



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

(11) PI 0609151-2 B1



(22) Data do Depósito: 24/03/2006

(45) Data de Concessão: 21/01/2020

(54) Título: MOLÉCULA DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO CAPAZ DE SE LIGAR A PLGF, USOS DA MESMA, LINHAGEM CELULAR DE HIBRIDOMA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E POLINUCLEOTÍDEO

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

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

(73) Titular(es): LIFE SCIENCES RESEARCH PARTNERS VZW; OXURION NV; VLAAMS INTERUNIVERSITAIR INSTITUT VOOR BIOTECHNOLOGIE VZW.

(72) Inventor(es): JEAN-MARIE STASSEN; PETER CARMELIET; DÉSIÉ COLLEN.

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

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

(85) Data do Início da Fase Nacional: 20/09/2007

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

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"MOLÉCULA DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO CAPAZ DE SE LIGAR A
PLGF, USOS DA MESMA, LINHAGEM CELULAR DE HIBRIDOMA,
COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E POLINUCLEOTÍDEO".**

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção refere-se a novos anticorpos e fragmentos e derivados desses particularmente adequados para a inibição de angiogênese em condições patológicas. A invenção também se refere a linhagens celulares que produzem anticorpos específicos. A presente invenção fornece composições farmacêuticas que compreendem anticorpos, fragmentos e/ou derivados da invenção e fornece métodos de prevenir e tratar angiogênese e/ou extravasamento vascular onde esses são indesejados tais como em formação de tumor, doenças do olho, hipertensão pulmonar e distúrbios inflamatórios e métodos para prevenir e tratar distúrbios ósseos tal como osteoporose.

Antecedentes da Invenção

[0002] A formação anormal de vasos sangüíneos contribui para a patogênese de várias doenças com alta morbidade e mortalidade. A elucidação dos mecanismos que dão suporte ao crescimento vascular pode permitir o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para estimular o crescimento vascular em tecidos isquêmicos ou para suprimir sua formação em tumores. Estudos recentes direcionados a genes em embriões identificaram alguns dos mecanismos envolvidos na formação inicial de canais endoteliais (angiogênese) e sua maturação subsequente pelo revestimento com células musculares lisas (arteriogênese). Surgiu a evidência de que mecanismos moleculares distintos podem mediar o crescimento de vasos sangüíneos durante condições patológicas, mas os fatores moleculares permanecem amplamente indeterminados.

[0003] Foi estabelecido que o Fator de Crescimento Endotelial

Vascular (VEGF) está implicado no desenvolvimento e crescimento patológico da vasculatura (Ferrara N. et al., 1999, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 237, 1-30). Além disso, também foi mostrado que o fator de crescimento Placentário (PlGF), um homólogo de VEGF, é um modulador específico de VEGF durante uma variedade de condições patológicas, tais como retinopatia isquêmica, tumorigênese, distúrbios inflamatórios e edema. Foi mostrado que camundongos PlGF^{-/-} têm angiogênese e arteriogênese prejudicada na doença (Carmeliet P. et al., 2000, *J. Pathol.* 190, 387-405), enquanto a angiogênese fisiológica em saudáveis normais permanece não afetada. Assim, inibidores de PlGF têm um imenso potencial para o tratamento de doenças nas quais a angiogênese ou arteriogênese contribuem para a patogenicidade da doença.

[0004] Inibidores de PlGF são conhecidos na técnica, tal como um anticorpo policlonal de cabra contra PlGF humano (R&D Pharmaceuticals, Abingdon, UK) e um anticorpo policlonal de galinha (Gassmann et al., 1990, *Faseb J.* 4, 2528). Esses anticorpos são usados para estudos de *Western blotting*, histoquímica e de imunoprecipitação. WO01/85796 descreve o uso de inibidores de PlGF, incluindo os anticorpos monoclonais anti-PlGF, para o tratamento ou prevenção de doenças, tais como formação tumoral. Mais especificamente, a preparação de anticorpos monoclonais de murino que inibem completamente a ligação de PlGF-2 de murino ao seu receptor Flt-1, está descrita, através da qual o anticorpo Mab-PL5D11, é selecionado como tendo a atividade inibitória mais eficiente. O uso de anticorpo em modelos animais de angiogênese patológica está descrito.

[0005] Anticorpos gerados em animais têm características que podem limitar severamente seu uso na terapia humana. Como proteínas estranhas, eles podem fazer surgir uma resposta antiimunoglobulina (que para anticorpos de camundongo é referida como anticorpo humano

anticamundongo ou HAMA) que reduz ou destrói sua eficácia terapêutica e/ou provoca reações alérgicas ou de hipersensibilidade em pacientes, como mostrado por Jaffers et al., 1986 (*Transplantation* 1986 41:572). Embora o uso de anticorpos monoclonais humanos possa lidar com essa limitação, foi provado ser difícil gerar grandes quantidades de anticorpos humanos anti-humano pela tecnologia de hibridoma convencional. A tecnologia recombinante tem, portanto, sido usada na técnica para construir anticorpos “humanizados” que mantêm a alta afinidade de ligação do animal, tal como anticorpos monoclonais de murino mas que exibem imunogenicidade reduzida em seres humanos. Em particular, foram sugeridos anticorpos quiméricos nos quais a região variável (V) de um anticorpo não humano é combinada com a região constante (C) de um anticorpo humano. Métodos de obter tais imunoglobulinas quiméricas estão descritos em detalhes na Patente U.S. 5.770.198. Em outras tentativas de reduzir a imunogenicidade de anticorpos de murino, apenas a região de determinação de complementaridade (CDR), isto é regiões de hipervariabilidade nas regiões V, ao invés do domínio V completo, são transplantadas para um anticorpo humano. Tais anticorpos humanizados são conhecidos como anticorpos de CDR enxertada. A construção de anticorpos de CDR enxertada que reconhecem mais antígenos complexos tem resultado em anticorpos que tem atividade de ligação significativamente menor do que os anticorpos não humanizados nativos. Em vários casos foi demonstrado que a mera introdução de CDRs não humanas em uma cadeia principal de anticorpo humano é suficiente para manter a atividade de ligação total. Apesar de um modelo computadorizado refinado do anticorpo de murino de interesse ser necessário a fim de identificar os aminoácidos críticos a serem considerados no esboço de um anticorpo humanizado, e regras teóricas gerais terem sido propostas para tal esboço, em todos os casos o procedimento deve ser detalhado

e otimizado para o anticorpo não humano em particular de interesse.

[0006] Subseqüentemente, permanece uma necessidade por anticorpos (monoclonais) que inibam otimamente a ligação de PIGF humana ao seu receptor. Além disso, tais anticorpos também precisam ser não imunogênicos, já que eles não podem fazer surgir HAMA (ou ter uma baixa tendência de fazê-lo).

Sumário da Invenção

[0007] A presente invenção se refere a novos anticorpos monoclonais e derivados desses direcionados para PIGF e capazes de inibir a ligação de PIGF ao seu receptor. Os presentes ligantes são os primeiros a demonstrar a inibição de PIGF humano em uma condição patológica *in vivo*. Mais especificamente, os anticorpos e derivados desses de acordo com a presente invenção são capazes de reduzir o tamanho do tumor e a vascularização de tecido tumoral humano *in vivo*. Os anticorpos da presente invenção fornecem uma alternativa para terapias antiangiogênicas que atingem VEGF atualmente usadas, com a importante vantagem de que os efeitos colaterais causados pela inibição da angiogênese patológica associada com essas terapias são significativamente reduzidos.

[0008] A presente invenção se refere a moléculas de ligação a antígeno, particularmente anticorpos monoclonais, fragmentos ou derivados desses, incluindo anticorpos humanizados e fragmentos de anticorpo, que se ligam ao mesmo epitopo de PIGF como o anticorpo referido aqui como 16D3.

[0009] Um primeiro objetivo da presente invenção é o fornecimento de novos anticorpos monoclonais capazes de se ligar a PIGF e que tem a capacidade de inibir o funcionamento de PIGF, mais especificamente anticorpos caracterizados em que sua região variável de cadeia pesada compreende a seqüência de SEQ ID N°: 2 ou uma seqüência que tem pelo menos 80%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais

particularmente 95% de identidade de seqüência com essa dentro das regiões de CDR e/ou em que sua região variável de cadeia leve compreende a seqüência de SEQ ID N°: 4 ou uma seqüência que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de seqüência com essa dentro das regiões de CDR, tal como o anticorpo 16D3 ou derivados desse. Adicional ou alternativamente, em uma modalidade adicional, as moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção têm uma identidade de seqüência dentro das regiões variáveis da cadeia pesada e/ou leve fora das regiões de CDR que é de pelo menos 70%, particularmente pelo menos 80%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% idêntica às seqüências de SEQ ID N°: 2 e SEQ ID N°: 4 respectivamente.

