REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0213223-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0213223-0

(22) Data do Depósito: 11/10/2002

(43) Data da Publicação do Pedido: 17/07/2003

(51) Classificação Internacional: C07K 5/00; C07K 1/00; C07K 14/00.

(30) Prioridade Unionista: US 10/269695 de 10/10/2002; US 60/328624 de 11/10/2001; US 60/414155 de 27/09/2002.

(54) Título: POLIPEPTÍDEO, DÍMERO OU MULTÍMERO, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UMA COMPOSIÇÃO

(73) Titular: AMGEN INC.. Endereço: One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, Califórnia 91320-1799, ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA(US)

(72) Inventor: JONATHAN DANIEL OLINER; HOSUNG MIN.

Código de Controle: 9C5E6002F4924DA6 23ACCD448C3A919B

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 21/05/2019, observadas as condições legais

Expedida em: 21/05/2019

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

"POLIPEPTÍDEO, DÍMERO OU MULTÍMERO, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UMA COMPOSIÇÃO"

Este pedido reivindica benefício para o Pedido Provisório U.S. Série Nº 60/328.624 depositado em 11 de outubro de 2001, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a agentes de ligação específicos que reconhecem e se ligam à angiopoietina-2 (Ang-2). Mais especificamente, a invenção diz respeito à produção, uso em diagnóstico e uso terapêutico dos agentes de ligação específicos e fragmentos destes, que especificamente se ligam à Ang-2.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A angiogênese, a formação de novos vasos sangüíneos a partir dos existentes, é essencial para muitos processos fisiológicos e patológicos. Normalmente, a angiogênese é firmemente regulada pelos fatores pró- e anti-angiogênicos, mas no caso de doenças tais como o câncer, doenças neovasculares oculares, artrite e psoríase, o processo pode seguir de modo errado. Folkman, J., Nat. Med., 1: 27 a 31 (1995).

Existem várias doenças conhecidas por estarem associadas com a angiogênese desregulada ou indesejada. Tais doenças incluem, mas não

"segue-se a página 2"

PI0213223

são limitadas à neovascularização ocular, tais como retinopatias (incluindo a retinopatia diabética), degeneração macular relacionada com a idade, psoríase, hemangioblastoma, hemangioma, arteriosclerose, doença inflamatória, tal como uma doença inflamatória reumatóide ou reumática, especialmente a artrite (que inclui a artrite reumatóide) ou outros distúrbios inflamatórios crônicos, tais como a asma crônica, aterosclerose arterial ou pós transplantacional, endometriose e doenças neoplásticas, por exemplo os chamados tumores sólidos e tumores líquidos (ou hematopóiéticos) (tais como leucemias e linfomas). Outras doenças associadas com a angiogênese indesejada estará evidente àqueles habilitados na técnica.

Embora muitos sistemas de transdução de sinal tenham sido implicados na regulagem da angiogênese, um dos sistemas melhor caracterizado e o mais seletivo em célula endotelial envolve o receptor Tie-2 da tirosina cinase (aludido como "Tie-2" ou "Tie-2R" (também aludido como "ORK"); o Tie-2 de murino também é aludido como "tek") e seus ligandos, as angiopoietinas (Gale, N. W. e Yancopoulos, G. D., Genes Dev. 13: 1055 a 1066 [1999]). Existem 4 angiopoietinas conhecidas; a angiopoietina-1 ("Ang-1") até a angiopoietina-4 ("Ang-4"). Estas angiopoietinas também são aludidas como "ligandos Tie-2". (Davis, S., *et al.*, Cell, 87: 1161 a 1169 [1996]; Grosios, K., *et al.*, Cytogenet Cell Genet, 84: 118 a 120 [1999]; Holash, J., *et al.*, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42: 1617 a 1625 [1999]; Koblizek, T. I., *et al.*, Current Biology, 8: 529 a 532 [1998]; Lin, P., *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 95: 8829 a 8834 [1998]; Maisonpierre, P. C., *et al.*, Science, 277: 5560 [1997]; Papapetropoulos, A., *et al.*, Lab Invest, 79: 213 a 223 [1999]; Sato, T. N., *et al.*, Nature, 375: 70 a 74 [1998]; Shyu, K. G., *et al.*, Circulation, 98: 2081 a 2087 [1998]; Suri, C., *et al.*, Cell, 87: 1171 a 1180 [1996]; Suri, C., *et al.*, Science, 282: 468 a 471 [1998]; Valenzuela, D. M., *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 96: 1904 a 1909 [1999]; Witzenbichler, B., *et al.*, J Biol Chem,

PI0213223

273: 18514 a 18521 [1998]). Enquanto que a ligação de Ang-1 ao Tie-2 estimula a fosforilação do receptor em células endoteliais cultivadas, a Ang-2 foi observada atuar tanto como agonista quanto como antagonista na fosforilação do receptor Tie-2 (Davis, S., *et al.*, [1996], supra; Maisonpierre, P. C., *et al.*, [1997], supra; Kim, I., J. H. Kim, *et al.*, Oncogene 19(39): 4549 a 4552 (2000); Teichert-Kuliszewska, K., P. C. Maisonpierre, *et al.*, Cardiovascular Research 49(3): 659 a 670 (2001)).

Os fenótipos de *knockouts* em Tie-2 e Ang-1 de camundongo são similares e sugerem que a fosforilação de Tie-2 estimulada pelo Ang-1 medeia a remodelagem e a estabilização de vasos em desenvolvimento no útero através da manutenção adesão celular sustentada pela célula endotelial (Dumont, D. J., *et al.*, Genes & Development, 8: 1897 a 1909 [1994]; Sato, T. N., *et al.*, Nature, 376: 70 a 74 [1995]; Suri, C., *et al.*, [1996], supra). O papel de Ang-1 na estabilização de vaso é considerada ser conservada no adulto, onde ela é expressada ampla e constitutivamente (Hanahan, D., Science, 277: 48 a 50 [1997]; Zagzag, D., *et al.*, Experimental Neurology, 159: 391 a 400 [1999]). Ao contrário, a expressão de Ang-2 é primariamente limitada aos sítios de remodelagem vascular, onde ela é julgada bloquear a função da Ang-1, induzindo deste modo um estado de plasticidade vascular condutiva à angiogênese (Hanahan, D., [1997], supra; Holash, J., *et al.*, Science, 284: 1994 a 1998 [1999]; Maisonpierre, P. C., *et al.*, [1997], supra).

Numerosos estudos publicados têm significantemente demonstrado a expressão seletiva em vaso da Ang-2 em estados de doença associados com a angiogênese. Estas condições patológicas incluem, por exemplo, psoríase, degeneração macular e câncer (Bunone, G., *et al.*, American Journal of Pathology, 155: 1967 a 1976 [1999]; Etoh, T., *et al.*, Cancer Research, 61: 2145 a 2153 [2001]; Hangai, M., *et al.*, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42: 1617 a 1625 [2001]; Holash, J., *et al.*, [1999] supra; Kuroda, K., *et al.*, Journal of Investigative Dermatology, 116:

PI0213223

713 a 720 [2001]; Otani, A., *et al.*, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 40: 1912 a 1920 [1999]; Stratmann, A., *et al.*, American Journal of Pathology, 153: 1459 a 1466 [1998]; Tanaka, S., *et al.*, J Clin Invest, 103: 34 a 345 [1999]; Yoshida, Y., *et al.*, International Journal of Oncology, 15: 1221 a 1225 [1999]; Yuan, K., *et al.*, Journal of Periodontal Research, 35: 165 a 171 [2000]; Zagzag, D., *et al.*, [1999] supra). A maior parte destes estudos focalizaram no câncer, em que muitos tipos de tumor dão a impressão de demonstrar a expressão vascular de Ang-2. Ao contrário com a sua expressão na angiogênese patológica, a expressão de Ang-2 em tecidos normais é extremamente limitada (Maisonpierre, P. C., *et al.*, [1997], supra; Mezquita, J., *et al.*, Biochemical e Biophysical Research Communications, 260: 492 a 498 [1999]). No adulto normal, os três sítios principais de angiogênese são o ovário, a placenta e o útero; Estes são os tecidos primários em tecidos normais (isto é, não cancerosos) em que o mRNA de Ang-2 foi detectado.

Certos estudos funcionais sugerem que a Ang-2 pode estar envolvida na angiogênese de tumor. Ahmad *et al.* (Cancer Res., 61: 1255 a 1259 [2001]) descrevem a supra-expressão de Ang-2 e mostram que ela está acentuadamente associada com um aumento no crescimento do tumor em um modelo de xenoenxerto de camundongo. Ver também Etoh *et al.*, supra e Tanaka *et al.*, supra, em que os dados estão apresentados associando acentuadamente a supra expressão de Ang-2 com a hipervascularidade de tumor. Entretanto, ao contrário, Yu *et al.* (Am. J. Path., 158: 563 a 570 [2001]) reportam dados para mostrar que a supraexpressão de Ang-2 no carcinoma pulmonar de Lewis e nas células de carcinoma mamário TA3 prolongou acentuadamente a sobrevivência de camundongos injetados com os transfectantes correspondentes.

Nos poucos anos passados, várias publicações sugeriram a Ang-1, Ang-2 e/ou Tie-2 como um alvo possível para a terapia anticâncer. Por exemplo, a Patente U.S. Nºs 6.166.185, 5.650.490 e 5.814.464 cada uma

PI0213223

divulga o conceito de anticorpos de ligando anti-Tie-2 e corpos receptores. Lin *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95: 8829 a 8834 [1998]) injetaram um Tie-2 que expressa adenovírus, solúvel em camundongos; o Tie-2 solúvel diminuiu acentuadamente o número e o tamanho dos tumores desenvolvidos pelos camundongos. Em um estudo relacionado, Lin *et al* (J. Clin. Invest., 100: 2072 a 2078 [1997]) injetaram uma forma solúvel de Tie-2 em ratos; este composto reduziu acentuadamente o tamanho do tumor nos ratos. Siemeister *et al.* (Cancer Res., 59: 3185 a 3189 [1999]) geraram linhagens de célula de melanoma humano que expressam o domínio extracelular de Tie-2, injetaram estas linhagens de célula em camundongos nus e concluíram que o Tie-2 solúvel acentuadamente resultou em uma "inibição significante" do crescimento do tumor e angiogênese do tumor. em vista desta informação e dado que tanto a Ang-1 quanto a Ang-2 ligam-se ao Tie-2, não está claro a partir destes estudos se a Ang-1, a Ang-2 ou o Tie-2 seriam um alvo atraente para a terapia anticâncer.

A fusão de certos peptídeos a uma proteína plasmática estável tal como uma região constante Ig para melhorar a meia vida destas moléculas foi descrita, por exemplo, na publicação PCT WO 00/24782, publicada em 4 de maio de 2000.

A fusão de uma proteína ou fragmento desta a uma proteína plasmática estável tal como uma região constante Ig para melhorar a meia vida destas moléculas foi variadamente descrita (ver, por exemplo, a Patente U.S. 5.480.981; Zheng *et al.*, J. Immunol., 154: 5590 a 5600, (1995); Fisher *et al.*, N. Engl. J. Med., 334: 1697 a 1702, (1996); Van Zee, K. *et al.*, J. Immunol., 156: 2221 a 2230, (1996); Patente U.S. 5.808.029, concedida em 15 de setembro de 1998; Capon *et al.*, Nature, 337: 525 a 531, (1989); Harvill *et al.*, Immunotech., 1: 95 a 105, (1995); WO 97/23614, publicada em 3 de julho de 1997; PCT/US 97/23183, depositada em 11 de dezembro de 1997; Linsley, J. Exp. Med., 174: 561 a 569, (1991); WO 95/21258, publicada em

PI0213223

10 de agosto de 1995).

Uma terapia anti-Ang-2 eficaz poderia beneficiar uma vasta população de pacientes cancerosos por que a maior parte dos tumores sólidos requerem a neovascularização para crescer além de 1 a 2 milímetros no diâmetro. Tal terapia poderia ter aplicação mais ampla também em outras doenças associadas com a angiogênese, tais como retinopatias, artrite e psoríase.

Existe uma necessidade não desenvolvida para identificar novos agentes que especificamente reconheçam e se liguem à Ang-2. Tais agentes, seriam úteis para a triagem de diagnóstico e intervenção terapêutica em estados de doença que estão associados com a atividade da Ang-2.

Consequentemente, é um objetivo da presente invenção fornecer agentes de ligação específicos de Ang-2 que modulem a atividade da Ang-2. Tais agentes da presente invenção tomam a forma de pepticorpos, isto é, peptídeos fundidos a outras moléculas tais como um domínio Fc de um anticorpo, onde a porção peptídica especificamente se liga à Ang-2.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção está direcionada em uma forma de realização aos peptídeos (também aludidos aqui como polipeptídeos) que se ligam à Ang-2. Também abrangidos na presente invenção estão as variantes e derivados de tais peptídeos.

Em uma outra forma de realização, os peptídeos e variantes e derivados destes da presente invenção são vinculados aos veículos.

Em uma outra forma de realização, os peptídeos podem ser fundidos aos domínios Fc, fornecendo deste modo pepticorpos. Opcionalmente, os pepticorpos compreendem pelo menos um peptídeo, por exemplo, SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 76 - SEQ ID NO: 157, assim como variantes e derivados deste. Além disso, os peptídeos podem compreender pelo menos um peptídeo de acordo com as fórmulas

PI0213223

apresentadas na SEQ ID NO: 65 - SEQ ID NO: 75 e na SEQ ID NO: 158.

Já em uma outra forma de realização, a invenção fornece moléculas de ácido nucléico que codificam os agentes de ligação específicos e variantes e derivados destes.

Ainda em uma outra forma de realização, a invenção fornece moléculas de ácido nucléico que codificam os pepticorpos, assim como variantes e derivados destes. Opcionalmente, tais moléculas de ácido nucléico incluem a SEQ ID NO: 33 - SEQ ID NO: 53.

Ainda em uma outra forma de realização, a invenção fornece um método de diminuir um tumor pela administração de uma quantidade eficaz dos agentes de ligação específicos da presente invenção a um paciente em necessidade deste. A invenção também fornece um método de inibir a angiogênese em um paciente, que compreende administrar uma quantidade eficaz dos agentes de ligação específicos da presente invenção a um paciente em necessidade deste. A invenção ainda fornece um método de tratar câncer em um paciente, que compreende uma quantidade eficaz dos agentes de ligação específicos da presente invenção a um paciente em necessidade deste.

A invenção também diz respeito a um polipeptídeo capaz de ligar a Ang-2 em que o polipeptídeo compreende a seqüência de aminoácido WDPWT (SEQ ID NO: 65) e em que o polipeptídeo é de 5 a 50 aminoácidos no comprimento, assim como aos sais deste fisiologicamente aceitáveis. O polipeptídeo também pode compreender a seqüência de aminoácido:

WDPWTC

(SEQ ID NO: 66)

e sais deste fisiologicamente aceitáveis. Adicionalmente, o polipeptídeo pode compreender a seqüência de aminoácido:

Cz^2WDPWT

(SEQ ID NO: 67)

em que z^2 é um resíduo de aminoácido polar, ácido ou neutro e

PI0213223

sais deste fisiologicamente aceitáveis. O polipeptídeo pode ainda compreender a seqüência de aminoácido:

$Cz^2WDPWTC$

(SEQ ID NO: 68)

em que z^2 é um resíduo de aminoácido polar, ácido ou neutro e sais deste fisiologicamente aceitáveis.

Em uma outra forma de realização, a invenção diz respeito a um polipeptídeo capaz de ligar Ang-2 que compreenda uma seqüência de aminoácido da fórmula:

$$a^1a^2a^3\mathbf{C}a^5\mathbf{WDPWTC}a^{12}a^{13}a^{14}$$

(SEQ ID NO: 69)

em que:

a^1, a^2 e a^3 são cada um independentemente resíduos de aminoácido;

a^5 é um resíduo de aminoácido;

a^{12} está ausente ou é um resíduo de aminoácido;

a^{13} está ausente ou é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou um básico;

a^{14} é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro;

e sais deste fisiologicamente aceitáveis. Em uma forma de realização preferida:

a^1 é V, I, P, W, G, S, Q, N, E, K, R ou H;

a^2 é V, P, M, G, S, Q, D, E, K, R ou H;

a^3 é A, V, P, M, F, T, G, D, E, K ou H;

a^8 é A, V, G, Q, N, D ou E;

a^{12} é S, Q, N, D, E, K ou R;

a^{13} é L, T ou H; e

a^{14} é V, L, I, W ou M.

PI0213223

Em uma forma de realização mais preferida, a^1 é Q; a^2 é E; a^3 é E; a^5 é D ou E; a^{12} é D ou E; a^{13} é H; e a^{14} é M.

Será avaliado que o uso de letras minúsculas com números sobrescritos inclusos (tais como a^1 e b^1) são intencionadas para identificar posições de aminoácido e não são intencionadas a indicar as abreviações de letra única para um dado aminoácido. Aqui as abreviações de aminoácido de letra única são dadas em letras maiúsculas.

A invenção ainda diz respeito a um polipeptídeo capaz de ligar Ang-2 que compreenda uma seqüência de aminoácido da fórmula:

$$b^1b^2b^3b^4b^5b^6\mathbf{C}b^8\mathbf{WDPWTC}b^{15}b^{16}b^{17}b^{18}b^{19}b^{20}$$

(SEQ ID NO: 70)

em que:

b^1 está ausente ou é um resíduo de aminoácido;

b^2 está ausente ou é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou um básico;

b^3, b^4, b^5 e b^6 estão cada um independentemente ausentes ou são resíduos de aminoácido;

b^8 é um resíduo de aminoácido;

b^{15} está ausente ou é um resíduo de aminoácido;

b^{16} está ausente ou é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou um básico;

b^{17} está ausente ou é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro;

b^{18}, b^{19} e b^{20} estão cada um independentemente ausentes ou são resíduos de aminoácido;

e sais deste fisiologicamente aceitáveis. Em uma forma de realização preferida:

b^1 está ausente ou A, V, L, P, W, F, T, G, S, Q, N, K, R ou H;

b^2 está ausente ou A, V, L, I, P, W, M, T, G, S, Y, N, K, R ou H;

PI0213223

b^3 está ausente ou A, L, I, P, W, M, T, G, S, Q, N, E, R ou H;

b^4 é V, I, P, W, G, S, Q, N, E, K, R ou H;

b^5 é V, P, M, G, S, Q, D, E, K, R ou H;

b^6 é A, V, P, M, F, T, G, D, E, K ou H;

b^8 é A, V, G, Q, N, D ou E;

b^{15} é S, Q, N, D, E, K ou R;

b^{16} é L, T ou H;

b^{17} é V, L, I, W ou M;

b^{18} está ausente ou A, V, L, P, W, F, T, G, Y, Q, D, E ou R;

b^{19} está ausente ou V, L, I, P, T, G, S, Y, Q, N, D, E ou R; e

b^{20} está ausente ou V, L, P, W, M, T, G, S, Y, Q, N, D, K ou R.

Em uma forma de realização mais preferida, b^1 está ausente ou P ou T; b^2 está ausente ou I ou N; b^3 está ausente ou R ou I; b^4 é Q; b^5 é E; b^6 é E; b^8 é D ou E; b^{15} é D ou E; b^{16} é H; b^{17} é M; b^{18} está ausente ou W ou P; b^{19} está ausente ou G ou E; e b^{20} está ausente ou V ou K.

Também será avaliado que a invenção preferivelmente diz respeito a um polipeptídeo que compreenda pelo menos uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste da SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 76 a SEQ ID NO: 118, inclusive, em que o polipeptídeo é capaz de ligar-se à Ang-2, assim como sais deste fisiologicamente aceitáveis. As seqüências de peptídeo são apresentadas abaixo:

PI0213223

TABELA 1

PEPTÍDEO	SEQ ID NO.	SEQÜÊNCIA DE PEPTÍDEO
Con4-44	76	PIRQEECDWDPWTCEHMWEV
Con4-40	77	TNIQEECEWDPWTCDHMPGK
Con4-4	78	WYEQDACEWDPWTCEHMAEV
Con4-31	79	NRLQEVCEWDPWTCEHMENV
Con4-C5	80	AATQEECEWDPWTCEHMPRS
Con4-42	81	LRHQEGCEWDPWTCEHMFDW
Con4-35	82	VPRQKDCEWDPWTCEHMYVG
Con4-43	83	SISHEECEWDPWTCEHMQVG
Con4-49	84	WAAQEECEWDPWTCEHMGRM
Con4-27	85	TWPQDKCEWDPWTCEHMGST
Con4-48	86	GHSQEECGWDPWTCEHMGTS
Con4-46	87	QHWQEECEWDPWTCDHMPSK
Con4-41	88	NVRQEKCEWDPWTCEHMPVR
Con4-36	89	KSGQVECNWDPWTCEHMPRN
Con4-34	90	VKTQEHCDWDPWTCEHMREW
Con4-28	91	AWGQEGCDWDPWTCEHMLPM
Con4-39	92	PVNQEDCEWDPWTCEHMPPM
Con4-25	93	RAPQEDCEWDPWTCAHMDIK
Con4-50	94	HGQNMECEWDPWTCEHMFRY
Con4-38	95	PRLQEECVWDPWTCEHMPLR
Con4-29	96	RTTQEKCEWDPWTCEHMESQ
Con4-47	97	QTSQEDCVWDPWTCDHMVSS
Con4-20	98	QVIGRPCEWDPWTCEHLEGL
Con4-45	99	WAQQEECAWDPWTCDHMVGL
Con4-37	100	LPGQEDCEWDPWTCEHMVRS
Con4-33	101	PMNQVECDWDPWTCEHMPRS
AC2-Con4	102	FGWSHGCEWDPWTCEHMGST
Con4-32	103	KSTQDDCDWDPWTCEHMVGP
Con4-17	104	GPRISTCQWDPWTCEHMDQL
Con4-8	105	STIGDMCEWDPWTCAHMQVD
AC4-Con4	106	VLGGQGCEWDPWTCRLLQGW
Con4-1	107	VLGGQGCQWDPWTCSHLEDG
Con4-C1	108	TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG
Con4-21	109	TKGKSVCQWDPWTCSHMQSG
Con4-C2	110	TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG
Con4-18	111	WVNEVVCEWDPWTCNHWDTP
Con4-19	112	VVQVGMCQWDPWTCKHMRLQ
Con4-16	113	AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV
Con4-11	114	QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR
Con4-C4	115	TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG
Con4-23	116	TSQRVGCEWDPWTCQHLTYT
Con4-15	117	QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS
Con4-9	118	GTSPSFCQWDPWTCSHMVQG
TN8-Con4*	4	QEECEWDPWTCEHM

* Será avaliado que certos peptídeos e/ou pepticorpos podem conter o prefixo "TN", "TN8" ou "TN12" e que este prefixo pode estar presente ou não para um dado pepticorpo. Assim, por exemplo, os termos "TNS-Con4" e "Con4" são aqui usados intercambiavelmente.

PI0213223

Em uma outra forma de realização, a invenção diz respeito a uma composição de matéria tendo a fórmula:

$$(X^1)_a\text{-}F^1\text{-}(X^2)_b$$

e multímeros desta, em que:

F^1 é um veículo;

X^1 e X^2 são cada um independentemente selecionados de

$-(L^1)_c\text{-}P^1$;

$-(L^1)_c\text{-}P^1\text{-}(L^2)_d\text{-}P^2$;

$-(L^1)_c\text{-}P^1\text{-}(L^2)_d\text{-}P^2\text{-}(L^3)_e\text{-}P^3$; e

$-(L^1)_c\text{-}P^1\text{-}(L^2)_d\text{-}P^2\text{-}(L^3)_e\text{-}P^3\text{-}(L^4)_f\text{-}P^4$;

em que um ou mais de P^1, P^2, P^3 e P^4 cada um independentemente compreende um polipeptídeo como aqui descrito. Por exemplo, em uma forma de realização preferida, P^1, P^2, P^3 e P^4 cada um pode independentemente compreender um polipeptídeo da SEQ ID NO: 3 à SEQ ID NO: 6, e/ou SEQ ID NO: 76 à SEQ ID NO: 157.

Em uma outra forma de realização, a composição de matéria é das fórmulas:

$$X^1\text{-}F^1$$

ou

$$F^1\text{-}X^2$$

e sais destes fisiologicamente aceitáveis, onde X^1, F^1 e X^2 são como aqui definidos. Em uma outra forma de realização, a composição de matéria é da fórmula:

$$F^1\text{-}(L^1)_c\text{-}P^1$$

e sais deste fisiologicamente aceitáveis, onde L^1, F^1 e P^1 são como aqui definidos. Já em uma outra forma de realização, a composição de matéria é da fórmula:

$$F^1\text{-}(L^1)_c\text{-}P^1\text{-}(L^2)_d\text{-}P^2$$

e sais deste fisiologicamente aceitáveis, onde L^1, F^1, P^1, P^2 e c

PI0213223

e d são como aqui definidos. Ainda em uma outra forma de realização a composição de matéria é da fórmula:

$$\mathbf{P^1\text{-}(L^1)_c\text{-}F^1\text{-}(L^2)_d\text{-}P^2}$$

e sais deste fisiologicamente aceitáveis. Em uma forma de realização preferida, F^1 é um domínio Fc ou fragmento deste.

A invenção ainda diz respeito a um polipeptídeo capaz de ligar-se à Ang-2 que compreende uma seqüência de aminoácido da fórmula:

$$\mathbf{Pc^2Dc^4Lc^6c^7c^8LY}$$

(SEQ ID NO: 71)

em que

c^2 é um resíduo de aminoácido hidrofóbico, neutro

c^4 é um A, D ou E

c^6 é um resíduo de aminoácido ácido

c^7 é um resíduo de aminoácido; e

c^8 é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou básico;

e sais deste fisiologicamente aceitáveis. Em uma forma de realização preferida, c^2 é L ou M. Em uma outra forma de realização preferida, c^6 é D ou E.

A invenção ainda diz respeito a um polipeptídeo capaz de ligar-se à Ang-2 que compreende uma seqüência de aminoácido da fórmula:

$$d^1d^2d^3d^4\mathbf{P}d^6\mathbf{D}d^8\mathbf{L}d^{10}d^{11}d^{12}\mathbf{LY}d^{15}d^{16}d^{17}d^{18}d^{19}d^{20}d^{21}d^{22}$$

(SEQ ID NO: 72)

em que,

d^1 está ausente ou é um resíduo de aminoácido;

d^2 está ausente ou é um resíduo de aminoácido polar neutro, ácido ou um básico;

d^3 está ausente ou é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro;

PI0213223

d^4 está ausente ou é um resíduo de aminoácido;

d^6 é um resíduo de aminoácido hidrofóbico, neutro;

d^8 é um A, D ou E;

d^{10} é um resíduo de aminoácido ácido;

d^{11} é um resíduo de aminoácido;

d^{12} é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou básico;

d^{15} está ausente ou é um resíduo de aminoácido polar neutro, ácido ou um básico;

d^{16} está ausente ou é um resíduo de aminoácido polar neutro, ácido ou um básico;

d^{17} está ausente ou é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro;

d^{18} está ausente ou é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro;

d^{19} está ausente ou é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou básico;

d^{20} está ausente ou é um resíduo de aminoácido;

d^{21} está ausente ou é um resíduo de aminoácido polar neutro, ácido ou um básico;

d^{22} está ausente ou é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou básico;

e sais deste fisiologicamente aceitáveis. Em uma forma de realização preferida:

d^1 é T, S, Q, R ou H;

d^2 é T, Q, N ou K;

d^3 é F;

d^4 é M, Q, E ou K;

d^6 é L ou M;

PI0213223

d^8 é D ou E;
d^{10} é E;
d^{11} é Q ou E;
d^{12} é T ou R;
d^{15} Y, D, E ou K;
d^{16} é Q;
d^{17} é W ou F;
d^{18} é L, I, M ou T;
d^{19} é L, F ou Y;
d^{20} é Q, D ou E;
d^{21} está ausente, Q ou H;
d^{22} está ausente, A, L, G, S ou R.

Em uma forma de realização preferida, o polipeptídeo compreende pelo menos uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste de SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 119 à SEQ ID NO: 142, inclusive, em que o polipeptídeo é capaz de ligar-se à Ang-2. As SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NOS: 119 a 142 são apresentadas abaixo:

Peptídeo	SEQ ID NO.	Seqüência de peptídeo
L1-1	119	QNYKPLDELDATLYEHFIFHYT
L1-2	120	LNFTPLDELEQTLYEQWTLQQS
L1-3	121	TKFNPLDELEQTLYEQWTLQHQ
L1-4	122	VKFKPLDALEQTLYEHWMFQQA
Ll-5	123	VKYKPLDELDEILYEQQTFQER
L1-7	124	TNFMPMDDLEQRLYEQFILQQG
L1-9	125	SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA
Ll-10	126	QKFQPLDELEQTLYEQFMLQQA
L1-11	127	QNFKPMDELEDTLYKQFLFQHS
L1-12	128	YKFTPLDDLEQTLYEQWTLQHV
L1-13	129	QEYEPLDELDETLYNQWMFHQR
L1-14	130	SNFMPLDELEQTLYEQFMLQHQ
L1-15	131	QKYQPLDELDKTLYDQFMLQQG
L1-16	132	QKFQPLDELEETLYKQWTLQQR
L1-17	133	VKYKPLDELDEWLYHQFTLHHQ
L1-18	134	QKFMPLDELDEILYEQFMFQQS
L1-19	135	QTFQPLDDLEEYLYEQWIRRYH
L1-20	136	EDYMPLDALDAQLYEQFILLHG
L1-21	137	HTFQPLDELEETLYYQWLYDQL
L1-22	138	YKFNPMDELEQTLYEEFLFQHA
AC6-L1	139	TNYKPLDELDATLYEHWILQHS
L1-C1	140	QKFKPLDELEQTLYEQWTLQQR
L1-C2	141	TKFQPLDELDQTLYEQWTLQQR
L1-C3	142	TNFQPLDELDQTLYEQWTLQQR
L1	6	KFNPLDELEETLYEQFTFQQ

PI0213223

A invenção também diz respeito a um polipeptídeo capaz de ligar-se à Ang-2 que compreende uma seqüência de aminoácido da fórmula:

$$\mathbf{RP}e^3e^4e^5e^6e^7\mathbf{G}$$

(SEQ ID NO: 73)

em que

e^3 é um resíduo de aminoácido polar neutro;

e^4 é um resíduo de aminoácido ácido;

e^5 é um resíduo de aminoácido polar neutro ou um ácido;

e^6 é um resíduo de aminoácido hidrofóbico, neutro;

e^7 é um resíduo de aminoácido hidrofóbico, neutro;

e sais deste fisiologicamente aceitáveis. Em uma forma de realização preferida, e^3 é Y ou C. Em uma outra forma de realização preferida, e^4 é D ou E. Ainda em uma outra forma de realização preferida e^6 é I ou M. A invenção ainda diz respeito a um polipeptídeo capaz de ligar-se à Ang-2 que compreenda uma seqüência de aminoácido da fórmula:

$$f^1f^2f^3f^4\mathbf{RP}f^7f^8f^9f^{10}f^{11}\mathbf{G}f^{13}f^{14}f^{15}f^{16}f^{17}f^{18}f^{19}f^{20}$$

(SEQ ID NO: 74)

em que,

f^1 é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro;

f^2 é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro;

f^3 é um resíduo de aminoácido polar neutro ou ácido;

f^4 é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro;

f^7 é um resíduo de aminoácido polar neutro;

f^8 é um resíduo de aminoácido ácido;

f^9 é um resíduo de aminoácido polar neutro ou ácido;

f^{10} é um resíduo de aminoácido hidrofóbico, neutro;

PI0213223

f^{11} é um resíduo de aminoácido hidrofóbico, neutro;

f^{13} é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro;

f^{14} é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro;

f^{15} é um resíduo de aminoácido polar neutro;

f^{16} é um resíduo de aminoácido polar neutro;

f^{17} é um resíduo de aminoácido polar neutro ou ácido;

f^{18} é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro ou básico;

f^{19} é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro; e

f^{20} é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro;

e sais deste fisiologicamente aceitáveis

Em uma forma de realização preferida:

f^{1} é S, A ou G;

f^{2} é G, Q ou P;

f^{3} é Q, G ou D;

f^{4} é L, M ou Q;

f^{7} é C ou Y;

f^{8} é E ou D;

f^{9} é E, G ou D;

f^{10} é I ou M;

f^{11} é F ou L;

f^{13} é C ou W;

f^{14} é G ou P;

f^{15} T ou N;

f^{16} é Q, Y ou K;

f^{17} é N, D ou Q;

PI0213223

f^{18} é L, V, W ou R;

f^{19} é A, Q, Y ou I; e

f^{20} é L, A, G ou V.

Em uma forma de realização mais preferida, a invenção diz respeito a um polipeptídeo que compreenda pelo menos uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste da SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 143 à SEQ ID NO: 148, inclusive, em que o polipeptídeo é capaz de ligar-se à Ang-2 e sais deste fisiologicamente aceitáveis. A SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 143 à SEQ ID NO: 148 são como segue.

Peptídeo	SEQ ID NO:	Seqüência
Con1-1	143	AGGMRPYDGMLGWPNYDVQA
Con1-2	144	QTWDDPCMHILGPVTWRRCI
Con1-3	145	APGQRPYDGMLGWPTYQRIV
Con1-4	146	SGQLRPCEEIFGCGTQNLAL
Con1-5	147	FGDKRPLECMFGGPIQLCPR
Con1-6	148	GQDLRPCEDMFGCGTKDWYG
Con1	3	KRPCEEIFGGCTYQ

Ainda em um outro aspecto, a invenção diz respeito a um polipeptídeo capaz de ligar-se à Ang-2 que compreenda uma seqüência de aminoácido da fórmula:

$$\mathbf{C}g^{2}\mathbf{G}g^{4}g^{5}\mathbf{DPFT}g^{10}\mathbf{GC}g^{13}$$

(SEQ ID NO: 75)

em que

g^2 é um resíduo de aminoácido ácido;

g^4 é um resíduo de aminoácido hidrofóbico, neutro;

g^5 é E, D ou Q;

g^{10} é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro;

g^{13} é um resíduo ácido;

e sais deste fisiologicamente aceitáveis. Em uma forma de realização preferida, g^2 é E ou D. Em uma outra forma de realização preferida, g^4 é V ou M. Já em uma outra forma de realização, g^{10} é F ou Q.

PI0213223

Ainda em uma outra forma de realização, g^{13} é D ou E.

A invenção ainda diz respeito a um polipeptídeo capaz de ligar-se à Ang-2 que compreenda uma seqüência de aminoácido da fórmula:

$h^1h^2h^3h^4$**C**h^6**G**h^8h^9**DPFT**h^{14}**GC**$h^{17}h^{18}h^{19}h^{20}$

(SEQ ID NO: 158)

em que,

h^1 está ausente ou é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou um básico;

h^2 é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro;

h^3 é um resíduo de aminoácido ácido;

h^4 é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro;

h^6 é um resíduo de aminoácido ácido;

h^8 é um resíduo de aminoácido hidrofóbico, neutro;

h^9 é E, D ou Q;

h^{14} é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro;

h^{17} é um resíduo de aminoácido ácido;

h^{18} é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou um básico;

h^{19} é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro; e

h^{20} está ausente ou é um resíduo de aminoácido;

e sais deste fisiologicamente aceitáveis.

Em uma forma de realização preferida,

h^1 está ausente ou A, L, M, G, K ou H;

h^2 é L, F ou Q;

h^3 é D ou E;

PI0213223

h^4 é W ou Y;

h^6 é D ou E;

h^8 é V ou M;

h^{14} é F ou Q;

h^{17} é D ou E;

h^{18} é M, Y, N ou K;

h^{19} é L ou Q; e

h^{20} está ausente ou M, T, G, S, D, K ou R.

Em uma forma de realização mais preferida, a invenção diz respeito a um polipeptídeo que compreenda pelo menos uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste da SEQ ID NO: 5 ou SEQ ED NO: 149 à SEQ ID NO: 157 inclusive, em que o dito polipeptídeo é capaz de ligar-se à Ang-2 e sais deste fisiologicamente aceitáveis. A SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 149 à SEQ ID NO: 157 são apresentadas abaixo.

Peptídeo	SEQ ID NO:	Seqüência
12-9-1	149	GFEYCDGMEDPFTFGCDKQT
12-9-2	150	KLEYCDGMEDPFTQGCDNQS
12-9-3	151	LQEWCEGVEDPFTFGCEKQR
12-9-4	152	AQDYCEGMEDPFTFGCEMQK
12-9-5	153	LLDYCEGVQDPFTFGCENLD
12-9-6	154	HQEYCEGMEDPFTFGCEYQG
12-9-7	155	MLDYCEGMDDPFTFGCDKQM
12-9-C2	156	LQDYCEGVEDPFTFGCENQR
12-9-Cl	157	LQDYCEGVEDPFTFGCEKQR
12-9	5	FDYCEGVEDPFTFGCDNH

Em uma forma de realização altamente preferida, a invenção diz respeito a um uma composição de matéria tendo a fórmula:

$$(X^1)_q\text{-}F^1\text{-}(X^2)_r$$

e multímeros desta, em que:

F^1 é um veículo;

X^1 e X^2 são cada um independentemente selecionados de

$-(L^1)_s\text{-}P^1$;

$-(L^1)_s\text{-}P^1\text{-}(L^2)_t\text{-}P^2$;

$-(L^1)_s\text{-}P^1\text{-}(L^2)_t\text{-}P^2\text{-}(L^3)_u\text{-}P^3$; e

PI0213223

$-(L^1)_s-P^1-(L^2)_t-P^2-(L^3)_u-P^3-(L^4)_v-P^4$;

em que um ou mais de P^1, P^2, P^3 e P^4 cada um compreende independentemente um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste de:

(a) a seqüência de aminoácido WDPWT (SEQ ID NO: 65), em que o dito polipeptídeo é de 5 a 50 aminoácidos no comprimento;

(b) a seqüência de aminoácido WDPWTC (SEQ ID NO: 66);

(c) a seqüência de aminoácido Cz^2WDPWT (SEQ ID NO: 67), em que z^2 é um resíduo de aminoácido polar, ácido ou neutro;

(d) a seqüência de aminoácido Cz^2WDPWTC (SEQ ID NO: 68), em que z^2 é um resíduo de aminoácido polar, ácido ou neutro;

(e) a seqüência de aminoácido $Pc^2Dc^4Lc^6c^7c^8LY$ (SEQ ID NO: 71) em que c^2 é um resíduo de aminoácido hidrofóbico, neutro; c^4 é A, D ou E; c^6 é um resíduo de aminoácido ácido; c^7 é um resíduo de aminoácido; e c^8 é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro, polar neutro ou básico;

(f) a seqüência de aminoácido $RPe^3e^4e^5e^6e^7G$ (SEQ ID NO: 73) em que e^3 é um resíduo de aminoácido polar neutro; e^4 é um resíduo de aminoácido ácido; e^5 é um resíduo de aminoácido polar neutro ou um ácido; e^6 é um resíduo de aminoácido hidrofóbico, neutro; e e^7 é um resíduo de aminoácido hidrofóbico, neutro;

(g) a seqüência de aminoácido $Cg^2Gg^4g^5DPFTg^{10}GCg^{13}$ (SEQ ID NO: 75) em que g^2 é um resíduo de aminoácido ácido; g^4 é um resíduo de aminoácido hidrofóbico, neutro; g^5 é um resíduo de aminoácido polar neutro ou um ácido; g^{10} é um resíduo de aminoácido hidrofóbico neutro ou polar neutro; e g^{13} é um resíduo ácido;

(h) um polipeptídeo da SEQ ID NO: 1;

(i) um polipeptídeo da SEQ ID NO: 2; e

(j) um polipeptídeo da SEQ ID NO: 7;

em que L^1, L^2, L^3 e L^4 são cada um independentemente ligadores; e q, r, s, t, u e v são cada um independentemente 0 ou 1, contanto

PI0213223

que pelo menos um de q e r seja 1;

e sais deste fisiologicamente aceitáveis.

Será avaliado que a invenção ainda diz respeito a um polipeptídeo de fusão que compreenda pelo menos um peptídeo descrito como aqui descrito e um veículo, em que o polipeptídeo de fusão é capaz de ligar-se à Ang-2 e sais deste fisiologicamente aceitáveis. No polipeptídeo de fusão, o veículo é preferivelmente pelo menos um de um domínio Fc, polietileno glicol, um lipídeo, um grupo colesterol, um carboidrato e um oligossacarídeo. Outros veículos adequados, tais como albumina e outros, serão avaliados por aqueles habilitados na técnica e estão abrangidos dentro do escopo da invenção.

Uma pessoa habilitada na técnica reconhecerá que várias moléculas pode ser inseridas na estrutura de agente de ligação específica. Assim uma dada molécula pode ser inserida, por exemplo, entre as porções de peptídeo e veículo dos agentes de ligação específicos ou inserida dentro da própria porção de peptídeo, enquanto retém a atividade desejada do agente de ligação específico. Uma pessoa pode facilmente inserir por exemplo, moléculas tais como um domínio Fc ou fragmento deste, polietileno glicol ou outras moléculas relacionadas tais como dextrano, um ácido graxo, um lipídeo, um grupo colesterol, um carboidrato pequeno, um peptídeo, um agente citotóxico, um agente quimioterapêutico, uma porção detectável como aqui descrita (que inclui agentes fluorescentes, radiorrótulos tais como radioisótopos), um oligossacarídeo, oligonucleotídeo, um polinucleotídeo, RNA de interferência (ou outro), enzimas, hormônios ou coisa parecida. Outras moléculas adequadas para a inserção deste modo serão avaliadas por aqueles habilitados na técnica e estão abrangidas dentro do escopo da invenção. Isto inclui a inserção, por exemplo, de uma molécula desejada entre dois aminoácidos consecutivos, opcionalmente unidos por um ligador adequado. Por via de exemplo, na seqüência de pepticorpo Con4(C):

PI0213223

M-Fc-GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 23)

uma pessoa habilitada na técnica poderia facilmente inserir uma molécula desejada entre, por exemplo, os dois resíduos de glutamina adjacentes ("QQ") para obter uma estrutura e/ou função desejada, enquanto retém a capacidade do peptídeo para ligar-se à Ang-2. Assim, esta seqüência seria modificada como segue:

M-Fc-GGGGGAQ-[**molécula**]-QEECEWDPWTCEHMLE

Moléculas ligadoras adequadas podem ser adicionadas se desejado. Será ainda avaliado que a molécula pode ser inserida em vários locais na molécula, incluindo nas cadeias laterais adequadas, entre o veículo e a seqüência de peptídeo como segue:

M-Fc-[**molécula**]-GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMLE

ou em qualquer outro local desejado por uma pessoa habilitada na técnica. Outras formas de realização adequadas estarão evidentes àqueles habilitados na técnica.

Ainda em uma outra forma de realização, a invenção diz respeito a um polinucleotídeo que codifica os agentes de ligação específicos (incluindo, mas não limitado aos peptídeos e/ou pepticorpos) da invenção, como aqui descritos. Uma pessoa habilitada na técnica avaliará que onde a seqüência de aminoácido é conhecida, a(s) seqüência(s) de nucleotídeo correspondente(s) pode(m) ser facilmente determinada(s) usando técnicas conhecidas. Ver por exemplo Suzuki, D., A Introduction to Genetic Analysis, W. H. Freeman Pub. Co. (1986). As seqüências de nucleotídeo exemplares que codificam os peptídeos da invenção são apresentadas abaixo. Uma pessoa habilitada na técnica reconhecerá que mais do que um códon pode codificar um dado aminoácido e portanto a invenção diz respeito a qualquer seqüência de nucleotídeo que codifique os peptídeos e/ou pepticorpos da invenção.

PI0213223

Peptídeo	Seq. Id No.	Seqüência de peptídeo	Seqüência de DNA Exemplar
Con4-44	76	PIRQEECDWDPWTCEHMWEV	ccgatccgtcaggaagaatgcga ctgggacccgtggacctgcgaac acatgtgggaagtt (SEQ ID NO: 159)
Con4-40	77	TNIQEECEWDPWTCDHMPGK	accaacatccaggaagaatgcga atgggacccgtggacctgcgacc acatgccgggtaaa (SEQ ID NO: 160)
Con4-4	78	WYEQDACEWDPWTCEHMAEV	tggtacgaacaggacgcttgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatggctgaagtt (SEQ ID NO: 161)
Con4-31	79	NRLQEVCEWDPWTCEHMENV	aaccgtctgcaggaagtttgcgaa tgggacccgtggacctgcgaaca catggaaaacgtt (SEQ ID NO: 162)
Con4-C5	80	AATQEECEWDPWTCEHMPRS	gctgctacccaggaagaatgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgccgcgttcc (SEQ ID NO: 163)
Con4-42	81	LRHQEGCEWDPWTCEHMFDW	ctgcgtcaccaggaaggttgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgttcgactgg (SEQ ID NO: 164)

PI0213223

Con4-35	82	VPRQKDCEWDPWTCEHMYVG	gttccgcgtcagaaagactgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgtacgttggt (SEQ ID NO: 165)
Con4-43	83	SISHEECEWDPWTCEHMQVG	tccatctcccacgaagaatgcgaa tgggacccgtggacctgcgaaca catgcaggttggt (SEQ ID NO: 360)
Con4-49	84	WAAQEECEWDPWTCEHMGRM	tgggctgctcaggaagaatgcga atgggatccgtggacttgcgaaca catgggtcgtatg (SEQ ID NO: 166)
Con4-27	85	TWPQDKCEWDPWTCEHMGST	acttggccgcaggacaaatgcga atgggatccgtggacttgcgaaca catgggttctact (SEQ ID NO: 167)
Con4-48	86	GHSQEECGWDPWTCEHMGTS	ggtcactcccaggaagaatgcgg ttgggacccgtggacctgcgaac acatgggtacgtcc (SEQ ID NO: 168)
Con4-46	87	QHWQEECEWDPWTCDHMPSK	cagcactggcaggaagaatgcga atgggacccgtggacctgcgacc acatgccgtccaaa (SEQ ID NO: 169)
Con4-41	88	NVRQEKCEWDPWTCEHMPVR	aacgttcgtcaggaaaaatgcgaa tgggacccgtggacctgcgaaca catgccggttcgt (SEQ ID NO: 170)
Con4-36	89	KSGQVECNWDPWTCEHMPRN	aaatccggtcaggttgaatgcaac tgggacccgtggacctgcgaaca catgccgcgtaac (SEQ ID NO: 171)
Con4-34	90	VKTQEHCDWDPWTCEHMREW	gttaaaacccaggaacactgcga ctgggacccgtggacctgcgaac acatgcgtgaatgg (SEQ ID NO: 172)
Con4-28	91	AWGQEGCDWDPWTCEHMLPM	gcttggggtcaggaaggttgcga ctgggacccgtggacctgcgaac acatgctgccgatg (SEQ ID NO: 173)
Con4-39	92	PVNQEDCEWDPWTCEHMPPM	ccggttaaccaggaagactgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgccgccgatg (SEQ ID NO: 174)

PCT/US2003/...

