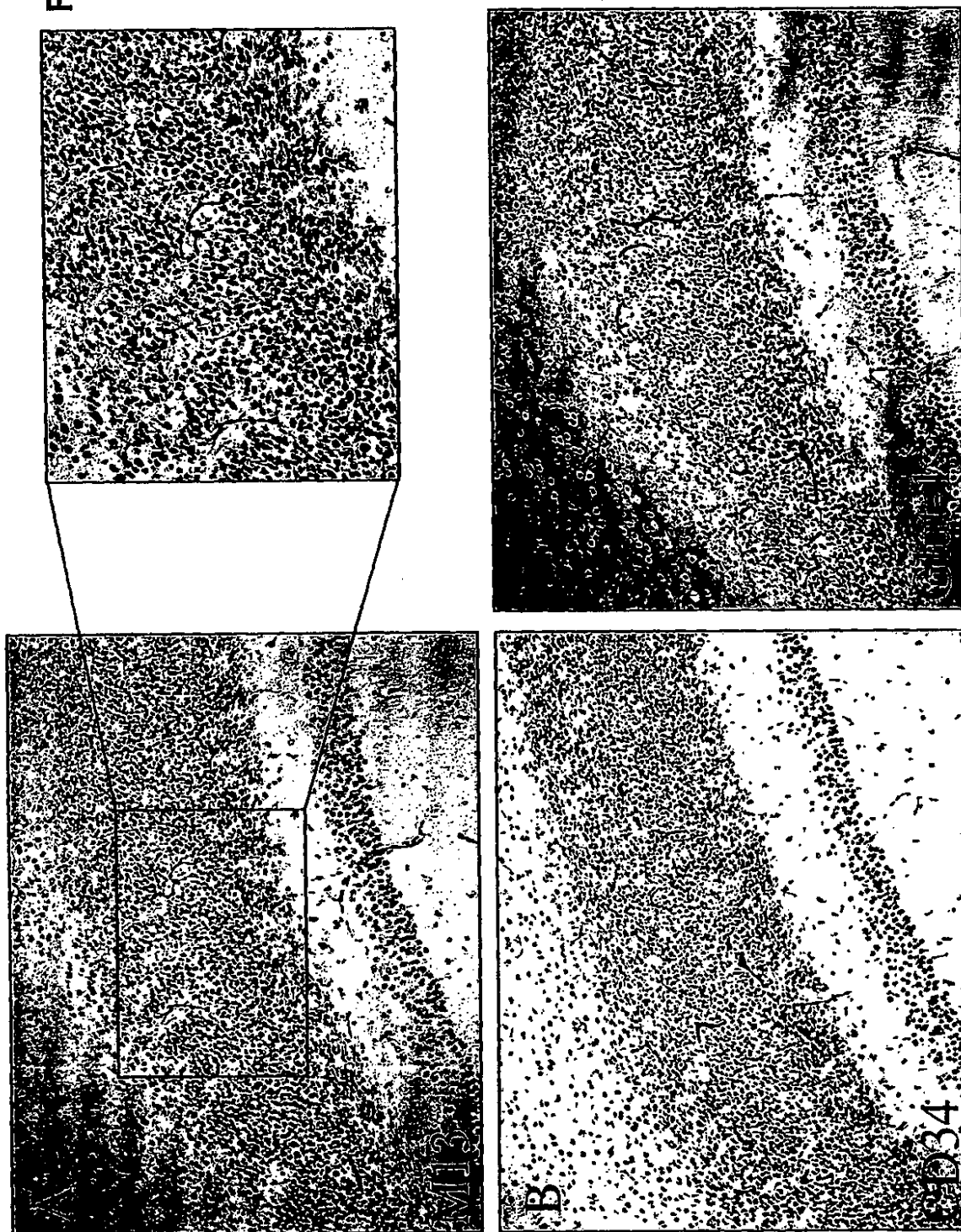


Figura 14