[00010] De acordo com uma modalidade particular da invenção, o anticorpo é um anticorpo humanizado, mais particularmente um anticorpo híbrido, o mais particularmente um anticorpo híbrido de camundongo/humano, mais particularmente um híbrido de 16D3 de camundongo/IgG1^K ou IgG4^K humano. Alternativamente, o anticorpo humanizado é um que compreende as regiões de CDR do anticorpo 16D3 de camundongo da presente invenção capazes de se ligar a PIGF, enxertada na cadeia principal de um anticorpo humano.

[00011] Uma modalidade adicional da presente invenção se refere a fragmentos de ligação a antígeno do anticorpo 16D3 de camundongo ou um derivado dos mesmos, tal como um anticorpo humanizado desse, tal como mas não limitado a um Fab, Fab' ou F(ab')₂, uma combinação de pelo menos duas regiões de determinação de complementaridade (CDRs), uma região variável de cadeia única ancorada na membrana ou solúvel ou um domínio variável único. Modalidades particulares de tais fragmentos de ligação ao antígeno incluem fragmentos que

compreendem pelo menos duas CDRs de 16D3 ou derivados desse ou mais particularmente pelo menos duas CDRs selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID N°: 17 (GYTFTDYY), SEQ ID N°: 18 (IYPGSGNT), SEQ ID N°: 19 (VRDSPFFDY), SEQ ID N°: 20 (QSLLNSGMRKSF), SEQ ID N°: 21 (WAS) e SEQ ID N°: 22 (KQSYHLFT) ou que compreendem pelo menos duas seqüências que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de seqüência com elas. Uma modalidade particular da invenção se refere ao fornecimento de fragmentos variáveis de cadeia única (scFvs) do anticorpo 16D3 de camundongo e scFvs humanizadas que são capazes de inibir a atividade de PIGF. O mais particularmente, a presente invenção fornece scFvs que compreendem a seqüência de aminoácidos de SEQ ID N°: 24 ou SEQ ID N°: 26 ou uma seqüência que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de seqüência com essas dentro das CDRs capazes de se ligar a PIGF.

[00012] Ainda um objetivo adicional da presente invenção é o fornecimento de linhagens celulares que produzem os anticorpos monoclonais da presente invenção, mais particularmente a linhagem celular 16D3 que produz o anticorpo 16D3, mas também outras linhagens celulares que são capazes de produzir as moléculas de ligação ao antígeno derivado de 16D3 ou fragmentos desse, por exemplo como um resultado de tecnologia recombinante.

[00013] Ainda um objetivo adicional da presente invenção é o fornecimento de uma composição farmacêutica para a prevenção ou tratamento de angiogênese (indesejada) em condições patológicas ou distúrbios em mamíferos ou para prevenção ou tratamento de reabsorção óssea, que compreende um anticorpo contra PIGF que é

16D3 ou um fragmento ou um derivado, mais particularmente uma versão humanizada de 16D3 ou um fragmento de ligação ao antígeno desse em mistura com um veículo farmaceuticamente aceitável. Uma modalidade específica da invenção é uma composição farmacêutica que compreende um fragmento de ligação ao antígeno de 16D3 ou um derivado desse, que é selecionado a partir do grupo que consiste em um Fab, Fab' ou F(ab')₂, uma parte variável de cadeia única ancorada à membrana ou solúvel ou um domínio variável único. As modalidades mais particulares da presente invenção se referem a composições farmacêuticas que compreendem um fragmento de ligação ao antígeno que compreende pelo menos duas CDRs selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID N°: 17 (GYTFTDYY), SEQ ID N°: 18 (IYPGSGNT), SEQ ID N°: 19 (VRDSPFFDY), SEQ ID N°: 20 (QSLNSGMRKSF), SEQ ID N°: 21 (WAS) e SEQ ID N°: 22 (KQSYHLFT) ou menos duas que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de seqüência com duas seqüências diferentes selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID N°: 17 a 22. Uma modalidade particular da mesma se refere a composições farmacêuticas que compreendem um scFv do anticorpo 16D3 da invenção, mais particularmente que compreendem um scFv que compreende pelo menos duas CDRs selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID N°: 17 (GYTFTDYY), SEQ ID N°: 18 (IYPGSGNT), SEQ ID N°: 19 (VRDSPFFDY), SEQ ID N°: 20 (QSLNSGMRKSF), SEQ ID N°: 21 (WAS) e SEQ ID N°: 22 (KQSYHLFT) ou pelo menos duas seqüências que têm pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de seqüência com duas seqüências diferentes selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID N°: 17 a 22, tal como um scFv que

compreende a SEQ ID Nº: 24. Mais particularmente, a composição farmacêutica compreende um scFv humanizado de 16D3, tal como mas não limitado a scFv humanizado que compreende SEQ ID Nº: 26 ou uma seqüência que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de seqüência com essa dentro das CDRs capazes de se ligar a PIGF.

[00014] Em ainda outra modalidade particular da composição farmacêutica de acordo com a invenção, uma quantidade terapeuticamente eficaz de outro agente antiangiogênico está incluída além da molécula de ligação ao antígeno capaz de se ligar a PIGF da invenção. O mais particularmente em relação a isso, agentes antiangiogênicos tais como inibidores de VEGF- e bFGF-, são considerados, o mais particularmente anticorpos anti-VEGF.

[00015] Outro objetivo da presente invenção é fornecer seqüências de nucleotídeos que codificam os fragmentos de ligação ao antígeno dos anticorpos que se ligam a PIGF descritos aqui, mais particularmente seqüências de nucleotídeos que codificam as regiões variáveis de cadeia pesada e leve de 16D3 produzido pela linhagem celular 16D3. O mais especificamente a seqüência de nucleotídeo que codifica as regiões variáveis de SEQ ID Nº: 2 e SEQ ID Nº: 4 é considerada. Adicionalmente, seqüências de polinucleotídeo que codificam fragmentos de ligação ao antígeno que compreendem pelo menos duas CDRs de 16D3, mais especificamente, polinucleotídeos que codificam pelo menos duas das CDRs selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 17 (GYTFTDYY), SEQ ID Nº: 18 (IYPGSGNT), SEQ ID Nº: 19 (VRDSPFFDY), SEQ ID Nº: 20 (QSLNSGMRKSF), SEQ ID Nº: 21 (WAS) e SEQ ID Nº: 22 (KQSYHLFT) ou que codificam seqüências que compreendem pelo menos duas CDRs que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos

90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de seqüência com SEQ ID N°: 17 a 22. Modalidades específicas das seqüências de nucleotídeos da presente invenção são fornecidas nas SEQ ID N°s: 1, 3, 5 e 6. Modalidades específicas adicionais incluem as seqüências de nucleotídeos que codificam o scFv de 16D3 e versões humanizadas desse, mais particularmente a seqüência de SEQ ID N°: 23 e SEQ ID N°: 25 e as seqüências que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de seqüência com essas, o mais particularmente dentro de regiões que codificam as regiões de CDR do scFv. Entretanto, será observado que existe uma variedade de seqüências de nucleotídeos que caem dentro do escopo da presente invenção como um resultado da redundância no código genético.

[00016] Outro objetivo da presente invenção é fornecer um método de tratamento e/ou prevenção de angiogênese indesejada (ou patológica) em uma condição patológica em um mamífero, cujo método compreende administrar a um mamífero que necessite de tal tratamento ou prevenção de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um princípio ativo que é o anticorpo 16D3 da presente invenção ou um fragmento de ligação de antígeno ou derivado desse, o mais particularmente um scFv como aqui descrito. Particularmente adequados para os métodos da presente invenção são os anticorpos humanizados e fragmentos de anticorpo, tal como scFv de 16D3 ou derivados do mesmo. Uma modalidade particular do método da invenção se refere ao tratamento e/ou prevenção de condições patológicas tais como, mas não limitadas a câncer, inflamação, doenças do olho, hipertensão pulmonar e extravasamento vascular. Um objetivo particular da presente invenção é fornecer uma terapia eficaz e segura (isto é, sem efeitos colaterais) para a angiogênese patológica, mais em

particular para crescimento tumoral, inflamação, doenças do olho ou extravasamento vascular, em mamíferos, mais particularmente em seres humanos. O mais particularmente, o método da presente invenção é adequado para o tratamento e/ou prevenção de tumores sólidos, mais particularmente, para o tratamento e/ou prevenção de câncer de cólon, câncer de mama, câncer pancreático e melanomas.