Con4-25	93	RAPQEDCEWDPWTCAHMDIK	cgtgctccgcaggaagactgcga atgggacccgtggacctgcgctc acatggacatcaaa (SEQ ID NO: 175)
Con4-50	94	HGQNMECEWDPWTCEHMFRY	cacggtcagaacatggaatgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatgttccgttac (SEQ ID NO: 176)
Con4-38	95	PRLQEECVWDPWTCEHMPLR	ccgcgtctgcaggaagaatgcgtt tgggacccgtggacctgcgaaca catgccgctgcgt (SEQ ID NO: 177)
Con4-29	96	RTTQEKCEWDPWTCEHMESQ	cgtaccacccaggaaaaatgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatggaatcccag (SEQ ID NO: 178)
Con4-47	97	QTSQEDCVWDPWTCDHMVSS	cagacctcccaggaagactgcgtt tgggacccgtggacctgcgacca catggtttcctcc (SEQ ID NO: 179)
Con4-20	98	QVIGRPCEWDPWTCEHLEGL	caggttatcggtcgtccgtgcgaa tgggacccgtggacctgcgaaca cctggaaggtctg (SEQ ID NO: 180)
Con4-45	99	WAQQEECAWDPWTCDHMVGL	tgggctcagcaggaagaatgcgc ttgggacccgtggacctgcgacc acatggttggtctg (SEQ ID NO: 181)
Con4-37	100	LPGQEDCEWDPWTCEHMVRS	ctgccgggtcaggaagactgcga atgggacccgtggacctgcgaac acatggttcgttcc (SEQ ID NO: 182)
Con4-33	101	PMNQVECDWDPWTCEHMPRS	ccgatgaaccaggttgaatgcga ctgggacccgtggacctgcgaac acatgccgcgttcc (SEQ ID NO: 183)
AC2-Con4	102	FGWSHGCEWDPWTCEHMGST	ttcggttggtctcacggttgcgaat gggatccgtggacttgcgaacac atgggttctacc (SEQ ID NO: 184)
Con4-32	103	KSTQDDCDWDPWTCEHMVGP	aaatccacccaggacgactgcga ctgggacccgtggacctgcgaac acatggttggtccg (SEQ ID NO: 185)

PI0213223

Con4-17	104	GPRISTCQWDPWTCEHMDQL	ggtccgcgtatctccacctgccag tgggacccgtggacctgcgaaca catggaccagctg (SEQ ID NO: 186)
Con4-8	105	STIGDMCEWDPWTCAHMQVD	tccaccatcggtgacatgtgcgaa tgggacccgtggacctgcgctca catgcaggttgac (SEQ ID NO: 187)
AC4-Con4	106	VLGGQGCEWDPWTCRLLQGW	gttctgggtggtcagggttgcgaa tgggacccgtggacctgccgtctg ctgcagggttgg (SEQ ID NO: 188)
Con4-1	107	VLGGQGCQWDPWTCSHLEDG	gttctgggtggtcagggttgccag tgggacccgtggacctgctccca cctggaagacggt (SEQ ID NO: 189)
Con4-C1	108	TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG	accaccatcggttccatgtgcgaa tgggacccgtggacctgcgctca catgcagggtggt (SEQ ID NO: 190)
Con4-21	109	TKGKSVCQWDPWTCSHMQSG	accaaaggtaaatccgtttgccag tgggacccgtggacctgctccca catgcagtccggt (SEQ ID NO: 191)
Con4-C2	110	TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG	accaccatcggttccatgtgccag tgggacccgtggacctgcgctca catgcagggtggt (SEQ ID NO: 192)
Con4-18	111	WVNEVVCEWDPWTCNHWDTP	tgggttaacgaagttgtttgcgaat gggacccgtggacctgcaaccac tgggacaccccg (SEQ ID NO: 193)
Con4-19	112	VVQVGMCQWDPWTCKHMRLQ	gttgttcaggttggtatgtgccagt gggacccgtggacctgcaaacac atgcgtctgcag (SEQ ID NO: 194)

PTO 13223

Con4-16	113	AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV	gctgttggttcccagacctgcgaat gggacccgtggacctgcgctcac ctggttgaagtt (SEQ ID NO: 195)
Con4-11	114	QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR	cagggtatgaaaatgttctgcgaat gggacccgtggacctgcgctcac atcgtttaccgt (SEQ ID NO: 196)
Con4-C4	115	TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG	accaccatcggttccatgtgccag tgggacccgtggacctgcgaaca catgcagggtggt (SEQ ID NO: 197)
Con4-23	116	TSQRVGCEWDPWTCQHLTYT	acctcccagcgtgttggttgcgaat gggacccgtggacctgccagcac ctgacctacacc (SEQ ID NO: 198)
Con4-15	117	QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS	cagtggtcctggccgccgtgcga atgggacccgtggacctgccaga ccgtttggccgtcc (SEQ ID NO: 199)
Con4-9	118	GTSPSFCQWDPWTCSHMVQG	ggtacctccccgtccttctgccagt gggacccgtggacctgctcccac atggttcagggt (SEQ ID NO: 200)
TN8-Con4	4	QEECEWDPWTCEHM	caggaagaatgcgaatgggaccc atggacttgcgaacacatg (SEQ ID NO: 201)
L1-1	119	QNYKPLDELDATLYEHFIFHYT	cagaactacaaaccgctggacga actggacgctaccctgtacgaaca cttcatcttccactacacc (SEQ ID NO: 202)
L1-2	120	LNFTPLDELEQTLYEQWTLQQS	ctgaacttcaccccgctggacgaa ctggaacagaccctgtacgaaca gtggaccctgcagcagtcc (SEQ ID NO: 203)
L1-3	121	TKFNPLDELEQTLYEQWTLQIIQ	accaaattcaacccgctggacga actggaacagaccctgtacgaac agtggaccctgcagcaccag (SEQ ID NO: 204)

PI0213223

36

L1-4	122	VKFKPLDALEQTLYEHWMFQQA	gttaaattcaaaccgctggacgct ctggaacagaccctgtacgaaca ctggatgttccagcaggct (SEQ ID NO: 205)
L1-5	123	VKYKPLDELDEILYEQQTFQER	gttaaatacaaaccgctggacgaa ctggacgaaatcctgtacgaacag cagaccttccaggaacgt (SEQ ID NO: 206)
L1-7	124	TNFMPMDDLEQRLYEQFILQQG	accaacttcatgccgatggacgac ctggaacagcgtctgtacgaaca gttcatcctgcagcagggt (SEQ ID NO: 207)
L1-9	125	SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA	tccaaattcaaaccgctggacgaa ctggaacagaccctgtacgaaca gtggaccctgcagcacgct (SEQ ID NO: 208)
L1-10	126	QKFQPLDELEQTLYEQFMLQQA	cagaaattccagccgctggacga actggaacagaccctgtacgaac agttcatgctgcagcaggct (SEQ ID NO: 209)
L1-11	127	QNFKPMDELEDTLYKQFLFQHS	cagaacttcaaaccgatggacga attggaagacaccctgtacaaaca gttcctgttccagcactcc (SEQ ID NO: 210)
L1-12	128	YKFTPLDDLEQTLYEQWTLQHV	tacaaattcaccccgctggacgac ctggaacagaccctgtacgaaca gtggaccctgcagcacgtt (SEQ ID NO: 211)
L1-13	129	QEYEPLDELDETLYNQWMFHQR	caggaatacgaaccgctggacga actggacgaaaccctgtacaacc agtggatgttccaccagcgt (SEQ ID NO: 212)
L1-14	130	SNFMPLDELEQTLYEQFMLQHQ	tccaacttcatgccgctggacgaa ctggaacagaccctgtacgaaca gttcatgctgcagcaccag (SEQ ID NO: 213)
L1-15	131	QKYQPLDELDKTLYDQFMLQQG	cagaaataccagccgctggacga actggacaaaaccctgtacgatca gttcatgctgcagcagggt (SEQ ID NO: 214)

PTO/13223

L1-16	132	QKFQPLDELEETLYKQWTLQQR	cagaaattccagccgctggacga actggaagaaaccctgtacaaac agtggaccctgcagcagcgt (SEQ ID NO: 215)
L1-17	133	VKYKPLDELDEWLYHQFTLHHQ	gttaaatacaaaccgctggacgaa ctggacgaatggctgtaccacca gttcaccctgcaccaccag (SEQ ID NO: 216)
L1-18	134	QKFMPLDELDEILYEQFMFQQS	cagaaattcatgccgctggacgaa ctggacgaaatcctgtacgaacag ttcatgttccagcagtccc (SEQ ID NO: 217)
L1-19	135	QTFQPLDDLEEYLYEQWIRRYH	cagaccttccagccgctggacga cctggaagaatacttgtacgaaca gtggatccgtcgttaccac (SEQ ID NO: 218)
L1-20	136	EDYMPLDALDAQLYEQFILLHG	gaagactacatgccgctggacgc tctggacgctcagctgtacgaaca gttcatcctgctgcacggt (SEQ ID NO: 219)
L1-21	137	HTFQPLDELEETLYYQWLYDQL	cacaccttccagccgctggacga actggaagaaaccctgtactacca gtggctgtacgaccagctg (SEQ ID NO: 220)
L1-22	138	YKFNPMDELEQTLYEEFLFQHA	tacaaattcaacccgatggacgaa ctggaacagaccctgtacgaaga attcctgttccagcacgct (SEQ ID NO: 221)
AC6-L1	139	TNYKPLDELDATLYEHWILQHS	accaactacaaaccgctggacga actggacgctaccctgtacgaaca ctggatcctgcagcactcc (SEQ ID NO: 222)
L1-C1	140	QKFKPLDELEQTLYEQWTLQQR	cagaaattcaaaccgctggacga actggaacagaccctgtacgaac agtggaccctgcagcagcgt (SEQ ID NO: 223)
L1-C2	141	TKFQPLDELDQTLYEQWTLQQR	accaaattccagccgctggacga actggaccagaccctgtacgaac agtggaccctgcagcagcgt (SEQ ID NO: 224)

PI0213223

L1-C3	142	TNFQPLDELDQTLYEQWTLQQR	accaacttccagccgctggacga actggaccagaccctgtacgaac agtggaccctgcagcagcgt (SEQ ID NO: 225)
L1	6	KFNPLDELEETLYEQFTFQQ	aaattcaacccgctggacgagctg gaagagactctgtacgaacagttt acttttcaacag (SEQ ID NO: 226)
Con1-1	143	AGGMRPYDGMLGWPNYDVQA	gctggtggtatgcgtccgtacgac ggtatgctgggttggccgaactac gacgttcaggct (SEQ ID NO: 227)
Con1-2	144	QTWDDPCMHILGPVTWRRCI	cagacttgggacgatccgtgcatg cacattctgggtccggttacttggc gtcgttgcatc (SEQ ID NO: 228)
Con1-3	145	APGQRPYDGMLGWPTYQRIV	gctccgggtcagcgtccgtacga cggtatgctgggttggccgaccta ccagcgtatcgtt (SEQ ID NO: 229)
Con1-4	146	SGQLRPCEEIFGCGTQNLAL	tccggtcagctgcgtccgtgcgaa gaaatcttcggttgcggtacccag aacctggctctg (SEQ ID NO: 230)
Con1-5	147	FGDKRPLECMFGGPIQLCPR	ttcggtgacaaacgtccgctggaa tgcatgttcggtggtccgatccag ctgtgcccgcgt (SEQ ID NO: 231)
Con1-6	148	GQDLRPCEDMFGCGTKDWYG	ggtcaggacctgcgtccgtgcga agacatgttcggttgcggtaccaa agactggtacggt (SEQ ID NO: 232)
12-9-1	149	GFEYCDGMEDPFTFGCDKQT	ggtttcgaatactgcgacggtatg gaagacccgttcaccttcggttgc gacaaacagacc (SEQ ID NO: 233)
12-9-2	150	KLEYCDGMEDPFTQGCDNQS	aaactggaatactgcgacggtatg gaagacccgttcacccagggttg cgacaaccagtcc (SEQ ID NO: 234)
12-9-3	151	LQEWCEGVEDPFTFGCEKQR	ctgcaggaatggtgcgaaggtgtt

PI0213223

			gaagacccgttcaccttcggttgc gaaaaacagcgt (SEQ ID NO: 235)
12-9-4	152	AQDYCEGMEDPFTFGCEMQK	gctcaggactactgcgaaggtatg gaagacccgttcaccttcggttgc gaaatgcagaaa (SEQ ID NO: 236)
12-9-5	153	LLDYCEGVQDPFTFGCENLD	ctgctggactactgcgaaggtgtt caggacccgttcaccttcggttgc gaaaacctggac (SEQ ID NO: 237)
12-9-6	154	HQEYCEGMEDPFTFGCEYQG	caccaggaatactgcgaaggtat ggaagacccgttcaccttcggttg cgaataccagggt (SEQ ID NO: 238)
12-9-7	155	MLDYCEGMDDPFTFGCDKQM	atgctggactactgcgaaggtatg gacgacccgttcaccttcggttgc gacaaacagatg (SEQ ID NO: 239)
12-9-C2	156	LQDYCEGVEDPFTFGCENQR	ctgcaggactactgcgaaggtgtt gaagacccgttcaccttcggttgc gaaaaccagcgt (SEQ ID NO: 240)
12-9-C1	157	LQDYCEGVEDPFTFGCEKQR	ctgcaggactactgcgaaggtgtt gaagacccgttcaccttcggttgc gaaaaacagcgt (SEQ ID NO: 241)
12-9	5	FDYCEGVEDPFTFGCDNH	ttcgactactgcgaaggtgttgaa gacccgttcactttcggctgtgata accac (SEQ ID NO: 242)

Ainda em uma outra forma de realização, a invenção diz respeito a vetores de expressão que compreendem pelo menos um polinucleotídeo da invenção. Em uma outra forma de realização, a invenção diz respeito a células hospedeiras que compreendem o vetor de expressão. Será avaliado que as células hospedeiras são preferivelmente células procarióticas (tais como células de *E. coli*) ou células eucarióticas.

A invenção também diz respeito a uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade eficaz de uma composição como aqui descrita, em mistura com um portador farmaceuticamente

PI0213223

aceitável.

A invenção também diz respeito a um método de inibir a angiogênese indesejada em um mamífero que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipeptídeo ou composição como aqui descritos. A invenção também diz respeito a um método de modular a angiogênese em um mamífero que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipeptídeo ou composição como aqui descritos. A invenção ainda diz respeito a um método de inibir o crescimento de tumor caracterizado pela angiogênese indesejada em um mamífero que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipeptídeo ou composição como aqui descritos. Adicionalmente, a invenção diz respeito a um método de tratar câncer em um mamífero que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipeptídeo ou composição como aqui descritos e um agente quimioterapêutico. Em uma forma de realização preferida, o agente quimioterapêutico é pelo menos um de 5-FU, CPT-11 e Taxotere. Será avaliado, entretanto, que outros agentes quimioterapêuticos adequados e outras terapias contra o câncer podem ser usados.

A invenção também diz respeito a um método de modular pelo menos um de permeabilidade vascular ou vazamento de plasma em um mamífero que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipeptídeo ou composição como aqui descritos. A invenção ainda diz respeito a um método de tratar pelo menos um de doença neovascular ocular, obesidade, hemangioblastoma, hemangioma, arteriosclerose, doença inflamatória, distúrbios inflamatórios, aterosclerose, endometriose, doença neoplástica, doença relacionada com o osso ou psoríase em um mamífero que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipeptídeo ou composição como aqui descritos.

PI0213223

Será avaliado que os agentes de ligação específicos da invenção podem ser usados para tratar várias doenças associadas com a angiogênese desregulada ou indesejada. Tais doenças incluem, mas não são limitadas à neovascularização ocular, tais como retinopatias (que inclui a retinopatia diabética e a degeneração macular relacionada com a idade), psoríase, hemangioblastoma, hemangioma, arteriosclerose, doença inflamatória, tais como uma doença inflamatória reumatóide ou reumática, especialmente artrite (que inclui a artrite reumatóide) ou outros distúrbios inflamatórios crônicos, tais como a asma crônica, aterosclerose arterial ou pós-transplantacional, endometriose e doenças neoplásticas, por exemplo os chamados tumores sólidos e tumores líquidos (tais como leucemias). As doenças adicionais que podem ser tratadas pela administração dos agentes de ligação específicos estará evidente àqueles habilitados na técnica. Tais doenças adicionais incluem, mas não são limitadas à obesidade, permeabilidade vascular, vazamento de plasma e distúrbios relacionados com o osso, que incluem a osteoporose. Assim, a invenção ainda diz respeito a métodos de tratar estas doenças associadas com a angiogênese desregulada ou indesejada.

Outras formas de realização desta invenção estarão facilmente evidentes a partir da divulgação fornecida com estas.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DAS FIGURAS

A Figura 1 representa um gráfico do volume do tumor (eixo y) versus o tempo (eixo x) em camundongos que carregam o tumor A-431 tratados com o pepticorpo TN8-Con4-C da presente invenção ou com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Os detalhes estão descritos nos Exemplos.

A Figura 2 representa um gráfico da concentração de pepticorpo (eixo y) versus o tempo no pós-dose (eixo x) em camundongos do tipo selvagem tratados com uma dose de 50 μg de pepticorpo 2xCon4-C, L1-

PI0213223

7-N ou L1-21-N. Os detalhes estão descritos nos Exemplos.

A Figura 3 representa um gráfico do volume do tumor (eixo y) versus o tempo (eixo x) em camundongos que carregam o tumor A431 tratados com pepticorpo 2xCon4-C de acordo com a presente invenção ou com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou pepticorpo de controle. Os detalhes estão descritos nos Exemplos.

A Figura 4 representa um gráfico que representa o crescimento *in vitro* de células A431 cultivadas tratadas com pepticorpo Con4-C de acordo com a presente invenção, pepticorpo de controle ou não tratadas. Os detalhes estão descritos nos Exemplos.

A Figura 5 representa um gráfico do volume do tumor (eixo y) versus o tempo (eixo x) em células de tumor Colo205 tratadas com pepticorpo Con4-C, pepticorpo L1-7-N, pepticorpo L1-21-N ou pepticorpo 2xCon4-C de acordo com a presente invenção ou com solução salina tamponada com fosfato (PBS), anticorpo anti-Ang-2 (Ab536) ou Fc. Os detalhes estão descritos nos Exemplos.

A Figura 6 representa um gráfico do volume do tumor (eixo y) versus o tempo (eixo x) em camundongos que carregam o tumor de xenoenxerto de Colo205 tratados com doses variáveis de pepticorpo 2xCon4-C de acordo com a presente invenção ou com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou Fc. Os detalhes estão descritos nos Exemplos.

A Figura 7 representa um gráfico do volume do tumor (eixo y) versus o tempo (eixo x) em camundongos que carregam o tumor de xenoenxerto de Colo205 tratados com pepticorpo 2xCon4-C de acordo com a presente invenção ou com pepticorpos de controle. A Figura 7 também representa um gráfico da área tingida com CD31/área total do tumor para estes pepticorpos. Os detalhes estão descritos nos Exemplos.

A Figura 8 representa um gráfico do volume do tumor (eixo y)

PI0213223

versus o tempo (eixo x) em camundongos que carregam o tumor de xenoenxerto de Colo205 tratados com o pepticorpo 2xCon4-C de acordo com a presente invenção ou com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou pepticorpo de controle. Os detalhes estão descritos nos Exemplos. Este gráfico mostra que os pepticorpos anti-Ang-2 são capazes de inibir o crescimento do tumor Colo205 independente de quando a dosagem começa.

A Figura 9 representa um resumo das taxas de resposta completa (CR) obtidas em camundongos nus fêmeas que usam anticorpo Ab536 ou com pepticorpo 2xCon4-C, tanto nos modelos de xenoenxerto de A431 quanto nos de Colo-205. Os detalhes estão descritos nos Exemplos.

A Figura 10A representa um gráfico do volume do tumor (eixo y) versus o tempo (eixo x) em camundongos que carregam o tumor de xenoenxerto de Colo205 tratados com pepticorpo 2xCon4-C de acordo com a presente invenção ou uma combinação de 2xCon4-C e taxotere ou com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou com PBS mais taxotere. Os detalhes estão descritos nos Exemplos.

A Figura 10B representa um gráfico do volume do tumor (eixo y) versus o tempo (eixo x) em camundongos que carregam o tumor de xenoenxerto de Colo205 tratados com pepticorpo 2xCon4-C de acordo com a presente invenção ou uma combinação de 2xCon4-C e 5-FU ou com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou com PBS mais 5-FU. Os detalhes estão descritos nos Exemplos.

A Figura 11A representa um gráfico de níveis de intumescimento da pata (AUC ± SE) em um modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos tratados com pepticorpo 2xCon4-C de acordo com a presente invenção ou com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou com pepticorpo de controle ou normal ou controles de artrite. Os detalhes estão descritos nos Exemplos.

A Figura 11B representa um gráfico de densidade mineral

óssea da pata (BNM) em um modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos tratados com pepticorpo 2xCon4-C de acordo com a presente invenção ou com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou com pepticorpo de controle ou normal ou controles de artrite. Os detalhes estão descritos nos Exemplos.

A Figura 11C representa um gráfico de mudança no peso corpóreo em um modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos tratados com pepticorpo 2xCon4-C de acordo com a presente invenção ou com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou com pepticorpo de controle ou normal ou controles de artrite. Os detalhes estão descritos nos Exemplos.

A Figura 12 representa dois gráficos que representam a inibição da angiogênese córnea induzida por VEGF em ratos. O primeiro gráfico representa vários vasos sangüíneos medidos em ratos tratados com albumina sérica bovina (BSA), VEGF mais solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou VEGF mais o pepticorpo Con4-C da invenção. O segundo gráfico representa a área de vasos sangüíneos (mm^2) em ratos tratados com BSA, VEGF mais solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou VEGF mais pepticorpo Con4-C da invenção. Os detalhes estão descritos nos Exemplos.

As Figuras 13A, 13B e 13C representam os dados de mapeamento de epítopo (O.D. 370) para a Ang-2 humana de comprimento completo (hAng-2), para o término N de hAng-2 e para o término C de hAng-2, respectivamente, para os pepticorpos TN8-Con4-C, L1-7-N e 12-9-3-C de acordo com a invenção, assim como para os pepticorpos de controle, Tie2-Fc, C2B8 ou 5B12. Os detalhes estão descritos nos Exemplos.

A Figura 14 representa a afinidade de ligação (KD) do pepticorpo 2 xCon-4-C de acordo com a invenção, que usa o ensaio Sapidyne KinExA. Os detalhes estão descritos nos Exemplos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

PI0213223

Os cabeçalhos de seção são aqui usados apenas com propósitos de organização e não devem ser interpretados de nenhum modo como limitantes da matéria objeto descrita.

Técnicas padrão podem ser usadas para a produção de molécula de DNA recombinante, proteína e anticorpo, assim como para a cultura de tecido e transformação celular. As reações enzimáticas e as técnicas de purificação são tipicamente realizadas de acordo com as especificações do fabricante ou como habitualmente realizado na técnica que usa procedimentos convencionais tais como aqueles apresentados em Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY [1989]) ou como aqui descritos. A menos que definições específicas sejam fornecidas, a nomenclatura utilizada em conexão e os procedimentos e técnicas de laboratório de química analítica, química orgânica sintética e química medicinal e farmacêutica aqui descritos são aqueles bem conhecidos e habitualmente usados na técnica. As técnicas padrão podem ser usadas para as sínteses químicas, análises químicas, preparação, formulação e liberação farmacêuticas e tratamento de pacientes.

Definições

Os termos usado por toda este relatório descritivo são definidos como segue, a menos que de outro modo limitados em exemplos específicos.

O termo "Ang-2" refere-se ao polipeptídeo apresentado na Figura 6 da Patente U.S. Nº 6.166.185 ("ligando-2 Tie-2") ou fragmentos deste assim como aos polipeptídeos relacionados que incluem variantes alélicas, variantes de união, variantes derivadas, de substituição, de supressões e/ou de inserção, peptídeos e polipeptídeos de fusão e homólogos interespécies. O polipeptídeo de Ang-2 pode ou não incluir resíduos terminais adicionais, por exemplo, seqüências líder, seqüências alvejadoras, metionina de terminal amino, resíduos metionina e lisina de terminal amino, e/ou

PI0213223

seqüências de proteínas identificadoras ou de fusão, dependendo da maneira em que ele é preparado.

O termo "biologicamente ativo" quando usado em relação a Ang-2 ou um agente de ligação específico de Ang-2 refere-se a um peptídeo ou polipeptídeo tendo pelo menos uma característica de atividade de Ang-2 ou de um agente de ligação específico de Ang-2. Um agente de ligação específico de Ang-2 pode ter atividade agonística, antagonística ou neutralizadora ou bloqueadora com respeito a pelo menos uma atividade biológica de Ang-2.

O termo "agente de ligação específico" refere-se a uma molécula, preferivelmente uma molécula proteinácea, que especificamente se liga à Ang-2 e variantes e derivados desta, como aqui definido. Um agente de ligação específico pode ser uma proteína, peptídeo, ácido nucléico, carboidrato, lipídeo ou composto de peso molecular pequeno que se liga preferencialmente à Ang-2. Em uma forma de realização preferida, o agente de ligação específico de acordo com a presente invenção é um peptídeo ou um pepticorpo, assim como fragmentos, variantes ou derivados destes, sozinhos ou em combinação com outras seqüências de aminoácido, fornecidas pelas técnicas conhecidas. Tais técnicas incluem, mas não são limitadas à clivagem enzimática, clivagem química, síntese de peptídeo ou técnicas recombinantes. Os agentes de ligação específicos anti-Ang-2 da presente invenção são capazes de ligar porções de Ang-2 que modulem, por exemplo, inibam ou promovam, a atividade biológica de Ang-2 e/ou outras atividades associadas com a Ang-2.

O termo "variantes," como aqui usado, inclui aqueles peptídeos e polipeptídeos em que resíduos de aminoácido são inseridos, suprimidos e/ou substituídos na seqüência de aminoácido que ocorre naturalmente (ou pelo menos uma conhecida) no lugar do agente de ligação. As variantes da invenção incluem as proteínas de fusão como descrito abaixo.

PI0213223

"Derivados" incluem aqueles agentes de ligação que foram quimicamente modificados em alguma maneira distinta das variantes de inserção, supressão ou substituição.

"Especificamente se liga à Ang-2" refere-se à capacidade de um agente de ligação específico (tal como um pepticorpo ou porção peptídica deste) da presente invenção para reconhecer e ligar polipeptídeo de Ang-2 humano maduro, de comprimento completo ou de comprimento parcial ou um ortólogo deste, tal que a sua afinidade (como determinada, por exemplo, pelos ensaios de ELISA de Afinidade ou BIAcore como aqui descritos) ou a sua capacidade de neutralização (como determinada por exemplo, pelos ensaios de ELISA de Neutralização aqui descritos ou ensaios similares) seja pelo menos 10 vezes tão grande, mas opcionalmente 50 vezes tão grande, 100, 250 ou 500 vezes tão grande ou ainda pelo menos 1000 vezes tão grande quanto a afinidade ou capacidade de neutralização do mesmo para qualquer outra angiopoietina ou outro peptídeo ou polipeptídeo, em que a porção peptídica do pepticorpo é primeiro fundida a uma porção de Fc humana para a avaliação em tal ensaio.

O termo "epítopo" refere-se àquela porção de qualquer molécula capaz de ser reconhecida e ligada por um agente de ligação específico, por exemplo, um pepticorpo, a uma ou mais das regiões de ligação de antígeno do agente de ligação. Os epítopos usualmente consistem de agrupamentos de superfície quimicamente ativa de moléculas, tais como por exemplo, cadeias laterais de aminoácidos ou carboidrato e têm características estruturais tridimensionais específicas assim como características de carga específicas. Os epítopos como aqui usados podem ser contíguos ou não contíguos.

O termo "epítopo inibidor e/ou neutralizador" é um epítopo, que quando ligado por um agente de ligação específico tal como um pepticorpo, resulta na perda (ou pelo menos a diminuição) da atividade

PI0213223

biológica da molécula, célula ou organismo que contenha tal epítopo, *in vivo*, *in vitro* ou *in situ*. No contexto da presente invenção, o epítopo neutralizador está localizado ou está associado com uma região biologicamente ativa de Ang-2. Alternativamente, o termo "epítopo ativador" é um epítopo, que quando ligado por um agente de ligação específico da invenção, tal como um anticorpo, resulta na ativação ou pelo menos na manutenção de uma conformação biologicamente ativa, de Ang-2.

O termo "fragmento de pepticorpo" refere-se a um peptídeo ou polipeptídeo que compreende menos do que um pepticorpo completo, intacto.

O termo "que ocorre naturalmente" quando usado em conexão com materiais biológicos tais como moléculas de ácido nucléico, polipeptídeos, células hospedeiras e outros, refere-se àqueles que são encontrados na natureza e não modificados por um ser humano.

O termo "isolado" quando usado em relação a Ang-2 ou a um agente de ligação específico de Ang-2 refere-se a um composto que está livre de pelo menos um polipeptídeo ou composto contaminante que é encontrado no seu ambiente natural e preferível e substancialmente livre de quaisquer outros polipeptídeos de mamífero contaminantes que poderiam interferir com o seu uso terapêutico ou em diagnóstico.

O termo "maduro" quando usado em relação ao pepticorpo de Ang-2 ou um fragmento deste ou a qualquer outro agente de ligação específico proteináceo de Ang-2 refere-se a um peptídeo ou um polipeptídeo que carece de uma seqüência líder ou de sinal. Quando um agente de ligação da invenção é expressado, por exemplo, em uma célula hospedeira procariótica, o peptídeo ou polipeptídeo "maduros" também podem incluir resíduos de aminoácido adicionais (mas ainda carece de uma seqüência líder) tais como uma metionina de terminal amino ou um ou mais resíduos de metionina e lisina. Um peptídeo ou polipeptídeo produzidos desta maneira podem ser utilizados com ou sem estes resíduos de aminoácido adicionais

PI0213223

tendo sido removidos.

Os termos "quantidade eficaz" e "quantidade terapeuticamente eficaz" quando usados em relação a um agente de ligação específico de Ang-2 refere-se a uma quantidade de um agente de ligação específico que é útil ou necessário para sustentar uma mudança observável no nível de uma ou mais atividades biológicas de Ang-2. A mudança pode ser um aumento ou diminuição no nível de atividade da Ang-2. Preferivelmente, a mudança é uma diminuição na atividade da Ang-2.

O termo "pepticorpo" refere-se a uma molécula que compreende um domínio de anticorpo Fc ligado a pelo menos um peptídeo. A produção de pepticorpos está no geral descrita na publicação PCT WO 00/24782, publicada em 4 de maio de 2000.

O termo "variantes," como aqui usado, inclui aquelas moléculas tais como peptídeos ou combinações de peptídeo-veículo tais como os pepticorpos da presente invenção em que os resíduos de aminoácido são inseridos, suprimidos e/ou substituídos na seqüência de aminoácido para tais moléculas. As variantes tendo um ou mais aminoácidos inseridos incluem proteínas de fusão como descrito abaixo.

"Derivados" incluem aqueles peptídeos e/ou combinações de peptídeo-veículo tais como pepticorpos que foram quimicamente modificados em alguma maneira distinta das variantes de inserção, supressão ou substituição.

O termo "fragmento" refere-se a um peptídeo ou combinação de peptídeo-veículo que compreende menos do que a seqüência de aminoácido de comprimento completo de tais peptídeos e/ou combinações de peptídeo-veículo. Um tal fragmento pode originar-se, por exemplo, de uma truncagem no término amino, uma truncagem no término carbóxi e/ou uma supressão interna de um resíduo ou resíduos da seqüência de aminoácido do peptídeo ou combinação de peptídeo-veículo. Os fragmentos podem resultar

PI0213223

da união de RNA alternativa ou da atividade de protease *in vivo* ou *in vitro*. Tais fragmentos também podem ser construídos pelos métodos químicos de síntese de peptídeo ou pela modificação de um polinucleotídeo que codifica um peptídeo, combinação de peptídeo-veículo ou uma porção Fc e/ou porção peptídica de um pepticorpo.

O termo "Fc" refere-se a um tipo de veículo da presente invenção e compreende a seqüência de um fragmento de ligação não antigênica de um anticorpo que resulta da digestão proteolítica de um anticorpo inteiro, seja na forma monomérica ou multimérica. A fonte do Fc na presente invenção é preferivelmente Fc totalmente humano e pode ser qualquer uma das imunoglobulinas, embora a IgG1 e IgG2 sejam preferidas. Entretanto, as moléculas Fc que são parcialmente humanas ou obtidas a partir de espécies não humanas também são aqui incluídas. As Fc's são fabricadas de polipeptídeos monoméricos que podem ser ligados em formas diméricas ou multiméricas pela associação covalente (isto é, ligações de dissulfeto) e não covalentes. O número de ligações de dissulfeto intermoleculares entre as subunidades monoméricas de moléculas Fc nativas varia de 1 a 4 dependendo da classe (por exemplo, IgG, IgA, IgE) ou subclasse (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgGA2). Um exemplo de uma Fc nativa é um dímero ligado por dissulfeto que resulta da digestão com papaína de uma IgG [ver Ellison *et al.* (1982), Nucl. Acids. Res. 10: 4071 a 4079]. O termo "Fc nativo" como aqui usado é genérico para as formas monoméricas, diméricas e multiméricas.

O termo "domínio Fc" abrange moléculas de Fc nativas e Fc variante e seqüências como definidas acima. Como com as variantes de Fc e Fc's nativas, o termo "domínio Fc" inclui moléculas nas formas monomérica ou multimérica, sejam digeridas a partir de anticorpo inteiro ou produzidas por outros meios.

O termo "multímero" como aplicado aos domínios de Fc ou

moléculas que compreendem domínios de Fc refere-se às moléculas tendo duas ou mais cadeias polipeptídicas covalente, não covalentemente associadas ou pelas interações tanto covalentes quanto não covalentes. As moléculas IgG tipicamente formam dímeros; IgM, pentâmeros; IgD, dímeros; e IgA, monômeros, dímeros, trímeros ou tetrâmeros. Os multímeros podem ser formados explorando-se a seqüência e a atividade resultante da fonte de Ig nativa da Fc ou derivatizando-se (como definido abaixo) uma tal Fc nativa.

O termo "dímero" como aplicado aos domínios de Fc ou às moléculas que compreendem os domínios de Fc refere-se às moléculas tendo duas cadeias polipeptídicas covalente ou não covalentemente associadas.

O termo "veículo" refere-se a uma molécula que impede a degradação e/ou aumenta a meia vida, reduz a toxicidade, reduz a imunogenicidade ou aumenta a atividade biológica de uma proteína terapêutica. Os veículos exemplares incluem um domínio Fc assim como um polímero linear (por exemplo, polietileno glicol (PEG), polilisina, dextrano, etc.); um polímero de cadeia ramificada (Ver, por exemplo, a Patente U.S. No. 4.289,872 a Denkenwalter *et al.*, concedida em 15 de setembro de 1981; Patente U. S. Nº 5.229.490 a Tam, concedida em 20 de julho de 1993; WO 93/21259 por Frechet *et al.*, publicada em 28 de outubro de 1993); um lipídeo; um grupo de colesterol (tal como um esteróide); um carboidrato ou oligossacarídeo; ou qualquer proteína natural ou sintética, polipeptídeo ou peptídeo que se ligam a um receptor remanescente. Os veículos são ainda descritos a seguir.

Os termos "derivatizante" e "derivado" ou "derivatizado" compreendem processos e compostos resultantes respectivamente em que (1) o composto tem uma porção cíclica; por exemplo, reticulação entre os resíduos de cisteinila dentro do composto; (2) o composto é reticulado ou tem um sítio de reticulação; por exemplo, o composto tem um resíduo de cisteinila e assim forma dímeros reticulados em cultura ou *in vivo*; (3) uma ou mais

PI0213223

ligações de peptidila são substituídas por uma ligação que não de peptidila; (4) o término N é substituído por -NRR1, NRC(O)R1, -NRC(O)OR1, -NRS(O)2R1, -NHC(O)NHR, um grupo succinimida ou benziloxicarbonil-NH- substituídos ou não substituídos, em que R e R1 e os substituintes do anel são como definidos a seguir; (5) o término C é substituído por -C(O)R2 ou -NR3R4 em que R2, R3 e R4 são como definidos a seguir; e (6) compostos em que porções de aminoácido individuais são modificados através do tratamento com agentes capazes de reagir com cadeias laterais ou resíduos terminais selecionados. Os derivados são mais descritos a seguir.

O termo "peptídeo" refere-se a moléculas de cerca de 3 a cerca de 75 aminoácidos, com moléculas de cerca de 5 a 50 aminoácidos preferidas, de 8 a 40 mais preferidas e aquelas de cerca de 10 a 25 aminoácidos as mais preferidas. Os peptídeos podem ser de seqüências de aminoácido de ocorrência natural ou artificiais (isto é, que não ocorrem naturalmente). Os peptídeos exemplares podem ser gerados por qualquer um dos métodos aqui apresentados, tais como transportados por uma coleção de peptídeo (por exemplo, uma coleção de demonstração de fago), gerados pela síntese química, derivados pela digestão de proteínas ou gerados usando técnicas de DNA recombinante.

O termo "farmacologicamente ativo" significa que uma substância assim descrita é determinada ter atividade que afeta um parâmetro médico (por exemplo, pressão sangüínea, contagem de célula sangüínea, nível de colesterol) ou estado de doença (por exemplo, câncer, distúrbios autoimunes, etc.).

Os termos "peptídeo antagonista" ou "peptídeo inibidor" referem-se a um peptídeo que bloqueia ou de algum modo interfere com a atividade biológica da proteína associada de interesse ou tem atividade biológica comparável a um antagonista ou inibidor conhecido da proteína

associada de interesse. Assim, o termo "peptídeo antagonista de Ang-2" compreende peptídeos que podem ser identificados ou derivados como tendo características antagonísticas de Ang-2.

Adicionalmente, os sais fisiologicamente aceitáveis dos compostos desta invenção também são aqui abrangidos. Por "sais fisiologicamente aceitáveis" é intencionado quaisquer sais que sejam conhecidos ou mais tarde verificados serem farmaceuticamente aceitáveis. Alguns exemplos específicos são: acetato; trifluoroacetato; hidroaletos, tais como cloridretos e bromidretos; sulfato; citrato; tartarato; glicolato; e oxalato, mesilato e fosfato.

Pepticorpos

Um aspecto da presente invenção diz respeito ao desenvolvimento de pepticorpos Ang-2. A interação de um ligando de proteína com o seu receptor freqüentemente ocorre em uma interface relativamente grande. Entretanto, como demonstrado para o hormônio do crescimento humano e seu receptor, apenas uns poucos resíduos chave na interface contribuem para a maior parte da energia de ligação. Clackson *et al.*, Science 267: 383 a 386 (1995). O corpo do ligando de proteína meramente demonstra os epítopos de ligação na topologia certa ou serve às funções não relacionadas com a ligação. Assim, as moléculas de apenas comprimento "peptídico" (no geral de 2 a 40 aminoácidos) podem ligar-se à proteína receptora de um dado ligando de proteína grande. Tais peptídeos podem imitar a bioatividade do ligando de proteína grande ("agonistas peptídicos") ou, através da ligação competitiva, inibem a bioatividade do ligando de proteína grande ("antagonistas peptídicos").

A tecnologia de demonstração de fago tem emergido como um método poderoso na identificação de tais agonistas e antagonistas peptídicos. Ver, por exemplo, Scott *et al.* Science 249: 386 (1990); Devlin *et al.*, Science 249: 404 (1990); Patente U.S. Nº 5.223.409, concedida em 29 de junho de

P102323

1993; Patente U.S. Nº 5.733.731, concedida em 31 de março de 1998; Patente U.S. Nº 5.498.530, concedida em 12 de março de 1996; Patente U.S. Nº 5.432.018, concedida em 11 de julho de 1995; Patente U.S. Nº 5.338.665, concedida em 16 de agosto de 1994; Patente U.S. Nº 5,922,545, concedida em 13 de julho de 1999; WO 96/40987, publicada em 19 de dezembro de 1996; e WO 98/15833, publicada em 16 de abril de 1998 (cada uma das quais é incorporada por referência). Nas coleções de demonstração de fago peptídicas, as seqüências de peptídeo aleatórias podem ser demonstradas pela fusão com proteínas de revestimento de fago filamentoso. Os peptídeos demonstrados podem ser eluídos por afinidade contra um domínio extracelular imobilizado por anticorpo de um receptor, se desejado. O fago retido pode ser enriquecido pelas rodadas sucessivas de purificação por afinidade e repropagação. Os melhores peptídeos de ligação podem ser seqüenciados para identificar resíduos chave dentro de uma ou mais famílias estruturalmente relacionadas de peptídeos. Ver, por exemplo, Cwirla *et al.*, Science 276: 1696 a 1699 (1997), em que duas famílias distintas foram identificadas. As seqüências de peptídeo também podem sugerir quais resíduos podem ser substituídos com segurança pela triagem de alanina ou pela mutagênese ao nível de DNA. As coleções de mutagênese podem ser criadas e triadas para otimizar ainda mais a seqüência dos melhores aglutinates. Lowman, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26: 401 a 424 (1997).

A análise estrutural da interação de proteína-proteína também pode ser usada para sugerir peptídeos que imitem a atividade de ligação de ligandos de proteína grandes. Em uma tal análise, a estrutura cristalina pode sugerir a identidade e a orientação relativa de resíduos críticos do ligando de proteína grande, a partir do qual um peptídeo pode ser planejado. Ver, por exemplo, Takasaki *et al.*, Nature Biotech 15: 1266 a 1270 (1997). Estes métodos analíticos também podem ser usados para investigar a interação entre

PI0213223

uma proteína receptora e peptídeos selecionados pela demonstração de fago, que pode sugerir outra modificação dos peptídeos para aumentar a afinidade de ligação.

Outros métodos competem com a demonstração de fago na pesquisa de peptídeo. Uma coleção de peptídeo pode ser fundida com o término carbóxi do repressor lac e expressada na *E. coli*. Um outro método com base na *E. coli* permite a demonstração na membrana externa da célula pela fusão com uma lipoproteína associada a peptidoglicano (PAL). A seguir, este e métodos relacionados são coletivamente aludidos como "demonstração de *E. coli*." Em um outro método, a tradução de RNA aleatório é parada antes da liberação de ribossoma, resultando em uma coleção de polipeptídeos com seu RNA associado ainda ligado. A seguir, este e métodos relacionados são coletivamente aludidos como "demonstração de ribossoma." Outros métodos utilizam a ligação química de peptídeos ao RNA. Ver, por exemplo, Roberts e Szostak, Proc Natl Acad Sci USA, 94: 12297 a 12303 (1997). A seguir, este e métodos relacionados são coletivamente aludidos como "triagem de RNA-peptídeo." As coleções de peptídeo quimicamente derivadas foram desenvolvidas em que os peptídeos são imobilizados em materiais não biológicos estáveis, tais como varetas de polietileno ou resinas permeáveis a solvente. Uma outra coleção de peptídeo quimicamente derivada usa fotolitografia para triar peptídeos imobilizados em lâminas de vidro. A seguir, estes e métodos relacionados são coletivamente aludidos como "triagem química de peptídeo." A triagem química de peptídeo pode ser vantajosa em que ela permite o uso de D-aminoácidos e outros análogos não naturais, assim como elementos não peptídicos. os métodos tanto biológicos quanto químicos são revisados em Wells e Lowman, Curr. Opin. Biotechnol., 3: 355 a 362 (1992).

Conceitualmente, pode-se verificar miméticos peptídicos de qualquer proteína usando a demonstração de fago e os outros métodos acima

PI0213223

mencionados. Estes métodos foram usados para o mapeamento de epítopo, para a identificação de aminoácidos críticos nas interações de proteína-proteína e como guias para a verificação de novos agentes terapêuticos. Ver, por exemplo, Cortese *et al.*, Curr. Opin. Biotech. 7: 616 a 621 (1996). As coleções de peptídeo estão sendo agora usadas mais freqüentemente em estudos imunológicos, tais como o mapeamento de epítopo. Ver Kreeger, The Scientist 10(13): 19 a 20 (1996).

Os peptídeos identificados pela triagem da coleção de demonstração de fago foram considerados como "guias" no desenvolvimento de agentes terapêuticos ao invés de como os próprios agentes terapêuticos. Igual às outras proteínas e peptídeos, eles provavelmente podem ser rapidamente removidos *in vivo* pela filtração renal, pelos mecanismos de depuração celular no sistema reticuloendotelial ou pela degradação proteolítica [Francis, (supra)]. Como um resultado, a técnica presentemente usa peptídeos para validar alvos medicamentosos ou como esqueletos para o planejamento de compostos orgânicos que não poderiam ter sido tão fácil ou tão rapidamente identificados através da triagem de coleção química [Lowman, (supra); Kay *et al.*, (supra)]. A técnica beneficiar-se-ia de um processo pelo qual tais peptídeos poderiam mais facilmente produzir agentes terapêuticos contra a angiogênese.

Estrutura de Pepticorpos

Nas composições de matéria preparadas de acordo com esta invenção, o peptídeo pode ser ligado a um veículo através do término N ou término C do peptídeo. Assim, as moléculas de veículo-peptídeo desta invenção podem ser descritas pelas cinco fórmulas seguintes e seus multímeros:

$(X_1)_a$-F_1-$(X_2)_b$	(FÓRMULA I)
X_1-F_1	(FÓRMULA II)
F_1-X_2	(FÓRMULA III)
F_1-$(L_1)_c$-P_1	(FÓRMULA IV)
F_1-$(L_1)_c$-P_1-$(L_2)_d$-P_2	(FÓRMULA V)

PI0213223

em que:

F_1 é um veículo (preferivelmente um domínio Fc);

X_1 e X_2 são cada um independentemente selecionados de $-(L_1)_c-P_1$, $-(L_1)_c-P_1-(L_2)_d-P_2$, $-(L_1)_c-P_1-(L_2)_d-P_2-(L_3)_e-P_3$ e $-(L_1)_c-P_1-(L_2)_d-P_2-(L_3)_e-P_3-(L_4)_f-P_4$

P_1, P_2, P_3 e P_4 são cada um independentemente seqüências de peptídeos farmacologicamente ativos como aqui descrito;

L_1, L_2, L_3 e L_4 são cada um independentemente ligadores; e

"a", "b", 49c"7 "d", "e" e "f" são cada um independentemente 0 ou 1, contanto que pelo menos um de "a" e "b" seja 1.

Peptídeos

A presente invenção considera peptídeos que seletivamente se ligam ou especificamente se ligam à Ang-2. Qualquer quantidade de tais peptídeos pode ser usada em conjunção com a presente invenção. a demonstração de fago, em particular, é útil na geração de peptídeos para o uso na presente invenção como tem sido mostrado que a seleção por afinidade de coleções de peptídeos aletórios pode ser usada para identificar ligandos peptídicos para qualquer sítio de qualquer produto de gene. Dedman *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 23025 a 23030 (1993).

Os peptídeos nesta invenção podem ser preparados por qualquer um dos métodos divulgados na técnica. As abreviações de aminoácido de letra única são usadas. O "X" em qualquer seqüência (e por todo este relatório descritivo, a menos que de outro modo especificado em um caso particular) significa que qualquer um dos 20 resíduos de aminoácido que ocorrem naturalmente ou qualquer aminoácido que não ocorre naturalmente (descrito abaixo sob "Variantes"), pode estar presente. Qualquer um destes peptídeos pode ser ligado em tandem (isto é, seqüencialmente), com ou sem ligadores e exemplos ligados em tandem são fornecidos na tabela. Os ligadores são listados como "L" e podem ser qualquer um dos ligadores aqui

PI0213223

descritos. As repetições em tandem e os ligadores são mostrados separados por hífens para clareza. Qualquer peptídeo que contenha um resíduo de cisteinila pode ser reticulado com um outro peptídeo que contenha Cys, cada um ou ambos os quais podem estar ligados a um veículo. Qualquer peptídeo tendo mais do que um resíduo Cys pode formar também uma ligação de dissulfeto intrapeptídica. Qualquer um destes peptídeos pode ser derivatizado como aqui descrito. Para os derivados em que o término carboxila pode ser encapuzado com um grupo amino, o grupo amino de encapuzamento é $-NH_2$. Para os derivados em que os resíduos de aminoácido são substituídos por porções outras que não resíduos de aminoácido, as substituições são denotadas por S, que significa qualquer uma das porções descritas em Bhatnagar *et al.*, J Med. Chem. 39: 3814 a 3819 (1996) e Cuthbertson *et al.*, J. Med. Chem. 40: 2876 a 2882 (1997), que são incorporadas por referência. Todos os peptídeos são ligados através de ligações peptídicas a menos que de outro modo mencionado.

Veículos

Em uma forma de realização, esta invenção fornece pelo menos um peptídeo para ser ligado a pelo menos um veículo (F1, F2) através do término N, término C ou uma cadeia lateral de um dos resíduos de aminoácido do(s) peptídeo(s). Veículos múltiplos também podem ser usados; por exemplo, Fc's em cada término ou um Fc em um término e um grupo PEG no outro término ou uma cadeia lateral.

Um domínio Fc é um veículo preferido. O domínio Fc pode ser fundido aos términos N ou C dos peptídeos ou em ambos os términos N e C.

Como mencionado acima, as variantes Fc são veículos adequados dentro do escopo desta invenção. Um Fc nativo pode ser extensivamente modificado para formar uma variante Fc de acordo com esta invenção, contanto que a ligação ao receptor remanescente seja mantida. Ver,

PI0213223

por exemplo a WO 97/34631 e WO 96/32478. Em tais variantes Fc, pode-se remover um ou mais sítios de um Fc nativo que forneça características estruturais ou atividade funcional não requerida pelas moléculas de fusão desta invenção. Pode-se remover estes sítios, por exemplo, substituindo-se ou suprimindo-se resíduos, inserindo-se resíduos no sítio ou truncando-se porções que contenham o sítio. Os resíduos inseridos ou substituídos também podem ser aminoácidos alterados, tais como peptidomiméticos ou D-aminoácidos. As variantes Fc podem ser desejáveis por várias razões, diversas das quais são descritas abaixo. As variantes Fc exemplares incluem moléculas e seqüências em que:

1. Os sítios envolvidos na formação de ligação de dissulfeto são removidos. Tal remoção pode evitar a reação com outras proteínas que contenham cisteína presentes na célula hospedeira usada para produzir as moléculas da invenção. Para este propósito, o segmento contendo cisteína no término N pode ser truncado ou resíduos de cisteína podem ser suprimidos ou substituídos com outros aminoácidos (por exemplo, alanil, seril). Mesmo quando resíduos de cisteína são removidos, os domínios Fc de cadeia única pode ainda formar um domínio Fc dimérico que é mantido não covalentemente junto.

2. Um Fc nativo é modificado para torná-lo mais compatível com uma célula hospedeira selecionada. Por exemplo, pode-se remover a seqüência PA próxima ao término N de um Fc nativo típico, que pode ser reconhecido por uma enzima digestiva na *E. coli* tal como a prolina iminopeptidase. Pode-se também adicionar um resíduo de metionil de terminal N, especialmente quando a molécula é recombinantemente expressada em uma célula bacteriana tal como a *E. coli*.

3. Uma porção do término N de um Fc nativo é removida para impedir a heterogeneidade do terminal N quando expressado em um célula hospedeira selecionada. Para este propósito, pode-se suprimir qualquer um

dos primeiros 20 resíduos de aminoácido no término N, particularmente aqueles nas posições 1, 2, 3, 4 e 5.

4. Um ou mais sítios de glicosilação são removidos. Os resíduos que são tipicamente glicosilados (por exemplo, asparagina) podem conferir resposta citolítica. Tais resíduos podem ser suprimidos ou substituídos com resíduos não glicosilados (por exemplo, alanina).

5. Os sítios envolvidos na interação com complemento, tais como o sítio de ligação C1q, são removidos. Por exemplo, pode-se suprimir ou substituir a seqüência EKK do IgG1 humano. O recrutamento de complemento pode não ser vantajoso para as moléculas desta invenção e assim pode ser evitado com uma tal variante Fc.

6. Sítios são removidos que afetam a ligação aos receptores de Fc outros que não um receptor remanescente. Um Fc nativo pode ter sítios para a interação com certas células sangüíneas brancas que não são requeridas para as moléculas de fusão da presente invenção e assim podem ser removidos.

7. O sítio ADCC sítio é removido. Os sítios ADCC são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Molec. Immunol. 29 (5): 633 a 639 (1992) com respeito aos sítios ADCC na IgG1. Estes sítios, também, não são requeridos para as moléculas de fusão da presente invenção e assim podem ser removidos.

8. Quando o Fc nativo é derivado de um anticorpo não humano, o Fc nativo pode ser humanizado. Tipicamente, para humanizar um Fc nativo, substituir-se-á resíduos selecionados no Fc nativo não humano com resíduos que são normalmente encontrados no Fc nativo humano. Técnicas para a humanização de anticorpo são bem conhecidas no ramo.

Um veículo alternativo seria uma proteína, polipeptídeo, peptídeo, anticorpo, fragmento de anticorpo ou molécula pequena (por exemplo, um composto peptidomimético) capaz de ligar-se a um receptor

PI0213223

remanescente. Por exemplo, poder-se-ia usar como um veículo um polipeptídeo como descrito na Patente U.S. Nº 5.739.277, concedida em 14 de abril de 1998 a Presta *et al.* Os peptídeos também poderiam ser selecionados pela demonstração de fago para a ligação ao receptor remanescente FcRn. Tais receptor remanescente-compostos de ligação também são incluídos dentro do significado de "veículo" e estão dentro do escopo desta invenção. Tais veículos devem ser selecionados quanto a meia vida aumentada (por exemplo, evitando-se seqüências reconhecidas pelas proteases) e imunogenicidade diminuída (por exemplo, favorecendo-se as seqüências não imunogênicas, como verificado na humanização de anticorpo).

Como mencionado acima, veículos poliméricos também podem ser usados para F_1 e F_2. Vários meios para ligar porções químicas úteis como veículos estão correntemente disponíveis, ver, por exemplo, a Publicação Internacional do Patent Cooperation Treaty ("PCT") Nº WO 96/11953, intitulado "N-Terminally Chemically Modified Protein Compositions and Methods," aqui incorporada por referência em sua totalidade. Esta publicação PCT divulga, entre outras coisas, a ligação seletiva de polímeros solúveis em água ao término N de proteínas.

Um veículo polimérico preferido é o polietileno glicol (PEG). O grupo PEG pode ser de qualquer peso molecular conveniente e pode ser linear ou ramificado. O peso molecular médio do PEG preferivelmente variará de cerca de 2 quiloDalton ("kDa") a cerca de 100 kDa, mais preferivelmente de cerca de 5 kDa a cerca de 50 kDa, o mais preferivelmente de cerca de 5 kDa a cerca de 10 kDa. Os grupos PEG no geral serão ligados aos compostos da invenção por intermédio da acilação ou alquilação redutiva através de um grupo reativo na porção de PEG (por exemplo, um grupo aldeído, amino, tiol ou éster) a um grupo reativo no composto da invenção (por exemplo, um grupo aldeído, amino ou éster).

Uma estratégia útil para a PEGuilação de peptídeos sintéticos

PI0213223

consiste de combinar, através da formação de uma ligação conjugada em solução, um peptídeo e uma porção de PEG, cada um carregando uma funcionalidade especial que seja mutuamente reativa contra a outra. Os peptídeos podem ser facilmente preparados com a síntese de fase sólida convencional como conhecido na técnica. Os peptídeos são "pré ativados" com um grupo funcional apropriado em um sítio específico. Os precursores são purificados e completamente caracterizados antes de reagir com a porção de PEG. A ligação do peptídeo com PEG usualmente ocorre na fase aquosa e pode ser facilmente monitorada pela HPLC analítica de fase reversa. Os peptídeos PEGuilados podem ser facilmente purificados pela HPLC preparativa e caracterizados pela HPLC analítica, análise de aminoácido e espectrometria de massa de dessorção a laser.

Os polímeros de polissacarídeo são um outro tipo de polímero solúvel em água que podem ser usados para a modificação de proteína. Os dextranos são polímeros de polissacarídeo compreendidos de subunidades individuais de glicose predominantemente ligados pelas ligações a1-6. O próprio dextrano está disponível em muitas faixas de peso molecular e está facilmente disponível em pesos moleculares de cerca de 1 kDa a cerca de 70 kDa. O dextrano é um polímero solúvel em água adequado para o uso na presente invenção como um veículo por si só ou em combinação com um outro veículo (por exemplo, Fc). Ver, por exemplo, a WO 96/11953 e WO 96/05309. O uso de dextrano conjugado a imunoglobulinas terapêuticas ou de diagnóstico foi relatado; ver, por exemplo, a Publicação de Patente Européia Nº 0 315 456, que é aqui incorporada por referência. O dextrano de cerca de 1 kDa a cerca de 20 kDa é preferido quando o dextrano é usado como um veículo de acordo com a presente invenção.

Ligadores

Qualquer grupo "ligador" é opcional. Quando presente, a sua estrutura química não é crítica, visto que ele serve primariamente como um

PI0213223

espaçador. O ligador é preferivelmente fabricado de aminoácidos ligados juntos pelas ligações peptídicas. Assim, em formas de realização preferidas, o ligador é fabricado de 1 a 20 aminoácidos ligados pelas ligações peptídicas, em que os aminoácidos são selecionados dos 20 aminoácidos que ocorre naturalmente. Um ou mais destes aminoácidos podem ser glicosilados, como é bem entendido por aqueles na técnica. Em uma forma de realização mais preferida, os 1 a 20 aminoácidos são selecionados de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina e lisina. Ainda mais preferivelmente, um ligador é fabricado de uma maioria de aminoácidos que não são estericamente impedidos, tais como glicina e alanina. Assim, os ligadores preferidos são poliglicinas (particularmente $(Gly)_5$, $(Gly)_8$), poli(Gly-Ala) e polialaninas. As combinações de Gly e Ala também são preferidas como o é o ligador aqui aludido como K1 e tendo uma seqüência de aminoácido apresentada aqui nos Exemplos.

Os ligadores não peptídicos também são possíveis. Por exemplo, ligadores alquílicos tais como $-NH-(CH_2)_s-C(O)-$, em que s = 2 a 20 podem ser usados. Estes ligadores alquilícos podem ser ainda substituídos por qualquer grupo não estericamente impedido tal como alquila inferior (por exemplo, acila inferior C_1-C_6, halógeno (por exemplo, Cl, Br), CN, NH_2, fenila, etc. Um ligador não peptídico exemplar é um ligador de PEG e tem um peso molecular de 100 a 5000 kDa, preferivelmente de 100 a 500 kDa. Os ligadores peptídicos podem ser alterados para formar derivados na mesma maneira como descrito acima.

Variantes e Derivados

As variantes e derivados dos agentes de ligação específicos estão incluídos dentro do escopo da presente invenção. As variantes incluídas dentro são variantes de inserção, de supressão e de substituição. É entendido que um agente de ligação específico particular da presente invenção pode conter um, dois ou todos os três tipos de variantes. As variantes de inserção e

de substituição podem conter aminoácidos naturais, aminoácidos não convencionais (como apresentados abaixo) ou ambos.

Em um exemplo, as variantes de inserção são fornecida em que um ou mais resíduos de aminoácido, que ocorrem naturalmente ou aminoácidos não convencionais, suplementam uma seqüência de aminoácido de peptídeo ou de um pepticorpo. As inserções podem estar localizadas em cada um ou em ambos os términos da proteína ou podem estar posicionadas dentro de regiões internas da seqüência de aminoácido do pepticorpo. As variantes de inserção com resíduos adicionais em cada um ou em ambos os términos podem incluir, por exemplo, proteínas de fusão e proteínas que incluem etiquetas ou rótulos de aminoácido. As variantes de inserção incluem peptídeos e pepticorpos em que um ou mais resíduos de aminoácido são adicionados à seqüência de aminoácido do peptídeo ou pepticorpo ou fragmento deste.

Os produtos variantes da invenção também incluem peptídeos e pepticorpos maduros em que as seqüências líder ou de sinal são removidas e as proteínas resultantes tendo resíduos de terminal amino adicionais, cujos aminoácidos podem ser naturais ou não naturais. Agentes de ligação específicos (tais como pepticorpos) com um resíduo de metionil adicional na posição de aminoácido -1 (Met-1-pepticorpo) são considerados, como o são os agentes de ligação específicos com resíduos de metionina e lisina adicionais nas posições -2 e -1 (Met^{-2}-Lys^{-1}-). As variantes tendo resíduos Met, Met-Lys, Lys adicionais (ou um ou mais resíduos básicos, no geral) são particularmente úteis para a produção de proteína recombinante realçada em células hospedeiras bacteriana.