Mel57-VEGF-A165 Mel57-VEGF-A165/PLEXIN D1-ED

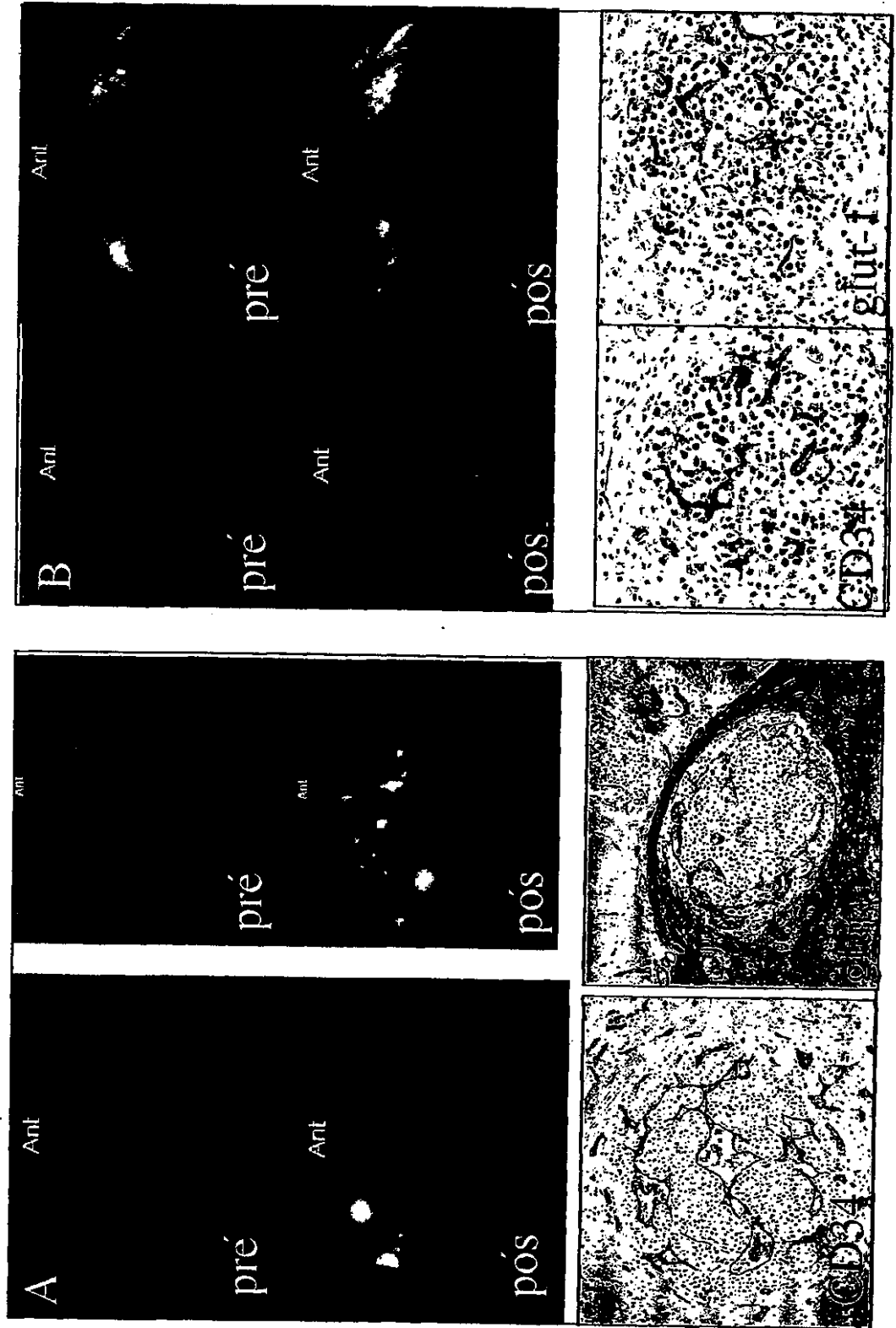