[00017] Usos adicionais dos anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno da presente invenção se referem a detecção imunológica de PIGF em amostras humanas, como porções marcadas em métodos de diagnóstico e para o rastreamento de compostos com um efeito aditivo para inibição de PIGF no tratamento de câncer.

[00018] A presente invenção se baseia na determinação surpreendente de novos ligantes, denominados novos anticorpos monoclonais de murino e humanizados e fragmentos, derivados e homólogos desses que inibem PIGF muito eficientemente. O mais particularmente, a presente invenção demonstra ligantes capazes de reduzir o crescimento tumoral, o mais particularmente capazes de reduzir o tamanho de um tumor entre 20% e 50%.

Breve Descrição das Figuras

[00019] A seguinte descrição, não pretendida para limitar a invenção às modalidades específicas aqui descritas, pode ser entendida em conjunto com as figuras que a acompanham, incorporadas aqui como referência, nas quais:

[00020] Figura 1: Ligação de anticorpo 16D3 (A) ou anticorpo 16D3 humanizado (hu 16D3) (B) a PIGF-2 humano (produzido em Pichia) com um teste ELISA de acordo com uma modalidade da presente invenção.

[00021] Figura 2: Inibição da ligação de PIGF-2 ao receptor Flt-1 humano pelo anticorpo 16D3 (quadrados) ou pelo anticorpo 16D3 humanizado (triângulos) com um teste ELISA de acordo com uma modalidade da presente invenção.

[00022] Figura 3: Resultados dos experimentos Biacore em que rhuPIGF-2 está imobilizado sobre um chip CM5 a fim de investigar o potencial de inibição do anticorpo 16D3 e seu fragmento Fab teste de acordo com uma modalidade da presente invenção.

[00023] Figura 4: O anticorpo monoclonal 16D3 inibe o crescimento do tumor em um modelo de xenoenxerto de tumor pancreático humano DanG subcutâneo. Tratamento de camundongos nu/nu com tumores de aproximadamente 60 mm³ com anti-tPA ('IgG de controle') (1C8; 50 mg/kg de peso corporal; n=10), 16D3 anti-hPIGF ('anti-hPIGF') (50 mg/kg de peso corporal; n=10), anti-mPIGF (PL5D11D4 (obtido como descrito em WO 01/85796); 50 mg/kg de peso corporal; n=10), uma combinação de 16D3 anti-hPIGF e PL5D11D4 anti-mPIGF ('anti-hPIGF/anti-mPIGF') (25 mg/kg de peso corporal de cada; n=10) e 'veículo' (n=10) de acordo com uma modalidade da presente invenção. (A) Tamanho do tumor (B) Peso do tumor 18 dias após a inoculação do tumor.

[00024] Figura 5: O anticorpo monoclonal 16D3 inibe o crescimento do tumor em um modelo de xenoenxerto de tumor pancreático humano subcutâneo DanG de uma maneira dependente da dose. Tratamento de camundongos nu/nu com tumores de aproximadamente 60 mm³ com 16D3 anti-hPIGF (50 mg/kg = '1000µg'/'C', 37,5 mg/kg = '750 µg'/'D', 25 mg/kg = '500 µg'/'E', 12,5 mg/kg = '250 µg'/'F'; n=10 para cada concentração), IgG de controle ('1C8'/'B'; 50 mg/kg) e 'veículo'/'A' (n=10) de acordo com uma modalidade da presente invenção. A: evolução do tamanho médio do tumor após a inoculação de célula tumoral; B: média do tamanho médio do tumor no dia 20.

[00025] Figura 6: O anticorpo monoclonal 16D3 inibe o crescimento do tumor em um modelo de xenoenxerto de tumor de mama humano subcutâneo MDA-MB. Tratamento de camundongos nu/nu com tumores de aproximadamente 60 mm³ com 16D3 anti-hPIGF (50 mg/kg de peso

corporal; n=10) ou veículo três vezes por semana de acordo com uma modalidade da presente invenção. A: peso do tumor e B: volume do tumor como determinado 32 dias após a inoculação.

[00026] Figura 7: O anticorpo monoclonal 16D3 inibe o crescimento do tumor em um modelo de xenoenxerto de tumor de cólon humano subcutâneo LOVO. Tratamento de camundongos nu/nu com tumores de aproximadamente 60 mm³ com 16D3 anti-hPIGF (50 mg/kg de peso corporal; n=10) ou veículo três vezes por semana de acordo com uma modalidade da presente invenção. A: peso do tumor e B: volume do tumor como determinado 30 dias após a inoculação.

[00027] Figura 8: O anticorpo monoclonal 16D3 inibe o crescimento do tumor em um modelo de xenoenxerto de tumor de melanoma humano subcutâneo Mel2a. Tratamento de camundongos nu/nu com tumores de aproximadamente 60 mm³ com 16D3 anti-hPIGF (50 mg/kg de peso corporal; n=10) ou veículo três vezes por semana de acordo com uma modalidade da presente invenção. Peso do tumor como determinado 53 dias após a inoculação.

[00028] Figura 9: Anticorpo monoclonal 16D3 evita perda de peso corporal em um modelo de xenoenxerto de tumor pancreático humano subcutâneo DanG. Tratamento de camundongos nu/nu com tumores de aproximadamente 60 mm³ com 16D3 anti-hPIGF (50 mg/kg de peso corporal; n=10), IgG de controle, uma combinação de anti-hPIGF e anti-PIGF (25 mg/kg de peso corporal de cada; n=10) e veículo (n=10) de acordo com uma modalidade da presente invenção. O peso do tumor foi subtraído do peso corporal antes do cálculo da porcentagem de perda de peso corporal. Barras abertas: peso corporal no primeiro dia de tratamento; barras preenchidas: peso corporal no último dia de tratamento.

[00029] Figura 10: Anticorpo monoclonal 16D3 e Avastin exercem efeito adicional sobre a inibição do crescimento do tumor em um DanG

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

[00030] Figura 11: Seqüências de nucleotídeo e aminoácidos de partes variáveis de anticorpo murino 16D3 de acordo com a uma modalidade da presente invenção. A. Seqüência de nucleotídeo que codifica uma parte variável da cadeia pesada; B. Seqüência de nucleotídeo que codifica parte variável da cadeia leve; C. Seqüência de aminoácido da parte variável da cadeia pesada; D. Seqüência de aminoácido da parte variável da cadeia leve. Nucleotídeos ou aminoácidos que podem ser modificados para fins de humanização de acordo com uma modalidade da invenção estão sublinhados.

[00031] Figura 12: Seqüências de nucleotídeos e aminoácidos de partes variáveis humanizadas de 16D3 de acordo com uma modalidade da presente invenção. A. Seqüência de nucleotídeo que codifica a parte variável humanizada da cadeia pesada. B. Seqüência de nucleotídeo que codifica a parte variável humanizada da cadeia leve; C. Seqüência de aminoácido da parte variável humanizada da cadeia pesada; D. Seqüência de aminoácido da parte variável humanizada da cadeia leve. Nucleotídeos ou aminoácidos modificados para fins de humanização estão sublinhados.

[00032] Figura 13: Ilustração do vetor para expressão de scFv de 16D3 humanizado em células 293.

[00033] Figura 14: A. Ligação de scFv16D33 e scFv16D3

humanizado a PIGF; B. Inibição da ligação de huPIGF-2 ao seu receptor huFlt-1 por scFv16D3 e scFv16D3 humanizado (B).

[00034] Figura 15: A. Seqüência de aminoácido de scFv de anticorpo murino 16D3; B. Seqüência de aminoácido de scFv humanizado de anticorpo 16D3. Regiões fora das regiões variáveis de cadeia pesada e leve estão sublinhadas.

[00035] Figura 16: Ilustração do vetor para expressão de Fab de 16D3 humanizado em células 293 de acordo com uma modalidade da invenção.