A invenção também abrange variantes de agente de ligação específicas tendo resíduos de aminoácido adicionais que surgem do uso de sistemas de expressão específicos. Por exemplo, o uso de vetores comercialmente disponíveis que expressam um polipeptídeo desejado como

parte do produto de fusão da glutationa-S-transferase (GST) fornece o polipeptídeo desejado tendo um resíduo de glicina adicional na posição de aminoácido -1 depois da clivagem do componente de GST do polipeptídeo desejado. As variantes que resultam da expressão em outros sistemas de vetor também são consideradas, incluindo aquelas em que os rótulos de poli-histidina são incorporados na seqüência de aminoácido, no geral nos términos carbóxi e/ou amino da seqüência.

As variantes de inserção também incluem proteínas de fusão em que os términos amino e/ou carbóxi do peptídeo ou pepticorpo são fundidos a um outro polipeptídeo, um fragmento deste ou aminoácidos que não são no geral reconhecidos como sendo parte de qualquer seqüência de proteína específica. Os exemplos de tais proteínas de fusão são polipeptídeos imunogênicos, proteínas com meia vidas circulantes longas, tais como as regiões constantes da imunoglobulina, proteínas marcadoras, proteínas ou polipeptídeos que facilitam a purificação do peptídeo ou pepticorpo desejados e seqüência de polipeptídeos que promovem a formação de proteínas multiméricas (tais como motivos de zíper de leucina que são úteis na formação/estabilidade do dímero.

Este tipo de variante insercional no geral tem toda ou uma porção substancial da molécula nativa, ligada ao término N ou C, a todo ou a uma porção de um segundo polipeptídeo. Por exemplo, as proteínas de fusão tipicamente utilizam seqüências líder de outras espécies para permitir a expressão recombinante de uma proteína em um hospedeiro heterólogo. Uma outra proteína de fusão útil inclui a adição de um domínio imunologicamente ativo, tal como um epítopo de anticorpo, para facilitar a purificação da proteína de fusão. A inclusão de um sítio de clivagem na junção de fusão ou próximo a ela facilitará a remoção do polipeptídeo estranho depois da purificação. Outras fusões úteis incluem a ligação de domínios funcionais, tais como sítios ativos de enzimas, domínios de glicosilação, sinais de

alvejamento celular ou regiões de transmembrana.

Existem vários sistemas de expressão de proteína de fusão comercialmente disponíveis que podem ser usados na presente invenção. os sistemas particularmente úteis incluem mas não são limitados ao sistema de glutationa-S-transferase (GST) (Pharmacia), o sistema de proteína de ligação da maltose (NEB, Beverley, MA), o sistema FLAG (IBI, New Haven, CT) e o sistema 6xHis (Qiagen, Chatsworth, CA). Estes sistemas são capazes de produzir peptídeos e/ou pepticorpos recombinantes que carregam apenas uma quantidade pequena de aminoácidos adicionais, que são improváveis de afetar significantemente a atividade do peptídeo ou pepticorpo. Por exemplo, tanto o sistema FLAG quanto o sistema 6xHis adicionam apenas seqüências curtas, ambos os quais são conhecidas por serem deficientemente antigênicos e que não afetam adversamente a dobra de um polipeptídeo para a sua conformação nativa. Uma outra fusão de terminal N que é considerada ser útil é a fusão de um dipeptídeo Met-Lys na região do terminal N da proteína ou peptídeos. Uma tal fusão pode produzir aumentos benéficos na expressão ou atividade da proteína.

Outros sistemas de fusão produzem híbridos de polipeptídeo onde é desejável excisar o parceiro de fusão do peptídeo ou pepticorpo desejados. Em uma forma de realização, o parceiro de fusão é ligado ao pepticorpo recombinante por uma seqüência de peptídeo que contenha uma seqüência de reconhecimento específica para uma protease. Os exemplos de seqüências adequadas são aquelas reconhecidas pela protease do Vírus Etch do Tabaco (Life Technologies, Gaithersburg, MD) ou Factor Xa (New England Biolabs, Beverley, MA).

A invenção também fornece polipeptídeos de fusão que compreendem todo ou parte de um pepticorpo ou peptídeo da presente invenção, em combinação com fator de tecido truncado (tTF). O tTF é um agente alvejador vascular que consiste de uma forma truncada de uma

proteína indutora de coagulação humana que atua como um agente coagulante de vasos sangüíneo de tumor, como descrito nas Patentes U.S. Nºs: 5.877.289, 6.004.555, 6.132.729, 6.132.730, 6.156.321 e Patente Européia Nº EP 0988056. A fusão de tTF ao pepticorpo ou peptídeo anti-Ang-2 ou fragmentos destes facilita a liberação de anti-Ang-2 para as células alvo.

Em um outro aspecto, a invenção fornece variantes de supressão em que um ou mais resíduos de aminoácido em um peptídeo ou pepticorpo são removidos. As supressões podem ser efetuadas em um ou em ambos os términos do pepticorpo ou da remoção de um ou mais resíduos dentro da seqüência de aminoácido do pepticorpo. As variantes de supressão necessariamente incluem todos os fragmentos de um peptídeo ou pepticorpo.

Ainda em um outro aspecto, a invenção fornece variantes de substituição de peptídeos e pepticorpos da invenção. As variantes de substituição incluem aqueles peptídeos e pepticorpos, em que um ou mais resíduos de aminoácido são removidos e substituídos com um ou mais aminoácidos alternativos, aminoácidos estes que podem ser que ocorrem naturalmente ou que não ocorrem naturalmente. As variantes de substituição geram peptídeos ou pepticorpos que são "similares" ao peptídeo ou pepticorpo originais, em que as duas moléculas têm uma certa porcentagem de aminoácidos que são idênticos. As variantes de substituição incluem substituições de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, aminoácidos dentro de um peptídeo ou pepticorpo, em que o número de substituições pode ser de até dez por cento ou mais, dos aminoácidos do peptídeo ou pepticorpo. Em um aspecto, as substituições são conservativas por natureza, entretanto, a invenção abrange substituições que também são não conservativas e também inclui aminoácidos não convencionais.

A identidade e a similaridade de peptídeos e pepticorpos relacionados podem ser facilmente calculadas pelos métodos conhecidos. Tais métodos incluem, mas não são limitados àqueles descritos em Computational

PI0213223

Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nova Iorque (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nova Iorque (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M. e Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nova Jérsei (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. e Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nova Iorque (1991); e Carillo *et al.*, SLAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988).

Os métodos preferidos para determinar a relacionabilidade ou identidade percentual de dois peptídeos ou polipeptídeos ou um polipeptídeo e um peptídeo, são planejados para dar o maior emparelhamento entre as seqüências testadas. Os métodos para determinar a identidade são descritos em programas de computador publicamente disponíveis. Os métodos de programa de computador preferidos para determinar a identidade entre duas seqüências incluem, mas não são limitados ao pacote de programa GCG, que inclui GAP (Devereux *et al.*, Nucl. Acid. Res., 12: 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN e FASTA (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 215: 403 a 410 (1990)). O programa BLASTX é publicamente disponível do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e outras fontes (BLAST Manual, Altschul *et al.* NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul *et al.*, supra (1990)). O algoritmo de Smith Waterman bem conhecido também pode ser usado para determinar a identidade.

Certos esquemas de alinhamento para alinhar duas seqüências de aminoácido podem resultar no emparelhamento apenas de uma região curta das duas seqüências e esta região de alinhamento pequena pode ter identidade de seqüência muito alta ainda que não exista nenhuma relação significante entre as duas seqüências de comprimento completo. Consequentemente, em certas formas de realização, o método de alinhamento selecionado (programa

PI0213223

GAP) resultará em um alinhamento que transpõem pelo menos dez por cento do comprimento completo do polipeptídeo alvo que é comparado, isto é, pelo menos 40 aminoácidos contíguos onde as seqüências de pelo menos 400 aminoácidos estão sendo comparadas, 30 aminoácidos contíguos onde as seqüências de pelo menos 300 a cerca de 400 aminoácidos estão sendo comparadas, pelo menos 20 aminoácidos contíguos onde as seqüências de 200 a cerca de 300 aminoácidos estão sendo comparadas e pelo menos 10 aminoácidos contíguos onde as seqüências de cerca de 100 a 200 aminoácidos estão sendo comparadas.

Por exemplo, usando o algoritmo de computador GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), dois polipeptídeos para os quais a identidade de seqüência percentual deva ser determinada são alinhadas quanto ao emparelhamento ótimo de seus respectivos aminoácidos (a "extensão emparelhada", como determinada pelo algoritmo). Em certas formas de realização, um penalidade de abertura de intervalo (que é tipicamente calculada como 3X a diagonal média; a "diagonal média" é a média da diagonal da matriz de comparação que é usada; a "diagonal" é a pontuação ou número designados a cada emparelhamento de aminoácido perfeito pela matriz de comparação particular) e uma penalidade de extensão de intervalo (que é usualmente 1/10 vezes a penalidade de abertura de intervalo), assim como uma matriz de comparação tal como PAM 250 ou BLOSUM 62 são usadas em conjunção com o algoritmo. Em certas formas de realização, uma matriz de comparação padrão (ver Dayhoff *et al.*, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5(3) (1978) para a matriz de comparação PAM 250; Henikoff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 10915 a 10919 (1992) para a matriz de comparação BLOSUM 62) também é usada pelo algoritmo.

Em certas formas de realização, os parâmetros para uma comparação de seqüência de polipeptídeo incluem os seguintes:

PI0213223

Algoritmo: Needleman *et al.*, J. Mol. Biol., 48: 443 a 453 (1970);

Matriz de Comparação: BLOSUM 62 de Henikoff *et al.*, supra (1992);

Penalidade de Intervalo: 12

Penalidade de Comprimento de Palavra: 4

Patamar de Similaridade: 0

O programa GAP pode ser útil com os parâmetros acima. Em certas formas de realização, os parâmetros anteriormente mencionados são os parâmetros de valor padrão para as comparações de polipeptídeo (junto com nenhuma penalidade para os intervalos de extremidade) que usam o algoritmo GAP.

Em certas formas de realização, os parâmetros para as comparações de seqüência de molécula de polinucleotídeo (como oposto a uma seqüência de aminoácido) incluem os seguintes:

Algoritmo: Needleman *et al*, supra (1970);

Matriz de comparação: emparelhamentos = +10,

desemparelhamentos = 0

Penalidade de Intervalo: 50

Penalidade de Comprimento de Intervalo: 3

O programa GAP também pode ser útil com os parâmetros acima. Os parâmetros anteriormente mencionados são os parâmetros de penalidade para as comparações de molécula de polinucleotídeo.

Outros algoritmos exemplares, penalidades de abertura de intervalo, penalidades de extensão de intervalo, matrizes de comparação, patamares de similaridade, etc. podem ser usados, incluindo aqueles apresentados no Program Manual, Wisconsin Package, Versão 9, setembro, 1997. As escolhas particulares a serem feitas estará evidente àqueles de habilidade na técnica e dependerá da comparação específica a ser feita, tais

como DNA-para-DNA, proteína-para-proteína, proteína-para-DNA; e adicionalmente, se a comparação está entre pares dados de seqüências (caso este em que GAP ou BestFit são no geral preferidos) ou entre uma seqüência e uma base de dados grande de seqüências (caso este em que FASTA ou BLASTA são preferidos).

Como aqui usado, os vinte aminoácidos convencionais e suas abreviações seguem o uso convencional. Ver Immunology--A Synthesis (2ª Edição, E. S. Golub e D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), que é aqui incorporado por referência para qualquer propósito.

Os aminoácidos podem ter estereoquímica L ou D (exceto para Gly, que não é nem L nem D) e os polipeptídeos e composições da presente invenção podem compreender uma combinação de estereoquímicas. Entretanto, a estereoquímica L é preferida. A invenção também fornece moléculas reversas em que a seqüência do terminal amino até o terminal carbóxi dos aminoácidos é virada em sentido contrário. Por exemplo, o reverso de uma molécula tendo a seqüência normal X_1-X_2-X_3 seria X_3-X_2-X_1. A invenção também fornece moléculas retro-reversas em que, como acima, a seqüência do terminal amino para o terminal carbóxi de aminoácidos é virada em sentido contrário e os resíduos que são normalmente enantiômeros "L" são alterados para a forma esteroisomérica "D".

Os estereoisômeros (por exemplo, D-aminoácidos) dos vinte aminoácidos convencionais, aminoácidos não naturais tais como aminoácidos α,α-dissubstituídos, N-alquil aminoácidos, ácido lático e outros aminoácidos não convencionais também podem ser componentes adequados para os polipeptídeos da presente invenção. Os exemplos de aminoácidos não convencionais incluem, sem limitação: ácido aminoadípico, beta-alanina, ácido beta-aminopropiônico, ácido aminobutírico, ácido piperidínico, ácido aminocaprióico, ácido aminoeptanóico, ácido aminoisobutírico, ácido aminopimélico, ácido diaminobutírico, desmosina, ácido diaminopimélico,

PI0213223

ácido diaminopropiônico, N-etilglicina, N-etilaspargina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilglicina, sarcosina, N-metilisoleucina, N-metilvalina, norvalina, norleucina, oritina, 4-hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato, ε-N,N,N-trimetillisina, ε-N-acetillisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilistidina, 5-hidroxilisina, α-N-metilarginina e outros aminoácidos similar e aminoácidos (por exemplo, 4-hidroxiprolina).

Similarmente, a menos que de outro modo especificado, a extremidade à esquerda das seqüências de polinucleotídeo de filamento único é a extremidade 5'; a direção à esquerda das seqüências de polinucleotídeo de filamento duplo é aludida como a direção 5'. A direção de adição de 5' para 3' de transcrito de RNA nascente é aludida como a direção de transcrição; as regiões de seqüência no filamento de DNA tendo a mesma seqüência como o RNA e que são 5' em relação à extremidade 5' do transcrito de RNA são aludidas como "seqüências a montante"; as regiões de seqüência no filamento de DNA tendo a mesma seqüência como o RNA e que são 3' em relação á extremidade 3' do transcrito de RNA são aludidas como "seqüências a jusante".

Será avaliado que os resíduos de aminoácido podem ser divididos em classes com base nas suas propriedades de cadeia lateral comuns:

1. Hidrofóbico Neutro: Alanina (Ala; A), Valina (Val; V), Leucina (Leu; L), Isoleucina (Ile; I), Prolina (Pro; P), Triptofano (Trp; W), Fenilalanina (Phe; F) e Metionina (Met, M).

2. Polar Neutro: Glicina (Gly; G); Serina (Ser; S), Treonina (Thr; T), Tirosina (Tyr; Y), Cisteína (Cys; C), Glutamina (Glu; Q), Asparagina (Asn; N) e Norleucina.

3. Ácido: Ácido Aspártico (Asp; D), Ácido Glutâmico (Glu; E);

4) Básico: Lisina (Lys; K), Arginina (Arg; R), Histidina (His; H). Ver Lewin, B., Genes V, Oxford University Press (1994), p. 11.

As substituições de aminoácido conservativas podem abranger resíduos de aminoácido não convencionais, que são tipicamente incorporados pela síntese química de peptídeo ao invés de pela síntese em sistemas biológicos. Estes incluem, sem limitação, peptidomiméticos e outras formas reversas ou invertidas de porções de aminoácido. As substituições não conservativas podem envolver a troca de um membro de uma dessas classes no lugar de um membro de uma outra classe.

Ao realizar tais trocas, de acordo com certas formas de realização, o índice hidropático de aminoácidos pode ser considerado. A cada aminoácido foi designado um índice hidropático com base na sua hidrofobicidade e características de carga. Eles são: isoleucina (+4,5); valina (+4,2), leucina (+3,8), fenilalanina (+2,8), cisteína/cistina (+2,5), metionina (+1,9), alanina (+1,8), glicina (-0,4), treonina (-0,7), serina (-0,8), triptofano (-0,9), tirosina (-1,3), prolina (-1,6), histidina (-3,2), glutamato (-3,5), glutamina (-3,5), aspartato (-3,5), asparagina (-3,5), lisina (-3,9) e arginina (4,5).

A importância do índice de aminoácido hidropático na conferência da função biológica interativa em uma proteína é entendido na técnica. Kyte *et al.*, J. Mol. Biol., 157: 105 a 131 (1982). É conhecido que certos aminoácidos podem ser substituídos no lugar de outros aminoácidos tendo um índice ou pontuação hidropáticos similares e ainda retêm uma atividade biológica similar. Ao realizar trocas com base no índice hidropático, em certas formas de realização, a substituição de aminoácidos cujos índices hidropáticos estão dentro de ± 2 estão incluídas. Em certas formas de realização, aqueles que estão dentro de ± 1 estão incluídos e em certas formas de realização, aqueles dentro de ± 0,5 estão incluídos.

Também é entendido na técnica que a substituição de

aminoácidos iguais pode ser feita eficazmente com base na hidrofilicidade, particularmente onde o pepticorpo ou peptídeo biologicamente funcionais por meio desta criados são intencionados para o uso em formas de realização imunológicas, como no presente caso. Em certas formas de realização, a hidrofilicidade local média maior de uma proteína, como controlada pela hidrofilicidade de seus aminoácidos adjacentes, correlaciona-se com a sua imunogenicidade e antigenicidade, isto é, com uma propriedade biológica da proteína.

Os seguintes valores de hidrofilicidade foram designados a estes resíduos de aminoácido: arginina (+3,0), lisina (+3,0), aspartato (+3,0 ± 1), glutamato (+3,0 ± 1), serina (+0,3), asparagina (+0,2), glutamina (+0,2), glicina (0), treonina (0,4), prolina (-0,5 ± 1), alanina (-0,5), histidina (-0,5), cisteína (-1,0), metionina (-1,3), valina (-1,5), leucina (-1,8), isoleucina (-1,8), tirosina (-2,3), fenilalanina (-2,5) e triptofano (-3,4). Ao realizar trocas com base nos valores de hidrofilicidade similares, em certas formas de realização, a substituição de aminoácidos cujos valores de hidrofilicidade estão dentro de ± 2 está incluída, em certas formas de realização, aquelas que estão dentro de ± 1 estão incluídas e em certas formas de realização, aquelas dentro de ± 0,5 estão incluídas. Pode-se também identificar epítopos de seqüências de aminoácido primárias com base na hidrofilicidade. Estas regiões também são aludidas como regiões de núcleo epitópicas."

As substituições de aminoácido exemplares são apresentadas na Tabela 2 abaixo.

PI0213223

Tabela 2

Substituições de Aminoácido

Resíduos Originais	Substituições Exemplares	Substituições Preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, Glu, Asp	Gln
Asp	Glu, Gln, Asp	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn, Glu, Asp	Asn
Glu	Asp, Gln, Asn	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Ácido 1,4 Diamino-butírico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Um técnico habilitado será capaz de determinar as variantes adequadas do polipeptídeo como aqui apresentadas usando técnicas bem conhecidas. Em certas formas de realização, uma pessoa habilitada na técnica pode identificar áreas adequadas da molécula que podem ser trocadas sem destruir a atividade pelas regiões alvejadoras não acreditadas serem importantes para a atividade. Em certas formas de realização, pode-se identificar resíduos e porções das moléculas que são conservadas entre peptídeos ou polipeptídeos similares. Em certas formas de realização, mesmo áreas que podem ser importantes para a atividade biológica ou para a estrutura podem ser objetos para substituições de aminoácido conservativas sem destruir a atividade biológica ou sem afetar adversamente a estrutura do polipeptídeo.

Adicionalmente, uma pessoa habilitada na técnica pode rever estudos de estrutura-função que identificam resíduos em polipeptídeos similares que são importantes para a atividade ou estrutura. Em vista de uma tal comparação, pode-se prognosticar a importância de resíduos de aminoácido em uma proteína que correspondam aos resíduos de aminoácido que são importantes para a atividade ou estrutura em proteínas similares. Uma pessoa habilitada na técnica pode optar por substituições de aminoácido quimicamente similar para tais resíduos de aminoácido prognosticados importantes.

Uma pessoa habilitada na técnica também pode analisar a estrutura tridimensional e a seqüência de aminoácido em relação àquela estrutura em polipeptídeos similares. Em vista de tal informação, uma pessoa habilitada na técnica pode prognosticar o alinhamento de resíduos de aminoácido de um anticorpo com respeito à sua estrutura tridimensional. Em certas formas de realização, uma pessoa habilitada na técnica pode escolher não fazer mudanças radicais nos resíduos de aminoácido prognosticados como estando na superfície da proteína, visto que tais resíduos podem estar envolvidos em interações importantes com outras moléculas. Além disso, uma pessoa habilitada na técnica pode gerar variantes de teste que contenham uma única substituição de aminoácido em cada resíduo de aminoácido desejado. As variantes podem ser depois triadas usando ensaios de atividade conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Tais variantes poderiam ser usadas para se obter informação a respeito de variantes adequadas. Por exemplo, se verificou-se que uma mudança em um resíduo de aminoácido particular resultou em atividade destruída, indesejavelmente reduzida ou inadequada, as variantes com uma tal mudança podem ser evitadas. Em outras palavras, com base na informação obtida de tais experimentos de rotina, uma pessoa habilitada na técnica pode facilmente determinar os aminoácidos onde outras substituições devem ser evitadas sozinhas ou em combinação com outras

PI0213223

mutações.

Várias publicações científicas foram dedicadas ao prognóstico da estrutura secundária. Ver Moult J., Curr. Op. in Biotech., 7(4): 422 a 427 (1996), Chou *et al.*, Biochemistry, 13(2): 222 a 245 (1974); Chou *et al.*, Biochemistry, 113(2): 211 a 222 (1974); Chou *et al.*, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47: 45 a 148 (1978); Chou *et al.*, Ann. Rev. Biochem., 47: 251 a 276 e Chou *et al.*, Biophys. J., 26: 367 a 384 (1979). Além disso, programas de computador são correntemente disponíveis para ajudar com o prognóstico da estrutura secundária. Um método de prognosticar a estrutura secundária está fundamentado na modelagem de homologia. Por exemplo, dois polipeptídeos ou proteínas que têm uma identidade de seqüência maior do que 30 % ou similaridade maior do que 40 % freqüentemente têm topologias estruturais similares. O desenvolvimento recente das bases de dados estruturais de proteína (PDB) tem fornecido prognosticabilidade realçada de estrutura secundária, que inclui o número potencial de vezes dentro de uma estrutura do polipeptídeo ou da proteína. Ver Holm *et al.*, Nucl. Acid. Res., 27(1): 244 a 247 (1999). Foi sugerido (Brenner *et al.*, Curr. Op. Struct. Biol., 7(3): 369 a 376 (1997)) que existe um número limitado de vezes em um dado polipeptídeo ou proteína e que uma vez um número crítico de estruturas tenha sido resolvido, o prognóstico estrutural tornar-se-á dramaticamente mais preciso.

Os métodos adicionais de prognosticar a estrutura secundária incluem "encadeamento" (Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3): 377 a 387 (1997); Sippl *et al.*, Structure, 4(1): 15 a 19 (1996)), "análise de perfil" (Bowie *et al.*, Science, 253: 164 a 170 (1991); Gribskov *et al.*, Meth. Enzym., 183: 146 a 159 (1990); Gribskov *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13): 4355 a 4358 (1987)) e "ligação evolucionária" (Ver Holm, supra (1999) e Brenner, supra (1997)).

Em certas formas de realização, as variantes de pepticorpo

PI0213223

incluem variantes de glicosilação em que um ou mais sítios de glicosilação, tais como um sítio de glicosilação ligado em N, foi adicionado ao pepticorpo. Um sítio de glicosilação ligado em N é caracterizado pela seqüência: Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr, em que o resíduo de aminoácido designado como X pode ser qualquer resíduo de aminoácido exceto prolina. A substituição ou adição de resíduos de aminoácido para criar esta seqüência fornece um novo sítio potencial para a adição de uma cadeia de carboidrato ligada em N. Alternativamente, as substituições que eliminam esta seqüência removerá uma cadeia de carboidrato ligada em N existente. Também é fornecido um rearranjo de cadeias de carboidrato ligadas em N em que um ou mais sítios de glicosilação ligados em N (tipicamente aqueles que são de ocorrência natural são eliminados e um ou mais novos sítios ligados em N são criados.

A invenção também fornece "derivados" que incluem pepticorpos que carregam modificações outras que não ou além de inserções, supressões ou substituições de resíduos de aminoácido. Preferivelmente, as modificações são covalentes por natureza e incluem por exemplo, ligação química com polímeros, lipídeos, outras porções orgânicas e inorgânicas. Os derivados da invenção podem ser preparados para aumentar a meia vida circulante de um pepticorpo ou podem ser planejados para melhorar a capacidade de alvejamento do pepticorpo às células, tecidos ou órgãos desejados.

Os derivados exemplares incluem porções em que uma ou mais das seguintes modificações foram feitas:

• Uma ou mais das ligações de peptidil [-C(O)NR-] (ligações) foram substituídas por uma ligação não peptidílica tais como uma ligação de -CH_2-carbamato [-CH_2-OC(O)NR-]; uma ligação de fosfonato; uma ligação de -CH_2-sulfonamida [-CH_2-$S(O)_2$NR-]; uma ligação de uréia [-NHC(O)NH-]; uma ligação de -CH_2-amina secundária; ou uma ligação peptidílica alquilada [-C(O)NR6- onde R6 é alquila inferior];

PI0213223

• Peptídeos em que o término N é derivatizado a um grupo -NRR[1]; a um grupo -NRC(O)R; a um grupo -NRC(O)OR; a um grupo $-NRS(O)_2R$; a um grupo -NHC(O)NHR, onde R e R^1 são hidrogênio ou alquila inferior, com a condição de que R e R^1 não sejam ambos hidrogênio; a um grupo succinimida; a um grupo benziloxicarbonil-NH- (CBZ-NH-); ou a um grupo benziloxicarbonil-NH- tendo de 1 a 3 substituintes no anel de fenila selecionados do grupo que consiste de alquila inferior, alcóxi inferior, cloro e bromo; e

• Peptídeos em que o término C livre é derivatizado a $-C(O)R^2$ onde R^2 é selecionado do grupo que consiste de alcóxi inferior e $-NR^3R^4$ onde R^3 e R^4 são independentemente selecionados do grupo que consiste de hidrogênio e alquila inferior. Por "inferior" é intencionado um grupo tendo de 1 a 6 átomos de carbono.

Adicionalmente, modificações de aminoácidos individuais podem ser introduzidas nos polipeptídeos ou composições da invenção reagindo-se resíduos de aminoácido alvejados do peptídeo com um agente derivatizante orgânico que é capaz de reagir com as cadeias laterais ou resíduos terminais selecionados. Os seguintes são exemplares:

Lisinil e resíduos de terminal amino podem ser reagidos com ácido succínico ou outros anidridos de ácido carboxílicos. A derivatização com estes agentes tem o efeito de reverter a carga dos resíduos de lisinila. Outros reagentes adequados para a derivatização de resíduos que contenham alfa-amino incluem imidoésteres tais como picolinimidato de metila; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroboroidreto; ácido trinitrobenzenossulfônico; O-metilisouréia; 2,4 pentanodiona; e reação catalisada por transaminase com glioxilato.

Os resíduos de arginil podem ser modificados pela reação com um ou diversos reagentes convencionais, entre eles fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-cicloexanodiona e ninhidrina. A derivatização de

PI0213223

resíduos de arginina requer que a reação seja realizada em condições alcalinas por causa do alto pKa do grupo funcional guanidina. Além disso, estes reagentes podem reagir com os grupos de lisina assim como o grupo arginina guanidino.

A modificação específica de resíduos de tirosil por si tem sido extensivamente estudada, com interesse particular na introdução de rótulos espectrais em resíduos de tirosil pela reação com compostos de diazônio aromáticos ou tetranitrometano. Mais habitualmente, N-acetilimidizol e tetranitrometano podem ser usados para formar espécies de O-acetil tirosil e derivados 3-nitro, respectivamente.

Grupos laterais carboxil (aspartil ou glutamil) podem ser seletivamente modificados pela reação com carbodiimidas (R'-N=C=N-R) tais como 1-cicloexil-3-(2-morfolinil-(4-etil) carbodiimida ou 1-etil-3-(4-azônia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Além disso, os resíduos de aspartil e glutamil podem ser convertidos a resíduos de asparaginil e glutaminil pela reação com íons amônio.

Os resíduos de glutaminil e asparaginil são freqüentemente desamidados aos resíduos de glutamil e aspartil correspondentes. Alternativamente, estes resíduos podem ser desamidados sob condições brandamente ácidas. Cada uma das formas destes resíduos caem dentro do escopo desta invenção.

A derivatização com agentes bifuncionais é útil para a reticulação dos peptídeos ou seus derivados funcionais a uma matriz de suporte insolúvel em água ou a outros portadores macromoleculares. Os agentes de reticulação habitualmente usados incluem, por exemplo, 1,1-bis-(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldeído, ésteres de N-hidroxissuccinimida, por exemplo, ésteres com ácido 4-azidossalicílico, imidoésteres homobifuncionais, que incluem os ésteres de dissuccinimidila tais como 3,3'-ditiobis (succinimidilpropionato) e maleimidas bifuncionais tais como

PI0213223

bis-N-maleimido-1,8-octano. Os agentes de derivatização tais como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato produzem intermediários fotoativáveis que são capazes de formar reticulações na presença da luz. Alternativamente, as matrizes insolúveis em água reativas tais como carboidratos ativados por brometo de cianogênio e os substratos reativos descritos nas Pat. U.S. Nº 3.969.287, 3.691.016, 4.195.128, 4.247.642, 4.229.537 e 4.330.440 podem ser utilizados para a imobilização de proteína.

Outras modificações possíveis incluem a hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxila de resíduos de seril ou treonil, oxidação do átomo de enxofre em Cys, metilação dos grupos alfa-amino das cadeias laterais de lisina, arginina e histidina (Creighton, T. E., Proteins: Structure and Molecule Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79 a 86 (1983)), acetilação da amina de terminal N e, em alguns exemplos, a amidação dos grupos carboxila do terminal C.

Tais porções derivatizadas preferivelmente melhoram uma ou mais características que incluem atividade anti-angiogênica, solubilidade, absorção, meia vida biológica e outras dos compostos. Alternativamente, as porções derivatizadas podem resultar em compostos que têm as mesmas ou essencialmente as mesmas, características e/ou propriedades do composto que não é derivatizado. As porções podem alternativamente eliminar ou atenuar quaisquer efeitos colaterais indesejáveis dos compostos e outros.

Os compostos da presente invenção podem ser mudados também ao nível de DNA. A seqüência de DNA de qualquer porção do composto pode ser mudada nos códons mais compatíveis com a célula hospedeira escolhida. Para a *E. coli*, que é a célula hospedeira preferida, códons otimizados são conhecidos na técnica. Os códons podem ser substituídos para eliminar sítios de restrição ou para incluir sítios de restrição silenciosos, que podem ajudar no processamento do DNA na célula hospedeira selecionada. As seqüências de DNA do veículo, ligador e peptídeo

PI0213223

podem ser modificadas para incluir qualquer uma das mudanças de seqüência precedentes. Assim, todas as modificações, substituições, derivatizações, etc. aqui debatidas aplicam-se igualmente a todos os aspectos da presente invenção, incluindo mas não limitado aos peptídeos, dímeros e multímeros peptídicos, ligadores e veículos.

Adicionalmente, uma pessoa habilitada na técnica pode rever os estudos de estrutura-função que identificam resíduos em peptídeos similar que são importantes para a atividade ou estrutura. Em vista de uma tal comparação, pode-se prognosticar a importância de resíduos de aminoácido em um peptídeo que correspondam aos resíduos de aminoácido que são importantes para a atividade ou estrutura em peptídeos similares. Uma pessoa habilitada na técnica pode optar por substituições de aminoácido quimicamente similares para tais resíduos de aminoácido prognosticados importantes dos peptídeos.

Uma pessoa habilitada na técnica também pode analisar a estrutura tridimensional e a seqüência de aminoácido em relação àquela estrutura em polipeptídeos similares. Em vista daquela informação, uma pessoa habilitada na técnica pode prognosticar o alinhamento de resíduos de aminoácido de um peptídeo com respeito à sua estrutura tridimensional. Uma pessoa habilitada na técnica pode escolher não fazer mudanças radicais nos resíduos de aminoácido prognosticados estarem na superfície da proteína, visto que tais resíduos podem estar envolvidos em interações importantes com outras moléculas. Além disso, uma pessoa habilitada na técnica pode gerar variantes de teste que contenham uma única substituição de aminoácido em cada resíduo de aminoácido desejado. As variantes podem ser depois triadas usando ensaios de atividade conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Tais dados seriam usados para se obter informação a cerca das variantes adequadas. Por exemplo, se verificou que uma mudança em um resíduo de aminoácido particular resultou em atividade destruída, indesejavelmente

PI0213223

reduzida ou inadequada, variantes com uma tal mudança seriam evitadas. Em outras palavras, com base na informação obtida de tais experimentos de rotina, uma pessoa habilitada na técnica pode facilmente determinar os aminoácidos onde outras substituições seriam evitadas sozinhas ou em combinação com outras mutações.

Várias publicações científicas se dedicaram ao prognóstico da estrutura secundária. Ver Moult J., Curr. Op. in Biotech., 7(4): 422 a 427 (1996), Chou *et al.*, Biochemistry, 13(2): 222 a 245 (1974); Chou *et al.*, Biochemistry, 113(2): 211 a 222 (1974); Chou *et al.*, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47: 45 a 148 (1978); Chou *et al.*, Ann. Rev. Biochem., 47: 251 a 276 e Chou *et al.*, Biophys. J., 26: 367 a 384 (1979). Além disso, programas de computador são correntemente disponíveis para ajudar com o prognóstico da estrutura secundária. Um método de prognosticar a estrutura secundária está fundamentado na modelagem de homologia. Por exemplo, dois polipeptídeos ou proteínas que têm uma identidade de seqüência maior do que 30 % ou similaridade maior do que 40 % freqüentemente têm topologias estruturais similares. O desenvolvimento recente das bases de dados estruturais de proteína (PDB) tem fornecido prognosticabilidade realçada de estrutura secundária, que inclui o número potencial de vezes dentro de uma estrutura do polipeptídeo ou da proteína. Ver Holm *et al.*, Nucl. Acid. Res., 27(1): 244 a 247 (1999). Foi sugerido (Brenner *et al.*, Curr. Op. Struct. Biol., 7(3): 369 a 376 (1997)) que existe um número limitado de vezes em um dado polipeptídeo ou proteína e que uma vez um número crítico de estruturas tenha sido resolvido, o prognóstico estrutural tornar-se-á dramaticamente mais preciso.

Os métodos adicionais de prognosticar a estrutura secundária incluem "encadeamento" (Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3): 377 a 387 (1997); Sippl *et al.*, Structure, 4(1): 15 a 19 (1996)), "análise de perfil" (Bowie *et al.*, Science, 253: 164 a 170 (1991); Gribskov *et al.*, Meth. Enzym.,

183: 146 a 159 (1990); Gribskov *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13): 4355 a 4358 (1987)) e "ligação evolucionária" (Ver Holm, supra (1999) e Brenner, supra (1997)).

A invenção abrange ainda agentes de ligação específicos derivados, por exemplo pepticorpos, covalentemente modificados para incluir uma ou mais ligações de polímero solúvel em água, tais como polietileno glicol, polioxietileno glicol ou polipropileno glicol, como descrito nas Patentes U.S. Nºs: 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192, e 4.179.337. Ainda outros polímeros úteis conhecidos na técnica incluem monometóxi-polietileno glicol, dextrano, celulose ou outros polímeros com base em carboidratos, poli-(N-vinil pirrolidona)-polietileno glicol, homopolímeros de propileno glicol, um co-polímero de óxido de polipropileno / óxido de etileno, polióis polioxietilados (por exemplo, glicerol) e álcool polivinílico, assim como misturas destes polímeros. Particularmente preferidos são pepticorpos covalentemente modificados com subunidades de polietileno glicol (PEG). Os polímeros solúveis em água pode ser ligados em posições específicas, por exemplo no término amino dos pepticorpos ou aleatoriamente ligados a uma ou mais cadeias laterais do polipeptídeo. O uso de PEG para melhorar a capacidade terapêutica para agentes de ligação específicos, por exemplo pepticorpos e para anticorpos humanizados em particular, está descrito na Patente US Nº 6.133.426 a Gonzales *et al.*, concedida em 17 de outubro de 2000.

A invenção também considera derivatizar a porção de peptídeo e/ou veículo dos compostos. Tais derivados podem melhorar a solubilidade, absorção, meia vida biológica e outros dos compostos. As porções podem alternativamente eliminar ou atenuar quaisquer efeitos colaterais indesejáveis dos compostos e outros. Os derivados exemplares incluem compostos em que:

1. O composto ou alguma porção deste é cíclico. Por exemplo, a porção peptídica pode ser modificada para conter dois ou mais resíduos Cys

PI0213223

(por exemplo, no ligador), que pode ciclizar pela formação de ligação de dissulfeto.

2. O composto é reticulado ou é tornado capaz de reticulação entre as moléculas. Por exemplo, a porção peptídica pode ser modificada para conter um resíduo Cys e deste modo ser capaz de formar uma ligação de dissulfeto intermolecular com uma molécula igual. O composto também pode ser reticulado através do seu término C.

3. Uma ou mais ligações de peptidil [-C(O)NR-] (ligações) são substituídas por uma ligação não peptidílica. As ligações não peptidílicas exemplares são -CH_2-carbamato [-CH_2-OC(O)NR-], fosfonato, -CH_2-sulfonamida [-CH_2-$S(O)_2$NR-], uréia [-NHC(O)NH-], -CH_2-amina secundária e peptídeo alquilado [-C(O)NR_6- em que R_6 é alquila inferior].

4. O término N é derivatizado. Tipicamente, o término N pode ser acilado ou modificado para uma amina substituída. Os grupos derivados de terminal N exemplares incluem -NRR_1 (outro que não -NH_2), -$NRC(O)R_1$, -$NRC(O)OR_1$, $NRS(O)_2R_1$, -$NHC(O)NHR_1$, succinimida ou benziloxicarbonil-NH- (CBZNH-), em que R e R_1 são cada um independentemente hidrogênio ou alquila inferior e em que o anel de fenila pode ser substituído com 1 a 3 substituintes selecionados do grupo que consiste de alquila C_1-C_4, alcóxi C_1-C_4, cloro e bromo.

5. O término C livre é derivatizado. Tipicamente, o término C é esterificado ou amidado. Por exemplo, pode-se usar métodos descritos na técnica para adicionar (NH-CH_2-CH_2-NH_2)$_2$ aos compostos desta invenção no término C. Igualmente, pode-se usar os métodos descritos na técnica para adicionar -NH_2 aos compostos desta invenção no término C. os grupos derivados do terminal C exemplares incluem, por exemplo, -$C(O)R_2$ em que R_2 é alcóxi inferior ou -NR_3R_4 em que R_3 e R_4 são independentemente hidrogênio ou alquila C_1-C_8 (preferivelmente alquila C_1-C_4).

6. Uma ligação de dissulfeto é substituída com uma outra,

PI0213223

preferivelmente porção de reticulação mais estável, (por exemplo, um alquileno). Ver, por exemplo, Bhatnagar (supra); Alberts *et al.*, Thirteenth Am. Pep. Symp., 357 a 359 (1993).

7. Um ou mais resíduos de aminoácido individuais são modificados. Vários agentes derivatizantes são conhecidos por reagir especificamente com as cadeias laterais selecionadas ou resíduos de terminal, como descrito em detalhes abaixo.

Os resíduos de lisinil e os resíduos de terminal amino podem ser reagidos com ácido succínico ou outros anidridos de ácido carboxílico, que revertem a carga dos resíduos de lisinil. Outros reagentes adequados para derivatizar resíduos que contenham alfa-amino incluem imidoésteres tais como picolinimidato de metila; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroboroidreto; ácido trinitrobenzenossulfônico; O-metilisouréia; 2,4 pentanodiona; e reação catalisada por transaminase com glioxilato.

Os resíduos de arginil podem ser modificados pela reação com qualquer um ou combinação de diversos reagentes convencionais, que incluem fenilglioxal, 2,3-butanodiono, 1,2-cicloexanodiona e ninhidrina. A derivatização de resíduos de arginil requerem que a reação seja realizada em condições alcalinas por causa do pKa alto do grupo funcional de guanidina. Além disso, estes reagentes pode reagir com os grupos de lisina assim como com o grupo epsílon-amino da arginina.

A modificação específica de resíduos de tirosil foi estudada extensivamente, com interesse particular na introdução de rótulos espectrais em resíduos de tirosil pela reação com compostos de diazônio aromáticos ou tetranitrometano. Mais habitualmente, N-acetilimidizol e tetranitrometano são usados para formar espécies de O-acetil tirosil e derivados 3-nitro, respectivamente.

Os grupos de cadeia lateral de carboxila (aspartil ou glutamil) podem ser seletivamente modificados pela reação com carbodiimidas

(R'-N=C=N-R') tais como 1-cicloexil-3-(2-morfolinil-(4-etil) carbodiimida ou 1-etil-3-(4-azônia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Além disso, os resíduos de aspartil e glutamil podem ser convertidos aos resíduos de asparaginil e glutaminil pela reação com íons amônio.

Os resíduos de glutaminil e asparaginil podem ser desamidados aos resíduos de glutamil e aspartil correspondentes. Alternativamente, estes resíduos são desamidados sob condições brandamente ácidas. Cada uma das formas destes resíduos caem dentro do escopo desta invenção.

Os resíduos de cisteinil podem ser substituídos por resíduos de aminoácido ou outras porções para eliminar as ligações de dissulfeto ou, ao contrário, para estabilizar a reticulação. Ver, por exemplo, Bhatnagar, (supra).

A derivatização com agentes bifuncionais é útil para a reticulação dos peptídeos ou seus derivados funcionais a uma matriz de suporte insolúvel em água ou a outros veículos macromoleculares. Os agentes de reticulação habitualmente usados incluem, por exemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldeído, ésteres de N-hidróxi-succinimida, por exemplo, ésteres com ácido 4-azidossalicílico, imidoésteres homobifuncionais, que incluem os ésteres de dissuccinimidila tais como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato) e maleimidas bifuncionais tais como bis-N-maleimido-1,8-octano. Os agentes derivatizantes tais como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato produzem intermediários fotoativáveis que são capazes de formar reticulações na presença de luz. Alternativamente, as matrizes insolúveis em água reativas tais como carboidratos ativados por brometo de cianogênio e os substratos reativos descritos na Patente U.S. Nos 3.969.287, 3.691.016, 4.195.128, 4.247.642, 4.229.537, e 4.330.440 são utilizados para a imobilização de proteína.

Os grupos de carboidrato (oligossacarídeo) podem ser convenientemente ligados aos sítios que são conhecidos por serem sítios de

PI0213223

glicosilação em proteínas. No geral, os oligossacarídeos ligados em O são ligados aos resíduos de serina (Ser) ou treonina (Thr) enquanto os oligossacarídeos ligados em N são ligados aos resíduos de asparagina (Asn) quando eles são parte da seqüência Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido exceto prolina. X é preferivelmente um dos 19 aminoácidos que ocorrem naturalmente outros que não prolina. As estruturas de oligossacarídeos ligados em N e ligados em O e os resíduos de açúcar encontrados em cada tipo são diferentes. Um tipo de açúcar que é habitualmente encontrado em ambos é o ácido N-acetilneuramínico (aludido como ácido siálico). O ácido siálico é usualmente o resíduo terminal dos oligossacarídeos tanto ligados em N quanto ligados em O e, em virtude da sua carga negativa, pode conferir propriedades ácidas ao composto glicosilado. Tal(is) sítio(s) pode(m) ser incorporado(s) no ligador dos compostos desta invenção e é(são) preferivelmente glicosilado(s) por uma célula durante a produção recombinante dos compostos polipeptídicos (por exemplo, em células de mamífero tais como CHO, BHK, COS). Entretanto, tais sítios podem ser ainda glicosilados pelos procedimentos sintéticos ou semi-sintéticos conhecidos na técnica.

Outras modificações possíveis incluem a hidroxilação de prolina e lisina, a fosforilação de grupos hidroxila de resíduos de seril ou treonil, a oxidação do átomo de enxofre em Cys, a metilação dos grupos de alfa-amino das cadeias laterais de lisina, arginina e histidina [Creighton, Proteins: Structure and Molecule Properties (W. H. Freeman & Co., San Francisco), pp. 79 a 86 (1983)].

Os compostos da presente invenção podem ser mudados também ao nível do DNA. A seqüência de DNA de qualquer porção do composto pode ser mudada para códons mais compatíveis com a célula hospedeira escolhida. Para a *E. coli*, que é a célula hospedeira preferida, os códons otimizados são conhecidos na técnica. Os códons podem ser

substituídos para eliminar sítios de restrição ou para incluir sítios de restrição silenciosos, que podem ajudar no processamento do DNA na célula hospedeira selecionada. As seqüências de DNA do veículo, ligador e peptídeo podem ser modificadas para incluir qualquer uma das mudanças de seqüência precedentes.

Maturação de Afinidade

Uma forma de realização da presente invenção inclui peptídeos e pepticorpos "maturados por afinidade". Este procedimento considera aumentar a afinidade ou a bio-atividade dos peptídeos e pepticorpos da presente invenção que usam demonstração de fago ou outras tecnologias de seleção. Com base em uma seqüência de consenso (que é gerada para uma coleção de peptídeos relacionados), coleções de demonstração de fago secundárias direcionadas podem ser geradas em que os aminoácidos de "núcleo" (determinada a partir da seqüência de consenso) são mantidos constantes ou são influenciados na freqüência de ocorrência. Alternativamente, uma seqüência de peptídeo individual pode ser usada para gerar uma coleção de demonstração de fago influenciada, direcionada. *Panning* de tais coleções pode produzir peptídeos (que podem ser convertidos a pepticorpos) com ligação realçada à Ang-2 ou com bio-atividade realçada.

Análogos Não Peptídicos/Miméticos de Proteína

Além disso, análogos não peptídicos de peptídeos que fornecem uma estrutura estabilizada ou biodegradação diminuída, também são considerados. Os análogos miméticos de peptídeo podem ser preparados com base em um peptídeo inibidor selecionado pela substituição de um ou mais resíduos pelas porções não peptídicas. Preferivelmente, as porções não peptídicas permitem que o peptídeo retenha a sua conformação natural ou estabilize uma conformação preferida, por exemplo, bioativa, que retenha a capacidade para reconhecer e ligar Ang-2. Em um aspecto, o análogo/ mimético resultante exibe afinidade aumentada de ligação para Ang-2. Um

PI0213223

exemplo de métodos para a preparação de análogos miméticos não peptídicos a partir de peptídeos é descrito em Nachman *et al.*, Regul. Pept. 57: 359 a 370 (1995). Se desejado, os peptídeos da invenção podem ser modificados, por exemplo, pela glicosilação, amidação, carboxilação ou fosforilação ou pela criação de sais de adição de ácido, amidas, ésteres, em particular ésteres de terminal C e derivados de N-acila dos peptídeos da invenção. Os pepticorpos também podem ser modificados para criar derivados peptídicos pela formação de complexos covalentes ou não covalentes com outras porções. Os complexos covalentemente ligados podem ser preparados pela ligação das porções químicas aos grupos funcionais nas cadeias laterais de aminoácidos que compreendem os pepticorpos ou nos términos N ou C.

Em particular, é previsto que os peptídeos podem ser conjugados a um grupo repórter, que inclui, mas não limitado a um radiorrótulo, um rótulo fluorescente, uma enzima (por exemplo, que catalisa uma reação colorimétrica ou fluorimétrica), um substrato, uma matriz sólida ou um portador (por exemplo, biotina ou avidina). A invenção consequentemente fornece uma molécula que compreende uma molécula de pepticorpo, em que a molécula preferivelmente ainda compreende um grupo repórter selecionado do grupo que consiste de um radiorrótulo, um rótulo fluorescente, uma enzima, um substrato, uma matriz sólida e um portador. Tais rótulos são bem conhecidos por aqueles de habilidade na técnica, por exemplo, rótulos de biotina são particularmente considerados. O uso de tais rótulos é bem conhecidos por aqueles de habilidade na técnica e é descrito, por exemplo, nas Patentes U.S. N^{os} 3.817.837, 3.850.752, 3.996.345, e 4.277.437. Outros rótulos que serão úteis incluem mas não são limitados a rótulos radioativos, rótulos fluorescentes e rótulos quimioluminescentes. As Patentes U.S. que dizem respeito ao uso de tais rótulos incluem, por exemplo, as Patentes U.S. N^{os} 3.817.837, 3.850.752, 3.939.350, e 3.996.345. Qualquer um dos pepticorpos da presente invenção pode compreender um, dois ou mais

PI0213223

de qualquer um destes rótulos.

Métodos de fabricar Peptídeos

Os peptídeos da presente invenção podem ser gerados usando uma ampla variedade de técnicas conhecidas no ramo. Por exemplo, tais peptídeos podem ser sintetizados em solução ou em um suporte sólido de acordo com técnicas convencionais. Vários sintetizadores automáticos são comercialmente disponíveis e podem ser usados de acordo com protocolos conhecidos. Ver, por exemplo, Stewart e Young (supra); Tam *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 105: 6442, (1983); Merrifield, Science 232: 341 a 347 (1986); Barany e Merrifield, The Peptides, Gross e Meienhofer, eds, Academic Press, Nova Iorque, 1 a 284; Barany *et al.*, Int. J. Pep. Protein Res., 30: 705 a 739 (1987); e Patente U.S. Nº 5.424.398, cada uma aqui incorporada por referência.

Os métodos de síntese de peptídeo de fase sólida usam um copoli(estirenodivinilbenzeno) contendo de 0,1 a 1,0 mM de aminas/g de polímero. Estes métodos para a síntese de peptídeo usam proteção de butiloxicarbonila (t-BOC) ou 9-fluorenilmetiloxicarbonila (FMOC) de grupos alfa-amino. Ambos os métodos envolvem a síntese escalonada por meio da qual um único aminoácido é adicionado em cada etapa partindo do término C do peptídeo (Ver, Coligan *et al.*, Curr. Prot. Immunol., Wiley Interscience, 1991, Unidade 9). Na conclusão da síntese química, o peptídeo sintético pode ser desprotegido para remover os grupos de bloqueio de aminoácido t-BOC ou FMOC e clivados do polímero pelo tratamento com ácido em temperatura reduzida (por exemplo, HF líquido-10 % de anisol durante cerca de 0,25 a cerca de 1 hora a 0° C). Depois da evaporação dos reagentes, os peptídeos são extraídos do polímero com solução a 1 % de ácido acético que é depois liofilizado para produzir o material bruto. Este pode ser normalmente purificado por técnicas tais como filtração em gel em Sephadex G15 que usa ácido acético a 5 % como um solvente. A liofilização das frações apropriadas

PI0213223

da coluna produzirá os peptídeos ou derivados de peptídeo homogêneos, que podem ser depois caracterizados por técnicas padrão tais como a análise de aminoácido, cromatografia de camada fina, cromatografia líquida de alto desempenho, espectroscopia de absorção de ultravioleta, rotação molar, solubilidade e quantificados pela degradação de Edman de fase sólida.

Outros métodos, tais como peptídeos de seleção de uma coleção de demonstração de fago, também são disponíveis. As coleções podem ser preparadas a partir de conjuntos de aminoácidos como aqui descritos. A demonstração de fago pode ser particularmente eficaz em identificar peptídeos úteis de acordo com a invenção. Em resumo, prepara-se uma coleção de fago (que usa por exemplo fago ml 13, fd ou lambda), demonstrando insertos de 4 a cerca de 80 resíduos de aminoácido. Os insertos podem representar, por exemplo, uma série completamente degenerada ou influenciada. Pode-se então selecionar insertos que carregam fagos que se ligam ao antígeno desejado. Este processo pode ser repetido através de diversos ciclos de resseleção de fago que se liga ao antígeno desejado. As rodadas repetidas levam ao enriquecimento de seqüências particulares que carregam fago. A análise de seqüência de DNA pode ser conduzida para identificar as seqüências dos peptídeos expressados. A porção linear mínima da seqüência que se liga ao antígeno desejado pode ser determinada. Pode-se repetir o procedimento usando uma coleção influenciada que contenha insertos contendo parte ou toda a porção linear mínima mais um ou mais resíduos degenerados adicionais a montante ou a jusante desta. Estas técnicas podem identificar peptídeos da invenção com afinidade ainda maior de ligação para Ang-2 do que os agentes aqui já identificados.

Independente da maneira em que os peptídeos são preparados, uma molécula de ácido nucléico que codifica cada tal peptídeo e pepticorpo pode ser gerada usando procedimentos de DNA recombinante padrão. A seqüência de nucleotídeo de tais moléculas de DNA pode ser manipulada

PI0213223

como apropriado sem mudar a seqüência de aminoácido que ela codifica levando-se em conta a degenerescência do código de ácido nucléico assim como levando-se em conta a preferência de códon em células hospedeiras particulares.

As técnicas de DNA recombinantes são um método conveniente para preparar pepticorpos de comprimento completo e outros agentes de ligação proteináceos grandes específicos da presente invenção ou fragmentos destes. Uma molécula de DNA que codifica o pepticorpo ou fragmento pode ser inserida em um vetor de expressão, que pode ser por sua vez inserido em uma célula hospedeira para a produção do anticorpo ou fragmento.

No geral, uma molécula de DNA que codifica um peptídeo ou pepticorpo pode ser obtida usando-se procedimentos aqui descritos nos Exemplos. As sondas e as condições de hibridização típicas são aquelas tais como apresentadas em Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols Press [1994]). Depois da hibridização, a mancha sondada pode ser lavada em uma severidade adequada, dependendo de fatores tais como o tamanho da sonda, a homologia esperada da sonda para o clone, o tipo de coleção que é triada e o número de clones que são triados. Os exemplos de triagem de severidade alta são 0,1 X SSC e 0,1 por cento de SDS a uma temperatura entre 50 e 65° C.