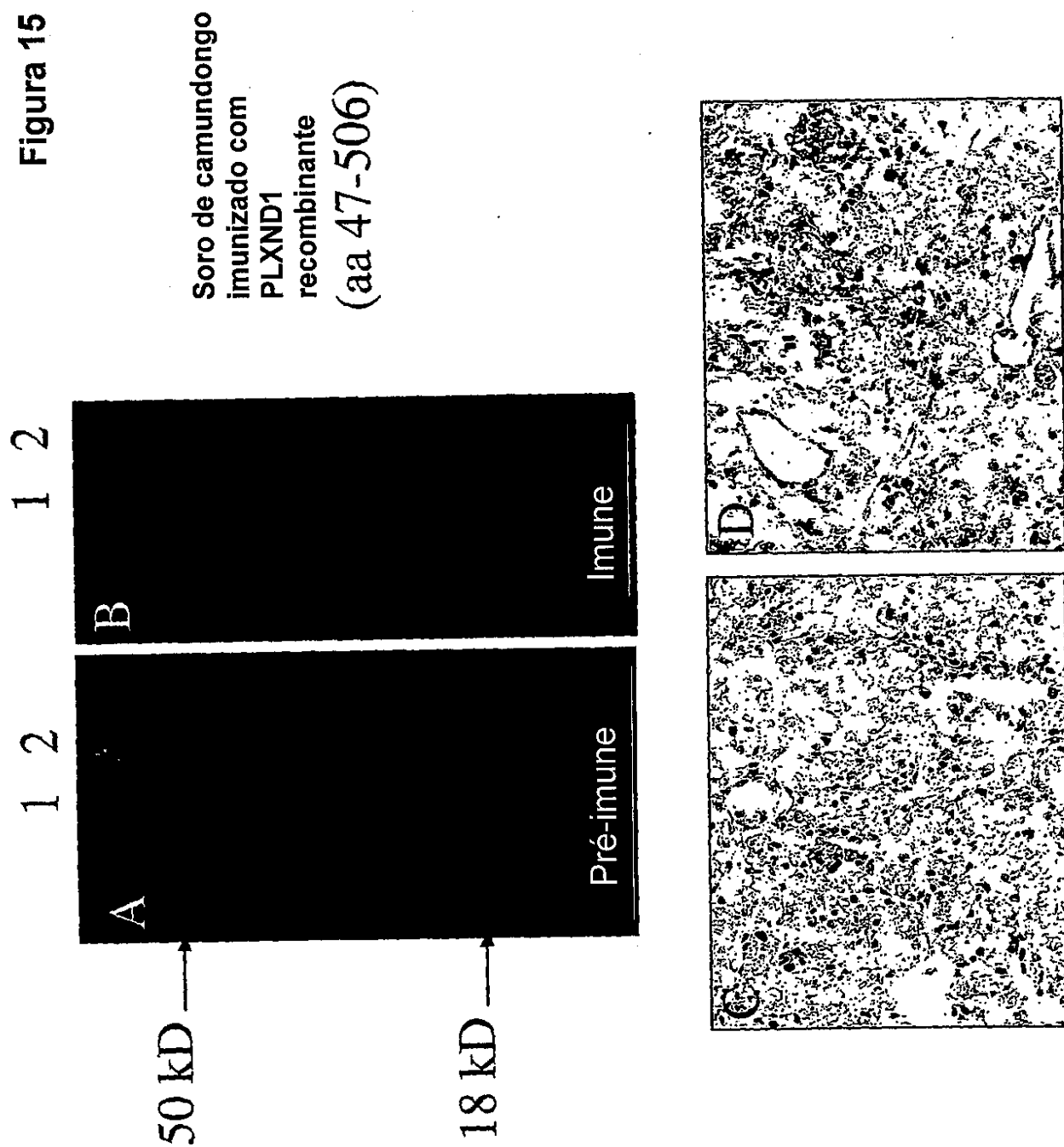