[00036] Figura 17: Ligação de Fab de 16D3 humanizado a huPIHG com um teste de ELISA de acordo com uma modalidade da presente invenção; B. Inibição da ligação de huPIGF-2 ao seu receptor huFlt-1 por Fab16D3.

Definições

[00037] O termo “16D3” como usado aqui se refere ao anticorpo monoclonal contra PIGF produzido pela linhagem celular depositada com o BCCM/LMBP sob o número LMBP 6399CB.

[00038] O termo “fragmento de anticorpo” se refere a uma subparte de uma molécula de anticorpo que sozinha, ou em combinação com outros fragmentos é capaz de se ligar ao antígeno contra o qual o anticorpo correspondente foi criado. Fragmentos de anticorpo típicos são Fab, Fab', F(ab')₂, Fv ou scFv, que freqüentemente retêm uma afinidade pelo antígeno que é comparável ao anticorpo completo. Fragmentos menores incluem regiões de determinação de complementaridade ou CDRs tais como CRD1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada ou leve e/ou combinações de duas ou mais das mesmas.

[00039] O termo “derivado” é usado aqui para se referir a uma molécula de ligação ao antígeno que corresponde a uma modificação do anticorpo original (por exemplo como produzido por uma linhagem celular de hibridoma) ou fragmento dessa, sem afetar de forma

significante a ligação ao antígeno. Modificações típicas incluem modificações da sequência de aminoácidos do anticorpo original ou modificações dos grupos funcionais presentes na sequência de aminoácido, por exemplo no contexto de humanização, para a ligação do anticorpo ou fragmento de anticorpo desse a outras moléculas tais como marcadores ou contas, ou para a modificação de glicosilação. Dessa forma, derivados incluem mas não são limitados a anticorpos humanizados, anticorpos híbridos, anticorpos ou outras moléculas de ligação ao antígeno que tenham sido obtidas por enxerto ou introdução de uma ou mais das regiões variáveis e/ou CDRs do anticorpo original na cadeia principal de outro anticorpo ou fragmento da mesma espécie ou de uma diferente. Derivados de um anticorpo incluem estruturas alternativas de uma ou mais CDRs do anticorpo que resultam em uma molécula de ligação ao antígeno tal como um polipeptídeo sintético.

[00040] Um “anticorpo humanizado ou fragmento de anticorpo” como usado aqui, se refere a uma molécula de anticorpo, ou fragmento dessa na qual, em comparação ao anticorpo original, aminoácidos foram substituídos a fim de assemelhar-se mais intimamente a um anticorpo humano. A maioria dessas substituições serão na cadeia principal do anticorpo ou fragmento de anticorpo, isto é em regiões onde o antígeno não se liga. Entretanto, é contemplado que dentro das CDRs, aminoácidos que não participam na ligação ao antígeno também podem ser substituídos.

[00041] Um anticorpo ou fragmento de anticorpo “remodelado” ou um “anticorpo híbrido” como usado aqui, se refere a um anticorpo que compreende partes de pelo menos dois anticorpos diferentes, que podem opcionalmente ser da mesma espécie ou de espécies diferentes. Tipicamente, um anticorpo híbrido humano pode ser uma região constante humana de um anticorpo ligado a uma região variável humanizada de outro anticorpo (que é direcionado contra o antígeno de

interesse) ou uma cadeia principal de anticorpo humano de um anticorpo no qual seqüências de aminoácidos nas regiões de ligação ao antígeno foram substituídas por seqüências de outro anticorpo por exemplo um anticorpo não humano direcionado contra um antígeno humano de interesse. Mais particularmente as regiões de ligação ao antígeno de um anticorpo (geralmente não humano) que têm afinidade por um antígeno de interesse, tal como uma ou mais CDRs ou regiões variáveis ou partes dessas, são introduzidas na cadeia principal de outro anticorpo (geralmente humano) (por exemplo anticorpos de CDR enxertada).

[00042] O termo “homologia” ou “homólogo” como usado aqui com referência a duas ou mais moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção se refere a habilidade das moléculas de ligação ao antígeno se ligarem ao mesmo antígeno, mais particularmente ao mesmo epitopo. A habilidade de duas moléculas de ligação ao antígeno se ligarem ao mesmo epitopo pode ser avaliada determinando se as moléculas de ligação ao antígeno podem competir uma com a outra pela ligação ao mesmo antígeno, por exemplo em um ensaio de ligação competitiva. A ligação ao antígeno de moléculas de ligação ao antígeno homólogas deve ser de especificidade similar.

[00043] A “identidade de seqüência” de duas seqüências como usado aqui se refere ao número de posições com nucleotídeos ou aminoácidos idênticos dividido pelo número de nucleotídeos ou aminoácidos na menor das seqüências, quando as duas seqüências são alinhadas. Preferivelmente a dita identidade de seqüência é maior do que 70%-80%, preferivelmente 81-85%, mais preferivelmente 86-90%, especialmente preferivelmente 91-95%, o mais preferivelmente 96-100%, mais especificamente é 100%. Em vista da contribuição geralmente limitada da cadeia principal das regiões variáveis para a ligação com o antígeno, identidade de seqüência é o mais comumente

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

[00044] O termo “PIGF” é usado aqui para se referir ao fator de crescimento placentário. Foi descoberto que PIGF ocorre principalmente em duas variantes de *splice* ou isoformas, PIGF-1 de 149 aminoácidos e PIGF-2 de 170 aminoácidos, que compreende um inserção de 21 aminoácidos na região carboxi-terminal, mas também outras isoformas foram descobertas.

[00045] O termo “inibitório” quando se referindo a um anticorpo para PIGF ou fragmento ou derivado desse é usado para indicar que o anticorpo, fragmento ou derivado é capaz de inibir a ligação de PIGF ao seu receptor Flt-1.

Descrição Detalhada

[00046] A presente invenção será descrita com referência a certas modalidades e a certas figuras mas a presente invenção não está limitada a elas mas apenas pelas reivindicações.

[00047] A presente invenção se refere a moléculas de ligação ao antígeno, particularmente anticorpos monoclonais, fragmentos ou derivados desses, que se ligam ao mesmo epitopo de PIGF que o anticorpo referido aqui como anticorpo 16D3. “Anticorpo 16D3”, produzido pela linhagem celular LMBP 6399CB, foi criado contra PIGF de origem humana, e se liga a PIGF humano (ambas as isoformas PIGF-1 e PIGF-2). O anticorpo 16D3 inibe a ligação de PIGF humano ao seu receptor Flt-1, inibindo a atividade de PIGF. O anticorpo 16D3 em si e

fragmentos ou derivados desses, assim como seqüências de nucleotídeos que codificam o anticorpo, fragmentos ou derivados, podem assim ser usados para a inibição de PIGF tanto em um contexto terapêutico como em um modelo animal para fins de teste ou rastreamento. Alternativamente, o anticorpo pode ser usado para detecção e/ou quantificação de PIGF *in vivo*, *ex vivo*, ou *in vitro*. Dessa forma, a presente invenção fornece diferentes aplicações das moléculas de ligação ao antígeno da invenção e as seqüências de nucleotídeos que as codificam. A invenção ainda se refere a métodos de produzir as moléculas de ligação ao antígeno da invenção, e a linhagens celulares capazes de produzir essas moléculas de ligação ao antígeno.

[00048] Um primeiro aspecto da presente invenção se refere a linhagens celulares que produzem as moléculas de ligação ao antígeno da invenção, mais particularmente linhagens celulares que produzem anticorpos monoclonais capazes de se ligar ao mesmo antígeno que 16D3 ou fragmentos ou derivados desses. Uma modalidade particular desse aspecto da invenção é a linhagem celular de hibridoma também referida como “linhagem celular 16D3” que produz o anticorpo monoclonal 16D3 e que foi depositada com o BCCM/LMBP (*Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms/Plasmid Collection Laboratorium voor Moleculaire Biologie*, Universidade de Ghent K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Ghent, BE por Thromb-X em 29 de março de 2005 como o número de depósito LMBP 6399CB. A presente invenção ainda fornece linhagens celulares que produzem anticorpos monoclonais derivados do anticorpo monoclonal 16D3. Tais linhagens celulares podem ser obtidas pela modificação da seqüência codificante para o anticorpo monoclonal 16D3, o mais particularmente a seqüência codificante que codifica as regiões que não se ligam ao antígeno de 16D3. Métodos de determinar a natureza das modificações a serem feitas, e exemplos de modificações adequadas estão descritos aqui.