Os métodos de triagem de híbrido duplo de levedura também podem ser usados para identificar peptídeos da invenção que se ligam à Ang-2. Assim, o antígeno ou um fragmento deste, pode ser usado para triar coleções peptídicas, que incluem as coleções de demonstração de fago, para identificar e selecionar agentes de ligação de Ang-2, por exemplo pepticorpos, da presente invenção.

Alternativamente, uma variedade de sistemas de vetor de expressão/hospedeiro podem ser utilizados para conter e expressar os

peptídeos da invenção. Estes sistemas incluem mas não são limitados a microorganismos tais como bactérias transformadas com bacteriofago recombinante, vetores de expressão de DNA plasmídico ou cosmídico; a levedura transformada com vetores de expressão de levedura; sistemas de célula de inseto infectada com vetores de expressão viral (por exemplo, baculovírus); sistemas de célula vegetal transfectada com vetores de expressão viral (por exemplo, o vírus mosaico da couve-flor, CaMV; o vírus mosaico do tabaco, TMV) ou transformada com vetores de expressão bacterianos (por exemplo, plasmídeo Ti ou pBR322); ou sistemas de célula animal. As células de mamífero que são úteis nas produções de proteína recombinante incluem mas não são limitadas às células VERO, células HeLa, linhagens de célula do ovário de hamsters chineses (CHO), células COS (tais como COS-7), células W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 e 293. Os protocolos exemplares para a expressão recombinante dos peptídeos são descritos aqui abaixo.

O termo "vetor de expressão" refere-se a um plasmídeo, fago, vírus ou vetor, para expressar um polipeptídeo a partir de uma seqüência de DNA (RNA). Um vetor de expressão pode compreender uma unidade transcricional que compreende uma montagem de (1) um elemento ou elementos genéticos tendo um papel regulador na expressão de gene, por exemplo, promotores ou realçadores, (2) uma estrutural ou seqüência que codifica o agente de ligação que é transcrito em mRNA e traduzido em proteína e (3) seqüências de início e término de transcrição apropriadas. As unidades estruturais intencionadas para o uso em levedura ou sistemas de expressão eucarióticas preferivelmente incluem uma seqüência líder que permitem a secreção extracelular de proteína traduzida por uma célula hospedeira. Alternativamente, onde a proteína recombinante é expressada sem uma seqüência líder ou de transporte, ela pode incluir um resíduo de metionil de terminal amino. Este resíduo pode ou não ser subsequentemente clivado a

partir da proteína recombinante expressada para fornecer um produto peptídico final.

Por exemplo, os peptídeos podem ser recombinantemente expressados em levedura usando um sistema de expressão comercialmente disponível, por exemplo, o Sistema de Expressão da *Pichia* (Invitrogen, San Diego, CA), seguindo as instruções do fabricante. Este sistema também conta com a seqüência pre-pro-alfa para direcionar a secreção, mas a transcrição do inserto é direcionada pelo promotor da álcool oxidase (AOX1) na indução pelo metanol.

O peptídeo secretado é purificado do meio de cultivo de levedura, por exemplo, pelos métodos usados para purificar o peptídeo de sobrenadantes de célula bacteriana e de mamífero.

Alternativamente, o cDNA que codifica o peptídeo pode ser clonado no vetor de expressão de baculovírus pVL1393 (Pharmingen, San Diego, CA). Este vetor pode ser usado de acordo com as diretrizes do fabricante (Pharmingen) para infectar células de *Spodoptera frugiperda* em meio isento de proteína sF9 e para produzir a proteína recombinante. A proteína recombinante pode ser purificada e concentrada a partir do meio usando uma coluna de heparina-Sepharose (Pharmacia).

Alternativamente, o peptídeo pode ser expressado em um sistema de inseto. Os sistemas de inseto para a expressão de proteína são bem conhecidos por aqueles de habilidade na técnica. Em um tal sistema, o vírus da poliedrose nuclear da *Autographa californica* (AcNPV) pode ser usado como um vetor para expressar genes estranhos em células de *Spodoptera frugiperda* ou em *Trichoplusia larvae*. A seqüência que codifica o peptídeo pode ser clonada em uma região não essencial do vírus, tal como o gene da poliedrina e colocado sob o controle do promotor da poliedrina. A inserção bem sucedida do peptídeo tornará o gene da poliedrina inativo e produzirá vírus recombinante que carece da proteína de revestimento. Os vírus

recombinantes podem ser usados para infectar células de *S. frugiperda* ou *Trichoplusia larvae* em que o peptídeo é expressado. Smith *et al.*, J. Virol. 46: 584 (1983); Engelhard *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 91: 3224 a 3227 (1994).

Em um outro exemplo, a seqüência de DNA que codifica o peptídeo pode ser amplificada pela PCR e clonada em um vetor apropriado por exemplo, pGEX-3X (Pharmacia). O vetor pGEX é planejado para produzir uma proteína de fusão que compreende a glutationa-S-transferase (GST), codificada pelo vetor e uma proteína codificada por um fragmento de DNA inserido no sítio de clonagem do vetor. Os iniciadores para a PCR podem ser gerados para incluir por exemplo, um sítio de clivagem apropriado. Onde a porção de fusão é usada unicamente para facilitar a expressão ou de outro modo não é desejável como uma ligação ao peptídeo de interesse, a proteína de fusão recombinante pode ser então clivada da porção GST da proteína de fusão. A construção peptídica específica pGEX-3X/agente de ligação é transformada em células XL-1 Blue da *E. coli* (Stratagene, La Jolla CA) e os transformantes individuais isolados e cultivados. O DNA plasmídico de transformantes individuais pode ser purificado e parcialmente seqüenciado usando um seqüenciador automatizado para confirmar a presença do agente de ligação específico desejado que codifica o inserto de ácido nucléico na orientação apropriada.

Certas composições peptídicas da presente invenção são aquelas em que um pepticorpo é conjugado a qualquer peptídeo anti-tumor tal como o fator de necrose de tumor (TNF). Em um método particularmente preferido, as quimeras peptídicas TNF-agente de ligação específico são geradas como fusões recombinantes com seqüências que codificam peptídeo fundidas na matriz para seqüências que codificam TNF (Novagen, Madison, WI). O cDNA peptídeo-TNF pode ser clonado pelo vetor pET-11b (Novagen) e a expressão de TNF-peptídeos em BL21 *E. coli* pode ser induzida de acordo

PI0213223

com a instrução do fabricante para pET11b. TNF-peptídeos solúveis podem ser purificados a partir de lisados bacterianos pela preparação com sulfato de amônio, cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow, cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose Fast Flow e cromatografia de filtração em gel em Sephacryl-S300 HR.

A proteína de fusão, que pode ser produzida como um corpo de inclusão insolúvel nas bactérias, pode ser purificada como segue. As células hospedeiras podem ser sacrificadas pela centrifugação; lavadas em NaCl 0,15 M, Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM; e tratadas com 0,1 mg/ml de lisozima (Sigma, St. Louis, MO) durante 15 minutos na temperatura ambiente. O lisado pode ser depurado pela sonificação e os fragmentos de célula podem ser pelotizados pela centrifugação durante 10 minutos a 12.000 X g. A pelota contendo a proteína de fusão pode ser recolocada em suspensão em Tris 50 mM, pH 8 e EDTA 10 mM, disposta em camada em 50 % de glicerol e centrifugada durante 30 minutos a 6000 X g. A pelota pode ser recolocada em suspensão em solução salina tamponada com fosfato padrão (PBS) livre de Mg++ e Ca++. A proteína de fusão pode ser ainda purificada pelo fracionamento da pelota recolocada em suspensão em um SDS-PAGE desnaturante (Sambrook *et al.*, supra). O gel pode ser embebido em KCl 0,4 M para visualizar a proteína, que pode ser excisada e eletroeluída em tampão fluente em gel que carece de SDS. Se o GST/proteína de fusão é produzido em bactérias como uma proteína solúvel, ela pode ser purificada usando o Módulo de Purificação GST (Pharmacia).

A proteína de fusão pode ser submetida à digestão para clivar o GST do peptídeo da invenção. A reação de digestão (20 a 40 mg de proteína de fusão, 20 a 30 unidades de trombina humana (4000 U/mg, Sigma) em 0,5 ml de PBS pode ser incubada de 16 a 48 horas na temperatura ambiente e carregada em um gel de SDS-PAGE desnaturante para fracionar os produtos de reação. O gel pode ser embebido em KCl 0,4 M para visualizar as faixas de

PI0213223

proteína. A identidade da faixa de proteína que corresponde ao peso molecular esperado do peptídeo pode ser confirmada pela análise de seqüência de aminoácido usando um seqüenciador automatizado (Applied Biosystems Modelo 473A, Foster City, CA). Alternativamente, a identidade pode ser confirmada realizando-se a HPLC e/ou a espectrometria de massa dos peptídeos.

Alternativamente, uma seqüência de DNA que codifica o peptídeo pode ser clonada em um plasmídeo contendo um promotor desejado e, opcionalmente, uma seqüência líder [Better *et al.*, Science 240: 1041 a 1043 (1988)]. A seqüência desta construção pode ser confirmada pelo seqüenciamento automatizado. O plasmídeo pode ser depois transformado na cepa MC1061 da *E. coli* usando procedimentos padrão que utilizam a incubação com $CaCl_2$ e tratamento de choque térmico das bactérias (Sambrook *et al.*, supra). As bactérias transformadas podem ser cultivadas em meio LB suplementado com carbenicilina e a produção da proteína expressada pode ser induzida pelo cultivo em um meio adequado. Se presente, a seqüência líder pode efetuar a secreção do peptídeo e ser clivada durante a secreção.

A proteína recombinante secretada pode ser purificada a partir do meio de cultura bacteriana pelos métodos descritos aqui abaixo.

Os sistemas hospedeiros mamíferos para a expressão da proteína recombinante são bem conhecidos por aqueles de habilidade na técnica. As cepas da célula hospedeira podem ser escolhidas quanto a uma capacidade particular para processar a proteína expressada ou produzir certas modificações pós tradução que serão úteis em fornecer atividade de proteína. Tais modificações da proteína incluem, mas não são limitadas à acetilação, carboxilação, glicosilação, fosforilação, lipidação e acilação. Células hospedeiras diferentes tais como CHO, HeLa, MDCK, 293, W138 e outras têm mecanismos celulares específicos e mecanismos característicos para tais

atividades pós tradução e podem ser escolhidas para garantir a modificação e o processamento corretos da proteína estranha introduzida.

É preferível que as células transformadas sejam usadas para a produção de proteína de longa duração, alto rendimento e como tal a expressão estável é desejável. Uma vez que tais células são transformadas com vetores que contenham marcadores selecionáveis junto com o cassete de expressão desejado, as células podem ser deixadas para desenvolver durante 1 a 2 dias em um meio enriquecido antes que elas sejam mudadas para meio seletivo. O marcador selecionável é planejado para conferir resistência à seleção e a sua presença permite o desenvolvimento e a recuperação de células que expressem com sucesso as seqüências introduzidas. Grumos resistentes de células estavelmente transformadas podem ser proliferados usando as técnicas de cultura de tecido apropriadas para a célula.

Vários sistemas de seleção podem ser usados para recuperar as células que foram transformadas para a produção de proteína recombinante. Tais sistemas de seleção incluem, mas não são limitados aos genes da HSV timidina cinase, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase e adenina fosforibosiltransferase, em células tk, hgprt ou aprt, respectivamente. Também, a resistência a anti-metabólito pode ser usada como a base de seleção para DBFR que confere resistência ao metotrexato; gpt que confere resistência ao ácido micofenólico; neo que confere resistência ao aminoglicosídeo G418 e confere resistência ao clorsulfuron; e hygro que confere resistência à higromicina. Os genes selecionáveis adicionais que podem ser úteis incluem trpB, que permite que as células utilizem indol no lugar do triptofano ou hisD, que permite que as células utilizem histinol no lugar da histidina. Os marcadores que dão uma indicação visual para a identificação de transformantes incluem antocianinas, β-glicuronidase e seu substrato, GUS e luciferase e seu substrato, a luciferina.

Purificação e Redobra de Agentes de Ligação Específicos

Em alguns casos, os agentes de ligação específicos tais como os peptídeos e/ou pepticorpos desta invenção pode necessitar serem "redobrados" e oxidados em uma estrutura terciária apropriada e gerar ligações de dissulfeto de modo a serem biologicamente ativos. A redobra pode ser realizada usando-se vários procedimentos bem conhecidos na técnica. Tais métodos incluem, por exemplo, expor o agente polipeptídico solubilizado a um pH usualmente acima de 7 na presença de um agente caotrópico. A seleção do caótropo é similar às escolhas usadas para a solubilização de corpo de inclusão, entretanto um caótropo é tipicamente usado em uma concentração mais baixa. Um agente caotrópico exemplar é a guanidina. Na maioria dos casos, a solução de redobra/oxidação também conterá um agente redutor mais a sua forma oxidada em uma relação específica para gerar um potencial de redox particular que permita que o embaralhamento de dissulfeto ocorra para a formação de pontes de cisteína. Alguns pares de redox habitualmente usados incluem cisteína/cistamina, glutationa/ditiobisGSH, cloreto cúprico, ditiotreitol DTT/ditiano DTT e 2-mercaptoetanol (bME)/ditio-bME. Em muitos exemplos, um co-solvente pode ser usado para aumentar a eficiência da redobra. Os co-solventes habitualmente usados incluem glicerol, polietileno glicol de vários pesos moleculares e arginina.

Pode ser desejável purificar os peptídeos e pepticorpos da presente invenção. As técnicas de purificação de proteína são bem conhecidas por aqueles de habilidade na técnica. Estas técnicas envolvem, em um nível, o fracionamento bruto das frações proteináceas e não proteináceas. Tendo separado o peptídeo e/ou pepticorpo de outras proteínas, o peptídeo ou polipeptídeo de interesse podem ser ainda purificados usando-se técnicas cromatográficas e eletroforéticas para se obter a purificação parcial ou completa (ou purificação até a homogeneidade). Os métodos analíticos particularmente adaptados para a preparação de pepticorpos e peptídeos ou a

presente invenção são a cromatografia de troca iônica, a cromatografia de exclusão; eletroforese em gel de poliacrilamida; focalização isoelétrica. Um método particularmente eficiente de purificar peptídeos é a cromatografia líquida de proteína rápida ou mesmo a HPLC.

Certos aspectos da presente invenção dizem respeito à purificação e em formas de realização particulares, à purificação substancial, de um pepticorpo ou peptídeo da presente invenção. O termo "pepticorpo ou peptídeo purificado" como aqui usado, é intencionado a referir-se a uma composição, isolável de outros componentes, em que o pepticorpo ou peptídeo é purificado em qualquer grau relativo ao seu estado naturalmente obtenível. Um peptídeo ou pepticorpo purificado portanto também refere-se a um pepticorpo ou peptídeo que seja livre do ambiente no qual ele pode ocorrer naturalmente.

No geral, "purificado" referir-se-á a uma composição de peptídeo ou pepticorpo que foi submetida ao fracionamento para remover vários outros componentes e cuja composição substancialmente retém a sua atividade biológica expressada. Onde o termo "substancialmente purificada" é usado, esta designação referir-se-á a uma composição de peptídeo ou pepticorpo em que o pepticorpo ou peptídeo formam o componente principal da composição, tal como constituindo cerca de 50 %, cerca de 60 %, cerca de 70 %, cerca de 80 %, cerca de 90 %, cerca de 95 % ou mais das proteínas na composição.

Vários métodos para quantificar o grau de purificação do peptídeo ou pepticorpo serão conhecidos por aqueles de habilidade na técnica considerando a presente divulgação. Estes incluem, por exemplo, determinar a atividade de ligação específica de uma fração ativa ou avaliar a quantidade de peptídeo ou pepticorpo dentro de uma fração pela análise de SDS/PAGE. Um método preferido para avaliar a pureza de uma fração de peptídeo ou pepticorpo é calcular a atividade de ligação da fração, para compará-la com a

PI0213223

atividade de ligação do extrato inicial e para assim calcular o grau de purificação, aqui estimado por um "número de vezes de purificação." As unidades atuais usadas para representar a quantidade de atividade de ligação, naturalmente, será dependente da técnica de ensaio particular escolhida para seguir a purificação e se o pepticorpo ou peptídeo exibe ou não uma atividade de ligação detectável.

Várias técnicas adequadas para o uso na purificação serão bem conhecidas por aqueles de habilidade na técnica. Estas incluem, por exemplo, precipitação com sulfato de amônio, PEG, anticorpos (imunoprecipitação) e outros ou pela desnaturação térmica, seguida por centrifugação; as etapas de cromatografia tais como a cromatografia de afinidade (por exemplo, Proteína-A-Sepharose), troca iônica, filtração em gel, fase reversa, hidroxilapatita e cromatografia de afinidade; focalização isoelétrica; eletroforese em gel; e combinações de tais e outras técnicas. Como é no geral conhecido na técnica, acredita-se que a ordem de conduzir as várias etapas de purificação pode ser mudada ou que certas etapas podem ser omitidas e ainda resultar em um método adequado para a preparação de um agente de ligação específico substancialmente purificado.

Não existe nenhuma exigência geral de que o peptídeo ou pepticorpo da presente invenção sempre sejam fornecidos no seu estado mais purificado. De fato, é considerado que produtos de agente de ligação menos substancialmente específicos terão utilidade em certas formas de realização. A purificação parcial pode ser realizada usando-se menos etapas de purificação em combinação ou utilizando-se formas diferentes do mesmo esquema de purificação geral. Por exemplo, é avaliado que uma cromatografia de coluna de troca catiônica realizada utilizando um aparelho de HPLC no geral resultará em uma purificação de "dobra" maior do que a mesma técnica utilizando um sistema de cromatografia de baixa pressão. Os métodos que exibem um grau mais baixo de purificação relativa pode ter vantagens na

recuperação total do peptídeo ou pepticorpo ou na manutenção da atividade de ligação do peptídeo ou pepticorpo.

É conhecido que a migração de um peptídeo ou polipeptídeo pode variar, algumas vezes significantemente, com condições diferentes de SDS/PAGE [Capaldi *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 76: 425 (1977)). Portanto será avaliado que sob condições de eletroforese diferentes, os pesos moleculares evidentes de produtos de expressão de agente de ligação específico purificados ou parcialmente purificados podem variar.

Ensaios de Ligação

Os ensaios de ligação imunológica tipicamente utilizam um agente de captura para ligar-se especificamente ao análito do agente alvo e freqüentemente imobilizá-lo. O agente de captura é uma porção que especificamente se liga ao análito. Em uma forma de realização da presente invenção, o agente de captura é um peptídeo ou pepticorpo ou fragmento deste que especificamente se liga à Ang-2. Estes ensaios de ligação imunológica são bem conhecidos na técnica [Asai, ed., Methods in Cell Biology, Vol. 37, Antibodies in Cell Biology, Academic Press, Inc., Nova Iorque (1993)].

Os ensaios de ligação imunológica freqüentemente utilizam um agente de rotulação que sinalizará a existência do complexo de ligação formado pelo agente de captura e antígeno. O agente de rotulação pode ser uma das moléculas que compreendem o complexo de ligação; isto é pode ser um agente de ligação específico rotulado ou um anticorpo anti-agente de ligação específico rotulado. Alternativamente, o agente de rotulação pode ser uma terceira molécula, habitualmente um outro anticorpo, que se liga ao complexo de ligação. O agente de rotulação pode ser, por exemplo, um anticorpo anti-agente de ligação específico que carrega um rótulo. O segundo anticorpo, específico para o complexo de ligação, pode carecer de um rótulo, mas pode estar ligado por uma quarta molécula específica para a espécie de

anticorpos da qual o segundo anticorpo é um membro. Por exemplo, o segundo anticorpo pode ser modificado com uma porção detectável, tal como biotina, que pode ser depois ligado por uma quarta molécula, tal como estreptavidina rotulada com enzima. Outras proteínas capazes de ligar especificamente regiões constantes de imunoglobulina, tais como a proteína A ou a proteína G também podem ser usadas como o agente de rotulação. Estas proteínas de ligação são constituintes normais das paredes celulares das bactérias estreptocócicas e exibem uma reatividade não imunogênica forte com as regiões constantes da imunoglobulina de uma variedade de espécies. Akerstrom, J. Immunol., 135: 2589 a 2542 (1985); Chaubert, Mod. Pathol., 10: 585 a 591(1997).

Por todos os ensaios, as etapas de incubação e/ou lavagem podem ser requeridas depois de cada combinação de reagentes. As etapas de incubação podem variar de cerca de 5 segundos a várias horas, preferivelmente de cerca de 5 minutos a cerca de 24 horas. Entretanto, o tempo de incubação dependerá do plano geral do ensaio, análito, volume de solução, concentrações e outros. Usualmente, os ensaios serão realizados na temperatura ambiente, embora eles possam ser conduzidos em uma faixa de temperaturas.

A. Ensaios de ligação não competitiva:

Os ensaios de ligação imunológica podem ser do tipo não competitivo. Estes ensaios têm uma quantidade de análito capturado que é diretamente medida. Por exemplo, em um ensaio de "sanduíche" preferido, o agente de captura (anticorpo ou pepticorpo) pode ser diretamente ligado a um substrato sólido onde ele é imobilizado. Estes agentes de captura imobilizados capturam então (se ligam ao) antígeno presente na amostra de teste. A proteína assim imobilizada é depois ligada a um agente de rotulação, tal como um segundo anticorpo tendo um rótulo. Em um outro ensaio "sanduíche" preferido, o segundo anticorpo carece de um rótulo, mas pode ser ligado por

um anticorpo específico rotulado a anticorpos das espécies das quais o segundo anticorpo é derivado. O segundo anticorpo também pode ser modificado com uma porção detectável, tal como biotina, à qual uma terceira molécula rotulada pode especificamente ligar-se, tal como estreptavidina. Ver Harlow e Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Ch 14, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1988), aqui incorporado por referência.

B. Ensaio de Ligação Competitiva:

Os ensaios de ligação imunológica podem ser do tipo competitivo. A quantidade de análito presente na amostra é medida indiretamente medindo-se a quantidade de um análito adicionado deslocado ou competido, de um agente de captura (anticorpo ou pepticorpo) pelo análito presente na amostra. Em um ensaio de ligação competitiva preferido, uma quantidade conhecida de análito, usualmente rotulado, é adicionada à amostra e a amostra é depois contatada com o agente de captura. A quantidade de análito rotulado ligado ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração de análito presente na amostra (Ver, Harlow e Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Ch 14, pp. 579 a 583, supra).

Em um outro ensaio de ligação competitiva preferido, o agente de captura é imobilizado em um substrato sólido. A quantidade de proteína ligada ao agente de captura pode ser determinada medindo-se a quantidade de proteína presente em um complexo de proteína/anticorpo ou alternativamente medindo-se a quantidade de proteína não complexada remanescente. A quantidade de proteína pode ser detectada fornecendo-se uma proteína rotulada. Harlow e Lane (supra).

Já um outro ensaio de ligação competitiva preferido, a inibição de hapteno é utilizada. Aqui, um análito conhecido é imobilizado em um substrato sólido. Uma quantidade conhecida de anticorpo é adicionada à amostra e a amostra é contatada com o análito imobilizado. A quantidade de anticorpo ligado ao análito imobilizado é inversamente proporcional à

quantidade de análito presente na amostra. A quantidade de anticorpo imobilizado pode ser detectada detectando-se a fração imobilizada de anticorpo ou a fração que permanece em solução. A detecção pode ser direta onde o anticorpo é rotulado ou indireta pela adição subsequente de uma porção rotulada que especificamente se liga ao anticorpo como descrito acima.

C. Utilização de Ensaios de Ligação Competitiva:

Os ensaios de ligação competitiva podem ser usados para determinações de reatividade cruzada para permitir que um técnico habilitado determine se um complexo de proteína ou enzima que é reconhecido por um pepticorpo da invenção é a proteína desejada e não uma molécula de reação cruzada ou para determinar se o pepticorpo é específico para o antígeno e não se liga a antígenos não relacionados. Nos ensaios deste tipo, o antígeno pode ser imobilizado a um suporte sólido e uma mistura de proteína desconhecida é adicionada ao ensaio, que competirá com a ligação dos pepticorpos à proteína imobilizada. A molécula competidora também se ligara a um ou mais antígenos não relacionados ao antígeno. A capacidade das proteínas para competir com a ligação dos pepticorpos ao antígeno imobilizado é comparada com a ligação pela mesma proteína que foi imobilizada ao suporte sólido para determinar a reatividade cruzada da mistura de proteína.

D. Outros Ensaios de Ligação

A presente invenção também fornece métodos de Western blot para detectar ou quantificar a presença de Ang-2 em uma amostra. A técnica no geral compreende separar proteínas de amostra pela eletroforese em gel com base no peso molecular e transferir as proteínas para um suporte sólido adequado, tal como filtro de nitrocelulose, um filtro de náilon ou filtro de náilon derivatizado. A amostra é incubada com pepticorpos ou fragmentos destes que especificamente se ligam à Ang-2 e o complexo resultante é detectado. Estes pepticorpos podem ser diretamente rotulados ou

PI0213223

alternativamente podem ser subsequentemente detectados usando anticorpos rotulados que se ligam especificamente ao pepticorpo.

Ensaio de Diagnóstico

Os agentes de ligação derivados, tais como peptídeos e pepticorpos ou fragmentos destes, da presente invenção são úteis para o diagnóstico de condições ou doenças caracterizadas pela expressão de Ang-2 ou subunidades ou em ensaios para monitorar pacientes que são tratados com indutores de Ang-2, seus fragmentos, agonistas ou inibidores da atividade da Ang-2. Os ensaios de diagnóstico para Ang-2 incluem métodos que utilizam um pepticorpo e um rótulo para detectar Ang-2 em fluidos corpóreos humanos ou extratos de células ou tecidos. Os pepticorpos da presente invenção podem ser usados com ou sem modificação. Em um ensaio de diagnóstico preferido, os pepticorpos serão rotulados pela ligação, por exemplo, de um rótulo ou uma molécula repórter. Uma ampla variedade de rótulos e moléculas repórter é conhecida, alguns dos quais já foram aqui descritos. Em particular, a presente invenção é útil para o diagnóstico de doença humana.

Uma variedade de protocolos para medir as proteínas Ang-2 que usam pepticorpos específicos para proteína respectiva é conhecida na técnica. Os exemplos incluem ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA) e classificação de célula ativada pela fluorescência (FACS). Um imunoensaio de sítio duplo, com base monoclonal que utiliza anticorpos monoclonais reativos a dois epítopos não interferentes em Ang-2 é preferido, mas um ensaio de ligação competitiva pode ser utilizado. Estes ensaios são descritos, por exemplo, em Maddox *et al.*, J. Exp. Med., 158: 1211 (1983).

De modo a fornecer uma base para diagnóstico, valores normais ou padrão para a expressão de Ang-2 humana são usualmente estabelecidos. Esta determinação pode ser realizada combinando-se fluidos

corpóreos ou extratos celulares de pacientes normais, preferivelmente humanos, com um pepticorpo para Ang-2, sob condições adequadas para a formação de complexo que são bem conhecidas na técnica. A quantidade de formação de complexo padrão pode ser quantificada comparando-se a ligação dos pepticorpos com quantidades conhecidas da proteína Ang-2, tanto com amostras de controle quanto de doença. Depois, os valores padrão obtidos a partir das amostras normais podem ser comparados com os valores obtidos a partir das amostras de pacientes potencialmente afetados pela doença. O desvio entre os valores padrão e do paciente sugere um papel para a Ang-2 no estado de doença.

Para aplicações em diagnóstico, em certas formas de realização os pepticorpos ou peptídeos da presente invenção tipicamente serão rotulados com uma porção detectável. A porção detectável pode ser qualquer uma que seja capaz de produzir, direta ou indiretamente, um sinal detectável. Por exemplo, a porção detectável pode ser um radioisótopo, tal como ^{3}H, ^{14}C, ^{32}p, ^{35}S ou ^{125}I, um composto fluorescente ou quimioluminescente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina ou luciferina; ou uma enzima, tal como alcalino fosfatase, β-galactosidase ou rábano peroxidase. Bayer *et al.*, Meth. Enz., 184: 138 a 163, (1990).

Doenças

A presente invenção fornece um agente de ligação tal como um peptídeo, pepticorpo ou fragmento, variante ou derivado destes que se ligam à Ang-2 que são úteis para o tratamento de doenças e condições patológicas humanas. Agentes que modulem a atividade de ligação da Ang-2 ou outra atividade celular, podem ser usados em combinação com outros agentes terapêuticos para realçar os seus efeitos terapêuticos ou a diminuição potencial de efeitos colaterais.

Em um aspecto, a presente invenção fornece reagentes e métodos úteis para tratar doenças e condições caracterizadas pelos níveis

indesejáveis ou aberrantes de atividade da Ang-2 em uma célula. Estas doenças incluem canceres e outras condições hiperproliferativas, tais como hiperplasia, psoríase, dermatite de contato, distúrbios imunológicos e infertilidade.

A presente invenção também fornece métodos de tratar câncer em um animal, incluindo seres humanos, que compreende administrar ao animal uma quantidade eficaz de um agente de ligação específico, tal como um pepticorpo, que iniba ou diminua a atividade da Ang-2. A invenção é ainda direcionada aos métodos de inibir o desenvolvimento de célula cancerosa, que inclui processos de proliferação celular, invasibilidade e metástase em sistemas biológicos. Os métodos incluem o uso de um composto da invenção como um inibidor do desenvolvimento de célula cancerosa. Preferivelmente, os métodos são utilizados para inibir ou reduzir o desenvolvimento de célula cancerosa, invasibilidade, metástase ou incidência de tumor em animais vivos, tais como mamíferos. Os métodos da invenção também são facilmente adaptáveis para o uso em sistemas de ensaio, por exemplo, ensaiar o desenvolvimento de célula cancerosa e suas propriedades, assim como identificar compostos que afetem o desenvolvimento de célula cancerosa.

Os canceres tratáveis pelos métodos da presente invenção preferivelmente ocorrem em mamíferos. Os mamíferos incluem, por exemplo, seres humanos e outros primatas, assim como animais de estimação ou de companhia tais como cães e gatos, animais de laboratório tais como ratos, camundongos e coelhos e animais de fazenda tais como cavalos, porcos, carneiros e gado.

Os tumores ou neoplasmos incluem desenvolvimentos de células de tecido em que a multiplicação das células é descontrolada e progressiva. Alguns de tais desenvolvimentos são benignos, mas outros são denominados malignos e podem levar à morte do organismo. Os neoplasmos

ou canceres malignos são distinguidos dos desenvolvimentos benignos em que, além de exibir proliferação celular agressiva, eles podem invadir os tecidos circundantes e metastatizar. Além disso, os neoplasmos malignos são caracterizados em que eles apresentam uma perda maior de diferenciação (desdiferenciação maior) e da sua organização em relação a um outro e seus tecidos circundantes. Esta propriedade também é chamada de "anaplasia."

Os neoplasmos tratáveis pela presente invenção também incluem tumores sólidos, isto é, carcinomas e sarcomas. Os carcinomas incluem aqueles neoplasmos malignos derivados de células epiteliais que infiltram (invadem) os tecidos circundantes e dão origem a metástases. Adenocarcinomas, são carcinomas derivados de tecido glandular ou que formam estruturas glandulares reconhecíveis. Uma outra categoria ampla ou canceres incluem sarcomas, que são tumores cujas células são embutidas em uma substância fibrilar ou homogênea como tecido conectivo embriônico. A invenção também permite o tratamento de canceres dos sistemas mielóides ou linfóides, que incluem leucemias, linfomas e outros canceres que tipicamente não se apresentam como uma massa tumoral, mas são distribuídos nos sistemas vasculares ou linforreticulares.

O tipo de câncer ou células de tumor passíveis ao tratamento de acordo com a invenção incluem, por exemplo, tumor que produz ACTH, leucemia linfocítica aguda, leucemia não linfocítica aguda, câncer do córtex adrenal, câncer de bexiga, câncer de cerebral, câncer de mama, câncer de cervical, leucemia linfocítica crônica, leucemia mielocítica crônica, câncer de colorretal, linfoma de célula T cutânea, câncer endometrial, câncer esofágico, sarcoma de Ewing, câncer da vesícula biliar, leucemia de célula pilosa, câncer da cabeça e pescoço, linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer renal, câncer hepático, câncer pulmonar (célula pequena e não pequena), efusão peritoneal maligna, efusão pleural maligna, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiplo, neuroblastoma, glioma, linfoma que não de Hodgkin,

osteossarcoma, câncer ovariano, câncer ovariano (célula germinativa), câncer pancreático, câncer peniano, câncer prostático, retinoblastoma, câncer de pele, sarcoma de tecido mole, carcinomas de célula escamosa, câncer estomacal, câncer testicular, câncer da tireóide, neoplasmos trofoblásticos, câncer uterino, câncer vaginal, câncer da vulva e tumor de Wilms.

A invenção é particularmente ilustrada aqui em referência ao tratamento de certos tipos de canceres experimentalmente definidos. Nestes tratamentos ilustrativos, modelos *in vitro* e *in vivo* no estado da técnica padrão foram usados. Estes métodos podem ser usados para identificar agentes que podem ser esperados ser eficazes em regimes de tratamento *in vivo*. Entretanto, será entendido que o método da invenção não é limitado ao tratamento destes tipos de tumor, mas estende-se a qualquer tumor sólido derivado de qualquer sistema de órgão. Os canceres cuja invasibilidade ou metástase é associada com a expressão ou atividade de Ang-2 são especialmente suscetíveis a serem inibidos ou mesmo induzidos a regredir por meio da invenção.

A invenção também pode ser praticada pela inclusão com um composto da invenção tal como um pepticorpo em combinação com um outra agente quimioterapêutico anticâncer, tal como qualquer agente quimioterapêutico convencional. A combinação de um agente de ligação específico com tal outros agentes pode potenciar o protocolo quimioterapêutico. Numerosos protocolos quimioterapêuticos apresentar-se-ão por si só na mente dos profissionais habilitados como sendo capazes de incorporar no método da invenção. Qualquer agente quimioterapêutico pode ser usado, incluindo agentes de alquilação, antimetabólitos, hormônios e antagonistas, radioisótopos, assim como produtos naturais. Por exemplo, o composto da invenção pode ser administrado com antibióticos tais como doxorrubicina e outros análogos de antraciclina, mostardas de nitrogênio tais como ciclofosfamida, análogos de pirimidina tais como 5-fluorouracila,

cisplatina, hidroxiuréia, taxol e seus derivados naturais e sintéticos e outros. Como um outro exemplo, no caso de tumores mistos, tais como adenocarcinoma da mama, onde os tumores incluem células dependentes de gonadotropina e independentes de gonadotropina, o composto pode ser administrado em conjunção com leuprolida ou goserelina (análogos peptídicos sintéticos de LH-RH). Outros protocolos antineoplásticos incluem o uso de um composto de tetraciclina com uma outra modalidade de tratamento, por exemplo, cirurgia, radiação, etc., também aludidas aqui como "modalidades antineoplásticas adjuntas." Assim, o método da invenção pode ser utilizado com regimes convencionais tais com o benefício de reduzir efeitos colaterais e realçar a eficácia.

A presente invenção fornece assim composições e métodos úteis para o tratamento de uma ampla variedade de canceres, incluindo tumores sólidos e leucemias. Tipos de câncer que podem ser tratados incluem, mas não são limitados a: adenocarcinoma da mama, próstata e cólon; todas as formas de carcinoma broncogênico do pulmão; mielóide; melanoma; hepatoma; neuroblastoma; papiloma; apudoma; coristoma; branquioma; síndrome carcinóide maligna; doença cardíaca carcinóide; carcinoma (por exemplo, de Walker, de célula basal, basoescamoso, de Brown-Pearce, ductal, tumor de Ehrlich, de Krebs 2, de célula de merkel, mucinoso, pulmonar de célula não pequena, de célula em aveia, papilar, cirroso, bronquiolar, broncogênico, de célula escamosa e de célula transicional); distúrbios histiocíticos; leucemia; histiocitose maligna; doença de Hodgkin; carcinoma de célula pulmonar pequena imunoproliferativa; linfoma que não de Hodgkin; plasmacitoma; reticuloendoteliose; melanoma; condroblastoma; condroma; condrossarcoma; fibroma; fibrossarcoma; tumores de célula gigante; histiocitoma; lipoma; lipossarcoma; mesotelioma; mixoma; mixossarcoma; osteoma; osteossarcoma; cordoma; craniofaringioma; disgerminoma; hamartoma; mesenquimoma; mesonefroma; miossarcoma; ameloblastoma;

cementoma; odontorna; teratoma; timoma; tumor tofoblástico. Além disso, os seguintes tipos de canceres também podem ser tratados: adenoma; colangioma; colesteatoma; ciclindroma; cistadenocarcinoma; cistadenoma; tumor de célula granulosa; ginandroblastoma; hepatoma; hidradenoma; tumor de célula de ilhota; tumor de célula de Leydig; papiloma; tumor de célula de Sertoli; tumor de célula tecal; leiomioma; leiomiossarcoma; mioblastoma; mioma; miossarcoma; rabdomioma; rabdomiossarcoma; ependimoma; ganglioneuroma; glioma; meduloblastoma; meningioma; neurilemoma; neuroblastoma; neuroepitelioma; neurofibroma; neuroma; paraganglioma; chemodectoma; angioceratorna; biperplasia angiolinfocítica com eosinofilia; angioma esclerosante; angiomatose; glomangioma; hemangioendotelioma; hemangioma; hemangiopericitoma; hemangiossarcoma; linfangioma; linfangiomioma; linfangiossarcoma; pinealoma; carcinossarcoma; condrossarcoma; cistossarcoma filóides; fibrossarcoma; hemangiossarcoma; leiomiossarcoma; leucossarcoma; lipossarcoma; linfangiossarcoma; miossarcoma; mixossarcoma; carcinoma ovariano; rabdomiossarcoma; sarcoma; neoplasmos; nerofibromatose; e displasia cervical.

Um outro aspecto da presente invenção é usar os materiais e métodos da presente invenção para prevenir e/ou tratar qualquer condição hiperproliferativa da pele que inclui psoríase e dermatite de contato ou outras doenças hiperproliferativas. Foi demonstrado que pacientes com psoríase e dermatite de contato têm atividade elevada da Ang-2 dentro destas lesões [Ogoshi *et al.*, J. Inv. Dermatol., 110: 818 a 823 (1998)]. Preferivelmente, agentes de ligação específicos, específicos para Ang-2 serão usados em combinação com outros agentes farmacêuticos para tratar seres humanos que expressam estes sintomas clínicos. Os agentes de ligação específicos podem ser liberados usando qualquer um dos vários portadores através de vias de administração aqui descritas e outras que são bem conhecidas por aqueles de habilidade na técnica.

Outros aspectos da presente invenção incluem tratar várias retinopatias (incluindo a retinopatia diabética e a degeneração macular relacionada com a idade) em que a angiogênese está envolvida, assim como distúrbios/doenças do trato reprodutivo feminino tais como endometriose, fibróides uterinos e outras tais condições associadas com a proliferação vascular disfuncional (incluindo o desenvolvimento microvascular endometrial) durante o ciclo reprodutivo feminino.

Ainda um outro aspecto da presente invenção diz respeito a tratar o desenvolvimento vascular anormal que inclui as malformações arteriovenosas cerebrais (AVMs) dano e reparo à mucosa gastrointestinal, ulceração da mucosa gastroduodenal em pacientes com uma história de doença de úlcera péptica, que inclui a isquemia que resulta do acidente vascular cerebral, um amplo espectro de distúrbios vasculares pulmonares na doença hepática e hipertensão portal em pacientes com hipertensão portal não hepática.

Um outro aspecto da presente invenção é a prevenção de canceres utilizando as composições e métodos fornecidos pela presente invenção. Tais reagentes incluirão agentes de ligação específicos tais como pepticorpos contra Ang-2.

Composições Farmacêuticas

As composições farmacêuticas de agentes de ligação específicos de Ang-2 tais como pepticorpos estão dentro do escopo da presente invenção. As composições farmacêuticas que compreendem anticorpos estão descritas em detalhes, por exemplo, na Patente US 6.171.586, a Lam *et al.*, concedida em 9 de janeiro de 2001. Tais composições compreendem uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um agente de ligação específico, tais como um anticorpo ou um fragmento, variante, derivado ou fusão deste como aqui descrito, em mistura com um agente farmaceuticamente aceitável. Em uma forma de realização preferida,

as composições farmacêuticas compreendem agentes de ligação específicos antagonistas que modulam parcial ou completamente pelo menos uma atividade biológica de Ang-2 em mistura com um agente farmaceuticamente aceitável. Tipicamente, os agentes de ligação específicos serão suficientemente purificados para a administração a um animal.

A composição farmacêutica pode conter materiais de formulação para modificar, manter ou preservar, por exemplo, o pH, a osmolaridade, viscosidade, claridade, cor, isotonicidade, odor, esterilidade, estabilidade, taxa de dissolução ou liberação, adsorção ou penetração da composição. Os materiais de formulação adequados incluem, mas não são limitados aos aminoácidos (tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tais como ácido ascórbico, sulfito de sódio ou hidrogeno-sulfito de sódio); tampões (tais como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos, outros ácidos orgânicos); agentes de volume (tais como manitol ou glicina), agentes queladores [tais como ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA)]; agentes complexantes (tais como cafeína, polivinilpirrolidona, betaciclodextrina ou hidroxipropil-beta-ciclodextrina); enchedores; monossacarídeos; dissacarídeos e outros carboidratos (tais como glicose, manose ou dextrinas); proteínas (tais como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas); agentes corantes; flavorizantes e diluentes; agentes emulsificadores; polímeros hidrofílicos (tais como polivinilpirrolidona); polipeptídeos de peso molecular baixo; contraíons formadores de sal (tais como sódio); preservantes (tais como cloreto de benzalcônio, ácido benzóico, ácido salicílico, timerosal, álcool fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorexidina, ácido sórbico ou peróxido de hidrogênio); solventes (tais como glicerina, propileno glicol ou polietileno glicol); álcoois de açúcar (tais como manitol ou sorbitol); agentes de suspensão; tensoativos ou agentes de umectação (tais como plurônicos, PEG, ésteres de sorbitano, polissorbatos tais como polissorbato 20, polissorbato 80,

PI0213223

triton, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes realçadores de estabilidade (sacarose ou sorbitol); agentes realçadores de tonicidade (tais como haletos de metal alcalino (preferivelmente cloreto de sódio ou potássio, manitol, sorbitol); veículos de liberação; diluentes; excipientes e/ou adjuvantes farmacêutica. (Remington's Pharmaceutic Sciences, 18ª Edição, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990).

A composição farmacêutica ótima será determinada por uma pessoa habilitada na técnica dependendo, por exemplo, da via intencionada de administração, plano geral de liberação e dosagem desejada. Ver por exemplo, Remington's Pharmaceutic Sciences, supra. Tais composições podem influenciar o estado física, a estabilidade, a taxa de liberação *in vivo* e a taxa de depuração *in vivo* do agente de ligação específico.

O veículo ou portador primários em uma composição farmacêutica pode ser aquosa ou não aquosa por natureza. Por exemplo, um veículo ou portador adequados podem ser água para injeção, solução salina fisiológica ou fluido cerebrospinhal artificial, possivelmente suplementado com outros materiais comuns em composições para a administração parenteral. Solução salina tamponada neutra ou solução salina misturada com albumina sérica são outros veículos exemplares. Outras composições farmacêuticas exemplares compreendem tampão Tris em torno do pH 7,0 a 8,5 ou tampão de acetato em torno do pH 4,0 a 5,5, que podem ainda incluir sorbitol ou um substituto adequada por conseguinte. Em uma forma de realização da presente invenção, as composições de agente de ligação podem ser preparadas para a armazenagem misturando-se a composição selecionada tendo o grau desejado de pureza com agentes de formulação opcionais (Remington's Pharmaceutic Sciences, supra) na forma de uma torta liofilizada ou uma solução aquosa. Além disso, o produto de agente de ligação pode ser formulado como um liofilizado usando excipientes apropriados tais como sacarose.

PI0213223

As composições farmacêuticas podem ser selecionadas para a liberação parenteral. Alternativamente, as composições podem ser selecionadas para a inalação ou para a liberação enteral tal como oral, auralmente, oftalmicamente, retalmente ou vaginalmente. A preparação de tais composições farmaceuticamente aceitáveis está dentro da habilidade da técnica.

Os componentes de formulação estão presentes nas concentrações que são aceitáveis para o sítio de administração. Por exemplo, tampões são usados para manter a composição em um pH fisiológico ou em um pH levemente mais baixo, tipicamente dentro de uma faixa de pH de cerca de 5 a cerca de 8.

Quando a administração parenteral é considerada, as composições terapêuticas para o uso nesta invenção podem estar na forma de uma solução aquosa parenteralmente aceitável isenta de pirogênio, que compreende o agente de ligação específico desejado em um veículo farmaceuticamente aceitável. Um veículo particularmente adequado para a injeção parenteral é água destilada estéril em que um agente de ligação é formulado como uma solução estéril, isotônica, apropriadamente preservada. Já uma outra preparação pode envolver a formulação da molécula desejada com um agente, tal como microesferas injetáveis, partículas bio-erodíveis, compostos poliméricos (ácido polilático, ácido poliglicólico), pérolas ou lipossomas, que fornecem a liberação controlada ou prolongada do produto que pode ser depois liberado por intermédio de uma injeção depósito. O ácido hialurônico também pode ser usado e este pode ter o efeito de promover a duração prolongada na circulação. Outros meios adequados para a introdução da molécula desejada incluem dispositivos de liberação de medicamento implantáveis.

Em um outro aspecto, as formulações farmacêuticas adequadas para a administração parenteral podem ser formuladas em soluções aquosas,

preferivelmente em tampões fisiologicamente compatíveis tais como solução de Hanks, solução de Ringer ou solução salina fisiologicamente tamponada. As suspensões de injeção aquosa podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, tais como carboximetil celulose sódica, sorbitol ou dextrano. Adicionalmente, as suspensões dos compostos ativos podem ser preparadas como suspensões de injeção oleosas apropriadas. Os solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos graxos, tais como óleo de gergelim ou ésteres de ácido graxo sintéticos, tais como oleato de etila, triglicerídeos ou lipossomas. Polímeros de amino policatiônicos não lipídicos também podem ser usados para liberação. Opcionalmente, a suspensão também pode conter estabilizadores adequados ou agentes para aumentar a solubilidade dos compostos e permitir a preparação de soluções altamente concentradas.

Em uma outra forma de realização, uma composição farmacêutica pode ser formulada para inalação. Por exemplo, um agente de ligação pode ser formulado como um pó seco para a inalação. As soluções de inalação de molécula de polipeptídeo ou ácido nucléico também podem ser formuladas com um propelente para a liberação de aerossol. Já em uma outra forma de realização, as soluções podem ser nebulizadas. A administração pulmonar é ainda descrita no Pedido PCT Nº PCT/US94/ 001875, que descreve a liberação pulmonar de proteínas quimicamente modificadas.

Também é considerado que certas formulações podem ser oralmente administradas. Em uma forma de realização da presente invenção, moléculas de agente de ligação que são administradas desta maneira podem ser formuladas com ou sem aqueles portadores habitualmente usados na combinação de formas de dosagem sólidas tais como tabletes e cápsulas. Por exemplo, uma cápsula pode ser planejada para liberar a porção ativa da formulação no ponto no trato gastrointestinal quando a biodisponibilidade é maximizada e a degradação pre-sistêmica é minimizada. Agentes adicionais

PI0213223

podem ser incluídos para facilitar a absorção da molécula de agente de ligação. Diluentes, flavorizantes, ceras de ponto de fusão baixo, óleos vegetais, lubrificantes, agentes de suspensão, agentes desintegradores de tablete e aglutinantes também podem ser utilizados.

As composições farmacêuticas para a administração oral também podem ser formulados usando portadores farmaceuticamente aceitáveis bem conhecidos na técnica em dosagens adequadas para a administração oral. Tais portadores permitem que as composições farmacêuticas sejam formuladas como tabletes, pílulas, drágeas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, lamas, suspensões e outros, para a ingestão pelo paciente.

As preparações farmacêuticas para o uso oral podem ser obtidas através da combinação de compostos ativos com excipientes sólidos e processando-se a mistura resultante mistura de grânulos (opcionalmente, depois da moagem) para se obter núcleos de tabletes ou drágeas. Os auxiliares adequados podem ser adicionados, se desejado. Os excipientes adequados incluem enchedores de carboidrato ou proteína, tais como açúcares, que incluem lactose, sacarose, manitol e sorbitol; amido de milho, trigo, arroz, batata ou outras plantas; celulose, tal como metil celulose, hidroxipropilmetil-celulose ou carboximetilcelulose sódica; gomas, que incluem a arábica e tragacanto; e proteínas, tais como gelatina e colágeno. Se desejado, agentes desintegrantes ou solubilizadores podem ser adicionados, tais como a polivinil pirrolidona reticulada, ágar e ácido algínico ou um sal deste, tal como alginato de sódio.

Os núcleos de drágeas podem ser usados em conjunção com revestimentos adequados, tais como soluções de açúcar concentradas, que também podem conter goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietileno glicol e/ou dióxido de titânio, soluções de laca e solventes orgânicos adequados ou misturas de solvente. Corantes ou

pigmentos podem ser adicionados aos revestimentos de tabletes ou drágeas para a identificação do produto ou para caracterizar a quantidade de composto ativo, isto é, a dosagem.

As preparações farmacêuticas que podem ser usadas oralmente também incluem cápsulas de encaixe fabricadas de gelatina, assim como cápsulas moles, seladas fabricadas de gelatina e um revestimento, tal como glicerol ou sorbitol. As cápsulas de encaixe podem conter ingredientes ativos misturados com enchedores ou aglutinantes, tais como lactose ou amidos, lubrificantes, tais como talco ou estearato de magnésio, e, opcionalmente, estabilizadores. Nas cápsulas moles, os compostos ativos podem ser dissolvidos ou colocados em suspensão em líquidos adequados, tais como óleos graxos, líquido ou polietileno glicol líquido com ou sem estabilizadores.

Uma outra composição farmacêutica pode envolver uma quantidade eficaz de agente de ligação em uma mistura com excipientes não tóxicos que são adequados para a fabricação de tabletes. Dissolvendo-se os tabletes em água estéril ou outro veículo apropriado, as soluções podem ser preparadas em forma de dose unitária. Os excipientes adequados incluem, mas não são limitados a, diluentes inertes, tais como carbonato de cálcio, carbonato ou bicarbonato de sódio, lactose ou fosfato de cálcio; ou agentes de ligação, tais como amido, gelatina ou acácia; ou agentes lubrificantes tais como estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco.

As composições farmacêuticas adicionais estarão evidentes àqueles habilitados na técnica, incluindo formulações que envolvem moléculas de agente de ligação em formulações de liberação prolongada ou controlada. As técnicas para formular uma variedade de outros meios de liberação prolongada ou controlada, tais como portadores lipossômicos, micropartículas bio-erodíveis ou pérolas porosas e injeções de depósito, também são conhecidas por aqueles habilitados na técnica. Ver por exemplo, a PCT/US93/00829 que descreve a liberação controlada de micropartículas

PI0213223

poliméricas porosas para a liberação de composições farmacêuticas. Os exemplos adicionais de preparações de liberação prolongada incluem matrizes poliméricas semipermeáveis na forma de artigos formados, por exemplo películas ou microcápsulas. As matrizes de liberação prolongada podem incluir poliésteres, hidrogéis, polilactídeos (U.S. 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama etil-L-glutamato [Sidman *et al.*, Biopolimers, 22: 547 a 556 (1983)], poli (2-hidroxietil-metacrilato) [Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res., 15: 167 a 277, (1981)] e [Langer *et al.*, Chem. Tech., 12: 98 a 105 (1982)], etileno vinil acetato (Langer *et al.*, supra) ou ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988). As composições de liberação prolongada também incluem lipossomas, que podem ser preparados por qualquer um de diversos métodos conhecidos na técnica. Ver por exemplo, Eppstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82: 3688 a 3692 (1985); EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949.

A composição farmacêutica a ser usada para a administração *in vivo* tipicamente deve ser estéril. Isto pode ser realizado pela filtração através de membranas de filtração estéreis. Onde a composição é liofilizada, a esterilização usando este método pode ser conduzida antes ou a seguir da liofilização e reconstituição. A composição para a administração parenteral pode ser armazenada na forma liofilizada ou em solução. Além disso, as composições parenterais no geral são colocadas em um recipiente tendo um orifício de acesso estéril, por exemplo, um saco ou frasco de solução intravenosa tendo uma tampa perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

Uma vez que a composição farmacêutica foi formulada, ela pode ser armazenada em frascos estéreis como uma solução, suspensão, gel, emulsão, sólido ou um pó desidratado ou liofilizado. Tais formulações podem ser armazenadas em uma forma pronta para o uso ou em uma forma (por exemplo, liofilizada) que requeira reconstituição antes da administração.

Em uma forma de realização específica, a presente invenção está direcionada aos kits para produzir uma unidade de administração de dose única. Os kits podem conter cada um tanto um primeiro recipiente tendo uma proteína seca quanto um segundo recipiente tendo uma formulação aquosa. Também incluídos dentro do escopo desta invenção estão os kits contendo seringas pré enchidas de câmara única e múltipla (por exemplo, seringas de líquido e liosseringas).

Uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica a ser terapeuticamente utilizada dependerá, por exemplo, do contexto e objetivos terapêuticos. Uma pessoa habilitada na técnica avaliará que os níveis de dosagem apropriados para o tratamento variará assim dependendo, em parte, da molécula liberada, da indicação para a qual a molécula de agente de ligação está sendo usada, da via de administração e do tamanho (peso corpóreo, superfície corpórea ou tamanho do órgão) e da condição (da idade e da saúde geral) do paciente. Consequentemente, o médico pode titular a dosagem e modificar a via de administração para se obter o efeito terapêutico ótimo. Uma dosagem típica pode variar de cerca de 0,1 mg/kg até cerca de 100 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores mencionados acima. Em outras formas de realização, a dosagem pode variar de 0,1 mg/kg até cerca de 100 mg/kg; ou de 1 mg/kg até cerca de 100 mg/kg; ou de 5 mg/kg até cerca de 100 mg/kg.

Para qualquer composto, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente nos ensaios de cultura celular ou em modelos de animal tais como camundongos, ratos, coelhos, cães, porcos ou macacos. Um modelo de animal também pode ser usado para determinar a faixa de concentração apropriada e a via de administração. Tal informação pode ser depois usada para determinar as doses úteis e a vias para a administração em seres humanos.

A dosagem exata será determinada considerando-se fatores

relacionados com o paciente que requer o tratamento. A dosagem e a administração são ajustadas para fornecer níveis suficientes do composto ativo ou para manter o efeito desejado. Os fatores que podem ser levados em conta incluem a gravidade do estado de doença, a saúde geral do paciente, a idade, peso e gênero do paciente, tempo e freqüência de administração, combinação(ões) medicamentosa(s), sensibilidades de reação e resposta à terapia. As composições farmacêuticas de ação duradoura podem ser administradas a cada 3 a 4 dias, a cada semana ou bissemanalmente dependendo da meia vida e taxa de depuração da formulação particular.

A freqüência de dosagem dependerá dos parâmetros farmacocinéticos da molécula de agente de ligação na formulação usada. Tipicamente, uma composição é administrada até que uma dosagem seja atingida que alcance o efeito desejado. A composição pode ser portanto administrada como uma dose única ou como doses múltiplas (nas mesmas ou concentrações/dosagens diferentes) com o tempo ou como uma infusão contínua. Outro refinamento da dosagem apropriada é rotineiramente feito. As dosagens apropriadas podem ser averiguadas através do uso de dados de dose-resposta apropriados.

A via de administração da composição farmacêutica está de acordo com métodos conhecidos, por exemplo oralmente, através de injeção pelos meios intravenoso, intraperitoneal, intracerebral (intra-parenquimatoso), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, vias intralesionais, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutâneo, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópico, sublingual, uretral, vaginal ou retal, pelos sistemas de liberação prolongada ou pelos dispositivos de implantação. Onde desejado, as composições podem ser administradas pela injeção de bolo ou continuamente pela infusão ou pelo dispositivo de implantação.

Alternativa ou adicionalmente, a composição pode ser

PI0213223

administrada localmente por intermédio da implantação de uma membrana, esponja ou um outro material apropriado sobre o qual a molécula desejada foi absorvida ou encapsulada. Onde um dispositivo de implantação é usado, o dispositivo pode ser implantado em qualquer tecido ou órgão adequados e a liberação da molécula desejada pode ser por intermédio da difusão, bolo de liberação controlada ou administração contínua.

Em alguns casos, pode ser desejável usar composições farmacêuticas em uma maneira *ex vivo*. Em tais exemplos, as células, tecidos ou órgãos que foram removidos do paciente são expostos às composições farmacêuticas depois do que as células, tecidos e/ou órgãos são subsequentemente implantados de volta no paciente.

Em outros casos, um agente de ligação da presente invenção tal como um pepticorpo pode ser liberado implantando-se certas células que foram geneticamente engendradas, usando métodos tais como aqueles aqui descritos, para expressar e secretar o polipeptídeo. Tais células podem ser células de animal ou de ser humano e podem ser autólogas, heterólogas ou xenogênicas. Opcionalmente, as células podem ser imortalizadas. De modo a diminuir a chance de uma resposta imunológica, as células podem ser encapsuladas para evitar a infiltração de tecidos circundantes. Os materiais de encapsulação são tipicamente biocompatíveis, fechamentos ou membranas poliméricas semi-permeáveis que permitem a liberação do(s) produto(s) de proteína mas impedem a destruição das células pelo sistema imune do paciente ou por outros fatores nocivos dos tecidos circundantes.

Terapia de Combinação

Agentes de ligação específicos da invenção tais como pepticorpos podem ser utilizados em combinação com outros produtos terapêuticos no tratamento de doenças associadas com a expressão de Ang-2. Estes outros produtos terapêuticos incluem, por exemplo tratamento por radiação, quimioterapia e terapias alvejadas tais como Herceptin®, Rituxan®,

PI0213223

Gleevec® e outros. As terapias de combinação adicionais não especificamente aqui listadas também estão dentro do escopo da presente invenção.

O tratamento de quimioterapia pode utilizar agentes anti-neoplásticos incluindo, por exemplo, agentes alquiladores que incluem: mostardas de nitrogênio, tais como mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan e clorambucil; nitrosouréias, tais como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU) e semustina (metil-CCNU); etileniminas/ metilmelamina tais como trietilenomelamina (TEM), trietileno, tiofosforamida (tiotepa), hexametilmelamina (HMM, altretamina); alquil sulfonatos tais como busulfan; triazinas tais como dacarbazina (DTIC); antimetabólitos que incluem análogos do ácido fólico tais como metotrexato e trimetrexato, análogos de pirimidina tais como 5-fluorouracila, fluorodesoxiuridina, gemcitabina, citosina arabinoside (AraC, citarabina), 5-azacitidina, 2,2'-difluorodesoxicitidina, análogos de purina tais como 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, azatioprina, 2'-desoxicoformicina (pentostatina), eritroidroxinonil adenina (EHNA), fosfato de fludarabina e 2-clorodesoxiadenosina (cladribina, 2CdA); produtos naturais que incluem medicamentos antimitóticos tais como paclitaxel, alcalóides vinca incluindo vinblastina (VLB), vincristina e vinorelbina, taxotere, estramustina e fosfato de estramustina; ppipodofilotoxinas tais como etoposide e teniposide; antibióticos tais como actimomicina D, daunomicina (rubidomicina), doxorubicina, mitoxantrona, idarubicina, bleomicinas, plicamicina (mitramicina), mitomicina C e actinomicina; enzimas tais como L-asparaginase; modificadores de resposta biológica tais como interferon-alfa, EL-2, G-CSF e GM-CSF; agentes mistos que inclui complexos de coordenação de platina tais como cisplatina e carboplatina, antracenodionas tais como mitoxantrona, uréia substituída tal como hidroxiuréia, derivados de metilidrazina que incluem N-metilidrazina (MIH) e procarbazina, supressores adrenocorticais tais como mitotano (o,p-DDD) e aminoglutetimida;

PI0213223

hormônios e antagonistas que incluem antagonistas de adrenocorticosteróide tais como prednisona e equivalentes, dexametasona e aminoglutetimida; progestina tal como caproato de hidroxiprogesterona, acetato medroxiprogesterona e acetato de megestrol; estrogênio tal como dietilstilbestrol e equivalentes de etinil estradiol; antiestrogênio tal como tamoxifeno; androgênios que incluem propionato de testosterona e fluoximesterona/equivalentes; antiandrogênios tais como flutamida, análogos do hormônio que libera gonadotropina e leuprolide; e antiandrogênios não esteróides tais como flutamida.

A terapia de combinação com fatores de desenvolvimento pode incluir citocinas, linfocinas, fatores de desenvolvimento ou outros fatores hematopoiéticos tais como M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN, TNF0, TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, GM-CSF, trombopoietina, fator de célula tronco e eritropoietina. Outros são composições podem incluir angiopoietinas conhecidas, por exemplo Ang-1, -2, -4, -Y, e/ou o polipeptídeo como a Ang humana e/ou o fator de desenvolvimento endotelial vascular (VEGF). Os fatores de desenvolvimento incluem angiogenina, proteína morfogênica óssea 1, proteína morfogênica óssea 2, proteína morfogênica óssea 3, proteína morfogênica óssea 4, proteína morfogênica óssea 5, proteína morfogênica óssea 6, proteína morfogênica óssea 7, proteína morfogênica óssea 8, proteína morfogênica óssea 9, proteína morfogênica óssea 10, proteína morfogênica óssea 11, proteína morfogênica óssea 12, proteína morfogênica óssea 13, proteína morfogênica óssea 14, proteína morfogênica óssea 15, receptor da proteína morfogênica óssea IA, receptor da proteína morfogênica óssea IIB, fator neurotrófico derivado do cérebro, fator neurotrófico ciliar, receptor do fator neurotrófico ciliar, fator quimiotático neutrofílico induzido pela citocina 1, fator quimiotático neutrofílico induzido pela citocina 2, fator quimiotático neutrofílico induzido

pela citocina 2, fator de desenvolvimento de célula endotelial, endotelina 1, fator de desenvolvimento epidérmico, atraente neutrofílico derivado de epitelial, fator de desenvolvimento de fibroblasto 4, fator de desenvolvimento de fibroblasto 5, fator de desenvolvimento de fibroblasto 6, fator de desenvolvimento de fibroblasto 7, fator de desenvolvimento de fibroblasto 8, fator de desenvolvimento de fibroblasto 8b, fator de desenvolvimento de fibroblasto 8c, fator de desenvolvimento de fibroblasto 9, fator de desenvolvimento de fibroblasto 10, fator de desenvolvimento de fibroblasto ácido, fator de desenvolvimento de fibroblasto básico, receptor do fator neutrófico derivado de linhagem de célula glial 1, receptor do fator neutrófico derivado de linhagem de célula glial 2, proteína relacionada com o desenvolvimento, proteína relacionada com o desenvolvimento 1, proteína relacionada com o desenvolvimento 2, proteína relacionada com o desenvolvimento 3, fator de desenvolvimento epidérmico de ligação de heparina, fator de desenvolvimento de hepatócito, receptor do fator de desenvolvimento de hepatócito, fator de desenvolvimento semelhante à insulina I, receptor do fator de desenvolvimento semelhante à insulina, fator de desenvolvimento semelhante à insulina II, proteína de ligação do fator de desenvolvimento semelhante à insulina, fator de desenvolvimento de queratinócito, fator inibidor da leucemia, receptor do fator inibidor da leucemia 1, fator de desenvolvimento de nervo, receptor do fator de desenvolvimento de nervo, neurotrofina-3, neurotrofina-4, fator de desenvolvimento da placenta, fator de desenvolvimento da placenta 2, fator de desenvolvimento de célula endotelial derivado de plaqueta, fator de desenvolvimento derivado de plaqueta, cadeia A do fator de desenvolvimento derivado de plaqueta, fator de desenvolvimento derivado de plaqueta AA, fator de desenvolvimento derivado de plaqueta AB, cadeia B do fator de desenvolvimento derivado de plaqueta, fator de desenvolvimento derivado de plaqueta BB, receptor do fator de desenvolvimento derivado de plaqueta 1,

receptor do fator de desenvolvimento derivado de plaqueta 2, fator estimulador de desenvolvimento de célula pré B, fator de célula tronco, receptor do fator de célula tronco, fator de desenvolvimento transformante 1, fator de desenvolvimento transformante 2, fator de desenvolvimento transformante 1, fator de desenvolvimento transformante 1,2, fator de desenvolvimento transformante 2, fator de desenvolvimento transformante 3, fator de desenvolvimento transformante 5, fator de desenvolvimento transformante latente 1, proteína de ligação I do fator de desenvolvimento transformante 1, proteína de ligação II fator de desenvolvimento transformante 1, proteína de ligação III do fator de desenvolvimento transformante 1, receptor do fator de necrose de tumor tipo I, receptor do fator de necrose de tumor tipo II, receptor ativador de plasminogênio do tipo urocinase, fator de desenvolvimento endotelial vascular e proteínas quiméricas e fragmentos destes biológica ou imunologicamente ativos.

Imunoterapêuticos

Os imunoterapêuticos no geral contam com o uso de células e moléculas efetoras imunes para alvejar e destruir células cancerosas. Os efetores imunes podem ser, por exemplo, um pepticorpo da presente invenção que reconhece algum marcador na superfície de uma célula alvo. O pepticorpo sozinho pode servir como um efetor de terapia ou pode recrutar outras células para efetuar realmente a morte celular. O pepticorpo também pode ser conjugado a um medicamento ou toxina (quimioterapêutico, radionuclide, cadeia A de ricina, toxina do cólera, toxina da coqueluche, etc.) e assim pode meramente servir como um agente alvejador.

De acordo com a presente invenção, as formas mutantes de Ang-2 podem ser alvejadas pela imunoterapia de pepticorpos ou conjugados de pepticorpo da invenção. É particularmente considerado que as composições de pepticorpo da invenção podem ser usadas em um método de terapia combinada em conjunção com a terapia alvejada à Ang-2.

PI0213223

A imunoterapia passiva tem provado ser particularmente eficaz contra vários canceres. Ver, por exemplo, a WO 98/39027.

Os seguintes exemplos são intencionados apenas com propósitos de ilustração e não devem ser interpretados de nenhum modo como limitantes do escopo da invenção.

Exemplo 1

Expressão de Ang-2 em Tecido Patológico e Normal

A expressão de Ang-2 foi examinada em tecido normal e patológico usando a hibridização *in situ*. Fragmentos das seqüências de Ang-2 humana (Número de Acesso no Genbank: AF004327, nucleotídeos de 1274 a 1726) e de murino (Número de Acesso no Genbank: AF004326, nucleotídeos de 1135 a 1588) foram amplificadas pela transcriptase reversa-PCR a partir de cDNA pulmonar fetal humano ou de murino, clonados no plasmídeo pGEM-T e verificadas pelo seqüenciamento. Sondas de RNA de anti-sentido rotuladas com ^{33}P foram transcritas a partir de padrões plasmídicos linearizados usando ^{33}p-UTP e RNA polimerase. Blocos de tecidos fixos em formaldeído, embutidos em parafina foram seccionados a 5 μm e coletados em lâminas carregadas. Antes da hibridização *in situ*, os tecidos foram permeabilizados com HCl 0,2 M, seguido pela digestão com proteinase K e acetilação com trietanolamina e anidrido acético. As seções foram hibridizadas com a sonda radio-rotulada durante a noite a 55° C depois submetidas à digestão com RNase e uma lavagem de alta severidade em cerca de 0,1 X SSC a 55° C. As lâminas foram mergulhadas em emulsão Kodak NTB2, expostas a 4° C durante 2 a 3 semanas, desenvolvidas e contratingidas. As seções foram examinadas com campo escuro e iluminação padrão para permitir a avaliação simultânea da morfologia de tecido e sinal de hibridização.

Os resultados indicaram que no pós natal normal humano, a expressão de Ang-2 é restrita aos poucos tecidos contendo vasculatura angiogênica, tais como o ovário, a placenta e o útero. Nenhuma expressão de

PI0213223

Ang-2 foi detectável no coração, cérebro, rim, fígado, pulmão, pâncreas, baço, músculo, amígdala, timo, apêndice, linfônodo, vesícula biliar, próstata ou testículos de ser humano adulto normal. Em camundongo de cinco semanas de idade (mas não macaco ou ser humano adultos), os rins demonstraram a expressão proeminente de Ang-2 nos vasos retos. Para determinar se esta expressão foi uma sobra do desenvolvimento embriônico, este experimento foi repetido nos rins derivados de camundongos variando em idade até um ano de idade usando a sonda de Ang-2 de murino e as condições descritas acima. A expressão de Ang-2 foi observada diminuir durante o desenvolvimento neonatal, mas foi ainda evidente nos rins de camundongos de um ano de idade.

A expressão de Ang-2 também foi detectada virtualmente em todos os tipos de tumor testados, incluindo, tumores humanos primários tais como carcinoma de cólon (5 casos), carcinoma de mama (10 casos), carcinoma de pulmão (8 casos), glioblastoma (1 caso), tumores humanos metastáticos tais como carcinoma de mama (2 casos), carcinoma de pulmão (2 casos) e carcinoma ovariano (2 casos) que metastatizaram para o cérebro e modelos de tumor de roedor tais como C6 (glioma de rato), HT29 (carcinoma de cólon humano), Colo-205 (carcinoma de cólon humano), HCTI 16 (carcinoma de cólon humano), A431 (carcinoma epidermóide humano), A673 (rabdomiossarcoma humano), HT1080 (fibrossarcoma humano), PC-3 (carcinoma prostático humano), B16F10 (melanoma de murino), MethA (sarcoma de murino) e carcinoma pulmonar de Lewis encontrados. Adicionalmente, a expressão de Ang-2 foi detectada em neovasos desenvolvendo em um tampão de Matrigel em resposta ao VEGF e em um modelo de hipoxia de camundongo de retinopatia de prematuridade.

Exemplo 2

Ensaio Molecular para Avaliar Pepticorpos de Ang-2

Ensaios moleculares (ELISA de Afinidade, ELISA de

PI0213223

Neutralização e BIAcore) foram desenvolvidos para avaliar a ligação de pepticorpo direta à Ang-2 e membros da família relacionados e o efeito dos pepticorpos na interação de Ang-2:Tie-2. Estes ensaios *in vitro* são descritos como segue.

ELISA de Afinidade

Para a triagem inicial de pepticorpos anti-Ang-2 candidatos, Ang-2 humana purificada (R&D Systems, Inc; catálogo número 623-A; a Ang-2 é fornecida como uma mistura de 2 versões truncadas) ou polipeptídeo de Ang-2 de murino (preparado como descrito acima) foram usados. Para os ensaios de ligação confirmatórios, a Ang-2 humana foi obtida de meio condicionado de células 293T humanas transfectadas com DNA de Ang-2 humana de comprimento completo e cultivadas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) isento de soro contendo cerca de 50 microgramas por ml de albumina sérica bovina (BSA).

Usando placas de microtítulo, aproximadamente 100 microlitros por reservatório de Ang-2 foram adicionados a cada reservatório e as placas foram incubadas cerca de 2 horas, depois do que as placas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo cerca de 0,1 por cento de Tween-20 quatro vezes. Os reservatórios foram depois bloqueados usando cerca de 250 microlitros por reservatório de cerca de 5 por cento de BSA em PBS e as placas foram incubadas na temperatura ambiente durante cerca de 2 horas. Depois da incubação, a solução de bloqueio em excesso foi descartada e cerca de 100 microlitros de cada pepticorpo anti-Ang-2 candidato foram adicionados a um reservatório em uma série de diluição começando a uma concentração de cerca de 40 nanomolares e depois diluindo-se em série de 4 vezes em PBS contendo cerca de 1 por cento de BSA. As placas foram depois incubadas durante a noite na temperatura ambiente. Depois da incubação, as placas foram lavadas com PBS contendo cerca de 0,1 por cento de Tween-20. A lavagem foi repetida quatro vezes

adicionais, depois do que cerca de 100 microlitros por reservatório de IgG(Fc)-BRP anti-humano de cabra (Pierce Chemical Co., catálogo # 31416) previamente diluída 1:5000 em PBS contendo 1 por cento de BSA foi adicionado. As placas foram incubadas aproximadamente 1 hora na temperatura ambiente. as placas foram depois lavadas cinco vezes em PBS contendo cerca de 0,1 por cento de Tween-20, depois do que cerca de 100 microlitros por reservatório de substrato TMB (Sistema de Substrato Líquido de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, número de catálogo T8665) foi adicionado e as placas foram incubadas cerca de 5 a 15 minutos até desenvolvida a cor azul. A absorbância foi depois lida em um espectrofotômetro a cerca de 370 nm.

ELISA de Neutralização

Placas de microtítulo às quais polipeptídeo Ang-2 humano foi ligado foram preparadas como descrito para o ELISA de Afinidade. Os pepticorpos anti-Ang-2 candidatos foram titulados de 1000 nM a 0,22 pM em diluições de 4 vezes em uma solução de PBS contendo cerca de 1 % de BSA e cerca de 1 nM de Tie-2 (fornecida como uma molécula Tie-2-Fc onde a porção Tie-2 contém apenas a porção extracelular solúvel da molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI). Depois cerca de 100 microlitros da solução de anticorpo/Tie-2 foram adicionados a cada reservatório, as placas foram incubadas durante a noite na temperatura ambiente e depois lavadas cinco vezes em PBS contendo cerca de 0,1 por cento de Tween-20. Depois da lavagem, cerca de 100 microlitros por reservatório de anticorpo anti-Tie-2 (Pharmingen Inc., catálogo # 557039) foram adicionados a uma concentração final de cerca de 1 micrograma por ml e as placas foram incubadas cerca de 1 hora na temperatura ambiente. Em seguida, cerca de 100 microlitros por reservatório de IgG-IIRP anti-camundongo de cabra (Pierce Chemical CO., catálogo # 31432) foram adicionados a uma diluição de 1:10.000 em PBS contendo cerca de 1 por cento de BSA. As placas foram incubadas na

PI0213223

temperatura ambiente durante cerca de 1 hora, depois do que elas foram lavadas cinco vezes com PBS contendo cerca de 0,1 por cento de Tween-20. Cerca de 100 microlitros por reservatório de substrato de TMB (descrito acima) foi depois adicionado e a cor foi deixada desenvolver. A absorbância foi depois lida em um espectrofotômetro a 370 nm.

Afinidade BIAcore

Uma análise de afinidade de cada pepticorpo de Ang-2 candidato foi realizada em um BIAcore®2000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) com PBS e 0,005 por cento de tensoativo P20 (Biacore, Inc.) como tampão fluente. A Proteína Recombinante G (Repligen, Needham, MA) foi imobilizada em uma lasca de sensor CM5 grau de pesquisa (Biacore, Inc.) por intermédio de grupos de amina primária usando o Kit Amine Coupling (Biacore, Inc.) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

Os ensaios de ligação foram realizados capturando-se primeiro cerca de 100 Ru de cada pepticorpo anti-Ang-2 candidato na Proteína G imobilizada, depois do que várias concentrações (0 a 100 nM) de huAng-2 ou mAng-2 foram injetadas na superfície do anticorpo ligado a uma razão de fluxo de 50 µl/min durante 3 minutos. Os parâmetros cinéticos de ligação de pepticorpo que inclui k_a (constante da taxa de associação), k_d (constante da taxa de dissociação) e K_D (constante de equilíbrio de dissociação) foram determinados usando o programa de computador BIA evaluation 3.1 (Biacore, Inc.). As constantes de equilíbrio de dissociação mais baixas indicaram afinidade maior do pepticorpo para a Ang-2.

Exemplo 3

Identificação de Peptídeos de Ligação Ang-2

1. Preparação de Pérolas Magnéticas Revestidas com Ang-2

A. Imobilização de Ang-2 em pérolas magnéticas

Para a eluição não específica, a proteína Ang-2 biotinilada (Angiopoietina-2 Recombinante Humana Biotinilada, R&D Systems, Inc.;

PI0213223

número de catálogo BT 623) foi imobilizada em Streptavidin Dynabeads (Dynal, Lake Success, NY) a uma concentração de cerca de 4 μg da proteína Ang-2 biotinilada por 100 μl do estoque de pérola do fabricante para todas as três rodadas de seleção. Para as eluições de antígeno (Ang-2) e receptor (Tie-2), 2 μg de proteína Ang-2 biotinilada foram imobilizados em 50 μl das Streptavidin Dynabeads para a segunda rodada de seleção. A concentração de revestimento foi reduzida a cerca de 1 μg de proteína Ang-2 biotinilada por 50 μl do estoque de pérola para a terceira rodada de seleção. Drenando-se as pérolas para um lado de um tubo usando um imã e pipetando-se o líquido, as pérolas foram lavadas cinco vezes com a solução salina tamponada com fosfato (PBS) e recolocadas em suspensão em PBS. A proteína Ang-2 biotinilada foi adicionada às pérolas lavadas na concentração acima e incubadas com rotação durante 1 hora na temperatura ambiente, seguido por umas poucas horas até uma incubação durante a noite a 4°C com rotação. As pérolas revestidas com Ang-2 foram depois bloqueadas adicionando-se BSA a cerca de 1 % da concentração final e incubando durante a noite a 4°C com rotação. As pérolas revestidas com Ang-2 resultantes foram depois lavadas cinco vezes com PBS antes de serem submetidas aos procedimentos de seleção.

B. Preparação de pérola por seleção negativa

Pérolas adicionais também foram preparadas para seleções negativas. Para cada condição de *panning*, 500 μl do estoque de pérola do fabricante foram submetidos ao procedimento acima (seção 1A) exceto que a etapa de incubação com Ang-2 biotinilada foi omitida. Na última etapa de lavagem, as pérolas foram divididas em cinco alíquotas de 100 μl.

2. Seleção de Fago de Ligação de Ang-2

A. Estratégia global

Três coleções de fago filamentoso, designadas como "TN8-IX" (5 x 10^9 transformantes independentes), "TN12-I" (1,4x 10^9

PI0213223

transformantes independentes) e "Linear" (2,3 x 10^9 transformantes independentes) (todos da Dyax Corp.), foram usadas para selecionar o Fago de Ligação de Ang-2. Cada coleção foi depois submetida à eluição não específica, eluição de Ang-2 e eluição de receptor (Tie-2). Nove condições de *panning* diferentes foram realizadas para Ang-2 (TN8-IX usando o método de eluição não específica, TN8-IX usando o método de eluição de Ang-2, TN8-IX usando o método de eluição de Tie-2, TN12-I usando o método da eluição não específica, TN12-I usando o método da eluição de Ang-2 e TN124 usando o método da eluição de Tie-2, Linear usando o método da eluição não específica, Linear usando o método da eluição de Ang-2 e Linear usando o método da eluição de Tie-2). Para todas as três coleções, o fago da primeira rodada de seleção foi eluído apenas em uma maneira não específica para outras rodadas de seleção. As eluições de Ang-2 e Tie-2 foram usadas nas segunda e terceira rodadas de seleção. Para a coleção linear, a seleção foi realizada apenas na segunda rodada para as eluições de Ang-2 e Tie-2.

B. Seleção Negativa

Para cada condição de *panning*, cerca de 100 equivalentes de coleção aleatória para TN8-IX e TN12-I (cerca de 5 x 10^{11} pfu para TN8-IX e cerca de 1,4 x 10^{11} pfu para TN12-I) e cerca de 10 equivalentes de coleção aleatória para a coleção linear (cerca de 1 x 10^{11} pfu) foram aliquotados do estoque da coleção e diluídos a cerca de 400 µl com PBST (PBS com 0,05 % de Tween-20). Depois da última lavagem, o líquido foi drenado da primeira alíquota de 100 µl das pérolas preparadas para a seleção negativa (seção 1B), o estoque de coleção diluído a aproximadamente 400 µl foi adicionado às pérolas. A mistura resultante foi incubada durante cerca de 10 minutos na temperatura ambiente com rotação. O sobrenadante de fago foi drenado usando o imã e adicionado à segunda alíquota de 100 µl para uma outra etapa de seleção negativa. Deste modo, cinco etapas de seleção negativa foram realizadas.

PI0213223

C. Seleção usando as pérolas revestidas com a proteína Ang-2

O sobrenadante de fago depois da última etapa de seleção negativa (seção 1B) foi adicionado às pérolas revestidas com Ang-2 (seção IA). Esta mistura foi incubada com rotação durante uma a duas horas na temperatura ambiente, deixando o fago ligar-se à proteína alvo. Depois que o sobrenadante foi descartado, as pérolas foram lavadas cerca de dez vezes com PBST seguido por duas lavagens com PBS.

D. Eluição não específica

Depois que o líquido de lavagem final foi drenado (seção 2C), cerca de 1 ml da solução de sais Min A (60 mM K_2HPO_4, 33 mM KH_2PO_4, 7,6 mM $(NH_4)SO_4$ e 1,7 mM de citrato de sódio) foi adicionado às pérolas. Esta mistura de pérola foi adicionada diretamente a uma amostra de bactéria concentrada para infecção (ver abaixo as seções 3A e 3B).

E. Eluição de antígeno (Ang-2) de fago ligado

Para a rodada 2, depois da última etapa de lavagem (seção 2C), o fago ligado foi eluído das pérolas magnéticas adicionando-se 100 µl de 1 pM, 0,1 nM e 10 nM de proteína Ang-2 recombinante (Angiopoietina-2 Humana Recombinante, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota) sucessivamente com uma incubação de 30 minutos para cada condição. O fago remanescente foi eluído não especificamente (seção 2D). O fago eluído de 10 nM e as eluições não específicas foram combinados e eles foram submetidos a terceira rodada de seleção (ver Seção 4, abaixo).

Para a rodada 3, depois da última etapa de lavagem (seção 2C), o fago ligado foi eluído das pérolas magnéticas adicionando-se cerca de 1 nM da proteína Ang-2 recombinante e 10 nM da proteína Ang-2 recombinante sucessivamente com uma incubação de 30 minutos para cada condição. Além disso, o fago foi eluído com 1 ml de solução 100 mM de trietilamina (Sigma, St. Louis, Missouri) durante cerca de 10 minutos em um girador. O pH da solução de trietilamina contendo o fago foi neutralizado com 0,5 ml de

PI0213223

Tris-HCl 1 M (pH 7,5). Depois da última eluição com solução de trietilamina 100 mM, o fago remanescente foi eluído adicionando-se pérolas às bactérias (seção 2D).

F. Eluição do Receptor (Tie-2) de fago ligado

Para a rodada 2, depois da última etapa de lavagem (seção 2C), o fago ligado foi eluído das pérolas magnéticas adicionando-se cerca de 100 µl de 1 pM, 0,1 nM e 10 nM de proteína Tie-2 recombinante (Quimera Tie-2-Fc Humana Recombinante, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota) sucessivamente com uma incubação de 30 minutos para cada condição. O fago remanescente foi eluído não especificamente (seção 2D). O fago eluído de 10 nM e as eluições não específicas foram combinados e eles foram submetidos à terceira rodada de seleção (ver a seção 4 abaixo).

Para a rodada 3, depois da última etapa de lavagem (seção 2C), o fago ligado foi eluído das pérolas magnéticas adicionando-se cerca de 1 nM de proteína Ang-2 recombinante e 10 nM de proteína Tie-2 recombinante sucessivamente com uma incubação de 30 minutos para cada condição. Além disso, o fago foi eluído com 1 ml de solução 100 mM de trietilamina (Sigma, St. Louis, Missouri) durante 10 minutos em um girador. O pH do fago contendo a solução de trietilamina foi neutralizado com 0,5 ml de 1 M Tris-HCl (pH 7,5). Depois da última eluição com 100 mM de solução de trietilamina, o fago remanescente foi eluído adicionando-se pérolas à bactéria (seção 2D).

3. Amplificação

A. Preparação de células plaqueadas

Cultura de *E. coli* fresca (XL-1 Blue MRF) foi cultivada a uma OD_{600} de cerca de 0,5 em meio LB contendo cerca de 12,5 µg/ml de tetraciclina. Para cada condição de *panning*, cerca de 20 ml desta cultura foi congelada em gelo e centrifugada. A pelota de bactérias foi recolocada em suspensão em cerca de 1 ml da solução de Sais Min A.

B. Transdução

Cada mistura de cada método de eluição diferente apresentada acima (seções 2D, 2E e 2F) foi adicionada a uma amostra de bactérias concentrada (seção 3A) e incubadas a cerca de 37° C durante cerca de 15 minutos. Aproximadamente 2 ml de meio NZCYM (2 xNZCYM, 50 µg/ml de Ampicilina) foram adicionados a cada mistura e incubados a cerca de 37° C durante 15 minutos. A solução de 4 ml resultante foi plaqueada em uma placa de NZCYM ágar grande contendo cerca de 50 µg/ml de Ampicilina e incubadas durante a noite a 37° C.

C. Colheita de Fago

Cada mistura de bactérias/fago foi cultivada durante a noite em uma placa de NZCYM ágar grande (seção 3B), depois do que elas foram raspadas em cerca de 35 ml de meio LB. A placa de ágar foi ainda enxaguada com 35 ml adicionais de meio LB. A mistura de bactérias/fago resultante em meio LB foi centrifugada para pelotizar as bactérias. Aproximadamente 50 ml do sobrenadante de fago foi depois transferida para um tubo frasco e cerca de 12,5 ml de solução de PEG (20 % PEG8000, 3,5 M de acetato de amônio) foi adicionado e incubado em gelo durante 2 horas para precipitar o fago. O fago precipitado foi centrifugado e recolocado em suspensão em 6 ml de tampão de ressuspensão de fago (250 mM de NaCl, 100 mM de Tris pH 8, 1 mM de EDTA). Esta solução de fago foi ainda purificada centrifugando-se as bactérias remanescentes e precipitando o fago pela segunda vez adicionando-se cerca de 1,5 ml da solução de PEG. Depois de uma etapa de centrifugação, a pelota de fago foi recolocada em suspensão em cerca de 400 µl de PBS. Esta solução foi submetida a uma centrifugação final para livrar a solução de qualquer fragmento de bactérias remanescentes. A preparação de fago resultante foi titulada usando ensaios de formação de placa padrão.

4. Seleção e Amplificação Adicionais

Na segunda rodada, a preparação de fago amplificado (cerca

PI0213223

de 10^{10} pfu) da primeira rodada (seção 3C) foi usada como o fago de entrada para realizar as etapas de seleção e amplificação (seções 2 e 3). Para as eluições Ang-2 e Tie-2, o fago de 10 nM e eluições não específicas foram combinados e amplificados para a terceira rodada de seleção. A preparação de fago amplificado (cerca de 10^9 pfu) da 2ª rodada por sua vez foi usada como o fago de entrada para realizar a 3ª rodada de seleção e amplificação (seções 2 e 3). Depois das etapas de eluição (seções 2D, 2E e 2F) da 3ª rodada, uma fração pequena do fago eluído foi colocado em placa como no ensaio de formação de placa (seção 3C). As placas individuais foram coletadas e colocadas em placas de microtítulo de 96 reservatórios contendo 100 µl de tampão TE em cada reservatório. Estas placas mestras foram incubadas a 4° C durante a noite para permitir o fago de eluir no tampão TE.

5. Análise Clonal

Os clones de fago foram analisados pelo ELISA de fago e seqüenciamento de DNA.

As seqüências foram classificadas com base nos resultados combinados destes dois ensaios.

A. ELISA de Fago

Uma cultura de XL-1 Blue MRF foi cultivada até que a OD_{600} atingiu cerca de 0,5. Cerca de trinta µl desta cultura foi aliquotada em cada reservatório de uma placa de microtítulo de 96 reservatórios. Cerca de 10 µl de fago eluído (seção 4) foram adicionados a cada reservatório e deixado infectar as bactérias durante cerca de 15 minutos na temperatura ambiente. Cerca de 100 µl de meio LB contendo aproximadamente 12,5 µg/ml de tetraciclina e aproximadamente 50 µg/ml de ampicilina foram adicionados a cada reservatório. A placa de microtítulo foi depois incubada com agitação durante a noite a cerca de 37° C. A proteína Ang-2 recombinante (cerca de 1 µg/ml em PBS) foi deixada ligar-se às placas Maxisorp de 96 reservatórios (NUNC) durante a noite a cerca de 4° C. Como um controle, a estreptavidina

PI0213223

pura foi revestida em uma placa Maxisorp separada a cerca de 2 μg/ml em PBS.

No dia seguinte, o líquido nas placas Maxisorp revestidas com proteína foi descartado e cada reservatório foi bloqueado com cerca de 300 μl de solução a 5 % de leite a cerca de 4° C durante a noite (alternativamente, 1 hora na temperatura ambiente). A solução de leite foi depois descartada e os reservatórios foram lavados três vezes com a solução de PBST. Depois da última etapa de lavagem, cerca de 50 μl de PBST-4 % de leite foram adicionados a cada reservatório das placas Maxisorp revestidas com proteína. Cerca de 50 μl de culturas durante a noite de cada reservatório na placa de microtítulo de 96 reservatórios foi transferida para os reservatórios correspondentes das placas revestidas com Ang-2 assim como as placas revestidas com estreptavidina de controle. A mistura de 100 μl em cada tipo de placa foi incubada durante cerca de 1 hora na temperatura ambiente. O líquido foi descartado das placas Maxisorp e os reservatórios foram lavados cerca de três vezes com PBST. O anticorpo anti-M13 conjugado a HRP (Amersham Pharmacia Biotech) foi diluído a cerca de 1:7.500 e cerca de 100 μl da solução diluída foram adicionados a cada reservatório das placas Maxisorp durante uma incubação de aproximadamente 1 hora na temperatura ambiente. O líquido foi mais uma vez descartado e os reservatórios foram lavados cerca de cinco vezes com PBST. Cerca de 100 μl de substrato TMB (Sigma) foi depois adicionado a cada reservatório e a reação foi interrompida com cerca de 50 μl da solução 5 N de H_2SO_4. A OD_{450} foi lida em um espectrofotômetro (Molecular Devices).

B. Seqüenciamento dos clones de fago

Para cada clone de fago, o padrão de seqüenciamento foi preparado usando a PCR. O seguinte par de oligonucleotídeos foi usado para amplificar um fragmento de aproximadamente 500 nucleotídeos:

Iniciador 1: 5'-CGGCGCAACTATCGGTATCAAGCTG-3' (SEQ ID NO:

PI0213223

54)

Iniciador 2: 5'-CATGTACCGTAACACTGAGTTTCGTC-3' (SEQ ID NO: 55)

A seguinte mistura foi preparada para cada clone:

Reagentes	**Volume (µl) / Tubo**
dH_2O	26,25
Glicerol a 50 %	10
10x Tampão de PCR (w/o $MgCl_2$)	5
25 mM $MgCl_2$	4
10 mM de mistura de dNTP	1
100 µM iniciador 1	0,25
100 µM iniciador 2	0,25
Taq polimerase	0,25
Fago em TE (seção 4)	3
Volume de reação final	50

Para a PCR, um termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) foi usado para rodar os seguintes programas: 94° C durante 5 minutos; (94° C durante 30 s, 55° C durante 30 s, 72° C durante 45 s) x 30 ciclos; 72° C durante 7 minutos; esfriar a 4° C. O produto de PCR de cada reação foi purificado usando o kit de purificação de PCR de Reservatório Múltiplo QIAquick da Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. O produto de PCR purificado foi depois ensaiado rodando-se a cerca de 10 µl de cada mistura de reação de PCR com cerca de 1 µl de corante (10 x BBXS corante de carga em gel de agarose) em um gel de agarose a 1 %. O produto remanescente foi depois seqüenciado usando o Seqüenciador ABI 377 (Perkin Elmer) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

6. Classificação de seqüência e determinação da seqüência de consenso

A. Classificação e análise de seqüência

As seqüências de peptídeo que foram traduzidas a partir de seqüências de nucleotídeo variáveis (seção 5B) foram correlacionadas com os dados de ELISA. Os clones que apresentaram uma OD_{450} alta nos reservatórios revestidos com Ang-2 e uma OD_{450} baixa nos reservatórios revestidos com estreptavidina foram dados uma classificação prioritária mais

PI0213223

alta. Às seqüências que ocorreram múltiplas vezes também foi dada uma classificação prioritária alta. As seqüências candidatas foram escolhidas com base nestes critérios para outra análise como peptídeos ou pepticorpos.

B. Determinação da seqüência de consenso

Três classes diferentes de motivos de consenso foram gerados a partir da coleção TN8-IX como segue:

KRPCEEXWGGCXYX (SEQ ID NO: 56)

KRPCEEXFGGCXYX (SEQ ID NO: 57)

XXXCXDXYWYCXXX (SEQ ID NO: 61)

XXXCXDXYTYCXXX (SEQ ID NO: 62)

XXXCXDXFWYCXXX (SEQ ID NO: 63)

XXXCXDXFTYCXXX (SEQ ID NO: 64)

XXXCXWDPWTCEXM (SEQ ID NO: 58)

Um motivo de consenso foi gerado a partir da coleção TN12-I:

WSXCAWFXGXXXXXCRRX (SEQ ID NO: 59)

Para todas as seqüências de motivo consenso, as "seqüências de aminoácido de núcleo" sublinhadas de cada seqüência de consenso foram obtidas determinando-se o aminoácido que ocorre mais freqüentemente em cada posição. "X" refere-se a qualquer aminoácido que ocorre naturalmente. As duas cisteínas adjacentes às seqüências de núcleo foram aminoácidos fixos nas coleções TN8-IX e TN12-I.

Os peptídeos identificados como ligação a Ang-2 são apresentados na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3 - Peptídeos de Ligação de Ang-2

Peptídeo	SEQ ID NO:	Seqüência
TN8-8	1	KRPCEEMWGGCNYD
TN8-14	2	HQICKVVDPWTCKHW
TN8-Con1	3	KRPCEEEFGGCTYQ
TN8-Con4	4	QEECEVVDPWTCEHM
TN12-9	5	FDYCEGVEDPFIFGCDNH
L1	6	KFNPLDELEETLYEQFTFQQ
C17	7	QYGCDGFLYGCMIN

PI0213223

Exemplo 4

Construção de Pepticorpos Que Codificam o DNA

Os peptídeos modificados selecionados como potencialmente inibidores para a ligação Ang-2:Tie-2 (ver Tabela 3) foram usados para construir proteínas de fusão em que um monômero de cada peptídeo ou um dímero em tandem de cada peptídeo (com um ligador entre as unidades de monômero) foram fundidos na matriz ao DNA que codifica um ligador seguido pela região Fc da IgG1 humana. Cada peptídeo modificado foi construído pelo recozimento de pares de oligonucleotídeos ("oligos") para gerar um polinucleotídeo duplex que codifica o peptídeo junto com um ligador compreendido, dependendo do peptídeo, de cinco resíduos de glicina, oito resíduos de glicina ou um resíduo de lisina; estas construções foram geradas como fragmentos *Nde*I a *Xho*I. Estas moléculas de polinucleotídeo duplex foram ligadas no vetor (pAMG21-Fc terminal N, descrito mais abaixo) contendo o gene Fc humano, que foi previamente digerido com *Nde*I e *Xho*I. As misturas de ligação resultantes foram transformadas pela eletroporação nas células 2596 da cepa da *E. coli* (GM221, descrito mais abaixo) usando procedimentos padrão. Os clones foram triados quanto a capacidade para produzir o produto de proteína recombinante e para possuir a fusão de gene tendo uma seqüência de nucleotídeo correta. Um tal clone único foi selecionado para cada um dos peptídeos modificados (isto é, produtos de fusão de peptídeo Fc).

Construção do Vetor de Terminal N pAMG21-Fc

pAMG21

O plasmídeo de expressão pAMG21 (ATCC Nº 98113) é derivado do vetor de expressão pCFM1656 (ATCC Nº 69576) e do sistema de vetor de expressão descrito na Patente dos Estados Unidos Nº 4.710.473, seguindo-se o procedimento descrito no Pedido de Patente Internacional publicado WO 00/24782 (ver a porção o Exemplo 2 neste que se estende da

PI0213223

página 100 a 103, assim como as Figuras 17A e 17B).

Vetor de terminal N Fc

O vetor de terminal N Fc foi criado usando a cepa da *E. coli* 3788, o monômero pAMG21 Tpo_Gly5_Fc, como um padrão. A informação sobre a clonagem desta cepa pode ser encontrada na WO 00/24782 (Ver o Exemplo 2 e a Figura 10 neste). Um iniciador 5'PCR (descrito mais abaixo) foi planejado para remover a seqüência de peptídeo Tpo no pAMG Tpo Gly5 e substituí-la com um poliligador contendo os sítios ApaLI e XhoI. Usando a cepa 3788 como um padrão, a PCR foi realizada com Expand Long Polimerase, usando o oligonucleotídeo da SEQ ID NO: 8, abaixo, como o iniciador 5' e um iniciador 3' universal, a SEQ ID NO: 9, abaixo. O produto de PCR resultante foi purificado em gel e digerido com enzimas de restrição NdeI e BsrGI. Tanto o plasmídeo quanto o polinucleotídeo que codificam o peptídeo de interesse junto com o seu ligador foram purificados em gel usando colunas giratórias de purificação em gel Qiagen (Chatsworth, CA). O plasmídeo e o inserto foram depois ligados usando procedimentos de ligação padrão e a mistura de ligação resultante foi transformada em células *E. coli* (cepa 2596). Os clones únicos foram selecionados e o seqüenciamento de DNA foi realizado. Um clone correto foi identificado e este foi usado como uma fonte de vetor para os peptídeos modificados aqui descritos.

Iniciador 5':

ACAAACAAACATATGGGTGCACAGAAAGCGGCCGCAAAAAAA
CTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACA (SEQ ID NO: 8)

Iniciador 3':

GGTCATTACTGGACCGGATC (SEQ ID NO: 9)

Além de fabricar estes peptídeos modificados como fusões de terminal N ao Fc (pepticorpos de terminal N), alguns deles também foram fabricados como produtos de fusão de terminal C (pepticorpos de terminal C). O vetor usado para fabricar as fusões de terminal C é descrito abaixo.

PI0213223

Construção de vetor Fc de terminal C

O vetor Fc de terminal C para os peptídeos modificados foi criado usando a cepa 3728 da *E. coli*, o monômero pAMG21 Fc-Gly5- Tpo, como um padrão. A informação sobre a clonagem desta cepa pode ser encontrada na WO 00/24782 (Ver o Exemplo 2 e a Figura 7 neste). Um iniciador de 3' PCR (SEQ ID NO: 10) foi planejado para remover a seqüência de peptídeo Tpo e para substituí-la com um poliligador contendo os sítios ApaLI e XhoI. Usando a cepa 3728 como um padrão, a PCR foi realizada com a Expand Long Polimerase usando um iniciador 5' universal (SEQ ID NO: 11) e o iniciador 3' anteriormente mencionado. O produto de PCR resultante foi purificado em gel e digerido com enzimas de restrição BsrGI e BamHI. Tanto o plasmídeo quanto o polinucleotídeo que codificam cada peptídeo de interesse com o seu ligador foram purificados em gel via colunas giratórias de purificação em gel da Qiagen. O plasmídeo e o inserto foram depois ligados usando procedimentos de ligação padrão e a mistura de ligação resultante foi transformada nas células da *E. coli* (cepa 2596). Os clones únicos foram selecionados e o seqüenciamento de DNA foi realizado. Um clone correto foi identificado e usado como uma fonte de vetor para os peptídeos modificados aqui descritos.

Iniciador 5':

CGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGG (SEQ ID NO: 10)

Iniciador 3':

TTTGTTGGATCCATTACTCGAGTTTTTTTGCGGCCGCTTTCTGTG CACCACCACCTCCACCTTTAC (SEQ ID NO: 11)

GM221 (#2596). Cepa hospedeira #2596, usada para expressar as proteínas de fusão Fc-peptídeo, é uma cepa K-12 da *E. coli* modificada para conter o promotor lux e tanto o repressor lambda sensível à temperatura cI857s7 na região ebg precoce quanto o repressor $lacI^Q$ na região ebg tardia. A presença destes dois genes repressores permite o uso deste hospedeiro com

PI0213223

uma variedade de sistemas de expressão. A designação ATCC para esta cepa é 202174.

Exemplo 5

Produção de Pepticorpos

Expressão na *E. coli*. As culturas de cada uma das construções de fusão pAMG21-Fc na *E. coli* GM221 foram cultivadas a 37° C em meio de Caldo Terrífico (Ver Tartof e Hobbs, "Improved media for growing plasmid and cosmid clones", Bethesda Research Labs Focus, Volume 9, página 12, 1987, citado na referência anteriormente mencionada Sambrook *et al.*). A indução da expressão de produto de gene a partir do promotor luxPR foi obtida a seguir da adição do autoindutor sintético, N-(3-oxoexanoil)-DL-homosserina lactona, ao meio de cultura a uma concentração final de 20 nanogramas por mililitro (ng/ml). As culturas foram incubadas a 37° C por um adicional de seis horas. As culturas bacterianas foram depois examinadas pela microscopia quanto a presença de corpos de inclusão e coletados pela centrifugação. Corpos de inclusão refráteis foram observados em culturas induzidas, indicando que as fusões Fc foram mais provavelmente produzidas na fração insolúvel na *E. coli*. As pelotas de célula foram lisadas diretamente pela recolocação em suspensão em tampão de amostra de Laemmli contendo 10 % de β-mercaptoetanol e depois analisadas pela SDS-PAGE. Na maioria dos casos, uma faixa tingida com coomassie intensa do peso molecular apropriado foi observada em um gel de SDS-PAGE.

Purificação. As células foram quebradas em água (1/10) usando homogeneização de alta pressão (duas passadas a 14.000 PSI (96,6 MPa)) e os corpos de inclusão foram colhidos pela centrifugação (4000 RPM em uma centrífuga J-6B, por uma hora). Os corpos de inclusão foram solubilizados em guanidina 6 M, 50 mM de Tris, 10 mM de DTT, pH 8,5, durante uma hora a uma razão de 1/10. Para peptídeos lineares fundidos a Fc, a mistura solubilizada foi diluída vinte e cinco vezes em uréia a 2 M, 50 mM

de Tris, 160 mM de arginina, 2 mM de cisteína, pH 8,5. A oxidação foi deixada processar durante dois dias a 4° C, seguindo a formação do composto ligado a dissulfeto (isto é, homodímero Fc-peptídeo). Para os peptídeos cíclicos fundidos a Fc, este mesmo protocolo foi seguido com a adição das seguintes três condições de dobra: (1) uréia 2 M, 50 mM de Tris, 160 mM de arginina, 4 mM de cisteína, 1 mM de cistamina, pH 8,5; (2) uréia 4 M, 20 % de glicerol, 50 mM de Tris, 160 mM de arginina, 2 mM de cisteína, pH 8,5; e (3) uréia 4 M, 20 % de glicerol, 50 mM de Tris, 160 mM de arginina, 4 mM de cisteína, 1 mM de cistamina, pH 8,5. A proteína redobrada foi dializada contra uréia 1,5 M, 50 mM de NaCl, 50 mM de Tris, pH 9,0. O pH desta mistura foi diminuído para pH 5 com ácido acético. O precipitado foi removido pela centrifugação e o sobrenadante foi ajustado a um pH de 5 a 6,5, dependendo do ponto isoelétrico de cada produto de fusão. A proteína foi filtrada e carregada em VC sobre uma coluna HP de SP-Sepharose equilibrada em 20 mM de NaAc, 50 mM de NaCl no pH determinado para cada construção. A proteína foi eluída usando um gradiente linear de 20 volumes da coluna no mesmo tampão variando de 50 mM de NaCl a 500 mM de NaCl. O pico foi reunido e filtrado.

Os pepticorpos gerados usando os procedimentos acima são apresentados na Tabela 4 abaixo.

PI0213223

Tabela 4

Pepticorpo	Seqüência de Pepticorpo
L1 (N)	MGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:12)
L1 (N) WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:13)
L1 (N) 1K WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQGSGSATGGSGSTASSGS GSATHLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:14)
2xL1 (N)	MGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGGGKFNPL DELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:15)
2xL1 (N) WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGGKFNPLDELEE TLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:16)
Con4 (N)	MGAQQEECEWDPWTCEHMLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:17)
Con4 (N) 1K-WT	MQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATH LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:18)
2xCon4 (N) 1K	MGAQQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGS ATHQEECEWDPWTCEHMLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:19)
L1 (C)	M-Fc-GGGGGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQLE (SEQ ID NO:20)

L1 (C) 1K	M-Fc-GGGGGAQGSGSATGGSGSTASSGSGSATHKFNPLDELEETLYEQFTFQQLE (SEQ ID NO:21)
2xL1 (C)	M-Fc-GGGGGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGGKFNPLDELEETLYEQFTFQQLE (SEQ ID NO:22)
Con4 (C)	M-Fc-GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:23)
Con4 (C) 1K	M-Fc-GGGGGAQGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:24)
2xCon4 (C) 1K	M-Fc-GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:25)
Con4-L1 (N)	MGAQEECEWDPWTCEHMGGGGGGGGKFNPLDELEETLYEQFTFQQGSGSATGGSGSTASSGSGSATHLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:26)
Con4-L1 (C)	M-Fc-GGGGGAQGSGSATGGSGSTASSGSGSATHKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:27)
TN-12-9 (N)	MGAQ-FDYCEGVEDPFTFGCDNHLE-GGGGG-Fc (SEQ ID NO:28)
C17 (N)	MGAQ-QYGCDGFLYGCMINLE-GGGGG-Fc (SEQ ID NO:29)
TN8-8 (N)	MGAQ-KRPCEEMWGGCNYDLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:30)
TN8-14 (N)	MGAQ-HQICKWDPWTCKHWLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:31)
Con1 (N)	MGAQ-KRPCEEIFGGCTYQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:32)

Na Tabela 4, "Fc" refere-se à seqüência Fc IgG1 humana. A coluna dois apresenta a seqüência de aminoácido do pepticorpo. A sua porção Fc é rotulada "Fc" e é como apresentada na SEQ ID NO: 60 abaixo. Será avaliado que onde um rótulo é usado, por exemplo, "Con4" ou "Con-4", este refere-se ao peptídeo Con-4, ao passo que o uso do sufixo "C", "(C)" ou "-C"; ou "N", "(N)" ou "-N" nelas indica que a molécula é um pepticorpo como

PI0213223

aqui descrito. Os sufixos "N", "(N)" ou "-N" em um nome de pepticorpo indica que o peptídeo de ligação de Ang-2 (ou peptídeos) é/são de terminal N em relação ao domínio Fc e os sufixos "C", "(C)" ou "-C" indicam que o peptídeo de ligação de Ang-2 (ou peptídeos) é/são de terminal C em relação ao domínio Fc. Além disso, 2xCon4 (C) 1K, como definido na SEQ ID NO: 25, também pode ser aludido sem o sufixo "1K" anexo.