Figura 15



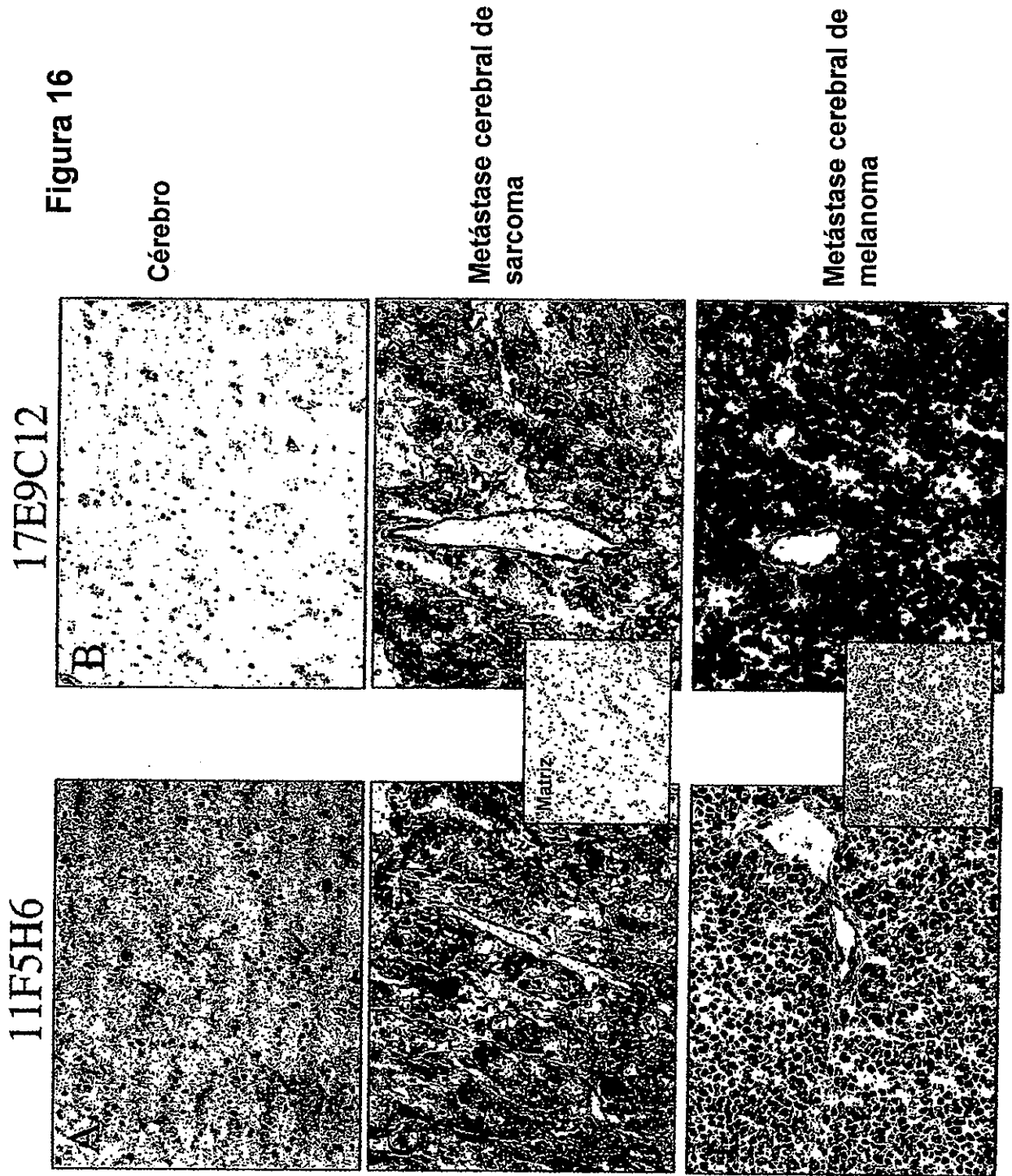


Figura 17

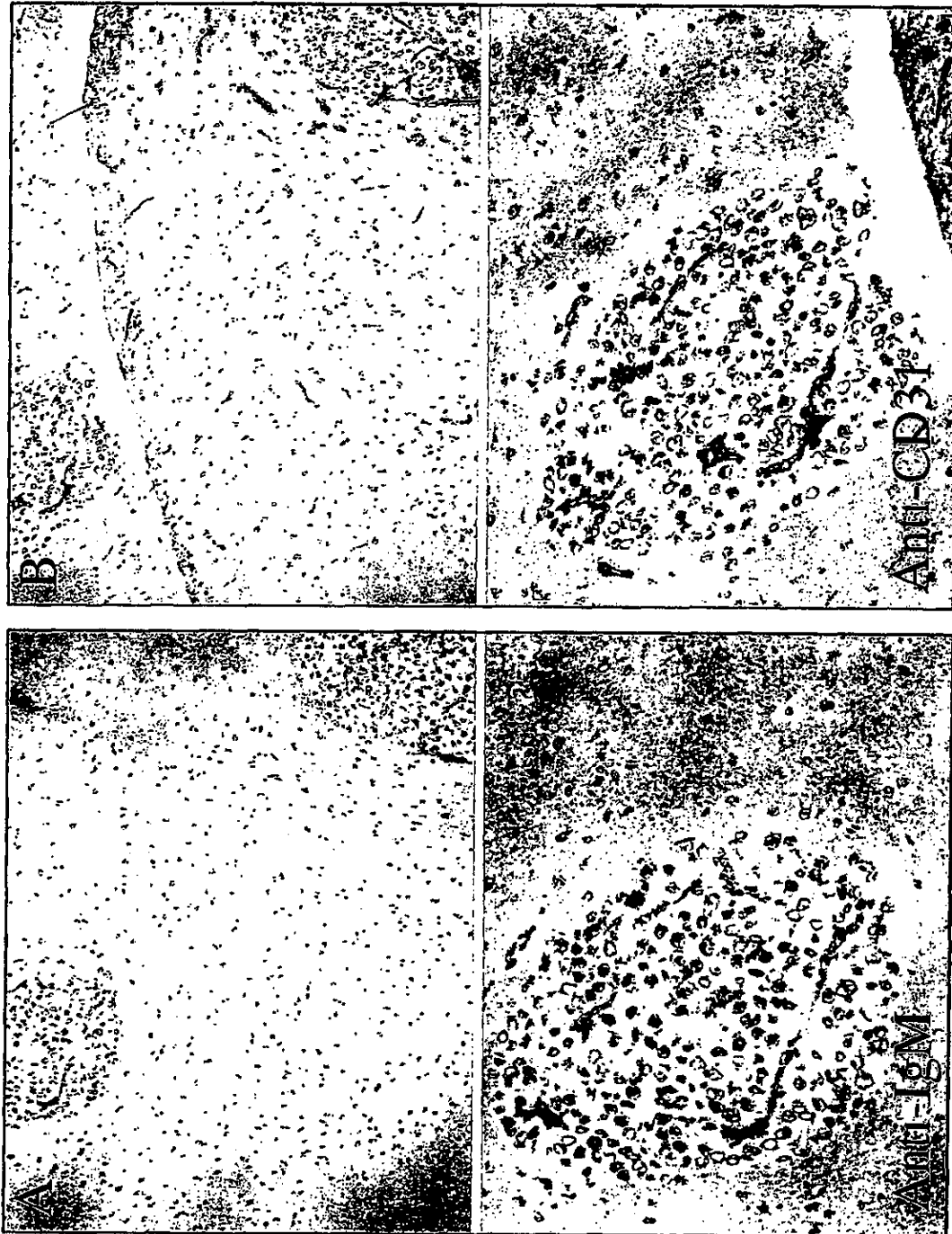


Figura 18

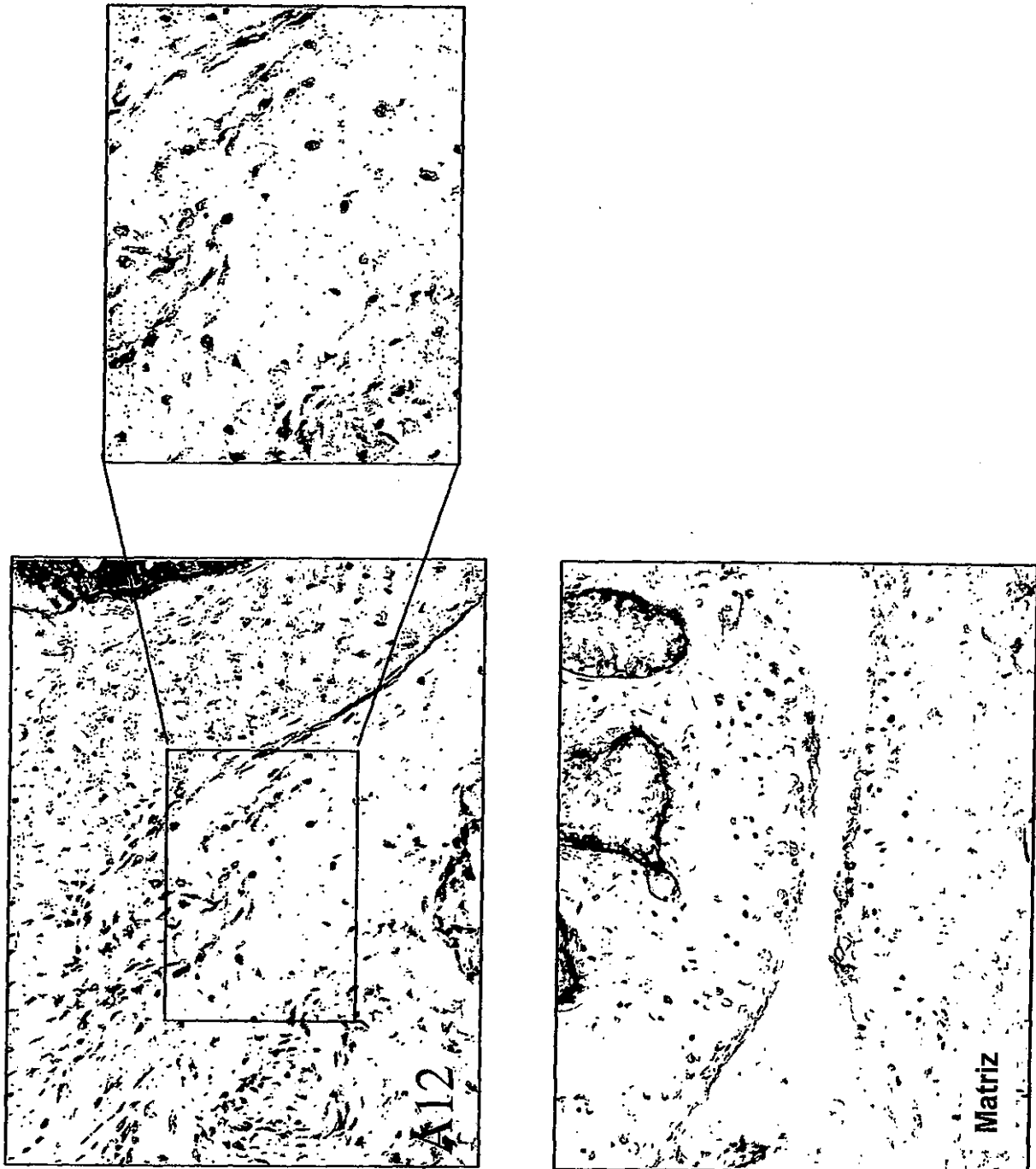
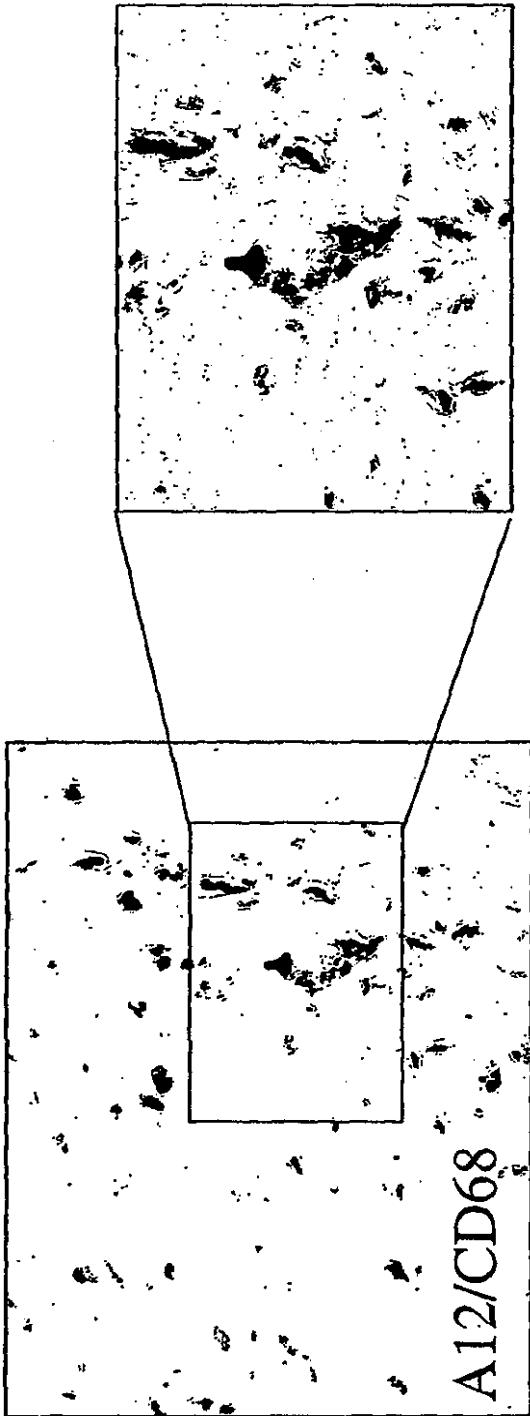


Figura 19



RESUMO

“PLEXINA D1, USO DE MOLÉCULAS, MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO DE
PLEXINA D1, COMPOSIÇÃO DIAGNÓSTICA, COMPOSIÇÃO
TERAPÊUTICA, E, MÉTODO PARA IDENTIFICAR MOLÉCULAS QUE
5 SÃO CAPAZES DE SE LIGAR A PLEXINA DL”

A presente invenção se refere plexina D1 para uso como uma
proteína marcável no tratamento ou diagnose de distúrbios que envolvem
expressão de plexina D1. Diagnose é adequadamente efetuada detectando a
presença de plexina D1 no corpo ou em um tecido ou fluido corporal, ao
10 passo que tratamento é efetuado marcando plexina D1 para liberação de
terapêuticos ao sítio onde tratamento é necessário. A invenção se refere
adicionalmente ao uso de moléculas que se ligam a plexina D1, um ácido
nucléico codificando plexina D1 ou um ligante de plexina D1 para a
preparação de uma composição terapêutica para o tratamento ou diagnose de
15 distúrbios que envolvem expressão de plexina D1. Os distúrbios
compreendem distúrbios nos quais plexina D1 é expressa em células
tumorosas, vasos sanguíneos de tumor ou macrófagos ativados.