[00049] Um segundo aspecto da invenção se refere a moléculas de ligação ao antígeno capazes de se ligar ao mesmo antígeno que o anticorpo 16D3. Mais particularmente, a invenção se refere ao anticorpo chamado 16D3 produzido pela linhagem celular 16D3 descrita acima e homólogos, fragmentos de derivados desse capazes de se ligar a PIGF e inibir a atividade de PIGF.

[00050] Dessa forma uma modalidade particular da presente invenção fornece o anticorpo monoclonal anti-PIGF humano 16D3 produzido pela linhagem celular LMBP 6399CB, e fragmentos desse anticorpo. O anticorpo monoclonal 16D3 é caracterizado pela seqüência de aminoácido das regiões variáveis de suas cadeias pesada e leve como descrito em SEQ ID N°: 2 e SEQ ID N°: 4, respectivamente.

[00051] De acordo com uma modalidade específica, a presente invenção se refere a fragmentos, mais particularmente fragmentos de ligação ao antígeno do anticorpo 16D3. Tais fragmentos incluem, mas não estão limitados a Fab, Fab', F(ab')₂, CDR's, peptídeos com uma seqüência de um parte do anticorpo ou suas CDRs, domínios variáveis únicos e combinações desses. Fragmentos Fab, Fab' e F(ab')₂, podem ser gerados por digestão proteolítica de anticorpos monoclonais usando métodos bem-conhecidos na técnica, tal como descrito por Stanworth et al, *Handbook of Experimental Immunology* (1978), vol. I capítulo 8 (Blackwell Scientific Publications). Tais fragmentos, que retêm a habilidade de se ligar ao antígeno, perderam várias propriedades do anticorpo de origem, tais como ativação do complemento ou capacidade de se ligar a receptores Fc gama. Mais especificamente a presente invenção fornece fragmentos que compreendem as regiões variáveis das cadeias pesada e leve de 16D3 que correspondem a SEQ ID N°: 2 e SEQ ID N°: 4, respectivamente. Uma modalidade particular adicional da invenção se refere a fragmentos que compreendem as regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de 16D3 e derivados

desses. Os dois métodos mais comumente seguidos para identificar CDRs são IMGT e KABAT, e fragmentos que compreendem mais de um tipo de CDR de 16D3 são considerados dentro do contexto da invenção, assim como derivados de 16D3 que compreendem esses fragmentos ou CDRs. De acordo com a identificação por IMGT de CDRs, as regiões CDR dentro das regiões variáveis de 16D3 correspondem a SEQ ID N°: 17 (GYTFTDYY), SEQ ID N°: 18 (IYPGSGNT); SEQ ID N°: 19 (VRDSPFFDY), SEQ ID N°: 20 (QSLNLSGMRKSF), SEQ ID N°: 21 (WAS) e SEQ ID N°: 22 (KQSYHLFT). Dessa forma, a presente invenção fornece fragmentos do anticorpo 16D3 que compreendem uma ou mais das CRDs de 16D3 como fornecido em SEQ ID N°: 17 a SEQ ID N°: 22.

[00052] Uma modalidade específica adicional da invenção fornece fragmentos de 16D3 que são partes variáveis de cadeia única ancoradas à membrana ou solúveis de 16D3. Um fragmento variável de cadeia única (scFv) é um fragmento de anticorpo geneticamente projetado que geralmente consiste na cadeia variável pesada (VH) e cadeia leve (VL) de uma imunoglobulina, ou partes dessas, unidas juntas por um ligante de peptídeo flexível. Opcionalmente, scFvs compreendem as regiões CDR do anticorpo de interesse e regiões de arcabouço de outro anticorpo. A sequência de aminoácido das regiões de arcabouço e/ou CDR de scFv é opcionalmente humanizada para reduzir antigenicidade para uso como um farmacêutico em seres humanos. A invenção fornece um scFv de 16D3 e uma versão humanizada desse que compreende SEQ ID N°: 24 e SEQ ID N°: 26, respectivamente. Métodos para obter partes variáveis de cadeia única de anticorpos são conhecidas do versado na técnica e estão descritas no exemplo 6 aqui contido. Por exemplo o método pode incluir amplificação das seqüências de DNA das partes variáveis das cadeias pesada e leve humanas em reações separadas e clonagem, seguida

por inserção de uma sequência ligante de quinze aminoácidos, por exemplo (Gly4Ser)³ entre VH e VL por uma reação em cadeia da polimerase (PCR) de duas etapas (veja por exemplo Dieffleibach & Dveksler, "PCR Primer, a laboratory manual" (1995), Cold Spring Harbour Press, Plainview, NY, USA). O fragmento resultante pode então ser inserido em um vetor adequado para expressão de um fragmento variável de cadeia única como um polipeptídeo solúvel ou apresentado em fago. Isso pode ser alcançado por métodos bem-conhecidos daqueles versados na técnica, tal como descrito por Gilliland et al., *Tissue Antigens* (1996) 47: 1-20.

[00053] A presente invenção também fornece fragmentos de 16D3 que são peptídeos de ligação ao antígeno representativos das regiões hipervariáveis do anticorpo 16D3 ou combinações desses. Tais peptídeos podem ser obtidos por síntese usando um sintetizador de biosistema aplicado por exemplo um sintetizador de polipeptídeos tal como o modelo 9050 disponível por Milligen (USA) ou um modelo de uma tecnologia relacionada.

[00054] Uma modalidade adicional da invenção se refere a derivados do anticorpo 16D3 ou fragmentos desses. Mais particularmente, a invenção se refere a anticorpos que compreendem uma região de cadeia pesada variável e ou uma região de cadeia leve variável como descrito em SEQ ID N°: 2 e SEQ ID N°: 4, respectivamente, mas das quais as regiões constantes são diferentes daquelas em 16D3. Adicional ou alternativamente, os derivados do anticorpo 16D3 da presente invenção compreendem pelo menos duas das CDRs de 16D3 como fornecido em SEQ ID N°: 17 (GYTFTDYY), SEQ ID N°: 18 (IYPGSGNT); SEQ ID N°: 19 (VRDSPFFDY), SEQ ID N°: 20 (QSLLNSGMRKSF), SEQ ID N°: 21 (WAS) e SEQ ID N°: 22 (KQSYHLFT), enquanto as regiões de arcabouço entre as CDRs e/ou regiões constantes são diferentes.

[00055] De acordo com uma modalidade da invenção, derivados do anticorpo 16D3 ou fragmentos desses são fornecidos tendo pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de seqüência com a região variável de cadeia pesada e leve de 16D3 fornecida em SEQ ID N°: 2 e SEQ ID N°: 4, respectivamente. O mais particularmente, a presente invenção fornece derivados do anticorpo 16D3 ou fragmentos desses que compreendem uma região variável de cadeia pesada e/ou uma região variável de cadeia leve que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de seqüência com SEQ ID N°: 2 e SEQ ID N°: 4, respectivamente dentro das regiões CDR. Identidade de seqüência dentro das regiões de arcabouço pode ser, mas não é limitada a, menos do que 80%. Também considerados são derivados que compreendem pelo menos duas CDRs que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 85%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de seqüência com as seqüências de SEQ ID N°: 17 a 22, respectivamente.

[00056] De acordo com uma modalidade adicional, a invenção fornece derivado de uma scFV de 16D3 que compreende uma seqüência que tem pelo menos 80%, mais particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de seqüência com SEQ ID N°: 24 e uma seqüência que tem pelo menos 80%, particularmente pelo menos 90%, o mais particularmente pelo menos 95% de identidade de seqüência com SEQ ID N°: 26, o mais particularmente dentro das regiões CDR.