A seqüência de aminoácido da porção Fc de cada pepticorpo é como segue (do término amino ao término carbóxi):

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SBEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEYv'ESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVNH-IEALHNHYTQKSLS
LSPGK (SEQ ID NO: 60)

A seqüência de DNA (SEQ ID NOs: 33 a 53) que codificam os pepticorpos correspondentes aos pepticorpos SEQ ID NOs: 12 a 32, respectivamente, na Tabela 4) é apresentada abaixo:

PI02132

SEQ ID NO: 33

ATGGGTGCACAGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAAACTCT
GTACGAACAGTTCACTTTCCAGCAGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGG
ACAAAACTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG
GACCGTCAGTTTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC
CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATC
GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT
GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAG
CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC
CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGT
GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC
TCCGGGTAAATAATGGATCC

SEQ ID NO:34

ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAAACTCTGTACGAACA
GTTCACTTTCCAGCAGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACTCA
CACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGACCGTCAGT
TTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC
CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC
CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
ATAA

SEQ ID NO:35

ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAAACTCTGTACGAACA
GTTCACTTTCCAGCAGGGATCCGGTTCTGCTACTGGTGGTTCCGGCTCC
ACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGCGACTCATCTCGAGGGTGGAGGC
GGTGGGGACAAAACTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTC
CTGGGGGGACCGTCAGTTTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACC
CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG
AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC
TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA
GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAA
CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT
CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA
CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

SEQ ID NO:36

ATGGGTGCACAGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAAACTCT
GTACGAACAGTTCACTTTCCAGCAGGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGTGG
TAAGTTCAACCCACTGGATGAGCTGGAAGAGACTCTGTATGAACAGTT
CACTTTCCAGCAACTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACTCACA
CATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTT
TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG
GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA
GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCC
TGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
TAA

PI0213223

SEQ ID NO:37

ATGAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAAACTCTGTACGAACA
GTTCACTTTCCAGCAGGGTGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAGTTCAACCC
ACTGGATGAGCTGGAAGAGACTCTGTATGAACAGTTCACTTTCCAGCA
ACTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACTCACACATGTCCACCTT
GCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGACCGTCAGTTTTCCTCTTCCCCCC
AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG
CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG
GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG
AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC
TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG
ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC
TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

SEQ ID NO:38

ATGGGTGCACAGCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGA
ACACATGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACTCACACATGTC
CACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCCTCTT
CCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT
CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT

PI0213223

SEQ ID NO:39

ATGCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGGG
ATCCGGTTCTGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCA
GGCAGTGCGACTCATCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACTCA
CACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT
TTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC
CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC
CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
ATAA

SEQ ID NO:40

ATGGGTGCACAGCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGA
ACACATGGGATCCGGTTCTGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAG
CTCTGGTTCAGGCAGTGCGACTCATCAGGAAGAATGCGAATGGGACCC
ATGGACTTGCGAACACATGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAA
CTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT
CAGTTTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG
GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG
GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG

PI0213223

SEQ ID NO:41

ATGGACAAAACTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGGACCGTCAGTTTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGAAATTCAACCC
GCTGGACGAGCTGGAAGAGACTCTGTACGAACAGTTTACTTTTCAACA
GCTCGAGTAA

SEQ ID NO:42

ATGGACAAAACTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGGACCGTCAGTTTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA

P102132

SEQ ID NO:43

ATGGACAAAACTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGGACCGTCAGTTTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGAAATTCAACCC
GCTGGACGAACTGGAAGAAACTCTGTACGAACAGTTCACTTTCCAGCA
GGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAGTTCAACCCACTGGATGAGCT
GGAAGAGACTCTGTATGAACAGTTCACTTTCCAGCAACTCGAGTAA

SEQ ID NO:44

ATGGACAAAACTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGGACCGTCAGTTTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGCAGGAAGAAT
GCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGCTCGAGTAA

PD021323

SEQ ID NO:45

ATGGACAAAACTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGGACCGTCAGTTTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGGGATCCGGTTC
TGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGC
GACTCATCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACA
TGCTCGAGTAA

SEQ ID NO:46

ATGGACAAAACTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGGACCGTCAGTTTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGCAGGAAGAAT
GCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGGGATCCGGTTCTGCTA
CTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGCGCGACTC
ATCAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGCTC
GAGTAA

P1021323

SEQ ID NO:47

ATGGGTGCACAGGAAGAATGCGAATGGGACCCATGGACTTGCGAACA
CATGGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGTGGTAAATTCAACCCGCTGGACGA
ACTGGAAGAAACTCTGTACGAACAGTTCACTTTCCAGCAGGGATCCGG
TTCTGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGT
GCGACTCATCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGgGACAAAACTCACACATGT
CCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCCTCT
TCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG
TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

SEQ ID NO:48

ATGGACAAAACTCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGGACCGTCAGTTTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTGCACAGGGATCCGGTTC
TGCTACTGGTGGTTCCGGCTCCACCGCAAGCTCTGGTTCAGGCAGTGC
GACTCATAAATTCAACCCGCTGGACGAACTGGAAGAAACTCTGTACGA
ACAGTTCACTTTCCAGCAGGGTGGTGGCGGTGGTCAGGAAGAATGCGA
ATGGGACCCATGGACTTGCGAACACATGCTCGAGTAA

PI0213223

SEQ ID NO:49

ATGGGTGCACAGTTCGACTACTGCGAAGGTGTTGAAGACCCGTTCACT
TTCGGTTGCGACAACCACCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAAC
TCACACATGTCCACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGACCGTC
AGTTTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT
CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAAC
CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC
TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG
GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
AAATAA

SEQ ID NO:50

ATGGGTGCACAGCAGTACGGTTGCGACGGTTTTCTGTACGGTTGCATG
ATCAACCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACTCACACATGTCC
ACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGACCGTCAGTTTTCCTCTTC
CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

PD021323

SEQ ID NO:51

ATGGGTGCACAGAAACGCCCATGCGAAGAAATGTGGGGTGGTTGCAA
CTACGACCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACTCACACATGTC
CACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCCTCTT
CCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT
CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

SEQ ID NO:52

ATGGGTGCACAGCACCAGATCTGCAAATGGGACCCGTGGACCTGCAA
ACACTGGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACTCACACATGTC
CACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCCTCTT
CCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT
CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

SEQ ID NO:53

ATGGGTGCACAGAAACGTCCATGCGAAGAAATCTTCGGTGGTTGCACC
TACCAGCTCGAGGGTGGAGGCGGTGGGGACAAAACTCACACATGTCC
ACCTTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTTTTCCTCTTC
CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

PI0213223

Exemplo 6

Ensaios de Pepticorpo

Catorze dos pepticorpos foram testados usando o ELISA de neutralização e três dos pepticorpos foram testados usando o ELISA de afinidade. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5

	hAng-2		mAng-2		hAng-1	
Pepticorpo	IC 50 (nM)	EC 50 (nM)	IC 50 (nM)	EC 50 (nM)	IC 50 (nM)	EC 50 (nM)
2xCon4 (C) 1K	0,04		0,02			
Con4-L1 (C)	0,05		0,04			
Con4 (C)	0,20		0,30			
2 xL1 (N)	0,65		0,80			
Con4 (N)	0,85	0,03	0,72	0,07	Nenhuma Inibição	Nenhuma Ligação
2 xL1 (C)	0,90		1,0			
Con4 (N) 1K-WT			1,9			
Ll (N)	6		11		Nenhuma Inibição	
C17 (N)	9		13		Nenhuma Inibição	
12-9 (N)	21		7,7		Nenhuma Inibição	
Conl (N)	26		~200		Nenhuma Inibição	
8-14 (N)	45		33		Nenhuma Inibição	
L1 (C)	65		37			
8-8 (N)	80		~700		No Inibição	
Pepticorpo de controle negativo 4883	Nenhuma Inibição	Nenhuma Ligação	Nenhuma Inibição	Nenhuma Ligação	Nenhuma Inibição	Nenhuma Ligação

A seqüência de aminoácido de pepticorpo de controle negativo 4883 é como segue (a porção Fc está sublinhada, o ligador é "GGGGG" e a porção peptídica está em negrito):

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSBEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HODY&NGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPOVYTLPPS
RDELTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEV;ESNGOPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVNIHEALHNHYTQKSLSLS

PGK-GGGGG-**CTAGYHWNSDCECCRRN** (SEQ ID NO: 243)

Será avaliado que o uso do termo "Nenhuma Inibição" aqui não é intencionado a indicar que os compostos não tenham qualidades inibidoras. Ao invés, "Nenhuma Inibição" como aqui usado refere-se àqueles compostos que quando testados usando o ensaio de ELISA de neutralização sob as condições aqui descritas exibiram um valor IC_{50} maior do que 1000 nM, que foi a concentração mais alta na qual estes compostos foram triados. Embora qualidades inibidoras significantes não renham sido observadas para as moléculas rotuladas como não exibindo "nenhuma inibição", será avaliado que estas moléculas podem de fato demonstrar qualidades inibidoras sob condições de ensaio diferentes ou em ensaios diferentes. Em uma forma de realização preferida, será avaliado que a invenção diz respeito a pepticorpos que têm qualidades inibidoras usando os ensaios aqui descritos.

Dois dos pepticorpos foram testados usando o ensaio de afinidade BIAcore (como descrito no Exemplo 21). Os resultados são apresentados na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6

Afinidades de Pepticorpo (Pb) para hAng-2 e mAng-2

	hAng-2				mAng-2	
Pepticorpo	K_D (nM)	k_a (l/Ms)	k_d (l/s)	K_D (nM)	k_a (l/Ms)	k_d (l/s)
Pb L1 (N)	3,1	$2,9 \times 10^5$	$9,1 \times 10^{-4}$	0,42	$5,6 \times 10^5$	$2,3 \times 10^{-4}$
Con4 (N)	0,67	$3,3 \times 10^5$	$2,2 \times 10^{-4}$	0,60	$7,3 \times 10^5$	$4,4 \times 10^{-4}$
TN12-9 (N)	8,2	1,2 x 105	$1,0 \times 10^{-3}$	0,32	$7,2 \times 10^5$	$2,3 \times 10^{-4}$

Exemplo 7

Estudos de Eficácia Terapêutica Com Pepticorpo Ang-2 Sistemicamente Administrado

O pepticorpo Ang-2, TN8-Con4-C, foi subcutaneamente administrado a camundongos que carregam o tumor A431 em um programa de uma vez ao dia 72 horas depois da inoculação do tumor. As doses de pepticorpo usadas foram 1000, 200, 40 e 8 μg/camundongo/dia. Um total de 20 doses foi dado a todos os animais. Os volumes de tumor e os pesos

corpóreos foram registrados três vezes/semana. No final do estudo, os animais foram sacrificados e o seu soro foi coletado para medir os níveis de pepticorpo pelo ELISA. Os tumores e um painel de tecidos normais foram coletados de todos os grupos.

Os resultados são mostrados na Figura 1. Como pode ser observado, diferenças significantes no crescimento do tumor foram observadas entre o grupo tratado com o pepticorpo Ang-2 e o de controle de veículo. Todas as quatro doses de pepticorpo Ang-2 inibiu o crescimento do tumor quando comparado com os controles de veículo ($p < 0,0001$ *vs.* controle de veículo usando medida repetida ANOVA). Ao contrário, os tumores no grupo de controle continuaram a crescer em uma taxa muito maior. O tratamento com este pepticorpo não teve nenhum efeito significante nos peso corpóreos terminais, os peso de órgãos ou os parâmetros de hematologia dos animais tratados nas doses acima.

Exemplo 8

1. Construção de Coleções de Peptídeo Secundário de Ang-2

A. Células *E. coli* Eletrocompetentes

Células competentes em eletroporação Epicurian Coli® XL1-Blue MRF (Stratagene #200158) foram adquiridas da Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA).

B. Modificação do Vetor pCES1

A PCR foi realizada usando Extend Long Template PCR Systems (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN) com 1 μg de vetor pCES1 (TargetQuest Inc.) como um padrão. O volume da mistura de PCR foi 100 μl que conteve 1 x tampão de PCR, 200 nM de cada um dos dois iniciadores: 5'-CAAACGAATGGATCCTCATTAAAGCCAGA-3' (SEQ ID NO: 244) e 5'-GGTGGTGCGGCCGCACTCGAGACTGTTGAAAGTTGTTTAGCA-3' (SEQ ID NO: 245), 200 nM de dNTP e 3 unidades (U) de Tag DNA

PI0213223

polimerase. O sistema de PCR TRIO-Thermoblock (Biometra) foi conduzido como segue: 94° C durante 5 minutos; 30 ciclos de 94° C durante 30 segundos, 50° C durante 30 segundos, 72° C durante 45 segundos; e 72° C durante 10 minutos; esfriado a 4° C.

Os produtos de PCR foram depois conduzidos em um gel de agarose a 1 % e purificados com Coluna Giratória QIAGEN da QIAGEN Inc., Valencia, CA) de acordo com os protocolos do fabricante. Uma segunda reação de PCR foi realizada com 5 µl de produtos de PCR e 200 nM de cada um dos dois iniciadores 5'-CAAACGAATGGATCCTC ATTAAAGCCAGA-3' (SEQ ID NO: 246) e 5'AACACAAAAGTGCACA GGGTGGAGGTGGTGGTGCGGCCGCACT-3' (SEQ ID NO: 247) sob as mesmas condições de PCR como descrito acima.

Os produtos de PCR e o vetor pCES 1 original foram depois separadamente digeridos em uma reação de 100 µl contendo 1 x tampão NEB2, 60 U de ApaLI (New England Biolabs, Beverly, MA), 60 U de BamHI (New England Biolabs) a 37° C durante 1 hora. O DNA digerido foi depois purificado usando uma coluna giratória QIAGEN e ligado junto em uma reação de 40 µl contendo 1 x tampão de ligação e 40 U de T4 DNA ligase (New England Biolabs) na temperatura ambiente durante a noite.

Os vetores foram transfectados na *E. coli* e incubadas a 37° C durante a noite. As colônias únicas isoladas foram selecionadas e o plasmídeo foi depois purificado usando uma Coluna giratória QIAGEN. O inserto correto foi confirmado pelo seqüenciamento de DNA.

C. Preparação de DNA Vetorial

Um micrograma de DNA vetorial pCES1 modificado (da seção 1B acima) foi transformado em 40 µl de *E. coli* XL1-blue eletrocompetente (da seção 1A acima) usando o Gene Pulser II (BIO-RAD, Hercules, CA) ajustado a 2500 V, 25 pF e 200 ohms. A amostra de bactérias transformadas foi depois imediatamente transferida em um tubo contendo 960

PI0213223

µl de SOC (2 % de triptona, 0,5 % de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 20 mM de glicose, 10 mM de $MgSO_4$, 10 mM de $MgCl_2$) e a cultura foi deixada desenvolver a 37° C com agitação durante 1 hora.

As células foram depois espalhadas sobre a placa de 2 xYTAGT (2 xYT com 100 µg/ml de ampicilina, 12,5 µg/ml de tetraciclina e 2 % de glicose) e incubadas a 37° C durante a noite. Uma colônia única foi confirmada pelo seqüenciamento e usada para inocular 2 litros de meio 2 xYTAGT a 37° C com agitação durante a noite. O DNA vetorial plasmídico foi purificado com o Kit QIAGEN Plasmid Maxi de acordo com os protocolos do fabricante.

D. Digestão de DNA Vetorial

Total de cerca de 2000 microgramas de DNA Vetorial (da seção 1C acima) foi digerido em 5000 µl de reação contendo 1x tampão NEB 2, 300 U de ApaLI e 300 U de XhoI a 37° C durante a noite. A reação de digestão de restrição foi incubada durante a noite a 37° C e analisada em um gel de agarose a 0,8 % pré fabricado (Embi Tec, San Diego, CA). O DNA vetorial linearizado foi depois excisado do gel e extraído com o Kit de Extração em Gel QIAquick (QIAGEN Inc.) de acordo com as diretrizes do fabricante.

E. Preparação de Oligonucleotídeos de Coleção

Seis oligonucleotídeos de coleção (1 fixo e 5 dopados) foram planejados com base nas seqüências que derivaram dos resultados descritos acima. O oligonucleotídeo de coleção fixa foi:

5'-CACAGTGCACAGGGTNNYNNKNNKNNKNNKNNKNNYS ARTGGGATCCGTGGASCNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKCATT CTCTCGAGATCA-3' (número de coleção 20) (SEQ ID NO: 248);

e dois dos oligonucleotídeos de coleção dopados a 70 % foram como segue:

5'-CACAGTGCACAGGGTNNKNNKNNKaaKcgKccKNNKga

PI0213223

KgaKatKttKc,gKggKNNKacKtaKcaKNNKNNKNNKCATTCTC TCGAGATCA-3' (número de coleção 27); (SEQ ID NO: 249); 5'-CACAGTGCACAGGGTNNKaaKttKaaKccKctKgaKgaKctKgaKga KacKctKtaKgaKcaKttKacKttKcaKcaKNNKCATTCTCTCGAGATCA3' (número de coleção 99); (SEQ ID NO: 250);

As letras minúsculas representam uma mistura de 70 % das bases indicadas e 10 % de cada um dos outros três nucleotídeos). Os outros três dos oligonucleotídeos de coleção dopados a 91 % foram como segue: 5'-CACAGTGCACAGGGTNNKNNKNNKcaKgaKgaKTGCgaKtg KgaKccKtgKacKTGCgaKcaKatKNNKNNKNNKCATTCTCTCGAGA TC A-3' (número de coleção 94); (SEQ ID NO: 251); 5'-CACAGTGCACAGGGTNN-KttKgaKtaKNNKgaKggKgtKgaKgaKcc KttKacKttKggKNNKgaKaaKcaKNNKCATTCTCTCGAGATCA-3' (número de coleção 25); (SEQ ED NO: 252);

e

5'-CACAGTGCACAGGGTNNKaaKttKaaKccKctKgaKgaKctKgaKga KacKctKtaKgaKcaKttKacKttKcaKcaKNNKCATTCTCTCGAGATCA-3' (número de coleção 26); (SEQ ID NO: 253);

Para os oligos acima, aqueles habilitados na técnica avaliarão que "N" indica que cada um dos quatro nucleotídeos (A, T, C e G) são igualmente representados durante a síntese de oligo e "K" indica que os nucleotídeos G e T foram igualmente representados durante a síntese de oligo. As letras minúsculas representam uma mistura de 91 % das bases indicadas e 3% de cada um dos outros três nucleotídeos. Cada um destes oligonucleotídeos foi usado como padrão na PCR.

O kit Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics Corp.) foi usado para as reações de PCR. Cada coleção oligo foi amplificada em uma reação de PCR de 50 µl de noventa e seis reservatórios que conteve 1 nM de um oligonucleotídeo de coleção, 1X tampão de PCR, 300 nM de cada

PI0213223

um dos iniciadores:

5'-CACAGTGCACAGGGT-3' (SEQ ID NO: 254);

e

5'-TGATCTCGAGAGAATG-3', (SEQ ID NO: 255);

200 μM de dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$ e 350 U da Expand polimerase. O termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) foi usado para conduzir o seguinte programa: 94° C durante 5 minutos; 25 ciclos de (94° C durante 30 segundos, 52,5° C durante 60 segundos, 72° C durante 30 segundos); 72° C durante 10 minutos; esfriar a 4° C. Os nucleotídeos livres foram depois removidos usando o kit de Purificação de PCR QIAquick da QIAGEN Inc. Cat # 28104) de acordo com os protocolos do fabricante.

F. Digestão de Oligonucleotídeos de Coleção

Para cada coleção os produtos de PCR (seção 1E) foram digeridos em uma reação de 1200 μl que conteve 1 x tampão NEB 2, 750 U de ApaLI e 750 U de XhoI a 37° C durante a noite. O DNA digerido foi separado em um gel de agarose a 3 % pré fabricado (Embi Tec). A faixa de DNA de interesse de cada reação foi cortado do gel e extraído com filtro de tubo de centrífuga COSTAR Spin-X, 0,22 μm de acetato de celulose (Corning Inc., Cat # 8160).

G. Ligação de Vetor com Oligonucleotídeos de Coleção

A reação de ligação de 450 μl conteve o vetor linearizado (seção 1D) e cada produto de PCR de coleção digerido (seção 1F) n relação molar de 1:5, 1x tampão de ligação NEB e 20.000 U da T4 DNA ligase a 16° C durante a noite. Os produtos ligados foram incubados a 65° C durante 20 minutos para inativar a T4 DNA ligase e mais incubados com 100 U de NotI a 37° C durante 2 horas para minimizar a auto-ligação do vetor. Os produtos ligados foram depois purificados por uma extração com fenol/clorofórmio padrão (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis *et al.*, 3ª Edição,

PI0213223

Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000) e recolocados em suspensão em 120 µl de H_2O.

H. Transformação por Eletroporação

Para cada coleção, doze reações de eletroporação foram realizadas. Para cada transformação, 10 µl do DNA vetorial ligado (seção 1G) e 300 µl de células XL1-BLUE MRF' (seção 1A) foram misturadas em uma cubeta de 0,2 cm (BIO-RAD). A mistura resultante foi pulsada pelo Gene Pulser II ajustando a 2500 V, 25 uF e 200 ohms. As bactérias transformadas das doze reações de eletroporação foram depois combinadas e transferidas em um frascos contendo 26 ml de SOC para incubação a 37° C durante 1 hora. As células foram adicionadas a 450 ml de 2 xYTAG e cultivadas a 37° C com agitação durante 5 horas. As células foram centrifugadas a 4000 rpm durante 15 minutos a 4° C. As pelotas de célula foram depois recolocadas em suspensão em 12 ml de glicerol a 15 % /2 xYT e armazenadas a -80° C. Este foi o estoque primário das coleções. Os títulos mostraram tamanhos de coleção de 5,0 x 10^9 (número de coleção 20), 3,3 x 10^{10} (número de coleção 94), 4,7 x 10^9 (número de coleção 25), 5,0 x 10^9 (número de coleção 26), 3,6 x 10^9 (número de coleção 27) e 4,2 x 10^9 (número de coleção 99) transformantes independentes.

2. Amplificação das Coleções

A. Fabricação do Estoque Secundário das Coleções

A partir do estoque de células da coleção primária (da seção 1H acima), células suficientes para cobrir um excesso de 10X de cada tamanho de coleção foram usadas para inocular o meio de 2 xYTAGT (2YT com 100 µg/ml de ampicilina, 12,5 µg/ml de tetraciclina e 2 % de glicose) de modo que a OD_{600} de partida fosse de 0,1. As culturas foram deixadas desenvolver a 37° C com agitação durante várias horas até a OD_{600} = 0,5. Um alíquota de um décimo de cada coleção foi coletada e cultivada em frascos separados durante mais duas horas a 37° C. Estas sub-culturas foram depois

centrifugadas a 4000 rpm usando um rotor Beckman JA-14 durante 10 minutos a 4° C e as pelotas de bactérias recolocadas em suspensão em 7,0 ml (para cada coleção) de glicerol a 15 % /2 xYT para armazenagem a -80° C.

B. Indução de Fago

Alíquotas de fago auxiliar M13KO7 (Amersham. Pharmacia Biotech) foram adicionadas às culturas bacterianas remanescentes a OD_{600}: = 0,5 (da Seção 2A acima) até a concentração final de 3 x 10^9 pfu/ml. O fago auxiliar foi deixado infectar bactérias a 37° C durante 30 minutos sem agitação e 30 minutos com agitação lenta. As células infectadas foram centrifugadas com 5000 rpm durante 15 minutos a 4° C. As pelotas de célula foram recolocadas em suspensão no mesmo volume (da seção 2A acima) com o meio 2 xYTAK (2YT com 100 μg/ml de ampicilina e 40 μg/ml de canamicina). A produção de fagomídeo foi deixada ocorrer a 30° C durante a noite com agitação.

C. Colheita de Fago

As culturas de bactérias da seção 2B acima foram centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos a 4° C. Os sobrenadantes foram depois transferidos em novas garrafas e 0,2 volume de PEG a 20 % /NaCl 2,5 M foram adicionados e incubados em gelo durante 1 hora para precipitar os fagomídeos. Os fagomídeos precipitados foram centrifugados a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4° C e cuidadosamente recolocados em suspensão com 100 ml de PBS frio. A solução de fagomídeo foi ainda purificada centrifugando-se as células remanescentes com 4000 rpm durante 10 minutos a 4° C e precipitando os fagomídeos adicionando-se 0,2 volume de PEG a 20 % /NaCl a 2,5 M. Os fagomídeos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4° C e as pelotas de fagomídeo recolocadas em suspensão com 18 ml de PBS frio. Seis ml de solução de glicerol a 60 % foram adicionados à solução de fagomídeo para armazenagem a -80° C. Os títulos de fagomídeo foram determinados por um procedimento padrão (Molecular Cloning,

PI0213223

Maniatis *et al* 3ª Edição).

3. Seleção de Fago de Ligação de Ang-2

A. Imobilização de Ang-2 em Pérolas Magnéticas

A Ang-2 biotinilada (da seção 3A acima) foi imobilizada na Dynabead M-280 Estreptavidina (DYNAL, Lake Success, NY) a uma concentração de 2000 ng de proteína Ang-2 por 100 µl do estoque de pérola do fabricante. Depois de retirar as pérolas para um lado de um tubo usando um imã e pipetando o líquido, as pérolas foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e recolocadas em suspensão em PBS. A proteína Ang-2 biotinilada foi adicionada às pérolas lavadas na concentração acima e incubadas com rotação durante 1 hora na temperatura ambiente. As pérolas revestidas com Ang-2 foram depois bloqueadas adicionando-se BSA a uma concentração final de 2 % e incubando durante a noite a 4° C com rotação. As pérolas revestidas com Ang-2 resultantes foram depois lavadas duas vezes com PBST (PBS com 0,05 % de Tween20) antes de serem submetidas aos procedimentos de seleção.

B. Seleção Usando as Pérolas revestidas com Ang-2

Cerca de 1000 vezes o equivalente de coleção de fagomídeos (da seção 2C acima) foram bloqueados durante um hora com 1 ml de PBS contendo 2 % de BSA. A amostra de fagomídeo bloqueada foi submetida a três etapas de seleção negativa adicionando-a às pérolas em branco (mesmas pérolas como a seção 3A mas sem nenhum revestimento de proteína Ang-2) e esta mistura foi incubada na temperatura ambiente durante 15 minutos com rotação. O sobrenadante contendo fagomídeo foi puxado usando um imã e transferido para um segundo tubo contendo pérolas em branco (as mesmas pérolas como descritas na seção 3A acima mas sem o revestimento da proteína Ang-2 sobre elas) e esta mistura incubada na temperatura ambiente durante 15 minutos com rotação.

O procedimento foi repetido. O sobrenadante contendo

PI0213223

fagomídeo foi depois puxado usando imã e transferido para um novo tubo contendo pérolas revestidas com a proteína Ang-2 (da seção 3A) e a mistura foi incubada na temperatura ambiente durante 1 hora com rotação. Depois o sobrenadante foi descartado, as pérolas ligadas ao fagomídeo foram lavadas 10 vezes com 2 % leite-PBS; 10 vezes com 2 % BSA-PBS; 10 vezes com PBST e duas vezes com PBS. Os fagomídeos foram depois deixados eluir em 1 ml de solução a 100 mM de trietilamina (Sigma, St. Louis, MO) durante 10 minutos em um girador. O pH da solução contendo o fagomídeo foi neutralizado adicionando-se 0,5 ml de Tris-HCl 1 M (pH 7,5). Os fagomídeos resultantes foram usados para infectar 10 ml de bactérias YCU-Blue N4RF' recém cultivadas (OD_{600} de cerca de 0,5) a 37° C durante 30 minutos sem agitar e 30 minutos com agitação lenta. Todas as células XL1-BLUE N4RF' infectadas foram depois colocadas em placa em uma placa de 2 xYTAG de 15 x 15 cm e incubadas a 30° C durante a noite.

C. Indução e Colheita de Fago

Uma alíquota de 10 ml de meio 2 xYTAGT foi adicionada à placa (da seção 3B) para recolocar em suspensão as células XL1-BLUE NMF'. Todas as células XL1-BLUE N4RF' foram coletadas em um tubo e uma alíquota de 250 µl destas células foi adicionada a 25 ml de 2 xYTAGT e cultivadas a 37° C até OD_{600} = 0,5. O fago auxiliar M13KO7 foi adicionado a uma concentração final de 3 x 10^9 cfu/ml e incubado a 37° C durante 30 minutos sem agitar e 30 minutos com agitação lenta. As células foram centrifugadas com 5000 rpm durante 10 minutos a 4° C e recolocadas em suspensão com 25 ml de 2 xYTAK. Estas bactérias foram deixadas desenvolver a 30° C durante a noite com agitação. Os fagomídeos induzidos foram colhidos e purificados como na seção 2C.

D. Segunda Rodada de Seleção

A segunda rodada de seleção foi realizada como esboçado na seção 3B a 3C exceto para os seguintes. Cerca de 100 vezes equivalentes de

PI0213223

coleção de fagomídeos resultantes da seção 3C foram usados como o fagomídeo de entrada. A quantidade de proteína Ang-2 biotinilada (seção 3A) revestida sobre a Dynabead M-280 Estreptavidina foi diminuída para 20 ng. As pérolas ligadas a fago foram depois lavadas 10 vezes com 2 % de leite-PBS; 10 vezes com 2 % de BSA-PBS; 10 vezes com PBST, onde a lavagem final envolveu incubação de 60 minutos na temperatura ambiente em PBST. As pérolas foram lavadas duas vezes com PBS. As condições de eluição foram as mesmas como a primeira rodada (seção 3B).

E. Terceira Rodada de Seleção

A terceira rodada de seleção foi realizada como esboçado na seção 3B a 3C acima exceto os seguintes. Cerca de 10 vezes equivalentes de coleção de fagomídeos resultantes da seção 3D foram usados como o fagomídeo de entrada. Cerca de 2 ng de proteína Ang-2 biotinilada (da seção 3A) foi usado para revestir sobre a Dynabead M-280 Estreptavidina. As pérolas ligadas a fago foram lavadas 10 vezes com 2 % leite-PBS; 10 vezes com 2 % BSA-PBS; 10 vezes com PBST, onde a lavagem final envolveu incubação de 60 minutos na temperatura ambiente em PBST. As pérolas foram lavadas duas vezes com PBS. As condições de eluição foram as mesma como a primeiro rodada (seção 3B).

F. Quarta Rodada de Seleção

A quarta rodada de seleção foi realizada como esboçado na seção 3B a 3C acima exceto para os seguintes. Fagomídeos equivalentes de coleção resultantes da seção 3E foram usados como o fagomídeo de entrada. A quantidade de proteína Ang-2 biotinilada (seção 3A) revestida sobre a Dynabead M-280 Estreptavidina foi diminuída para 0,4 ng para as coleções 25, 26 e 27. Para as coleções 20 e 94, a quantidade de revestimento foi mantida como a terceira rodada a 2 ng. A coleção 99 não foi realizada para a etapa de seleção da quarta rodada. As condições de eluição foram as mesma como na primeira rodada (seção 3B).

PI0213223

4. ANÁLISE CLONAL

A. Preparação de Placa Mestra

Colônias únicas da seleção da segunda rodada foram coletadas e inoculadas em placas de 96 reservatório contendo 120 µl de 2 xYTAGT por reservatório. As placas de 96 reservatórios foram incubadas em 30° C agitadas durante a noite. Quarenta microlitros de glicerol a 60 % foram adicionadas por reservatório para armazenagem a -80° C.

B. ELISA de Fagomídeo

Alíquotas de cerca de 2 µl de células da placa mestra (da seção 4A acima) foram inoculadas em uma placa de 96 reservatórios Costar® fresca (Corning incorporated, Corning, NY, cat. #9794) que conteve, 100 µl de 2 xYTAGT por reservatório e esta nova placa de células foi cultivada a 37° C até aproximadamente $OD_{600} = 0,5$.

Quarenta µl de 2 xYTAGT contendo fago auxiliar M13KO7 ($1,5 \times 10^{13}$ cfu/ml) foram adicionados a cada reservatório e a placa de 96 reservatórios foi incubada a 37/ C durante 30 minutos sem agitar e uma outra 30 minutos com agitação lenta. A placa foi centrifugada a 2000 rpm (centrífuga de mesa Beckman CS-6R) durante 10 minutos a 4° C. Os sobrenadantes foram removidos dos reservatórios e cada pelota de célula foi recolocada em suspensão usando 150 µl de 2 xYTAK por reservatório. A placa foi incubada a 30° C durante a noite para a expressão de fagomídeo.

A proteína Ang-2 humana foi revestida em placa Maxisorp de 96 reservatórios (NUNQ a 1 µg/ml em 1xPBS a 4° C durante a noite. Como um controle, 2 % de BSA (Sigma) foram revestidos em uma placa Maxisorp separada. No dia seguinte, as culturas celulares durante a noite foram centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos a 4° C. Dez µl de sobrenadante de cada reservatório foram transferidos para uma nova placa de 96 reservatórios contendo solução de BSA/PBS para diluir o sobrenadante a 1:10. As misturas resultantes foram incubadas durante 1 hora na temperatura

PI0213223

ambiente com agitação para bloquear os fagomídeos. Nesse meio tempo, a placa revestida com a proteína Ang-2 foi bloqueada com 400 µl de 2 % de solução de BSA/PBS por reservatório durante 1 hora na temperatura ambiente com agitação. A solução de BSA foi descartada e cada reservatório foi lavado três vezes com solução de PBS. Depois da última etapa de lavagem, 100 µl de soluções de fagomídeo bloqueadas foram adicionados a cada reservatório da placa revestida com a proteína Ang-2 assim como a placa de controle e incubadas durante 1 hora na temperatura ambiente com agitação. O líquido foi descartado e cada reservatório foi lavado três vezes com solução de PBST. Cem µl do anti-M13 mAb conjugado com HRP (Amersham Pharmacia Biotech) na diluição de 15.000 foram adicionados a cada reservatório das placas revestida com a proteína Ang-2 e de controle e estas placas foram incubadas durante 1 hora na temperatura ambiente com agitação. O líquido foi descartado mais uma vez e cada reservatório foi lavado três vezes com solução de PBST. Cem µl de substratos quimioluminescentes LumiGLO (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) foram adicionados aos reservatórios e cada reservatório foi lido pela máquina Luminoskan Ascent DLRearly (Labsystems, Franklin, MA).

C. Seqüenciamento dos Clones de Fago

A reação de PCR foi realizada usando 1 µl de bactéria de cada reservatório da placa mestra (seção 4A) como um padrão. O volume de cada mistura de PCR foi de 50 µl contendo 1x tampão de PCR, 300 nM de cada um dos dois iniciadores:

5'-GTTAGCTCACTCATTAGGCAC-3' (SEQ ID NO: 256) e

5'-GTACCGTAACACTGAGTTTCG-3', (SEQ ID NO: 257);

200 µM de dNTP, 2 mM de $MgCl_2$ e 2,5 U de taq DNA polimerase (Roche Molecular Biochemicals). O Sistema de PCR GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) foi usado para conduzir o seguinte programa: 94° C durante 5 minutos; 40 ciclos de (94° C durante 45 segundos, 55° C durante

PI0213223

45 segundos, 72° C durante 90 segundos); 72° C durante 10 minutos; esfriar a 4° C. Os produtos de PCR foram purificados com o kit de Purificação por PCR QIAquick 96 (QIAGEN Inc.) de acordo com as diretrizes do fabricante. Todos os produtos de PCR purificados foram seqüenciados com o iniciador 5'-TTACACTTTATGCTTCCG-3' (SEQ ID NO: 258) usando o Seqüenciador ABI 3770 (Perkin Elmer) de acordo com as diretrizes do fabricante.

5. Classificação de Seqüência

As seqüências de peptídeo que foram traduzidas a partir das seqüências de nucleotídeo (da seção 4C acima) foram correlacionadas com os dados do ELISA. Os clones que apresentaram leitura de OD alta nos reservatórios revestidos com Ang-2 e leitura de OD baixa nos reservatórios revestidos com BSA foram considerados mais importantes. As seqüências que ocorreram múltiplas vezes foram também consideradas importantes. Vinte e quatro seqüências de peptídeo da coleção 20, 26 seqüências de peptídeo da coleção 94, 7 seqüências de peptídeo da coleção 25, 18 seqüências de peptídeo da coleção 26, 6 seqüências de peptídeo da coleção 27 e 4 seqüências de peptídeo da coleção 99 foram escolhidos para mais análise e geração de pepticorpo. Adicionalmente, onze seqüências de consenso das coleções 20 e 94, três seqüências de consenso das coleções 26 e 99 e duas da coleção 25 foram deduzidas e usadas para gerar pepticorpos. Os pepticorpos na Tabela 7 foram avaliados usando o protocolo do ELISA de Neutralização descrito aqui no Exemplo 10. Os resultados estão mostrados na Tabela 7.

PI0213223

Tabela 7

Pbs maturado por afinidade derivado de Con4	hAng-2:Tie2 IC_{50}(nM)	Seqüência de Pepticorpo (SEQ ID NO:)
Con4-44 (C)	0.09	M-Fc-GGGGGAQ-PIRQEECDWDPWTCEHMWEV-LE (SEQ ID NO: 259)
Con4-40 (C)	0.10	M-Fc-GGGGGAQ-TNIQEECEWDPWTCDHMPGK-LE (SEQ ID NO: 260)
Con4-4 (C)	0.12	M-Fc-GGGGGAQ-WYEQDACEWDPWTCEHMAEV-LE (SEQ ID NO: 261)
Con4-31 (C)	0.16	M-Fc-GGGGGAQ-NRLQEVCEWDPWTCEHMENV-LE (SEQ ID NO: 262)
Con4-C5 (C)	0.16	M-Fc-GGGGGAQ-AATQEECEWDPWTCEHMPRS-LE (SEQ ID NO: 263)
Con4-42 (C)	0.17	M-Fc-GGGGGAQ-LRHQEGCEWDPWTCEHMFDW-LE

		(SEQ ID NO: 264)
Con4-35 (C)	0.18	M-Fc-GGGGGAQ-VPRQKDCEWDPWTCEHMYVG-LE (SEQ ID NO: 265)
Con4-43 (C)	0.18	M-Fc-GGGGGAQ-SISHEECEWDPWTCEHMQVG-LE (SEQ ID NO: 266)
Con4-49 (C)	0.19	M-Fc-GGGGGAQ-WAAQEECEWDPWTCEHMGRM-LE (SEQ ID NO: 267)
Con4-27 (C)	0.22	M-Fc-GGGGGAQ-TWPQDKCEWDPWTCEHMGST-LE (SEQ ID NO: 268)
Con4-48 (C)	0.26	M-Fc-GGGGGAQ-GHSQEECGWDPWTCEHMGTS-LE (SEQ ID NO: 269)
Con4-46 (C)	0.26	M-Fc-GGGGGAQ-QHWQEECEWDPWTCDHMPSK-LE (SEQ ID NO: 270)
Con4-41 (C)	0.26	M-Fc-GGGGGAQ-NVRQEKCEWDPWTCEHMPVR-LE (SEQ ID NO: 271)
Con4-36 (C)	0.28	M-Fc-GGGGGAQ-KSGQVECNWDPWTCEHMPRN-LE (SEQ ID NO: 272)
Con4-34 (C)	0.28	M-Fc-GGGGGAQ-VKTQEHCDWDPWTCEHMREW-LE (SEQ ID NO: 273)
Con4-28 (C)	0.30	M-Fc-GGGGGAQ-AWGQEGCDWDPWTCEHMLPM-LE (SEQ ID NO: 274)
Con4-39 (C)	0.30	M-Fc-GGGGGAQ-PVNQEDCEWDPWTCEHMPPM-LE (SEQ ID NO: 275)
Con4-25 (C)	0.31	M-Fc-GGGGGAQ-RAPQEDCEWDPWTCAHMDIK-LE (SEQ ID NO: 276)

P102132Z3

Con4-50 (C)	0.38	M-Fc-GGGGGAQ-HGQNMECEWDPWTCEHMFRY-LE (SEQ ID NO: 277)
Con4-38 (C)	0.40	M-Fc-GGGGGAQ-PRLQEECVWDPWTCEHMPLR-LE (SEQ ID NO: 278)
Con4-29 (C)	0.41	M-Fc-GGGGGAQ-RTTQEKCEWDPWTCEHMESQ-LE (SEQ ID NO: 279)
Con4-47 (C)	0.44	M-Fc-GGGGGAQ-QTSQEDCVWDPWTCDHMVSS-LE (SEQ ID NO: 280)
Con4-20 (C)	0.48	M-Fc-GGGGGAQ-QVIGRPCEWDPWTCEHLEGL-LE (SEQ ID NO: 281)
Con4-45 (C)	0.48	M-Fc-GGGGGAQ-WAQQEECAWDPWTCDHMVGL-LE (SEQ ID NO: 282)
Con4-37 (C)	0.49	M-Fc-GGGGGAQ-LPGQEDCEWDPWTCEHMVRS-LE (SEQ ID NO: 283)
Con4-33 (C)	0.52	M-Fc-GGGGGAQ-PMNQVECDWDPWTCEHMPRS-LE (SEQ ID NO: 284)
AC2-Con4 (C)	0.52	M-Fc-GGGGGAQ-FGWSHGCEWDPWTCEHMGST-LE (SEQ ID NO: 285)
Con4-32 (C)	0.75	M-Fc-GGGGGAQ-KSTQDDCDWDPWTCEHMVGP-LE (SEQ ID NO: 286)
Con4-17 (C)	0.96	M-Fc-GGGGGAQ-GPRISTCQWDPWTCEHMDQL-LE (SEQ ID NO: 287)
Con4-8 (C)	1.20	M-Fc-GGGGGAQ-STIGDMCEWDPWTCAHMQVD-LE (SEQ ID NO: 288)
AC4-Con4 (C)	1.54	M-Fc-GGGGGAQ-VLGGQGCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 289)
Con4-1 (C)	2.47	M-Fc-GGGGGAQ-VLGGQGCQWDPWTCSHLEDG-LE (SEQ ID NO: 290)
Con4-C1 (C)	2.75	M-Fc-GGGGGAQ-TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG-LE

P102132.23

		(SEQ ID NO: 291)
Con4-21 (C)	3.21	M-Fc-GGGGGAQ-TKGKSVCQWDPWTCSHMQSG-LE (SEQ ID NO: 292)
Con4-C2 (C)	3.75	M-Fc-GGGGGAQ-TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG-LE (SEQ ID NO: 293)
Con4-18 (C)	4.80	M-Fc-GGGGGAQ-WVNEVVCEWDPWTCNHWDTP-LE (SEQ ID NO: 294)
Con4-19 (C)	5.76	M-Fc-GGGGGAQ-VVQVGMCQWDPWTCKHMRLQ-LE (SEQ ID NO: 295)
Con4-16 (C)	6.94	M-Fc-GGGGGAQ-AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV-LE (SEQ ID NO: 296)
Con4-11 (C)	9.70	M-Fc-GGGGGAQ-QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR-LE (SEQ ID NO: 297)
Con4-C4 (C)	9.80	M-Fc-GGGGGAQ-TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG-LE (SEQ ID NO: 298)
Con4-23 (C)	9.88	M-Fc-GGGGGAQ-TSQRVGCEWDPWTCQHLTYT-LE (SEQ ID NO: 299)
Con4-15 (C)	15.00	M-Fc-GGGGGAQ-QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS-LE (SEQ ID NO: 300)
Con4-9 (C)	20.11	M-Fc-GGGGGAQ-GTSPSFCQWDPWTCSHMVQG-LE (SEQ ID NO: 301)
Con4-10 (C)	86.61	M-Fc-GGGGGAQ-TQGLHQCEWDPWTCKVLWPS-LE (SEQ ID NO: 302)
Con4-22 (C)	150.00	M-Fc-GGGGGAQ-VWRSQVCQWDPWTCNLGGDW-LE (SEQ ID NO: 303)
Con4-3 (C)	281.50	M-Fc-GGGGGAQ-DKILEECQWDPWTCQFFYGA-LE (SEQ ID NO: 304)

PI0213223

Con4-5 (C)	nenhuma inibição	M-Fc-GGGGGAQ-ATFARQCQWDPWTCALGGNW-LE (SEQ ID NO: 305)
Con4-30 (C)	nenhuma inibição	M-Fc-GGGGGAQ-GPAQEECEWDPWTCEPLPLM-LE (SEQ ID NO: 306)
Con4-26 (C)	nenhuma inibição	M-Fc-GGGGGAQ-RPEDMCSQWDPWTWHLQGYC-LE (SEQ ID NO: 307)
Con4-7 (C)	nenhuma inibição	M-Fc-GGGGGAQ-LWQLAVCQWDPQTCDHMGAL-LE (SEQ ID NO: 308)
Con4-12 (C)	nenhuma inibição	M-Fc-GGGGGAQ-TQLVSLCEWDPWTCRLLDGW-LE (SEQ ID NO: 309)
Con4-13 (C)	nenhuma inibição	M-Fc-GGGGGAQ-MGGAGRCEWDPWTCQLLQGW-LE (SEQ ID NO: 310)
Con4-14 (C)	nenhuma inibição	M-Fc-GGGGGAQ-MFLPNECQWDPWTCSNLPEA-LE (SEQ ID NO: 311)
Con4-2 (C)	nenhuma inibição	M-Fc-GGGGGAQ-FGWSHGCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 312)
Con4-6 (C)	nenhuma inibição	M-Fc-GGGGGAQ-WPQTEGCQWDPWTCRLLHGW-LE (SEQ ID NO: 313)
Con4-24 (C)	nenhuma inibição	M-Fc-GGGGGAQ-PDTRQGCQWDPWTCRLYGMW-LE (SEQ ID NO: 314)
AC1-Con4 (C)	nenhuma inibição	M-Fc-GGGGGAQ-TWPQDKCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 315)
AC3-Con4 (C)	nenhuma inibição	M-Fc-GGGGGAQ-DKILEECEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 316)
AC5-Con4 (C)	nenhuma inibição	M-Fc-GGGGGAQ-AATQEECEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 317)

PI0213223

Pbs maturado por afinidade derivado de L1	hAng-2:Tie2 IC_{50} (nM)	Seqüência de pepticorpo (SEQ ID NO:)
L1-7 (N)	0.03	MGAQ-TNFMPMDDLEQRLYEQFILQQG-LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 318)
AC6-L1 (N)	0.03	MGAQ-TNYKPLDELDATLYEHWILQHS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 319)
L1-15 (N)	0.04	MGAQ-QKYQPLDELDKTLYDQFMLQQG LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 320)
L1-2 (N)	0.04	MGAQ-LNFTPLDELEQTLYEQWTLQQS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 321)
L1-10 (N)	0.05	MGAQ-QKFQPLDELEQTLYEQFMLQQA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 322)
L1-13 (N)	0.05	MGAQ-QEYEPLDELDETLYNQWMFHQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 323)
L1-5 (N)	0.05	MGAQ-VKYKPLDELDEILYEQQTFQER LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 324)
L1-C2 (N)	0.05	MGAQ-TKFQPLDELDQTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 325)
L1-C3 (N)	0.06	MGAQ-TNFQPLDELDQTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 326)
L[illegible]11 (N)	0.07	MGAQ-QNFKPMDELEDTLYKQFLFQHS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 327)

L1-17 (N)	0.08	MGAQ-VKYKPLDELDEWLYHQFTLHHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 328)
L1-12 (N)	0.08	MGAQ-YKFTPLDDLEQTLYEQWTLQHV LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 329)
L1-1 (N)	0.08	MGAQ-QNYKPLDELDATLYEHFIFHYT LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 330)
L1-4 (N)	0.08	MGAQ-VKFKPLDALEQTLYEHWMFQQA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 331)
L1-20 (N)	0.09	MGAQ-EDYMPLDALDAQLYEQFILLHG LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 332)
L1-22 (N)	0.09	MGAQ-YKFNPMDELEQTLYEEFLFQHA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 333)
L1-14 (N)	0.11	MGAQ-SNFMPLDELEQTLYEQFMLQHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 334)
L1-16 (N)	0.11	MGAQ-QKFQPLDELEETLYKQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 335)
L1-18 (N)	0.16	MGAQ-QKFMPLDELDEILYEQFMFQQS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 336)
L1-3 (N)	0.16	MGAQ-TKFNPLDELEQTLYEQWTLQHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 337)
L 21 (N)	0.17	MGAQ-HTFQPLDELEETLYYQWLYDQL LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 338)

PI0213223

L1-C1 (N)	0.56	MGAQ-QKFKPLDELEQTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 339)
L1-19 (N)	1.26	MGAQ-QTFQPLDDLEEYLYEQWIRRYH LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 340)
L1-9 (N)	1.62	MGAQ-SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 341)
Pbs maturado por afinidade derivado de Con1	**hAng-2:Tie2 IC_{50} (nM)**	**Seqüência de pepticorpo (SEQ ID NO:)**
Con1-4 (C)	1.68	M-Fc-GGGGGAQ-SGQLRPCEEIFGCGTQNLAL-LE (SEQ ID NO: 342)
Con1-1 (C)	3.08	M-Fc-GGGGGAQ-AGGMRPYDGMLGWPNYDVQA-LE (SEQ ID NO: 343)
Con1-6 (C)	8.60	M-Fc-GGGGGAQ-GQDLRPCEDMFGCGTKDWYG-LE (SEQ ID NO: 344)
Con1-3 (C)	16.42	M-Fc-GGGGGAQ-APGQRPYDGMLGWPTYQRIV-LE (SEQ ID NO: 345)
Con1-2 (C)	nenhuma inibição	M-Fc-GGGGGAQ-QTWDDPCMHILGPVTWRRCI-LE (SEQ ID NO: 346)
Con1-5 (C)	nenhuma inibição	M-Fc-GGGGGAQ-FGDKRPLECMFGGPIQLCPR-LE (SEQ ID NO: 347)
Originário: Con1 (C)	26.00	M-Fc-GGGGGAQ-KRPCEEIFGGCTYQ-LE (SEQ ID NO: 348)

Pbs maturado por afinidade derivado de 12-9	hAng-2:Tie2 IC_{50} (nM)	Seqüência de pepticorpo (SEQ ID NO:)
12-9-3 (C)	0.81	M-Fc-GGGGGAQ-LQEWCEGVEDPFTFGCEKQR-LE (SEQ ID NO: 349)
12-9-7 (C)	0.93	M-Fc-GGGGGAQ-MLDYCEGMDDPFTFGCDKQM-LE (SEQ ID NO: 350)
12-9-6 (C)	0.95	M-Fc-GGGGGAQ-HQEYCEGMEDPFTFGCEYQG-LE (SEQ ID NO: 351)
12-9-C2 (C)	1.41	M-Fc-GGGGGAQ-LQDYCEGVEDPFTFGCENQR-LE (SEQ ID NO: 352)
12-9-5 (C)	1.56	M-Fc-GGGGGAQ-LLDYCEGVQDPFTFGCENLD-LE (SEQ ID NO: 353)
12-9-1 (C)	1.84	M-Fc-GGGGGAQ-GFEYCDGMEDPFTFGCDKQT-LE (SEQ ID NO: 354)
12-9-4 (C)	2.05	M-Fc-GGGGGAQ-AQDYCEGMEDPFTFGCEMQK-LE (SEQ ID NO: 355)
12-9-C1 (C)	2.68	M-Fc-GGGGGAQ-LQDYCEGVEDPFTFGCEKQR-LE (SEQ ID NO: 356)
12-9-2 (C)	8.42	M-Fc-GGGGGAQ-KLEYCDGMEDPFTQGCDNQS-LE (SEQ ID NO: 357)
Originário: 12-9 (C)	15.00	M-Fc-GGGGGAQ-FDYCEGVEDPFTFGCDNH-LE (SEQ ID NO: 358)

Exemplo 9

Seis amostras de pepticorpos anti-Ang2 foram testadas quanto a sua atividade de ligação à huAng2 (R&D Systems, BNO12103A) no BIAcore. A proteína G foi imobilizada a uma lasca CM5 de acordo com o protocolo de ligação de amina padrão (BIAcore Inc.) e os pepticorpos foram depois injetados em uma superfície de proteína G para capturar (RL ~ 100 Ru). Para testar a ligação entre hAng2 e o pepticorpo capturado, 0,3 nM a 40

nM de huAng2 foram injetados nas superfícies do pepticorpo capturado e os sensogramas de ligação foram analisados usando BIAevaluation 3.0 (BIAcore Inc.). A Tabela 8 resume os resultados deste experimento.

Tabela 8

Pepticorpo	Lot #	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
Con4-44 (C)	011702	2,1E-10	2,9E+05	5,9E-05
L1-7 (N)	022102	2,4E-10	3,7E+05	8,7E-05
L1-10 (N)	021302	7,7E-10	1,5E+05	1,1E-04
L1-21 (N)	021802	2,4E-10	5,6E+05	1,4E-04
Con4 (C)	33456-77	3,8E-10	5,3E+05	2,0E-04
2xCon4 (C) 1K	092501	3,4E-10	4,8E+05	1,6E-04

Exemplo 10

ELISA de Neutralização

O meio condicionado de Ang-2 humana, de murino, cão e rato e Ang-1 humana e de murino foram diluídos em DMEM/50 μg/ml de BSA como segue: hAng-2 - diluição 1:64; mAng-2 - diluição 1:64; Ang-2 de rato - não diluído; cão Ang-2 - diluição 1:32; hAng-1 - diluição 1:4; e mAng-1 - diluição 1:4.

O grau ao qual cada um destes meios condicionados foi diluído foi determinado pela sua capacidade para ligar 1 nM de hTie2-Fc (fornecida como uma molécula Tie-2-Fc onde a porção Tie-2 contém apenas a porção extracelular solúvel da molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI) a 50 % de ligação maximamente obtenível (isto é, platô). Placas de microtítulo foram revestidas com 100 μl do meio condicionado diluído. Para os ELISAs de neutralização de Ang-2, os pepticorpos anti-Ang2 candidatos foram titulados de 62,5 nM a 0,015 pM em diluições de 4 vezes em uma solução de PBS contendo cerca de 1 % de BSA e cerca de 1 nM de Tie-2 (fornecida como uma molécula Tie-2-Fc onde a porção Tie-2 contém apenas a porção extracelular solúvel da molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI). Para os ELISAs de neutralização de Ang-1, pepticorpo anti-Ang-2 candidatos foram titulados de 1000 nM a 0,2 pM em diluições de 4 vezes em uma solução de PBS contendo cerca de 1 % de BSA e cerca de 1 nM de Tie-2

PI0213223

(fornecida como uma molécula Tie-2-Fc onde a porção Tie-2 contém apenas a porção extracelular solúvel da molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI).