[00057] De acordo com outra modalidade, a invenção fornece derivados de 16D3 ou fragmentos desses que são humanizados. Tais derivados humanizados de 16D3 são homólogos em que eles retêm sua

afinidade de ligação por PIGF. De acordo com uma modalidade particular, os derivados humanizados de 16D3 também retêm a habilidade de inibir a atividade de PIGF. Humanização de anticorpos não humanos é alcançada pela substituição de um ou mais aminoácidos na cadeia principal do anticorpo, isto é aqueles aminoácidos que não estão envolvidos na ligação do anticorpo ao antígeno, a fim de assemelhar-se mais intimamente à cadeia principal de um anticorpo humano. Diferentes tipos ou níveis de humanização são considerados. Modalidades particulares da invenção se referem a anticorpos ou fragmentos nos quais regiões inteiras, mais particularmente a(s) região(s) constante(s) do anticorpo não humano ou fragmento é (são) substituídas pela(s) região(ões) constante(s) de um anticorpo humano, a fim de resultar em anticorpos ou fragmentos quiméricos (por exemplo humano/murino). Modalidades particulares adicionais são anticorpos onde os aminoácidos de ligação ao antígeno (por exemplo duas ou mais CDRs) do anticorpo não humano contra PIGF é introduzido dentro da cadeia principal de um anticorpo humano (por exemplo anticorpos de CDR enxertada). Métodos para associar a ligação da região de determinação de complementaridade ("CDR") do anticorpo monoclonal não humano com as regiões de arcabouço humanas – em particular a região constante C do gene humano – são conhecidos do versado na técnica, tal como descrito por Jones et al. em *Nature* (1986) 321 :522 ou Riechmann em *Nature* (1988) 332:323. Alternativamente a substituição de um número mais limitado de aminoácidos dos anticorpos anti-PIGF não humanos da invenção também é considerada. Modalidades particulares da invenção se referem a anticorpos que compreendem regiões de cadeia pesada e/ou leve variáveis humanizadas da Figura 9 ou partes dessas e anticorpos que compreendem pelo menos duas, mais particularmente três a cinco, o mais particularmente todas as seis CDRs de SEQ ID Nº: 17 a SEQ ID Nº: 22. Modalidades adicionais da

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

[00058] A presente invenção dessa forma se refere a anticorpos humanizados e/ou quiméricos ou híbridos derivados do anticorpo murino 16D3. Em uma modalidade particular, aminoácidos específicos do anticorpo murino 16D3 estão mutados a fim de eliminar aminoácidos imunogênicos. Portanto, em uma modalidade particular, a presente invenção se refere a moléculas de ligação ao antígeno que compreendem uma seqüência de aminoácido da parte variável de cadeia pesada de acordo com SEQ ID Nº: 2 em que um ou mais dos seguintes aminoácidos foram alterados: I2V, P9A, K40A e/ou T111L. Adicional ou alternativamente, os anticorpos humanizados derivados do anticorpo 16D3 são moléculas de ligação ao antígeno que compreendem uma seqüência de aminoácido da parte variável de cadeia leve de acordo com SEQ ID Nº: 4, em que um ou mais dos seguintes aminoácidos foi alterado: S5T, S9D, A15L, K18R, R22N e/ou L89V. Dessa forma, de acordo com uma modalidade particular, a invenção fornece moléculas de ligação ao antígeno que compreendem tanto uma seqüência de aminoácido de parte variável da cadeia pesada de acordo com SEQ ID Nº: 2, em que um ou mais dos seguintes aminoácidos foi alterado: I2V, P9A, K40A e/ou T111L e uma seqüência

de aminoácido de parte variável de cadeia leve de SEQ ID N°: 4 em que um ou mais dos seguintes aminoácidos foi alterado: S5T, S9D, A1 5L, K1 8R, R22N e/ou L89V.

[00059] Em outra modalidade, o anticorpo é adicionalmente humanizado em que as cadeias leve variável e/ou pesada variável (humanizadas) do anticorpo murino 16D3 são enxertadas em uma estrutura de uma imunoglobulina humana ou são acopladas à região constante de um anticorpo humano, mais em particular a uma região constante de IgG humana. Particularmente adequados nesse respeito são IgG1k (IgG1-kappa), que são capazes de ativar células destruidoras naturais no corpo. Em uma modalidade particular, a presente invenção assim se refere a um híbrido Hu16D3 – IgG1k. Uma modalidade alternativa da presente invenção é um híbrido Hu16D3 – IgG4k. Anticorpos IgG humanos (e assim também anticorpos híbridos obtidos usando cadeia principal e/ou regiões constantes de IgG humana) exibem um tempo de meia-vida prolongado, assim fornecendo níveis plasmáticos muito estáveis e permitindo uma drástica redução na frequência de administração. Além disso, o uso de anticorpos ou derivados humanizados carrega um risco mínimo de induzir respostas imunes.

[00060] Modalidades adicionais da presente invenção se referem a moléculas de ligação ao antígeno que são homólogas ao anticorpo 16D3 ou fragmentos desses, isto é moléculas de ligação ao antígeno que se ligam ao mesmo epítipo que o anticorpo 16D3. Em uma modalidade as moléculas de ligação ao antígeno homólogas são produzidas pela imunização intencional em animais, mais particularmente em camundongo, por exemplo pela injeção de PIGF nos camundongos e então fusão dos linfócitos do baço com uma linhagem celular de mieloma de camundongo, seguida pela identificação das culturas celulares que produzem anticorpos anti-PIGF (por exemplo pelo

rastreamento da ligação a PIGF) e clonagem deles. Opcionalmente a seleção adicional dos anticorpos é realizada com base na reatividade com o epítipo de 16D3, ou competição com o anticorpo 16D3 ou um fragmento desse.

[00061] Ainda outro aspecto da invenção se refere a métodos para produzir as moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção. Esses métodos incluem mas não são limitados, aos métodos de humanização do anticorpo 16D3 como fornecido na seção de Exemplos aqui contida.

[00062] Ainda outro aspecto da presente invenção se refere ao fornecimento de seqüências de nucleotídeos que codificam moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção, o mais particularmente as regiões de ligação ao antígeno desse. Modalidades particulares da invenção se referem às seqüências de nucleotídeos que codificam região de cadeia pesada variável e a região de cadeia leve variável definidas por SEQ ID N°: 2 e SEQ ID N°: 4, respectivamente, tais como, mas não limitadas, às seqüências de nucleotídeos de SEQ ID N°: 1 e SEQ ID N°: 3, que correspondem às seqüências da linhagem celular 16D3 que codificam a região de cadeia pesada e leve do anticorpo 16D3. Também dentro do contexto da presente invenção seqüências de nucleotídeos são fornecidas que codificam uma ou mais das regiões de CDR do anticorpo monoclonal 16D3 como identificado nas SEQ ID N°s: 17 a 22. Modalidades particulares da invenção incluem a seqüência que codifica scFvs e scFvs humanizadas de 16D3 tais como mas não limitado a SEQ ID N°: 23 e SEQ ID N°: 25, respectivamente. A invenção também fornece seqüências de nucleotídeos que codificam os derivados de 16D3 e fragmentos desses, descritos aqui. A presente invenção também fornece sondas e iniciadores capazes de hibridizar especificamente com as seqüências de nucleotídeos descritas acima, tal como, mas não limitados aos iniciadores descritos na seção de

Exemplos.

[00063] A presente invenção também inclui seqüências de nucleotídeos que são complementares às seqüências que codificam anticorpos monoclonais, fragmentos ou derivados desses, descritos aqui.

[00064] Outro aspecto ainda da presente invenção, se refere à aplicação terapêutica das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção. A presente invenção assim fornece o uso de moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção como um medicamento. Em relação a isso, a invenção fornece composições farmacêuticas, que compreendem uma ou mais das moléculas de ligação ao antígeno da invenção, para a prevenção ou tratamento de doenças ou distúrbios nas quais a angiogênese contribui para a patologia da doença ou distúrbio. Conseqüentemente métodos de tratamento e/ou prevenção de doenças nas quais a angiogênese contribui para a patologia da doença ou distúrbio que compreendem administrar a um mamífero que necessite de tal tratamento ou prevenção, uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição que compreende uma ou mais das moléculas de ligação ao antígeno descritas aqui.

[00065] Em tais doenças a angiogênese também é referida como “angiogênese patológica”. Exemplos de tal angiogênese patológica incluem a angiogênese observada em patologias de vasos sanguíneos (aterosclerose, hemangioma, hemangioendotelioma), de ossos e articulações (artrite reumatóide, sinovite, destruição de ossos de cartilagens, osteomielite, crescimento de pannus, formação de osteofito, neoplasmas e metástases), de pele (verrugas, granulomas piogênicos, crescimento de cabelo, sarcoma de Kaposi, quelóides de cicatrizes, edema alérgico, neoplasmas), de fígado, rim, pulmão, ouvido e outros epitélios (processos inflamatórios e infecciosos incluindo hepatite, glomerulonefrite, pneumonia, asma, pólipos nasais, otite, e transplante,

regeneração, neoplasmas e metástase nesses órgãos), em certas patologias do útero, ovário e placenta (sangramento uterino disfuncional por exemplo devido a dispositivos contraceptivos intra-uterinos, formação de cisto folicular, síndrome de hiperestimulação ovariana, endometriose, neoplasmas), patologias no cérebro ou nervos (neoplasmas e metástase), certas afecções cardíacas e musculares esqueléticas (por exemplo devido a sobrecarga de trabalho), condições patológicas de tecido adiposo (obesidade) e órgãos endócrinos (tireoidite, dilatação de tireóide, transplante de pâncreas). Angiogênese patológica também pode contribuir para doenças de hematopoiese (AIDS, Kaposi), malignidades hematológicas (leucemias, etc).

[00066] Em várias doenças do olho acredita-se que a angiogênese patológica seja um fator importante, e dessa forma o tratamento com moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção é considerado. Nas “doenças isquêmicas da retina” o suprimento de sangue e oxigênio da retina é diminuído, as porções periféricas da retina perdem sua fonte de nutrição e param de funcionar apropriadamente. Causas comuns de retinopatia são oclusão da veia central da retina, estenose da artéria carótida, diabetes (retinopatia diabética) e anemia (retinopatia de célula caliciforme). Retinopatia também é observada em crianças prematuras (retinopatia da prematuridade). Retinopatia diabética é uma importante causa de perda visual em pacientes com diabetes. Na retina isquêmica ocorre o crescimento de novos vasos sanguíneos (neovascularização). Esses vasos freqüentemente crescem sobre a superfície da retina, no nervo ótico, ou na frente do olho, na íris. Os novos vasos não conseguem substituir o fluxo de nutrientes necessários, e ao contrário, pode causar vários problemas tais como hemorragia vítrea, descolamento de retina, e glaucoma incontrolado. Esses problemas ocorrem porque os novos vasos são frágeis e tendem a sangrar. Se descoberto nos seus estágios iniciais, a retinopatia diabética

proliferativa pode algumas vezes ser interrompida com fotocoagulação panretinal. Entretanto, em alguns casos, cirurgia de vitrectomia é a única opção. Outras doenças dos olhos nas quais acredita-se que a angiogênese desempenhe um papel crítico são distúrbios intraoculares, leucomalácia, e neoplasmas e metástase. Neovascularização coroidal, é o crescimento de novos vasos sangüíneos que se originam do coróide através de uma quebra na membrana de Bruch dentro do epitélio do pigmento sub-retinal (sub-RPE) ou espaço subretinal. A localização, padrão de crescimento, e tipo (1 ou 2) de CNV dependem da idade do paciente e da doença subjacente. Sangramento e exsudação ocorrem com crescimento adicional, sendo responsáveis pelos sintomas visuais. A neovascularização coroidal (CNV) é uma causa importante de perda visual. É estimado que a CNV ocorre em 5-10% de míopes e ocorre em virtualmente todas as rupturas coroidais durante a fase de cura; a maioria regride espontaneamente mas em 15-30% dos pacientes, a CNV pode recorrer e levar a um deslocamento hemorrágico ou macular seroso com perda visual concomitante.

[00067] O termo “hipertensão pulmonar” se refere a um distúrbio no qual a pressão sangüínea nas artérias pulmonares é anormalmente alta. Na ausência de outras doenças do coração ou pulmões ela é chamada hipertensão pulmonar primária. O estreitamento difuso das arteríolas pulmonares ocorre como um resultado de arteriogênese patológica seguida por hipertensão pulmonar como uma resposta à resistência aumentada ao fluxo sangüíneo. A incidência é 8 em cada 100.000 pessoas. Entretanto, hipertensão pulmonar também pode ocorrer como uma complicação de Doenças Pulmonares Obstrutivas Crônicas (COPD) tais como enfisema, bronquite crônica ou fibrose intersticial difusa e em paciente com COPD asmatiforme. A incidência de COPD é de aproximadamente 5 em cada 10.000 pessoas.

[00068] Ainda um exemplo adicional de uma doença na qual a

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

[00069] Formação de adesão pós-operatória (POA) é uma complicação cirúrgica freqüente em cirurgias ginecológicas, pélvicas e cardiológicas. O trauma cirúrgico aos tecidos freqüentemente causa formação de cicatriz permanente que conecta o tecido traumatizado a outro órgão. Dessa forma, no sítio de tal dano, os tecidos internos que normalmente permanecem separados, freqüentemente se tornam unidos. Complicações que surgem da formação de adesão são obstruções intestinais, obstruções do intestino delgado, dor pélvica crônica, e infertilidade em mulheres. O termo “formação de adesão” no seu sentido médico se refere a conglutinação, o processo de adesão ou união de duas superfícies ou partes. Por exemplo a união das superfícies opostas de uma ferida, ou superfícies opostas do peritônio. Ainda, adesões, no plural, podem se referir a faixas inflamatórias que conectam superfícies serosas opostas. O termo adesão, como usado

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

[00070] Foi ainda demonstrado que doenças caracterizadas por reabsorção óssea, tais como, mas não limitadas a osteoporose, podem se beneficiar da inibição de PIGF (WO2004002524).

[00071] Dessa forma, de acordo com uma modalidade específica as moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção são particularmente adequadas para o tratamento e/ou prevenção de crescimento tumoral e metástase, doenças do olho, inflamação, formação de adesão, e hipertensão pulmonar.

[00072] Uma modalidade particular adicional da invenção se refere ao uso das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção para a prevenção e/ou tratamento de câncer, tal como, mas não limitado a câncer de mama, pulmão, próstata, cérebro, fígado, pâncreas, cólon, rim, útero ou medula óssea. Mais particularmente, a invenção se refere ao uso das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção para a prevenção e/ou tratamento de tumores sólidos tais como mas não limitados a câncer de cólon, câncer de mama, câncer pancreático, e melanomas. Mais particularmente os dados são fornecidos aqui demonstrando que os anticorpos da presente invenção são particularmente adequados para obter regressão de tumores humanos pancreáticos. Os anticorpos da presente invenção são demonstrados reduzir significativamente o tamanho do tumor *in vivo*, pelo qual, reduções no tamanho de até cerca de 50% são demonstradas. Dessa

forma, a presente invenção fornece métodos e composições farmacêuticas para reduzir o tamanho do tumor em pelo menos 20%, mais particularmente pelo menos 30%, o mais particularmente pelo menos 50%.

[00073] Uma modalidade particular adicional da invenção se refere ao uso das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção no tratamento ou prevenção de distúrbios ósseos e mais especificamente para o tratamento de condições onde há uma reabsorção óssea aumentada tal como por exemplo osteoporose e osteomalácia.

[00074] Conseqüentemente, a presente invenção se refere ao uso das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção para a produção de um medicamento para o tratamento das doenças acima mencionadas.

[00075] Um aspecto importante da presente invenção é que os anticorpos, fragmentos e derivados desses permitem o tratamento e/ou prevenção das doenças acima mencionadas sem os efeitos colaterais atribuídos ou esperados com outros tratamentos antiangiogênicos, mais particularmente tratamentos alternativos que atingem fatores angiogênicos, tais como VEGF. Testes de segurança pré-clínicos com anticorpos humanos anti-VEGF recombinantes demonstraram já em 1999 que a inibição de VEGF resulta na inibição de angiogênese fisiológica, mais particularmente neovascularização no crescimento ósseo longitudinal e formação de *corpora lutea* (Ryan et al., 1999) Toxicologic pathology 27(I):78-86). Estudos recentes descrevem que inibidores de VEGF causam regressão de vasos em traquéia e glândulas tireóides saudáveis, o que pode levar a disfunção de órgãos (Baffert et al, 2004, Circ Res 94:984-992; Inai et al., 2004 Am J Pathol 165:35- 52). Apesar disso, bevacizumab, um anticorpo anti-VEGF humano é usado atualmente no mercado como supressor de angiogênese apesar dos seus efeitos observados na cura de feridas,

pressão sangüínea e risco de trombose, por causa da eficácia geral dessa abordagem antiangiogênica sobre a regressão do tumor. Os anticorpos anti-PIGF e derivados da presente invenção permitem a inibição de angiogênese indesejada sem esses efeitos colaterais observados sobre a pressão sangüínea, cura de feridas, risco de trombose, e regressão de vasos em órgãos saudáveis.