Depois que cerca de 100 microlitros da solução de pepticorpo/ Tie-2 foram adicionados a cada reservatório, as placas foram incubadas durante a noite na temperatura ambiente e depois lavadas cinco vezes em PBS contendo cerca de 0,1 por cento de Tween-20. Depois da lavagem, cerca de 100 microlitros por reservatório de anticorpo anti-Tie-2 (Pharmingen Inc., catálogo #557039) foram adicionados a uma concentração final de cerca de 1 micrograma por ml e as placas foram incubadas cerca de 1 hora na temperatura ambiente. Em seguida, cerca de 100 microlitros por reservatório de IgG-IHRP anti-camundongo de cabra (Pierce Chemical Co., catálogo #31432) foram adicionados a uma diluição de 1:10.000 em PBS contendo cerca de 1 % de BSA.

As placas foram incubadas na temperatura ambiente durante cerca de 1 hora, depois do que elas foram lavadas cinco vezes com PBS contendo cerca de 0,1 por cento de Tween-20. Cerca de 100 microlitros por reservatório de substrato TMB (SIGMA, catálogo # T8665) foram depois adicionados e a cor azul foi deixada desenvolver. A absorbância foi depois lida em um espectrofotômetro a 370 nm. Os resultados são apresentados na Tabela 9 abaixo.

Tabela 9

Neutralização Mediada por Pepticorpo de Interações Angiopoietina:Tie2

	hAng-2	mAng-2	rAng-2	cAng-2	hAng-1	mAng-1
Pepticorpo	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)
2xCon4 (C)	0,026	0,035	0,024	0,047	3,0	3,2
Con4 (C)	0,197	0,289	0,236	0,540	200	300
Con4-44 (C)	0,08	0,16	0,22	----	43	----
Con4-40 (C)	0,20	0,27	0,35	----	> 1000	----
L1-7 (N)	0,046	0,063	0,035	0,108	> 1000	> 1000
L1-21 (N)	0,179	0,249	0,204	0,608	> 1000	> 1000
L1-10 (N)	0,06	0,06	0,06	----	> 1000	----

Exemplo 11

Estudo PK

Planejamento de Estudo

Camundongos CD-1 machos, pesando 20 a 30, foram aleatoriamente divididas em cada grupo de tratamento com pepticorpo (2xCon4-C, L1-7-N e L1-21-N). Os animais receberam um único bolo IV (n = 38/grupo) ou uma única administração SC de 50 μg de pepticorpo (n = 34/grupo). As injeções foram feitas via a veia da cauda e sob a pele sobre os ombros para as administrações IV e SC, respectivamente.

Amostragem de Sangue e Métodos Analíticos

As amostras de sangue foram coletadas para cada medição da concentração de pepticorpo anti-Ang2 na pré dose e a 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 216, 264, 312 e 336 horas depois da administração para os grupos SC e IV. Amostras adicionais foram coletadas a 5 e 30 minutos após a dose para os grupos IV. Dois animais foram sangrados por ponto no tempo e os animais foram sacrificados depois da amostragem. O sangue (aproximadamente 0,50 ml) foi coletado de uma punção cardíaca em tubos separadores de soro microtainer® de polipropileno. As amostras foram mantidas em gelo durante aproximadamente 20 minutos ou até que a formação de coágulo ocorreu. O soro foi separado das amostras de sangue pela centrifugação durante aproximadamente 10 minutos de 2 a 8° C e armazenado a aproximadamente -70° C até ensaiado. As amostras foram

PI0213223

medidas usando um ensaio de fluorescência resolvido em tempo verificado (TRF) com um limite inferior de quantificação (LLOQ) de 100 ng/ml. Placas de microtítulo NUNC fluoroMaxisorp foram revestidas com proteína Ang-2 de camundongo recombinante. As placas foram depois bloqueadas com uma solução de proteína para reduzir a ligação não específica. Os padrões, os controles de qualidade e amostras desconhecidas foram preparadas em 10 % de tampão de ensaio de soro de camundongo e pipetados em reservatórios de placas de microtítulo. Os pepticorpos foram ligados especificamente à Ang-2 imobilizada. Depois da retirada por lavagem de quaisquer substâncias não ligadas (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.), um anticorpo monoclonal IgG (H+L) anti-Humano de cabra biotinilado (Jackson ImunoResearch Laboratories Inc.) foi adicionado aos reservatórios. A seguir de uma etapa de lavagem para remover qualquer anticorpo monoclonal biotinilado não ligado, estreptavidina rotulada com európio foi adicionada aos reservatórios. Depois de separar por lavagem a estreptavidina európio não ligada, o európio ligado foi liberado da estreptavidina com uma ácido solução pipetada em cada reservatório. O sinal fluorescente foi gerado e lido na leitora fluorimétrica da Wallac. A faixa de ensaio para a análise de pepticorpo anti-Ang-2 no soro de camundongo é 0,078 a 5 μg/ml.

Análise Farmacocinética

Os dados de concentração-tempo médios do compósito para cada grupo foram submetidos à análise não compartimentais usando WinNonlin Professional (Versão 3.3, Pharsight Corp., Mountain View, CA). Os tempos de amostragem nominal foram usados para a análise PK, visto que as amostras foram coletadas dentro de 10 % do tempo nominal. Todos os valores de concentração menos do que o LLOQ foram ajustados a zero antes da análise PK. Os seguintes parâmetros PK foram estimados:

- A meia vida terminal ($t_{½}$) foi calculada como $t_{½} = \frac{In(2)}{Kel}$, onde

P102132

k_{el} foi a constante de taxa terminal de primeira ordem estimada via regressão linear da fase de decaimento log-linear terminal.

• A área sob a curva de concentração sérica-tempo ($AUC_{(0\text{-último})}$) foi estimada usando o método trapezoidal linear/log de tempo 0 até último, o tempo da última concentração quantificável ($C_{último}$).

• A área sob a curva de tempo 0 até infinito ($AUC_{(0\text{-}\infty)}$) foi estimado como a soma da $AUC_{(0\text{-último})}$ correspondente e os valores $C_{último}/k_{el}$ prognosticados:

$$AUC_{(0\text{-}\infty)} = AUC_{(0\text{-último})} + \frac{C_{último}\ Prognosticado}{Kel}$$

• A biodisponibilidade Absoluta (F) depois da administração SC foi calculada como:

$$F = \frac{AUC(0\text{-}\infty)SC}{AUC(0\text{-}\infty)IV} \times 100$$

Os resultados estão apresentados na Figura 2.

Exemplo 12

Camundongos nus fêmeas foram injetados subcutaneamente com 1 x 10^7 células A431 no dia 0 do estudo. No dia 3, o pepticorpo de Ang-2 2xCon4-C foi administrado subcutaneamente a uma dose de 200 µg/camundongo/dia. Os volumes de tumor e os pesos corpóreos foram registrados em intervalos regulares, como mostrado na Figura. Diferenças significantes no crescimento do tumor foram observadas entre o grupo tratado com pepticorpo de Ang-2 versus o controle de veículo e pepticorpo de controle ($p < 0{,}0001$ *vs.* cada controle usando medições repetidas ANOVA, com o teste *post hoc* de Scheffe). O tratamento com este pepticorpo não teve nenhum efeito significante sobre os pesos corpóreos. Os resultados estão apresentados na Figura 3.

Exemplo 13

Curva de Desenvolvimento *In vitro* de A431

Células A431 foram semeadas em placas de cultura de tecido

de 96 reservatórios a 2000 células por reservatório, em 200 µl de DMEM suplementado com 10 % de soro bovino fetal (FBS). O meio foi depois aspirado 16 horas após a semeadura. Os seguintes foram depois adicionados de volta nos reservatórios e ajustados em triplicata: 100 µl por reservatório de DMFM, 10 % de FBS, 1 mg/ml de pepticorpo de controle negativo 4883 ou pepticorpo TN8-Con4. Os mesmos ajustes foram repetidos em 5 placas. O meio de uma placa foi aspirado a 24, 48, 72, 96 e 120 horas após o tratamento. Cem µl de ácido tricloroacético a 10 % (TCA) por reservatório foram depois adicionados e as placas foram depois armazenadas a 4° C. Todas as placas foram coletadas quando a última placa esteve em 10 % de TCA durante um mínimo de 4 horas. O TCA a 10 % foi jogado fora e os reservatórios foram enxaguados 5 vezes com água de torneira. As células foram depois tingidas com 100 µl de sulforodamina B a 0,4 % (Sigma S-9012) em ácido acético a 1 % (Sigma A-6283) durante 10 minutos na temperatura ambiente e depois lavadas 5 vezes com ácido acético a 1 %. As placas foram depois secadas ao ar. O corante foi solubilizado com 300 µl de Tris a 20 nM não tamponado (pH > 10) durante 2 horas em um agitador rotativo. A densidade ótima (OD) foi depois lida a 540 nm em uma leitora de placa de microtítulo. Os resultados estão apresentados na Figura 4.

Exemplo 14

Camundongos nus fêmeas foram injetados subcutaneamente com 2 x 10^6 células Colo-205 mais Matrigel (2:1) no dia 0 do estudo. No dia 3, os pepticorpos de Ang-2 L1-7-N, L1-21-N, Con4-C e 2xCon4-C foram subcutaneamente administrados na dose de 14 µg/camundongo, duas vezes por semana. O anticorpo anti-Ang-2 Ab536, 47 µg/camundongo, três vezes por semana, foi administrado como um controle positivo. Os volumes de tumor e os pesos corpóreos foram registrados em intervalos regulares.

Diferenças significantes no crescimento do tumor foram observadas entre cada um dos grupos tratados com pepticorpo Ang-2 versus

controle de veículo e pepticorpo de controle ($p < 0,0001$ *vs.* cada controle usando ANOVA de medição repetida, com teste *post hoc* de Scheffe). O tratamento com estes pepticorpos não teve nenhum efeito significante sobre os pesos corpóreos (resultados não mostrados). Os resultados são apresentados na Figura 5.

Exemplo 15

Camundongos nus fêmeas foram injetados subcutaneamente com 2 x 10^6 de células Colo-205 mais Matrigel (2:1) no dia 0 do estudo. No dia 3, o pepticorpo Ang-2 2xCon4C foi administrado subcutaneamente nas doses de 14, 2,8 e 0,56 μg/camundongo, duas vezes por semana. Os volumes de tumor e os pesos corpóreos foram registrados em intervalos regulares, como mostrado. Diferenças significantes no crescimento do tumor foram observadas entre as duas doses mais altas do grupo tratado com pepticorpo Ang-2 versus controle de veículo e pepticorpo de controle ($p = 0,003$ para a dose intermediária e $p < 0,0001$ para a dose alta, usando ANOVA de medição repetida, com teste *post hoc* de Scheffe). O tratamento com estes pepticorpos não teve nenhum efeito significante sobre os pesos corpóreos. A linha tracejada representa uma redução do n total do grupo, de 10 para 9 camundongos, devido à morte de um camundongo por razões desconhecidas. Os resultados estão apresentados na Figura 6.

Exemplo 16

Pepticorpos Anti-Ang-2 *vs.* Tumores de Xenoenxerto Colo-205

Camundongos nus fêmeas foram injetados subcutaneamente com 2 x 10^6 células Colo-205 mais Matrigel (2:1) no dia 0 do estudo. No dia 3, o pepticorpo Ang-2 2xCon4-C ou o pepticorpo de controle foram administrados subcutaneamente na dose de 350 μg/dia. Os tumores dos grupos tratados com pepticorpo de controle (como descrito na Tabela 5) foram colhidos no dia 14 (controle igualado no tamanho) ou Dia 18 (controle igualado no tempo). Os tumores do grupo tratado com 2xCon4(C) foram

depois colhidos no dia 18. Os volumes de tumor foram registrados em intervalos regulares, como mostrado. Diferenças significantes no crescimento do tumor foram observadas entre o grupo de controle igualado no tempo e o grupo tratado com 2xCon4-C ($p = 0,0154$ pelo ANOVA de medição repetida, com teste *post hoc* de Scheffe). O tratamento com estes pepticorpos não teve nenhum efeito significante sobre o peso corpóreo.

Os tumores preparados para a análise de imagem foram bissecados coronalmente e metade subitamente congelada em OCT (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA). Crio-seções foram imunoisto-quimicamente tingidas usando CD31 anti-camundongo (catálogo #553370, BD PharMingen, San Diego, CA) a 2 µg/ml, com DAB como o cromogênio. As seções de tumor foram digitalmente fotografadas em ampliação de objetiva de 20X. Quatro campos de "ponto circular" por tumor foram capturados, com dez tumores por grupo de tratamento. Um sistema de análise de imagem MetaMorph (Universal Imaging Corporation, Downington, PA) foi usado para *threshold* os vasos sangüíneos tingidos com CD31 dentro das imagens. As áreas de tingimento positivos em CD31 foram expressadas como uma relação do tecido de tumor total dentro de cada campo. Os resultados estão apresentados na Figura 7.

Exemplo 17

Camundongos nus fêmeas foram injetados subcutaneamente com 2×10^6 células Colo-205 mais Matrigel (2:1) no dia 0 do estudo. O tratamento com 350 µg/camundongo, s.c. duas vezes por semana, do pepticorpo de Ang-2 2xCon4-C ou pepticorpo de controle equivalente começou nos dias 3, 10 ou 15 do estudo. Os volumes de tumor e os pesos corpóreos foram registrados em intervalos regulares. Diferenças significantes no crescimento do tumor foram observadas entre todos os grupos tratados com pepticorpo Ang-2 versus controle de veículo ($p = 0,089$ para o grupo do dia 15 e $p < 0,0001$ para os grupos dos dias 3 e 10, usando ANOVA de

medição repetida, com teste *post hoc* de Scheffe). O tratamento com estes pepticorpos não teve nenhum efeito significante sobre os pesos corpóreos. Os resultados estão apresentados na Figura 8 (pesos corpóreos não mostrados).

Exemplo 18

Um resumo de taxas de resposta completa (CR) foi obtido usando anticorpo Ab536 a 47 μg/camundongo nu fêmea, administrados intraperitonealmente três vezes por semana ou com pepticorpo 2xCon4(C), dado subcutaneamente em programas de dosagem múltipla em estudos de duração prolongada diferentes (≥ 10 semanas de dosagem) tanto no modelo de xenoenxerto A431 quanto Colo-205. CR como aqui usado refere-se a um resultado em que nenhum tumor mensurável permaneceu a seguir do tratamento. Os resultados estão apresentados na Figura 9.

Exemplo 19

a) Combinação de Pb com Taxotere no Modelo de Tumor Colo-205

Camundongos nus fêmeas foram injetados subcutaneamente com 2 x 10^6 células Colo-205 mais Matrigel (2:1) no dia 0 do estudo. No dia 14 do estudo, os tratamentos foram iniciados com a) 350 μg/camundongo, s.c. duas vezes por semana, do pepticorpo Ang-2 2xCon4-C, b) 20 mg/kg de qwx3 i.p. de taxotere ou c) uma combinação de ambos. Os volumes de tumor e os pesos corpóreos foram registrados em intervalos regulares. Diferenças significantes no crescimento do tumor foram observadas entre todos os grupos de tratamento versus controle de veículo ($p < 0,0001$ usando ANOVA de medição repetida, com teste *post hoc* de Scheffe). Além disso, o grupo de terapia de combinação foi significantemente diferente do que cada um dos agentes de monoterapia ($p < 0,0001$ vs. 2 xCon-4-C e $p = 0,0122$ vs taxotere). A linha tracejada representa uma redução do n total do grupo, de 10 para 9 camundongos, devido à morte de um camundongo por razões desconhecidas. O tratamento com estes pepticorpos não teve nenhum efeito significante sobre os pesos corpóreos. Os resultados estão apresentados na Figura 10a.

b) Combinação de Pb com 5-FU no Modelo de Tumor Colo-205

Camundongos nus fêmeas foram injetados subcutaneamente com 2 x 10^6 células Colo-205 mais Matrigel (2:1) no dia 0 do estudo. No dia 14 do estudo os tratamentos iniciaram com a) 350 µg/camundongo, s.c. duas vezes por semana, do pepticorpo de Ang-2 2xCon4-C, b) 50 mg/kg qdx5 i.p. de 5-FU ou c) uma combinação de ambos. Os volumes de tumor e pesos corpóreos foram registrados em intervalos regulares, como mostrado.

Diferenças significantes no crescimento do tumor foram observadas entre todos os grupos de tratamento versus controle de veículo ($p < 0,0001$ usando ANOVA de medição repetida, com teste *post hoc* de Scheffe). Além disso, o grupo de terapia de combinação foi significantemente diferente do que cada um dos agentes de monoterapia ($p = 0,0375$ vs. 2xCon-4-C e $p = 0,0453$ vs. 5-FU). Uma redução transitória no peso corpóreo foi observada no grupo tratado com 5-FU (18 % no dia 20 do estudo) assim como com o grupo da terapia de combinação (16 % no dia 20 do estudo), seguido por uma recuperação completa dos pesos corpóreos. Os resultados estão apresentados na Figura 10b.

Exemplo 20

Modelo de Artrite de Adjuvante

Ratos Lewis machos (120 a 130 g, Charles River, Wilmington MA) foram alojados dois por gaiola tampada com filtro em uma sala ambientalmente controlada (temperatura 23 ± 2° C, umidade relativa 50 ± 20 %) em um ciclo de 12 horas de luz/escuro. Os animais foram alimentados com uma ração de roedor comercial (Formulação 8640; Tek Lab, Madison, WI) e receberam água de torneira purificada em filtro *ad libitum*. Os teores de cálcio e fósforo da dieta foram 1,2 % e 1,0 %, respectivamente.

A artrite de adjuvante foi induzida por uma única injeção de 0,5 mg de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra mortos por calor (Difco Laboratories, Detroit, MI) colocados em suspensão em 0,05 ml de óleo de

parafina (Crescent Chemical Co., Hauppauge, NY) intradermicamente na base da cauda. O início clínico da artrite foi no dia 9 como indicado pelo intumescimento da para traseira e dificuldades ambulatórias. Exceto no grupo tratado com 2xCon4(c) (que foi tratado a partir do Dia 1 depois da imunização), os tratamentos foram dados como injeções subcutâneas diárias começando no dia 9 depois da imunização (antes do início da artrite) e continuando até o dia 18.

Monitoramento Clínico da Artrite de Adjuvante.

A progressão da inflamação foi clinicamente avaliada pela medição intermitente do volume da pata traseira usando pletismografia aquosa de acordo com os métodos descritos por Feige *et al.*, Cellular Molec. Life Sci., 57: 1457 a 1470 (2000). A inibição da inflamação da pata foi calculada com base na área sob a curva (AUC) usando a regra trapezoidal de acordo com a fórmula:

[1 - {(AdA tratada) - normal) / (AdA não tratadas - normal)}] x 100

Além disso, o peso corpóreo total foi determinado diariamente durante o regime de tratamento de 9 dias como um ponto final suplementar por que a perda de peso corpóreo mostrou ser paralelo à progressão da inflamação da junta neste modelo de artrite. Os animais foram sacrificados sob CO_2 no dia 18.

A perda da densidade mineral óssea (BMD) foi examinada na necrópsia (dia 18 após a imunização). As patas traseiras foram removidas na linha da pele (exatamente próximo ao tornozelo (jarrete)), imerso em 70 % de etanol e depois varrido na orientação horizontal usando um densitômetro de raio X de feixe em forma de leque (Modelo QDR-4500A; Hologic, Waltham, MA). Ver Feige *et al.*, supra. Depois da varredura, uma caixa retangular (29 x 25 mm) centralizada no calcâneo foi posicionada para delinear o sítio a ser analisado e algoritmos patenteados (Hologic software) calcularam a área óssea, o teor mineral ósseo e a densidade mineral óssea.

PI0213223

Todos os resultados foram expressados como a média ± erro padrão. Um valor p de 0,05 foi usado para delinear as diferenças significantes entre os grupos. Um teste ANOVA de Kruskal-Wallis e um de Mann-Whitney U. usando software estatístico comercial (Statsoft v3.0; Statsoft, Tulsa, OK) foram realizados nos dados clínicos (variáveis contínuas).

Os resultados estão apresentados nas Figuras 11a, 11b e 11c, respectivamente.

Exemplo 21

Modelo de Angiogênese Córnea

Efeito de CON4(C) na Angiogênese induzida por VEGF em Ratos

O pepticorpo Ang-2 CON4(C) foi avaliado no modelo córneo de angiogênese em ratos. A angiogênese foi induzida implantando-se um disco de náilon embebido em VEGF (ou controle de BSA) no estroma córneo (n = 8/grupo). O pepticorpo TN8CON4-C foi administrado pela injeção sub-cutânea a 1,0 ou 0,1 mg/rato/dia durante sete dias. Dois outros grupos de animais foram tratados com a mesma dose de pepticorpo de controle negativo 4883. Todos os grupos foram pré tratados com uma única dose de carga de 3,0 ou 0,3 mg que foi três vezes a dose de manutenção de 1,0 ou 0,1 mg (ver Figura). Depois de sete dias de tratamento, dois pontos finais vasculares foram determinados a partir de cada imagem digital da córnea de rato: o número de vasos que intersectam o ponto central entre o disco e o limbo e a área de vasos sangüíneos. O tratamento com TN8CON4-C significantemente inibiu a angiogênese induzida por VEGF em uma maneira dependente da dose ($p < 0,04$), ao passo que o tratamento com o pepticorpo de controle não teve nenhum efeito significante em cada um dos pontos finais. Não houve evidência de toxicidade evidente com base nos pesos corpóreos dos animais tratados. Os resultados estão apresentados na Figura 12.

Exemplo 22

Mapeamento de Epítopo

Proteínas de Ang-2 humanas (hAng-2) de comprimento completo (aminoácidos de 1 a 495), de terminal N (aminoácidos de 1 a 254) e de terminal C (aminoácidos de 255 a 495) foram clonadas em um vetor de expressão mamífero direcionado com CMV com rótulos 6xHis de terminal C. As três construções resultantes mais um controle de vetor foram transitoriamente expressadas em células 293T. Os meios condicionados foram depois coletados a partir das células transfectadas e o nível de expressão de Ang-2 nos meios foi estimado pelo ELISA anti-6xhis e Western blotting.

O epítopo de ligação de anticorpos e pepticorpos anti-Ang-2 foi determinado pela sua capacidade para ligar-se às três versões de hAng-2 humano pelo ELISA de acordo com o seguinte protocolo: uma placa de ensaio de 96 reservatórios de alta ligação foi revestida com 100 µl de meio condicionado por reservatório e incubada a 37° C durante 1 hora. O meio condicionado foi aspirado e a placa foi bloqueada com 200 µl por reservatório de 5 % de BSA em PBS na temperatura ambiente durante 1 hora. A solução de bloqueio foi depois aspirada. 100 µl por reservatório de anticorpo, pepticorpo ou Tie2-Fc foram adicionados a 1 µg/ml em 1 % de BSA em PBS e incubados na temperatura ambiente durante 1 hora. Os reservatórios foram lavados 4 vezes com 200 µl de Tween a 0,1 % em PBS. 100 µl por reservatório de IgG anti-humano de cabra conjugado a HRP ou IgG anti-camundongo de cabra foram adicionados e incubados na temperatura ambiente durante 45 minutos. Os reservatórios foram depois lavados com 200 µl de Tween a 0,1 % em PBS 4 vezes. 100 µl por reservatório de substrato TMB foram depois adicionados. A O.D. foi lida a 370 nm.

Os resultados estão apresentados na Figura 13a, Figura 13b e Figura 13c.

Exemplo 23

Devido a certas limitações de sensibilidade inerentes no ensaio BiaCore, a afinidade de ligação também foi avaliada usando um ensaio de

PI0213223

Sepidyne KinExA.

A ligação de 2xCon4-C (Pb5714) à huAng-2 foi testada em KinExA (Sapidyne, Boise, ID). Pérolas Reacti-Gel 6x (Pierce, Rockford, IL) foram pré revestidas com huAng-2 e bloqueadas com BSA. Amostras com 10 pM e 30 pM de 2xCon4-C foram incubadas com várias concentrações (0,3 pM - 3 nM) de huAng-2 na temperatura ambiente durante 8 horas antes de conduzir através das pérolas revestidas com huAng-2. A quantidade do pepticorpo ligado à pérola foi quantificada pelo anticorpo anti-humano-Fc de cabra rotulado fluorescente (Cy5) (Jackson Imuno Research, West Grove, PA). O sinal de ligação é proporcional à concentração de pepticorpo livre no equilíbrio.

A constante de equilíbrio de dissociação (K_D) foi obtida a partir da regressão não linear das curvas de competição usando um modelo de ligação homogêneo de sítio único de curva dupla (software KinEx®). K_D foi depois determinada ser de aproximadamente 2 pM para a ligação de 2xCon4-C com huAng-2.

Como é mostrado na Figura 14, usando o ensaio KinExA o pepticorpo 2xCon4 mostrou ter ~2 pM de afinidade para hAng-2.

Exemplo 24

Peptídeos PEGuilados

O peptídeo L1-7 foi sintetizado com um sintetizador 431 ABI usando um protocolo de ligação padrão e a ligação dupla do resíduo 14 (met) ao resíduo 1 (Cys) do terminal N, a numeração do término N para o término C.

Conjugação de Peptídeo L1-7 com Metóxi-poli(etileno glicol)-maleimida; PM: 5 KDa; denominado "mPEG5K-(Peptídeo L1-7)"

Uma solução de 0,8 mg de peptídeo L1-7 em 400 µl de tampão 1 (20 mM de fosfato, 5 mM de EDTA, pH 6,5) foi tratada com 13,5 mg de metoxipoli(etileno glicol)-maleimida (PM = 5 KDa; Shearwater Corp.); 0,27

ml de uma solução 50,0 mg/ml em tampão 1. A mistura de reação foi incubada a 4° C durante a noite, depois diluída com 1,6 ml, de tampão A (20 mM de Tris cloridreto, pH 7,2) e dializada em um cassete Slide-A-Lyzer (3500 MWCO, Pierce) contra o mesmo tampão. A mistura de reação dializada foi purificada pela cromatografia de troca iônica em uma coluna de 1,0 ml HiTrap Q Sepharose HP (Amersham Biosciences Corp.). O pico do produto foi eluído em duas frações de 1,0 ml via um gradiente de 100 % de tampão A a 100 % de tampão B (tampão A + 0,5 M de NaCl) em 40 volumes da coluna. As frações de produto combinadas foram concentradas a 250 µl contendo 0,23 mg de proteína/ml com um Dispositivo Centrífugo NEcrosep IK (Pall Life Sciences).

Conjugação de Peptídeo L1-7 com 1,11-bis-maleimidotetraetilenoglicol; denominado "PEO4(Peptídeo L1-7)$_2$"

Uma solução de 1,0 mg de peptídeo L1-7 em 500 µl de tampão 1 (20 mM de fosfato, 5 mM de EDTA, pH 6,5) foi tratada com 0,0375 mg de 1,11-bismaleimidotetraetilenoglicol (Pierce) (0,375 ml de uma solução 0,1 mg/ml em tampão 1). A mistura de reação foi incubada a 4° C durante 3,33 horas, depois de dializada em um cassete Slide-A-Lyzer (3500 MWCO, Pierce) contra tampão A (20 mM de Tris cloridreto, pH 7,2). A mistura de reação dializada foi purificada pela cromatografia de troca iônica em uma coluna de 1,0 ml HiTrap Q Sepharose HP (Amersham Biosciences Corp.). O pico de produto dimérico foi eluído em três frações de 1,0 ml via um gradiente de 100 % de tampão A a 100 % de tampão B (tampão A + 0,5 M de NaCl) em 40 volumes da coluna. As frações de produto combinadas foram concentradas a 550 µl contendo 0,12 mg de proteína/ml com um Dispositivo Centrífugo Microsep 1 K (Pall Life Sciences).

Conjugação de Peptídeo L1-7 com Poli(etilene glicol)-bis-maleimida: PM 3,4 KDa; denominado "PEG3.4K(Peptídeo L1-7)$_2$"

Uma solução de 3,0 mg de Peptídeo L1-7 em 1,5 ml de tampão

PI0213223

1 (20 mM de fosfato, 5 mM de EDTA, pH 6,5) foi tratado com 1,125 mg de poli(etilene glicol)-bis-maleimida (PM = 3,4 KDa, Shearwater Corp.); 0,563 ml de uma solução 2,0 mg/ml em tampão 1. A mistura de reação foi incubada a 0° C durante a noite, depois de dializado em um cassete Slide-A-Lyzer (3500 MWCO, Pierce) contra tampão A (20 mM de Tris cloridreto, pH 7,2). A mistura de reação dializada foi purificada pela cromatografia de troca iônica em uma coluna de 5,0 ml HiTrap Q Sepharose HP (Amersham Biosciences Corp.). O pico do produto foi eluído em três frações de 3,0 ml via um gradiente de 100 % de tampão A a 100 % de tampão B (tampão A + 0,5 M de NaCl) em 40 volumes de coluna. As frações de produto combinadas foram concentradas a 850 µl contendo 0,24 mg de proteína/ml com dois Dispositivos Centrífugos NEcrosep 1K (Pall Life Sciences).

Os resultados de espectroscopia de massa MALDI-TOF foram como segue:

Amostra #	Identidade	Exp. MS	Obs. MS
1	L1-7 (Peptídeo não PEGuilado)	3.545	3.538,7
2	mPEG5K-(Peptídeo L1-7)	8.500	8.851
3	PEO4(Peptídeo L1-7)$_2$	7.443	7.446,29
4	PEG3.4K(Peptídeo L1-7)$_2$	10.550	10.552 6.882,61 3.550,13

Será avaliado que o "2" subscrito para o PEG3.4K(Peptídeo L1-7) e PEO4(Peptídeo L1-7) indica que existem dois peptídeos por cadeia polimérica, uma localizado em cada extremidade do polímero.

Determinação de IC_{50}

A IC_{50} para a inibição da interação hAng2:hTie2-Fc para os peptídeos L1-7 livre e PEGuilado foi determinada pelo ELISA de Neutralização como descrito no Exemplo 2. Para o ELISA de Neutralização, as placas de microtítulo às quais o polipeptídeo humano de Ang-2 foi ligado foram preparadas como descrito no Exemplo 2 para o ELISA de Afinidade. Os peptídeos L1-7 anti-Ang-2 PEGuilados e livres candidatos foram titulados a partir de 1000 nM a 0,2 pM em diluições de 4 vezes em uma solução de

PBS contendo cerca de 1 % de BSA e cerca de 1 nM de Tie-2 (fornecida como uma molécula de Tie-2-Fc onde a porção Tie-2 contém apenas a porção extracelular solúvel da molécula; R&D Systems, número de catálogo 313-TI). Depois que cerca de 100 microlitros da solução de anticorpo/Tie-2 foram adicionados a cada reservatório, as placas foram incubadas durante a noite na temperatura ambiente e depois lavadas cinco vezes em PBS contendo cerca de 0,1 por cento de Tween-20. Depois da lavagem, cerca de 100 microlitros por reservatório de anticorpo anti-Tie-2 (Pharmingen Inc., catálogo # 557039) foram adicionados a uma concentração final de cerca de 1 micrograma por ml e as placas foram incubadas cerca de 1 hora na temperatura ambiente. Em seguida, cerca de 100 microlitros por reservatório de IgG-BRP anti-camundongo de cabra (Pierce Chemical CO., catálogo # 31432) foram adicionados a uma diluição de 1:10.000 em PBS contendo cerca de 1 por cento de BSA. As placas foram incubadas na temperatura ambiente durante cerca de 1 hora, depois do que elas foram lavadas cinco vezes com PBS contendo cerca de 0,1 por cento de Tween-20. Cerca de 100 microlitros por reservatório de substrato TMB (descrito acima) foram depois adicionados e a cor foi deixada desenvolver. A absorbância foi depois lida em um espectrofotômetro a 370 nm.

Os peptídeos L1-7 (C-GGGGG-AQ-TNFMPMDDLEQRLYEQ FILQQG-LE) (SEQ ID NO: 359) incluíram: uma Cisteína de terminal N para ligar ao PEG; e um ligador 5Gly. As seqüências flanqueadoras AQ e LE estavam presentes tanto no clone de fago original quanto no pepticorpo. Os resultados da IC_{50} da inibição de hAng-2:Tie2 foram como segue:

Peptídeo	IC_{50} (nM)
Peptídeo L1-7	0,49
mPEG5K-(Peptídeo L1-7)	11,7
PEO4(Peptídeo L1-7)$_2$	0,064
PEG3.4K(Peptídeo L1-7)$_2$	0,058

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácido selecionado do grupo que consiste da SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 76 à SEQ ID NO: 118, inclusive, em que o dito polipeptídeo é capaz de ligar-se à Ang-2 e sais deste fisiologicamente aceitáveis, e em que o polipeptídeo compreende um domínio Fc, mas excluindo polipeptídeos compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 25 em que o Fc possui a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 60;

PEPTÍDEO	SEQ ID NO.	SEQÜÊNCIA DE PEPTÍDEO
Con4-44	76	PIRQEECDWDPWTCEHMWEV
Con4-40	77	TNIQEECEWDPWTCDHMPGK
Con4-4	78	WYEQDACEWDPWTCEHMAEV
Con4-31	79	NRLQEVCEWDPWTCEHMENV
Con4-C5	80	AATQEECEWDPWTCEHMPRS
Con4-42	81	LRHQEGCEWDPWTCEHMFDW
Con4-35	82	VPRQKDCEWDPWTCEHMYVG
Con4-43	83	SISHEECEWDPWTCEHMQVG
Con4-49	84	WAAQEECEWDPWTCEHMGRM
Con4-27	85	TWPQDKCEWDPWTCEHMGST
Con4-48	86	GHSQEECGWDPWTCEHMGTS
Con4-46	87	QHWQEECEWDPWTCDHMPSK
Con4-41	88	NVRQEKCEWDPWTCEHMPVR
Con4-36	89	KSGQVECNWDPWTCEHMPRN
Con4-34	90	VKTQEHCDWDPWTCEHMREW
Con4-28	91	AWGQEGCDWDPWTCEHMLPM
Con4-39	92	PVNQEDCEWDPWTCEHMPPM
Con4-25	93	RAPQEDCEWDPWTCAHMDIK
Con4-50	94	HGQNMECEWDPWTCEHMFRY
Con4-38	95	PRLQEECVWDPWTCEHMPLR
Con4-29	96	RTTQEKCEWDPWTCEHMESQ
Con4-47	97	QTSQEDCVWDPWTCDHMVSS
Con4-20	98	QVIGRPCEWDPWTCEHLEGL
Con4-45	99	WAQQEECAWDPWTCDHMVGL
Con4-37	100	LPGQEDCEWDPWTCEHMVRS
Con4-33	101	PMNQVECDWDPWTCEHMPRS
AC2-Con4	102	FGWSHGCEWDPWTCEHMGST
Con4-32	103	KSTQDDCDWDPWTCEHMVGP
Con4-17	104	GPRISTCQWDPWTCEHMDQL
Con4-8	105	STIGDMCEWDPWTCAHMQVD
AC4-Con4	106	VLGGQGCEWDPWTCRLLQGW
Con4-1	107	VLGGQGCQWDPWTCSHLEDG
Con4-C1	108	TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG

Con4-21	109	TKGKSVCQWDPWTCSHMQSG
Con4-C2	110	TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG
Con4-18	111	WVNEVVCEWDPWTCNHWDTP
Con4-19	112	VVQVGMCQWDPWTCKHMRLQ
Con4-16	113	AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV
Con4-11	114	QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR
Con4-C4	115	TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG
Con4-23	116	TSQRVGCEWDPWTCQHLTYT
Con4-15	117	QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS
Con4-9	118	GTSPSFCQWDPWTCSHMVQG
TN8-Con4*	4	QEECEWDPWTCEHM

2. Polipeptídeo acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente pelo menos um de polietileno glicol, um lipídeo, um grupo colesterol, um carboidrato e um oligossacarídeo.

3. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é cíclico.

4. Dímero ou multímero, caracterizado pelo fato de que são dos polipeptídeos como definidos na reivindicação 1.

5. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que codifica uma composição de matéria como definida na reivindicação 1.

6. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo como definido na reivindicação 5.

7. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor de expressão como definido na reivindicação 6 e ser uma célula procariótica.

8. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a célula é uma célula de *E. coli*.

9. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade eficaz de um polipeptídeo como definido na reivindicação 1 em mistura com um portador farmaceuticamente aceitável desta.

10. Uso de uma composição como definida na reivindicação 9, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para inibir a angiogênese indesejada em um mamífero.

11. Uso de uma composição como definida na reivindicação 9, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para tratar a angiogênese em um paciente.

12. Uso de uma composição como definida na reivindicação 9, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para modular a angiogênese em um mamífero.

13. Uso de uma composição como definida na reivindicação 9, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para inibir o crescimento de tumor distinguido pela angiogênese indesejada em um mamífero.

14. Uso de uma composição como definida na reivindicação 9 e um agente quimioterapêutico, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para tratar câncer em um mamífero.

15. Uso de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o agente quimioterapêutico é pelo menos um de 5-FU, CPT-11 e Taxotere.

16. Uso de uma composição como definida na reivindicação 9, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para modular pelo menos um dentre permeabilidade vascular ou vazamento de plasma em um mamífero.

17. Uso de uma composição como definida na reivindicação 16, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para tratar pelo menos um dentre doença neovascular ocular, obesidade, hemangioblastoma, hemangioma, arteriosclerose, doença inflamatória, distúrbios inflamatórios, aterosclerose, endometriose, doença neoplástica, doença relacionada com o osso ou psoríase em um mamífero.

18. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a doença inflamatória é artrite.

FIG.1

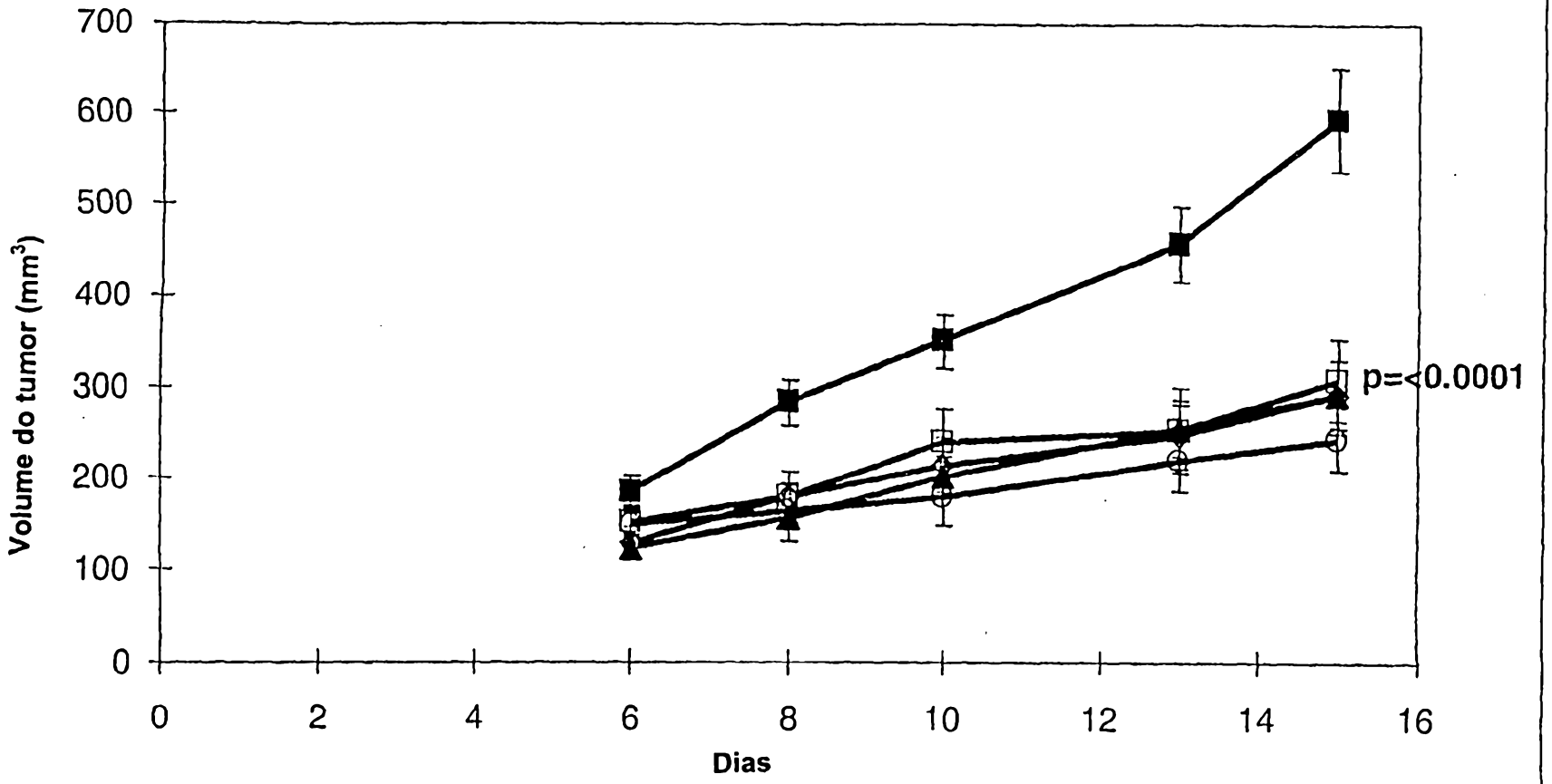
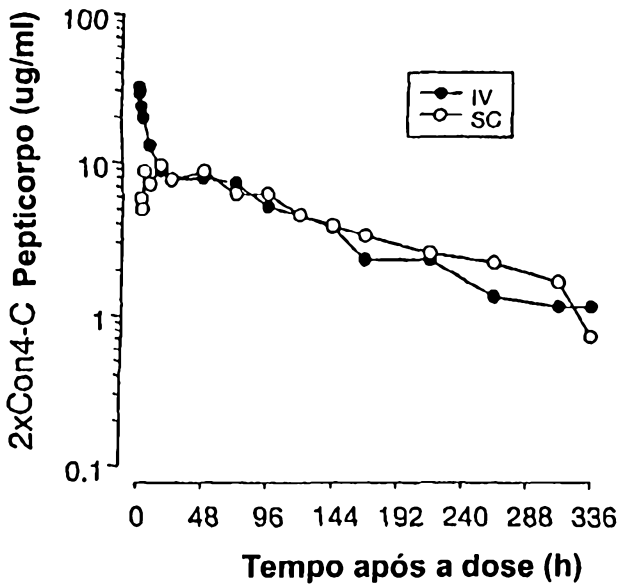

700
600
500
400
300
200
100
0
Volume do tumor (mm3)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Dias
p=<0.0001
1: Controle de Veículo
2: TN8-Con4 (C) (1 mg)
3: TN8-Con4 (C) (200 ug)
4: TN8-Con4 (C) (40 ug)
5: TN8-Con4 (C) (8 ug)

FIG.2

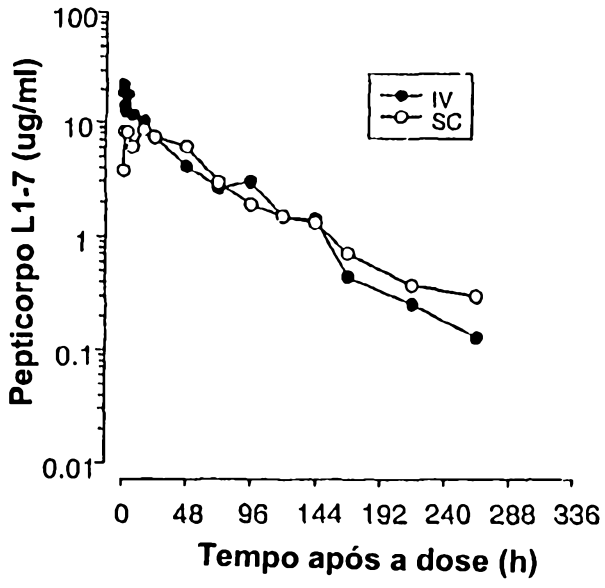
Pepticorpo PK em Camundongos (dose de 50 ug)

2xCon4-C



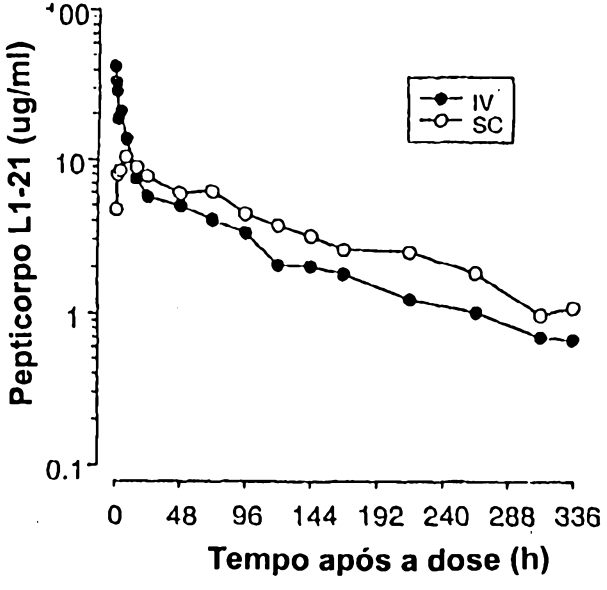
$t_{1/2}$ = 101 hrs
AUC_{inf} = 1545 ug*h /ml
Biodisp (s.c.) = 96 %

L1-7-N



$t_{1/2}$ = 49 hrs
AUC_{inf} = 679 ug*h /ml
Biodisp (s.c.) = 95 %

L1-21-N



$t_{1/2}$ = 105 hrs
AUC_{inf} = 1185 ug*h /ml
Biodisp (s.c.) = 124 %

FIG.3

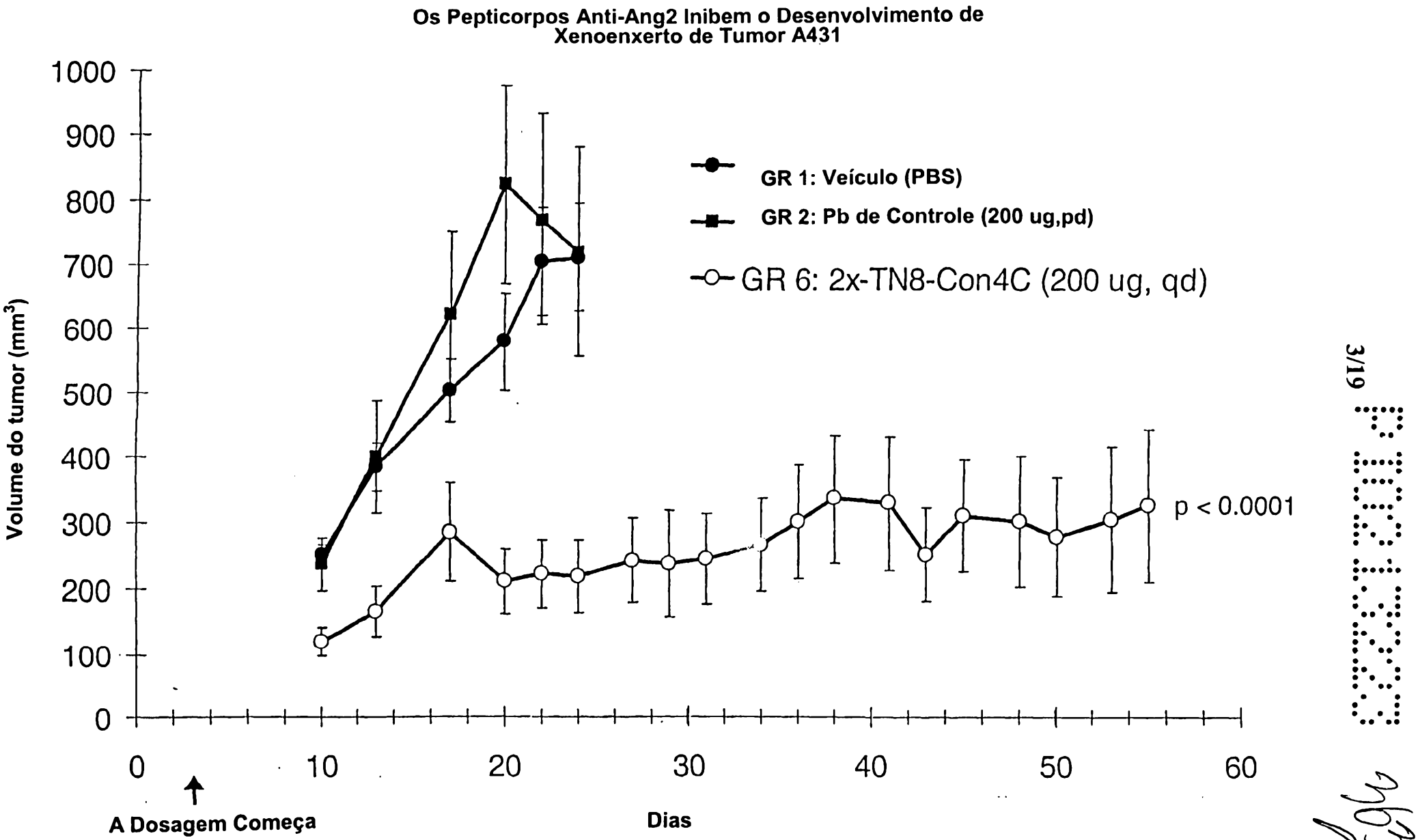

Os Pepticorpos Anti-Ang2 Inibem o Desenvolvimento de Xenoenxerto de Tumor A431
Volume do tumor (mm3)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
60
Dias
A Dosagem Começa
GR 1: Veículo (PBS)
GR 2: Pb de Controle (200 ug,pd)
GR 6: 2x-TN8-Con4C (200 ug, qd)
p < 0.0001

FIG.4

O Pepticorpo Anti-Ang2 a 1 mg/ml não tem Nenhum Efeito sobre o Desenvolvimento de Células A431 Cultivadas

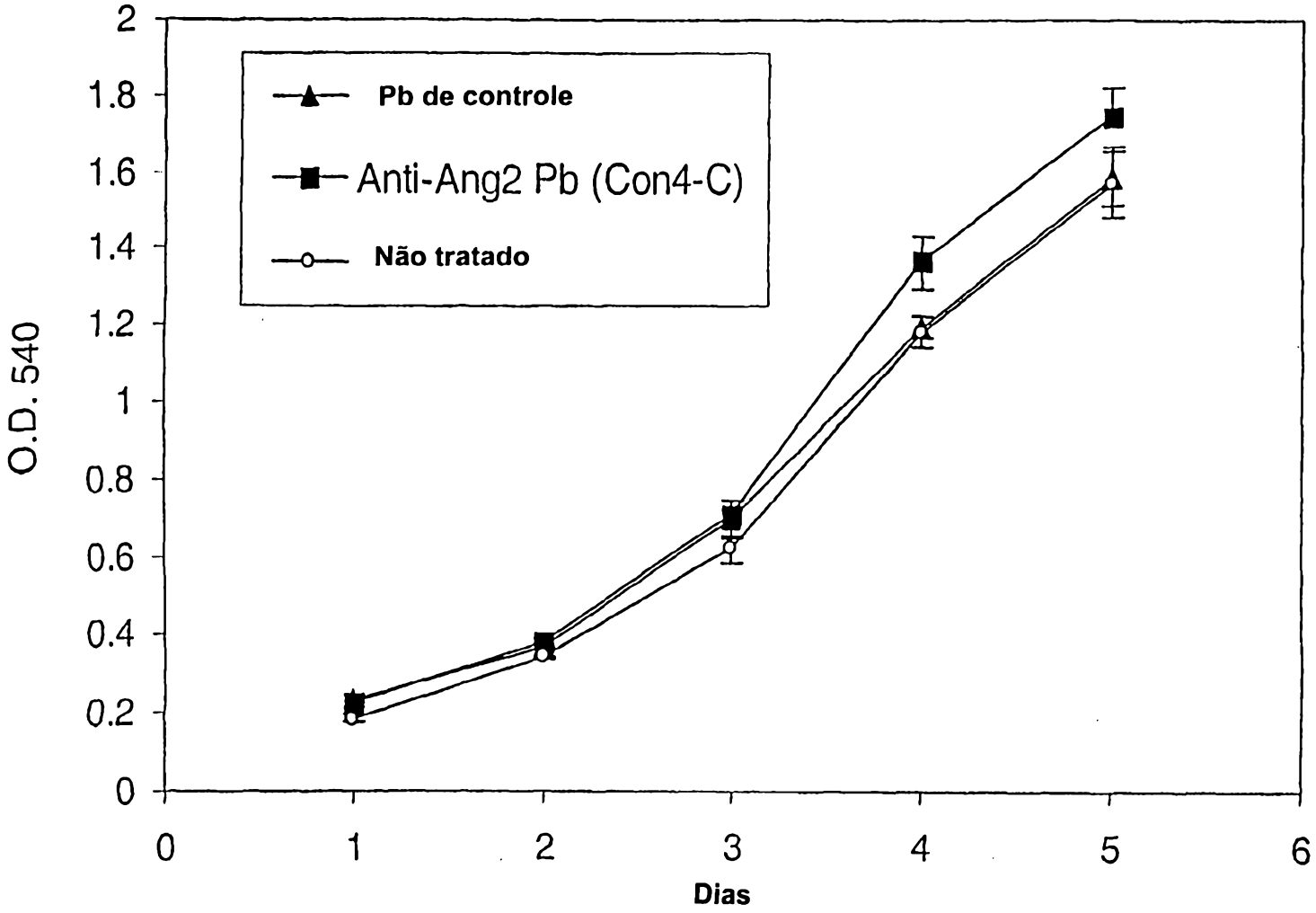


FIG.5

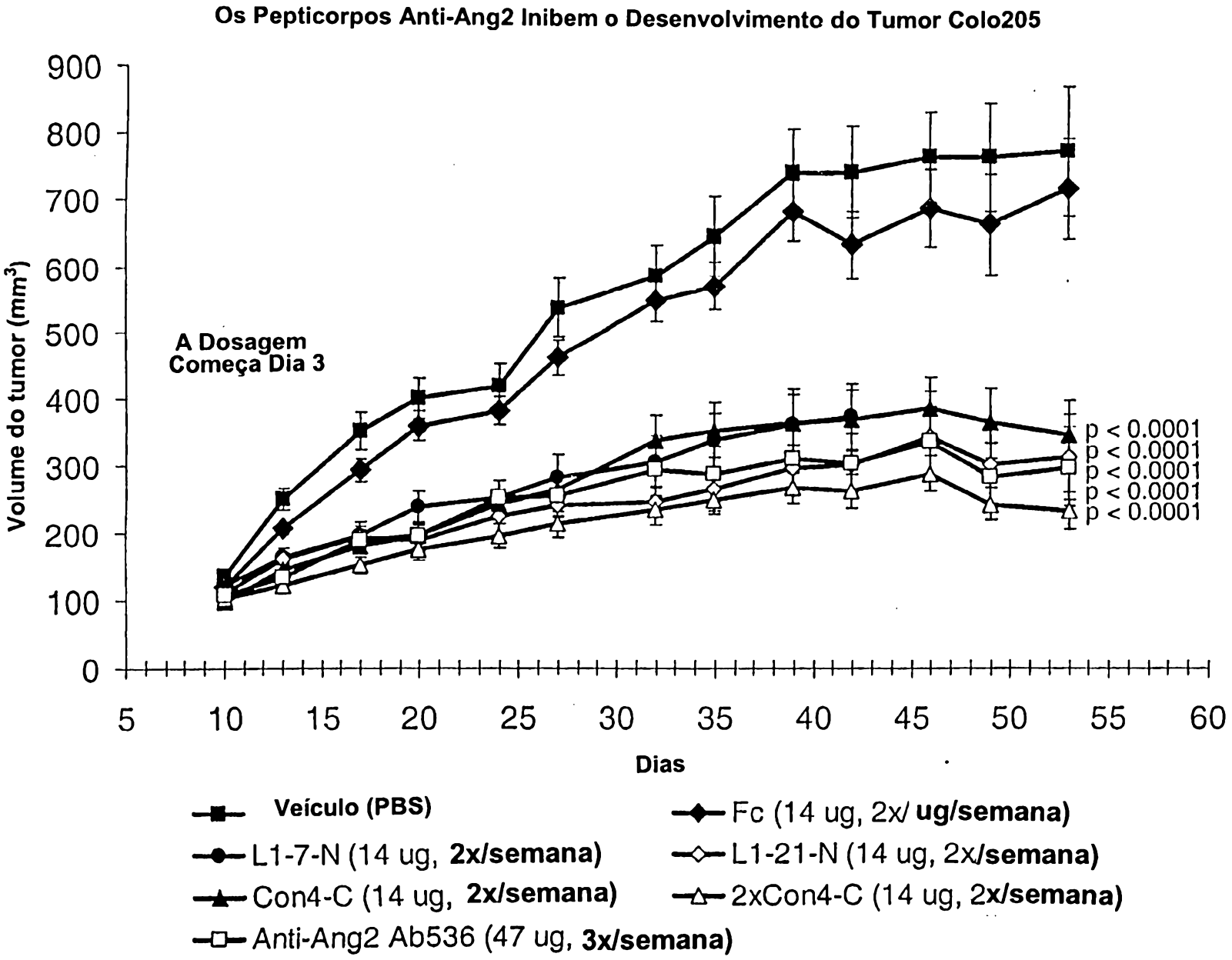
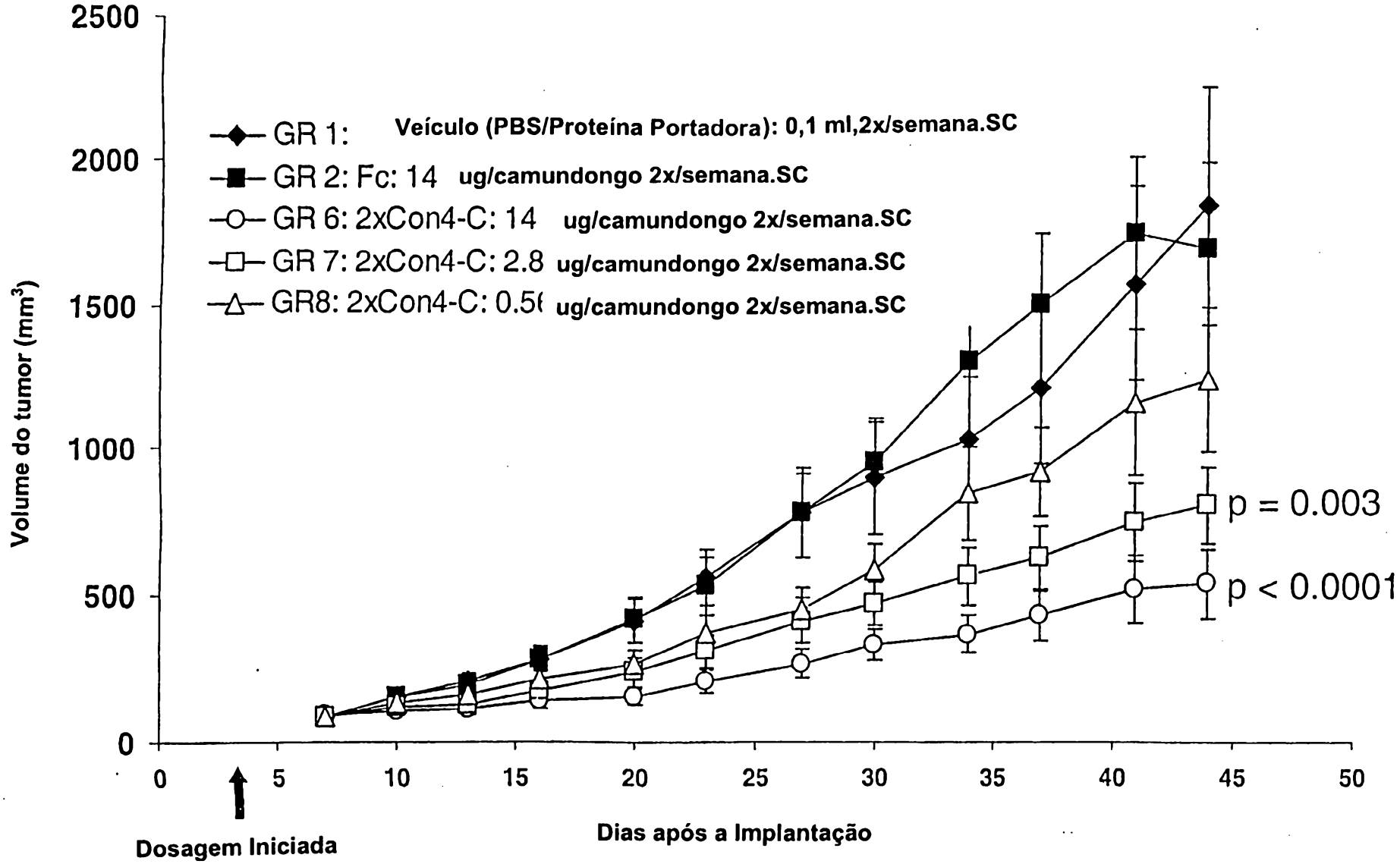

Os Pepticorpos Anti-Ang2 Inibem o Desenvolvimento do Tumor Colo205
Volume do tumor (mm³)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
A Dosagem
Começa Dia 3
p < 0.0001
p < 0.0001
p < 0.0001
p < 0.0001
p < 0.0001
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Dias
Veículo (PBS)
Fc (14 ug, 2x/ ug/semana)
L1-7-N (14 ug, 2x/semana)
L1-21-N (14 ug, 2x/semana)
Con4-C (14 ug, 2x/semana)
2xCon4-C (14 ug, 2x/semana)
Anti-Ang2 Ab536 (47 ug, 3x/semana)

FIG.6

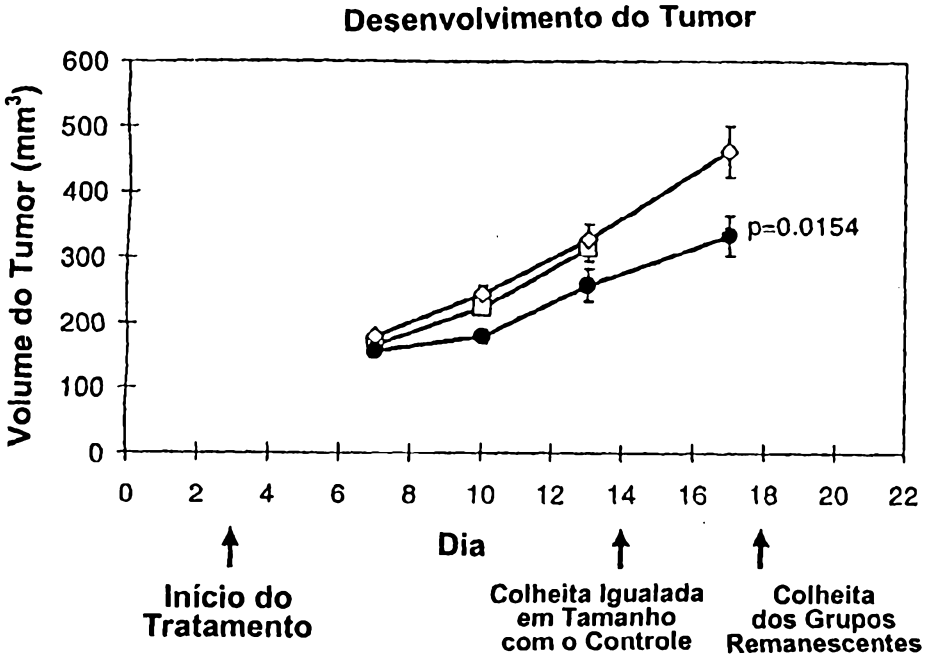
Os Pepticorpos Anti-Ang2 Inibem o Desenvolvimento do Tumor Colo205

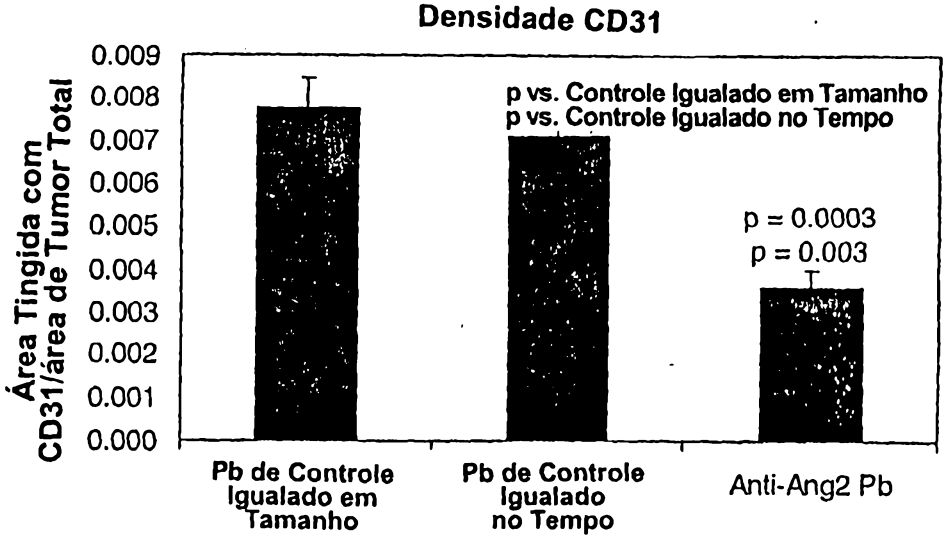


6/19

FIG.7

A Terapia de Pepticorpo Anti-Ang-2 Reduz a Densidade de Tingimento com CD31 de Xenoenxertos de Tumor Colo205





-□- **Pepticorpo de Controle 350 ug/dia (igualado no tamanho)**

-◇- **Pepticorpo de Controle 350 ug/dia (igualado no tempo)**

-●- Anti-Ang2 Pb (2xCon4C) **350 ug/dia**

FIG.8

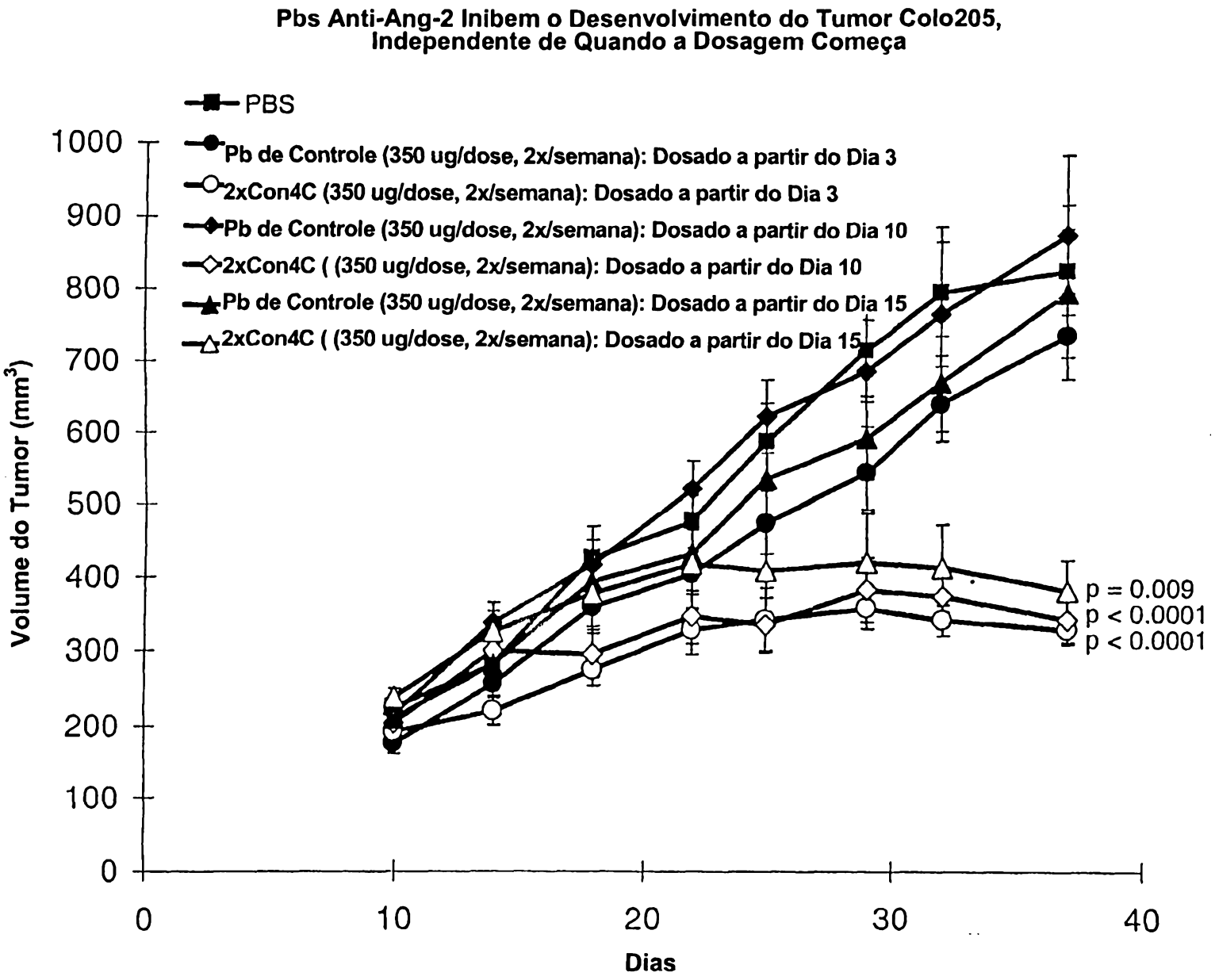

Pbs Anti-Ang-2 Inibem o Desenvolvimento do Tumor Colo205, Independente de Quando a Dosagem Começa
PBS
Pb de Controle (350 ug/dose, 2x/semana): Dosado a partir do Dia 3
2xCon4C (350 ug/dose, 2x/semana): Dosado a partir do Dia 3
Pb de Controle (350 ug/dose, 2x/semana): Dosado a partir do Dia 10
2xCon4C ((350 ug/dose, 2x/semana): Dosado a partir do Dia 10
Pb de Controle (350 ug/dose, 2x/semana): Dosado a partir do Dia 15
2xCon4C ((350 ug/dose, 2x/semana): Dosado a partir do Dia 15
Volume do Tumor (mm3)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
Dias
p = 0.009
p < 0.0001
p < 0.0001

FIG.9

Taxas de Resposta Completa em Estudos de Dosagem de Longa Duração

Estudo	Modelo de Tumor	Terapia	Programa de dosagem	Duração da Dosagem (Semanas)	% CR
082801	A431	Ab 536	46.7 ug, **3x/semana**	10	60**
100201	A431	Ab 536	46.7 ug, **3x/semana**	11	40**
100201	A431	2xCon4-C	200 **ug/dia**	11	30**
100201	A431	2xCon4-C	40 **ug/dia**	11	0
100201	A431	2xCon4-C	8 **ug/dia**	11	20
012902	Colo205	Ab 536	46.7 ug, **3x/semana**	12	10
012902	Colo205	2xCon4-C	140 **ug/semana**	12	0
031802	Colo205	2xCon4-C	350 ug, **2x/semana**	10	20
111901	Colo205	Ab 536	46.7 ug, **3x/semana**	21	20
042602	Colo205	2xCon4-C	14 ug, **2x/semana**	11	21

*** em todos os estudos, a dosagem começa no Dia 3**

**** Medicamento retirado depois de alcançadas as CRs e nenhuma retomada no desenvolvimento do tumor foi observada. Acompanhamento médio de 15,3 semanas (faixa de 6 a 27 semanas)**

FIG.10a

Combinação de Pb com Taxotere no Modelo de Tumor Colo205

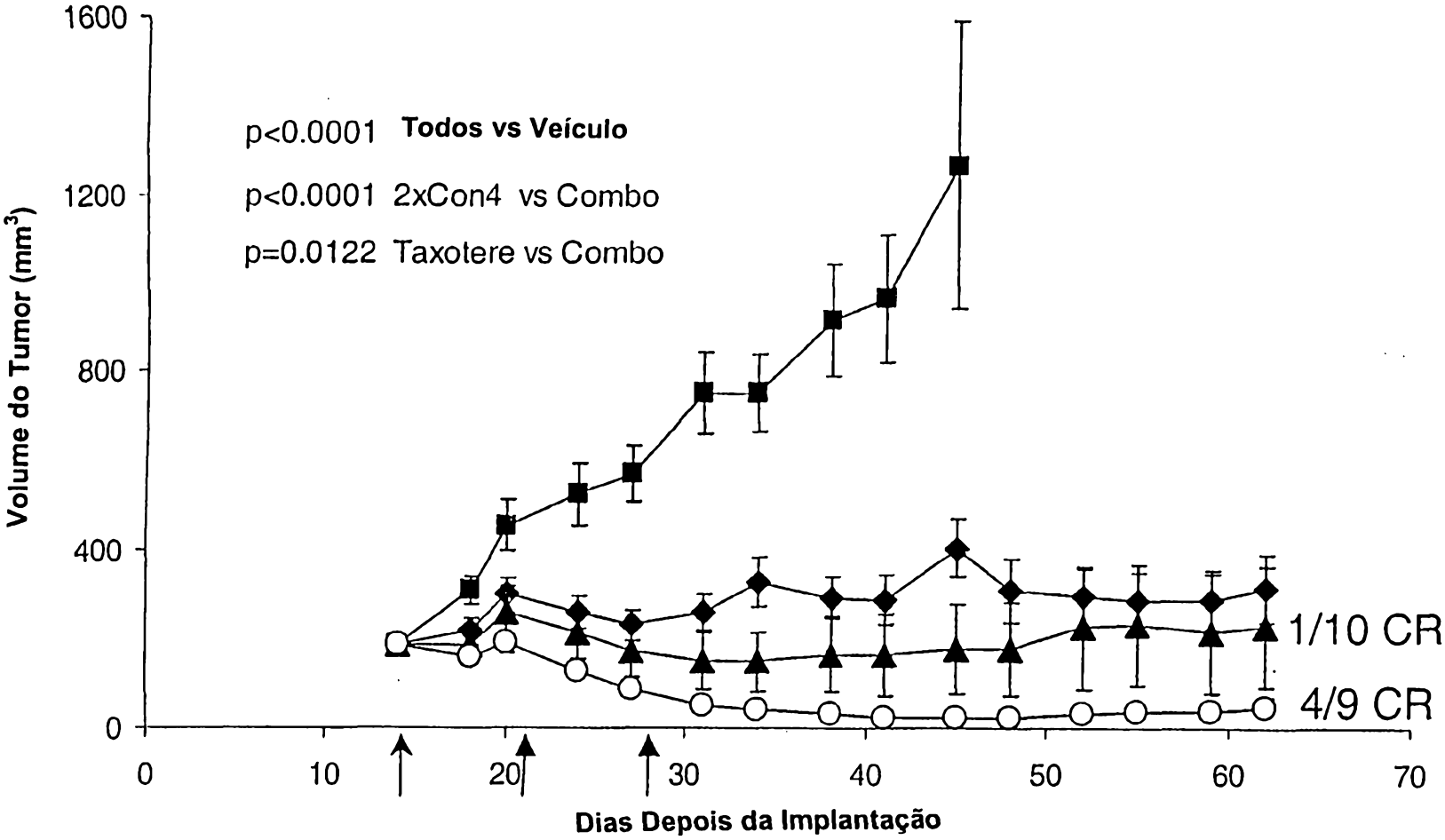
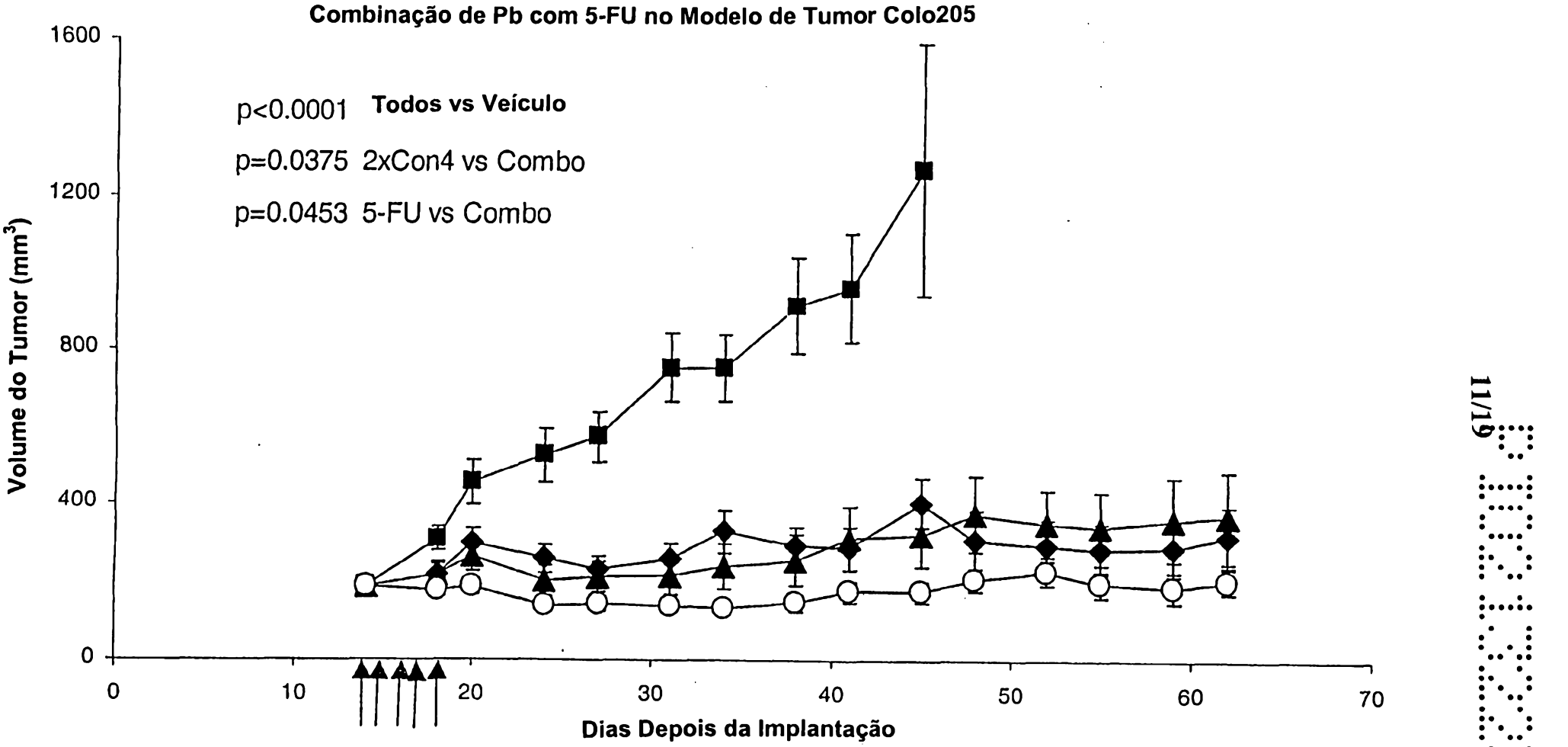


FIG.10b


Combinação de Pb com 5-FU no Modelo de Tumor Colo205
p<0.0001 Todos vs Veículo
p=0.0375 2xCon4 vs Combo
p=0.0453 5-FU vs Combo
Volume do Tumor (mm3)
1600
1200
800
400
0
0
10
20
30
40
50
60
70
Dias Depois da Implantação
GR 1: Veículo (PBS): 0.1ml, 2x/semana ,SC
GR 2: 2xCon4-C: 350 ug/camundongo, 2x/semana)
GR 4: 5-FU (50mg/kg, IP, QDx5) + PBS (0.1ml, 2x/semana ,SC
GR 7: 5-FU (50mg/kg, IP, QDx5) + 2x Con4-C (350 ug/camundongo, 2x/semana)

11/19

FIG.11a

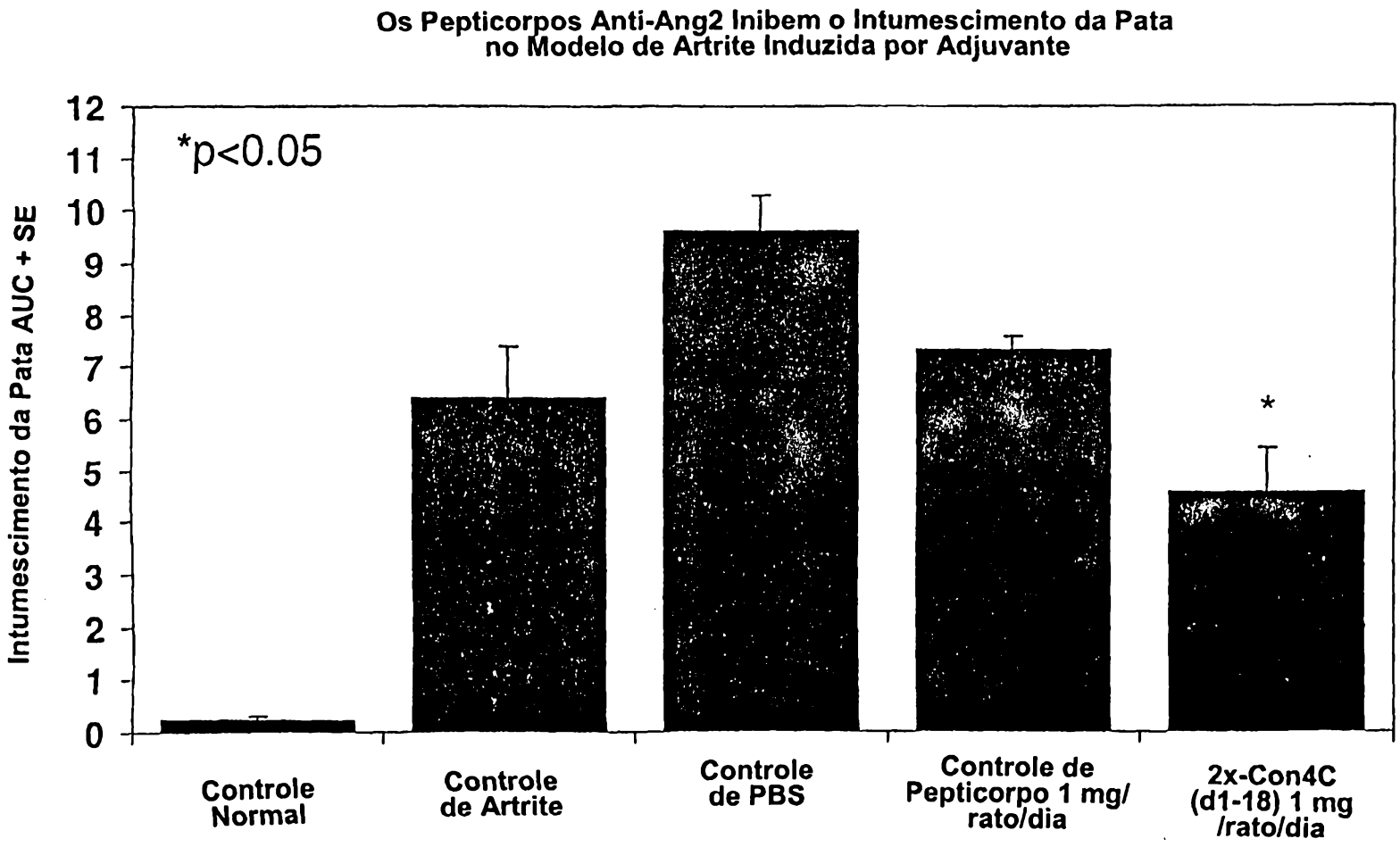
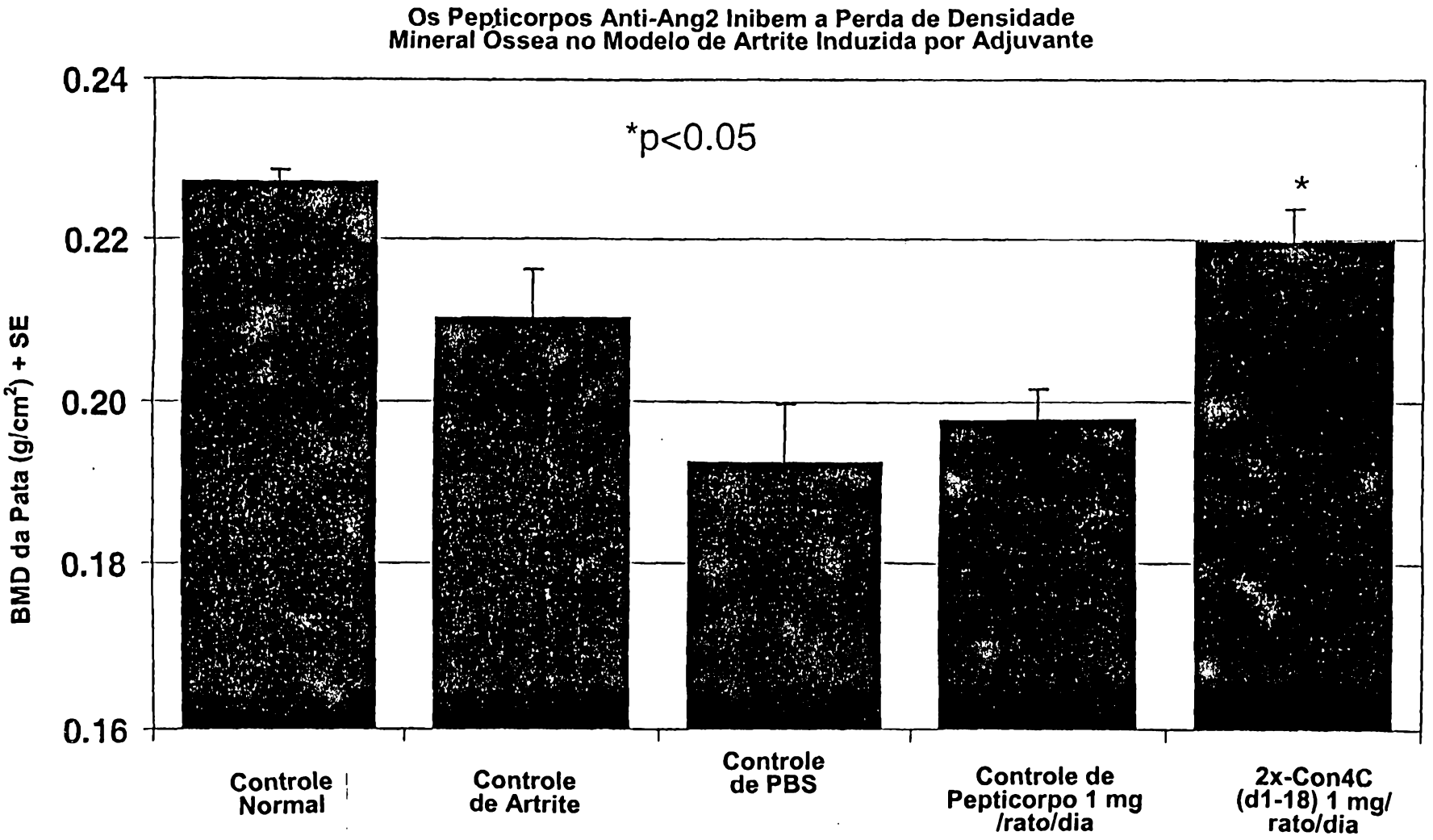

Os Pepticorpos Anti-Ang2 Inibem o Intumescimento da Pata
no Modelo de Artrite Induzida por Adjuvante
*p<0.05
Intumescimento da Pata AUC + SE
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
*
Controle Normal
Controle de Artrite
Controle de PBS
Controle de Pepticorpo 1 mg/ rato/dia
2x-Con4C (d1-18) 1 mg /rato/dia

FIG.11b


Os Pepticorpos Anti-Ang2 Inibem a Perda de Densidade Mineral Óssea no Modelo de Artrite Induzida por Adjuvante
*p<0.05
BMD da Pata (g/cm²) + SE
0.24
0.22
0.20
0.18
0.16
*
Controle Normal
Controle de Artrite
Controle de PBS
Controle de Pepticorpo 1 mg /rato/dia
2x-Con4C (d1-18) 1 mg/ rato/dia

P1021320

FIG.11c

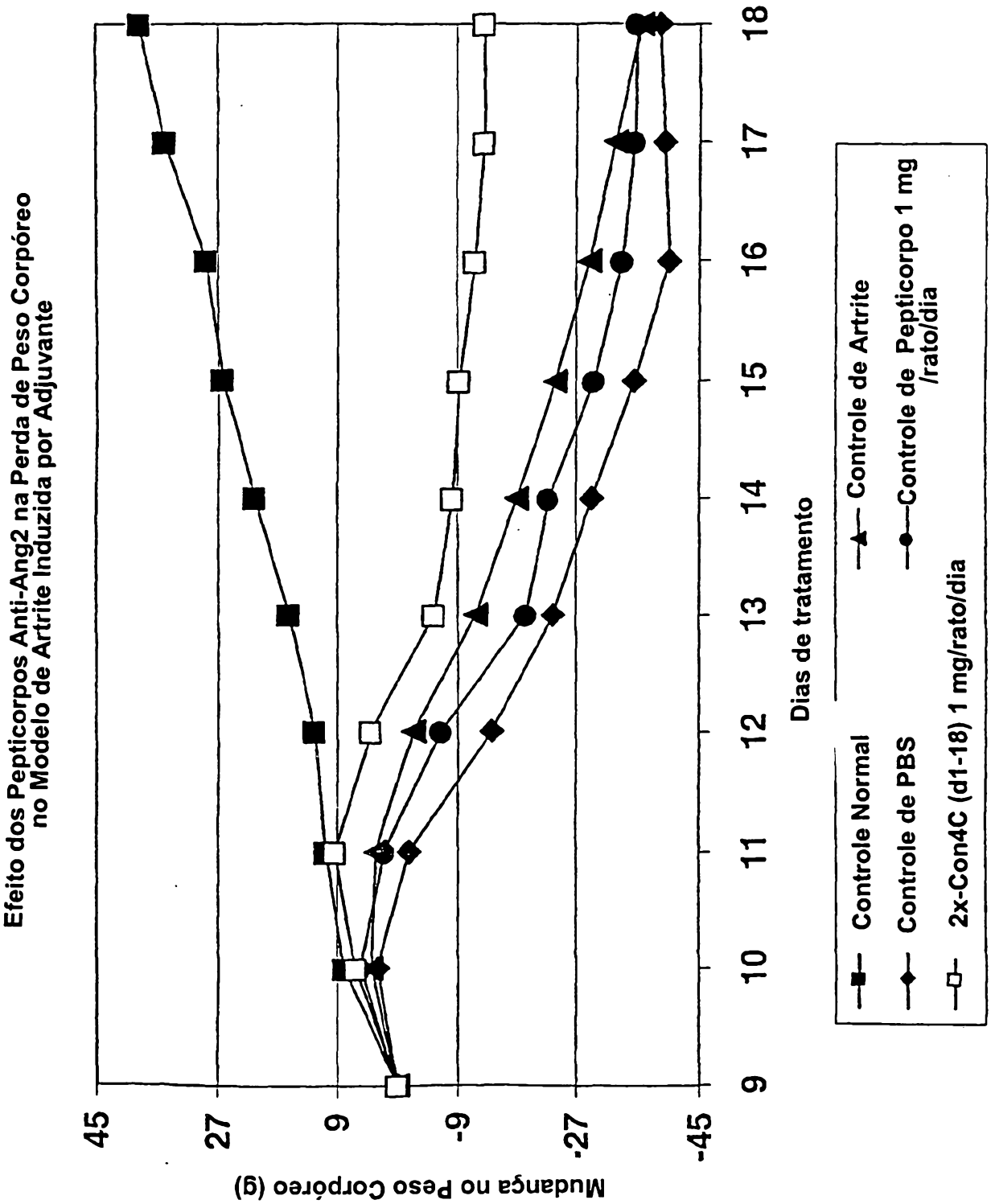
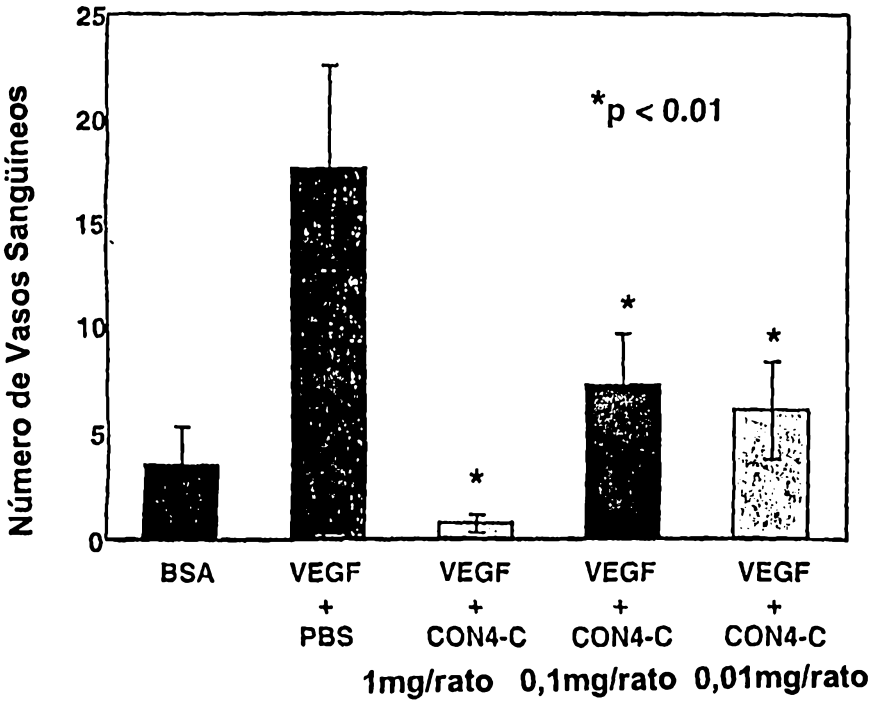


FIG.12

O Pepticorpo CON4-C Inibe a Angiogênese Córnea Induzida por VEGF



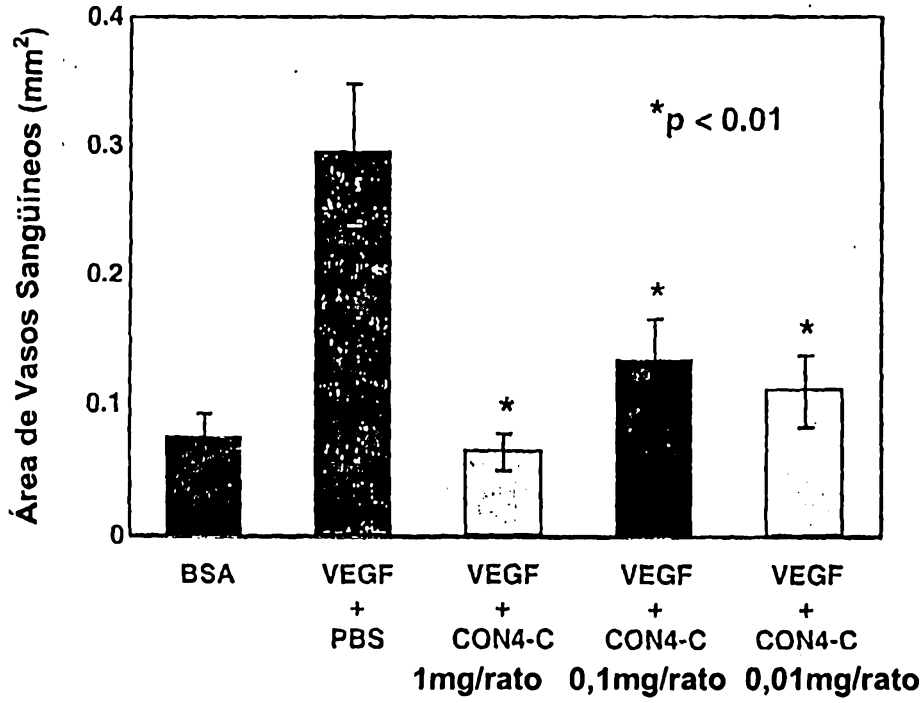


FIG.13a

Mapeamento de Epítopo

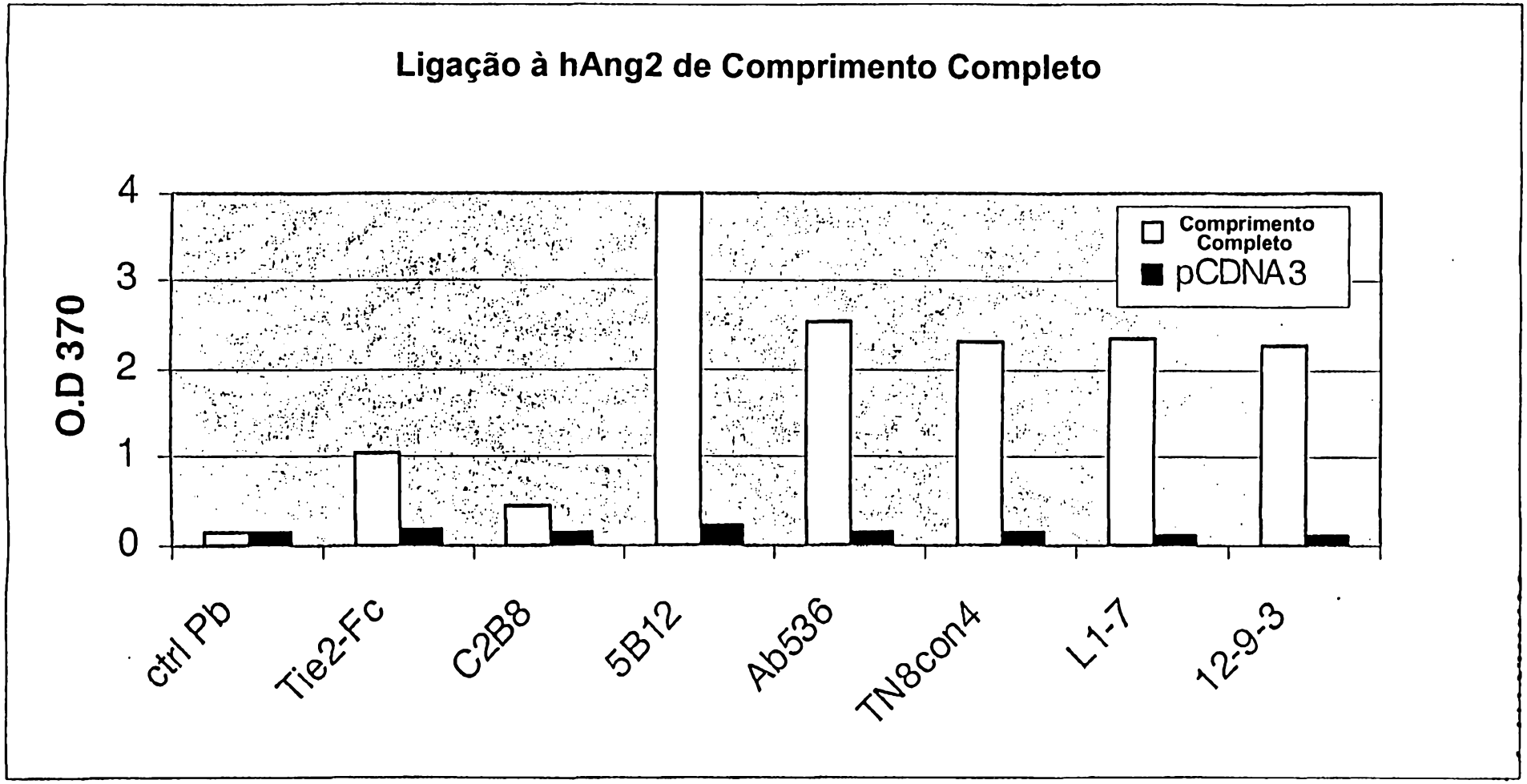


FIG.13b

Mapeamento de Epítopo

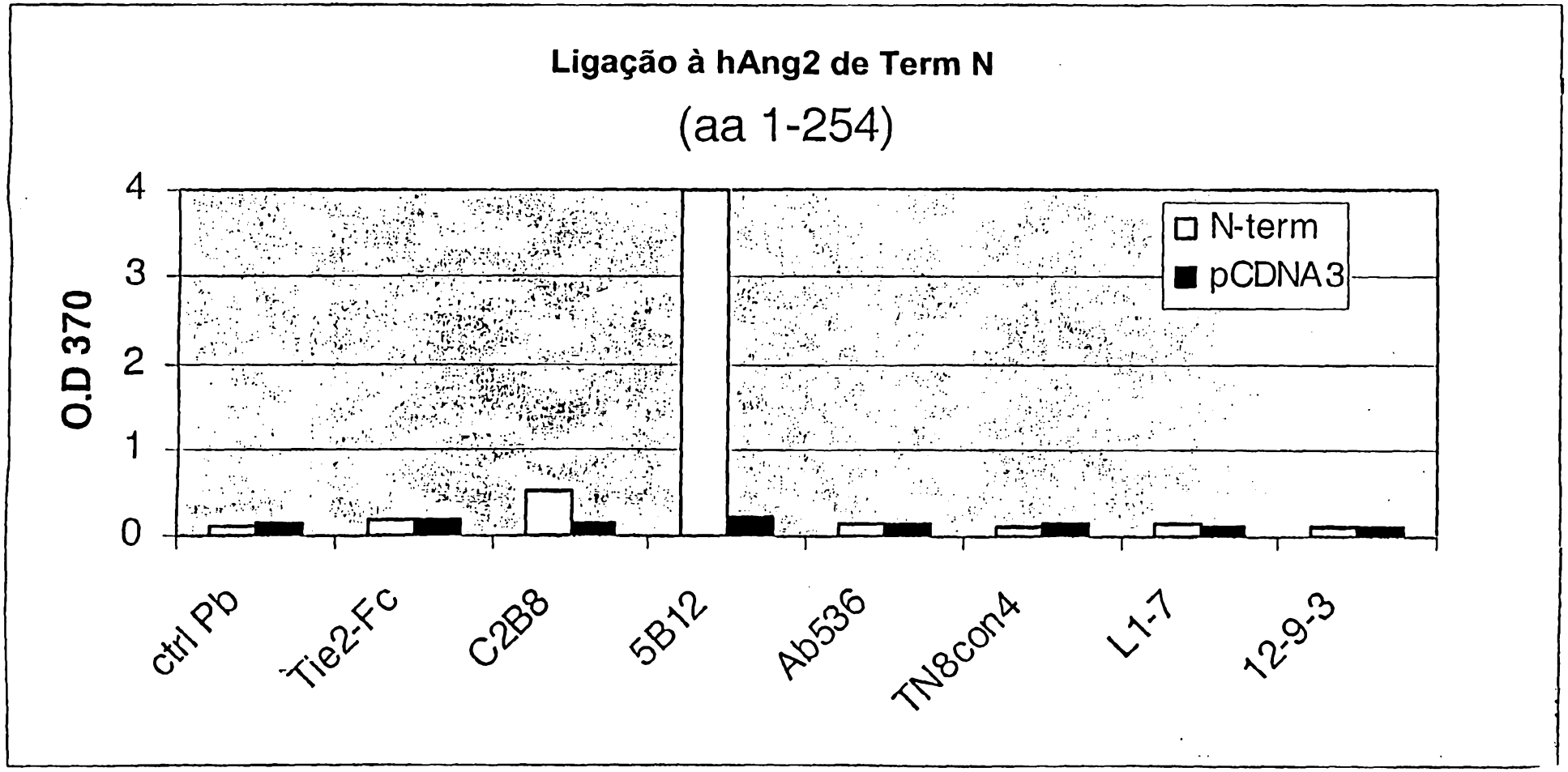
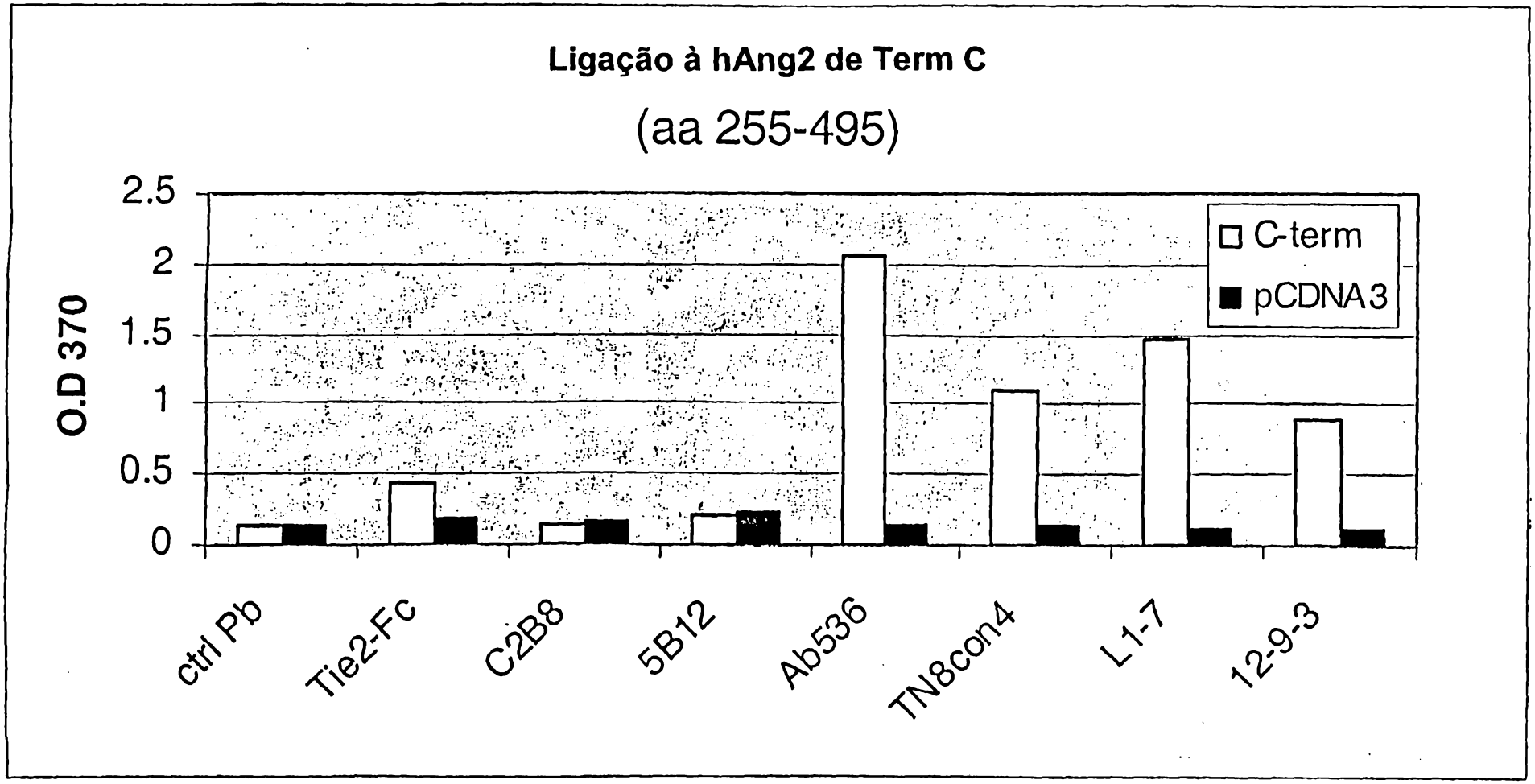


FIG.13c

Mapeamento de Epítopo



BR102013223

FIG.14