[00076] Uma modalidade particular da presente invenção se refere a composições farmacêuticas, como um princípio ativo, o anticorpo monoclonal 16D3 ou um fragmento ou derivado desse, em mistura com um veículo farmaceuticamente aceitável. A composição farmacêutica da presente invenção compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma ou mais das moléculas de ligação ao antígeno. De forma semelhante, a presente invenção fornece métodos de tratamento e/ou prevenção que compreendem a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma ou mais das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção.

[00077] Uma quantidade terapeuticamente eficaz como usada aqui significa uma quantidade dentro da faixa de cerca de 0,5 mg por quilograma de peso (mg/kg) a cerca de 50 mg/kg, mais preferivelmente de cerca de 1 mg/kg e cerca de 10 mg/kg do mamífero a ser tratado. Será observado que, em vista do longo tempo de meia vida da maioria dos anticorpos IgG humanos, as moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção que são anticorpos monoclonais dessa classe irão possuir uma periodicidade de tratamento que participa no conforto do paciente.

[00078] De acordo com outro aspecto ainda da invenção, composições farmacêuticas são fornecidas que compreendem as moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção e outro agente antiangiogênico, assim como métodos de tratamento que fornecem uma administração seqüencial das moléculas de ligação ao antígeno da

presente invenção e outro agente antiangiogênico. De fato, a presente invenção demonstra um efeito aditivo das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção e outros agentes antiangiogênicos, tais como anticorpos anti-VEGF sobre a inibição do crescimento tumoral. Mais particularmente é demonstrado que o uso combinado do anticorpo 16D3 da presente invenção e Avastin® é capaz de reduzir o tamanho do tumor em até 70%, enquanto doses aumentadas tanto de Avastin® sozinho como do anticorpo anti-PIGF não alcançam uma redução do tamanho do tumor de mais do que 55% nas mesmas condições. Outros produtos antiangiogênicos adequados, assim como, sua dosagem usual dependendo da classe a qual eles pertencem, são bem-conhecidas daqueles versados na técnica. Exemplos de agentes antiangiogênicos incluem inibidores de VEGF que agem diretamente sobre VEGF, tal como o anticorpo direcionado contra VEGF comercializado sob o nome Avastin® ou que age sobre os receptores de VEGF. Os anticorpos da presente invenção tornam possível diminuir a dosagem de por exemplo agentes antiangiogênicos que inibem VEGF, conhecidos por induzir vários efeitos colaterais como descrito acima.

[00079] As composições farmacêuticas da presente invenção podem ainda compreender, uma quantidade terapeuticamente eficaz de outros compostos/fármacos ativos contra a doença a ser tratada, mais particularmente outros compostos/fármacos úteis no tratamento de crescimento tumoral, inflamação, doenças do olho e hipertensão pulmonar.

[00080] Veículos farmacêuticos adequados para uso nas composições farmacêuticas da invenção são descritos por exemplo em Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª ed. (1980) e sua formulação é bem-conhecida daqueles versados na técnica. Eles incluem quaisquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos (por exemplo fenol, ácido sórbico e

clorobutanol), agentes isotônicos, (tal como açúcares ou cloreto de sódio) e similares. Ingredientes adicionais podem estar incluídos a fim de controlar a duração da ação do princípio ativo de anticorpo monoclonal na composição. Composições de liberação controlada podem assim ser obtidas pela seleção de veículos de polímeros apropriados tais como por exemplo poliésteres, ácidos de poliamino, polivinil pirrolidona, copolímeros de acetato de etileno-vinila, metilcelulose, carboximetilcelulose, sulfato de protamina e similares. A taxa da liberação e duração da ação do fármaco também pode ser controlada pela incorporação do princípio ativo de anticorpo monoclonal em partículas, por exemplo microcápsulas, de uma substância polimérica tais como hidrogéis, ácido polilático, hidroximetilcelulose, metacrilato de polimetila e os outros polímeros descritos acima. Tais métodos incluem sistemas de liberação de fármacos colóides como lipossomos, microesferas, microemulsões, nanopartículas, e assim por diante. Dependendo da via de administração, a composição farmacêutica que compreende o princípio ativo pode requerer revestimentos protetores. A forma farmacêutica adequada para uso injetável inclui soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea dessas. Veículos típicos incluem portanto tampões aquosos biocompatíveis, etanol, glicerol, propileno glicol, polietileno glicol e misturas desses.

[00081] As moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção podem ser fornecidas a um paciente por qualquer meio bem-conhecido na técnica, isto é oral, intranasal, intramuscular, intradérmica, intravenosa, intra-arterial ou parenteralmente, ou por cateterização.

[00082] De acordo com um aspecto particular da presente invenção, as moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção são administradas por terapia gênica. Terapia gênica a base de anticorpos torna possível superar várias das potenciais limitações associadas com

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

[00083] Dessa forma, de acordo com essa modalidade, a presente invenção fornece nucleotídeos que codificam as moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção para uso em terapia gênica no tratamento das doenças caracterizadas por angiogênese patológica descrita aqui. Particularmente, a presente invenção fornece composições que compreendem seqüências de nucleotídeos que codificam a região de cadeia pesada variável definida por SEQ ID N°: 2 e/ou seqüências de nucleotídeos que codificam a região variável de cadeia leve definida por SEQ ID N°: 4, para uso em terapia gênica. Mais particularmente, a presente invenção fornece composições que compreendem a seqüência de nucleotídeos de SEQ ID N°: 1 e/ou SEQ ID N°: 3, que corresponde às seqüências da linhagem celular 16D3 que codifica a região de cadeia leve e pesada do anticorpo 16D3. Também dentro do contexto da presente invenção composições que compreendem seqüências de nucleotídeos são fornecidas que

codificam uma ou mais das regiões de CDR do anticorpo monoclonal 16D3 como identificado nas SEQ ID N°s 17 a 22. Modalidades particulares da invenção incluem a seqüência que codifica as scFvs e scFvs humanizadas de 16D3 tais como mas não limitadas a SEQ ID N°: 23 e SEQ ID N°: 25, respectivamente.

[00084] O método de tratamento e/ou prevenção de acordo com a invenção pode incluir tratamento ou prevenção adicional da mesma condição de angiogênese patológica pela administração, preferivelmente pela administração seqüencial, ao paciente uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente antiangiogênico ou antitumoral tal como descrito aqui acima sob tópico de composições farmacêuticas. Seqüencialmente, como usado aqui, significa que o ligante da presente invenção e o agente antiangiogênese conhecidos são administrados ao paciente seqüencialmente mas não simultaneamente.

[00085] Ainda outro aspecto da presente invenção se refere ao uso das moléculas de ligação ao antígeno da invenção para a detecção imunológica de PIGF em amostras humanas e como componentes de kits adequados para tal detecção. Métodos de detecção imunológica de um antígeno são conhecidos na técnica e incluem, mas não são limitados a, EIA, ELISA e RIA e métodos imunohistoquímicos. A ligação dos anticorpos murinos da presente invenção ao antígeno de PIGF pode ser detectada indiretamente por exemplo por meio de um anticorpo anticumundongo marcado. Alternativamente os anticorpos ou fragmentos desses podem ser marcados diretamente. Uma modalidade específica desse aspecto da invenção se refere ao uso dos anticorpos contra PIGF e fragmentos de ligação ao antígeno desses na identificação de pacientes susceptíveis a um tratamento com anti-PIGF. Isso é de interesse particular no tratamento de câncer.

[00086] Ainda outro aspecto da presente invenção se refere ao uso

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

[00087] Ainda outro aspecto da presente invenção se refere ao uso das moléculas de ligação ao antígeno da presente invenção em modelos animais no rastreamento de compostos para uso em combinação com uma terapia anti-PIGF. Tais modelos incluem mas não estão limitados a modelos de tumor pelos quais o crescimento e desenvolvimento de células tumorais humanas em camundongos nu/nu é investigada. A administração combinada do composto a ser testado e do anticorpo ou fragmento de anticorpo da presente invenção torna possível identificar se o composto tem um efeito aditivo ao efeito observado por administração dos anticorpos ou fragmentos da invenção sozinhos. Outros aspectos tais como contra-eficácia ou toxicidade de um composto em combinação com um anticorpo anti-PIGF também podem ser determinados dessa forma.

[00088] Apesar da aplicação terapêutica descrita acima, as seqüências de nucleotídeos da presente invenção descritas acima são úteis na produção de anticorpos e outros fragmentos de ligação ao antígeno, por exemplo por métodos recombinantes. Dessa forma, a presente invenção ainda fornece métodos de produzir anticorpos recombinantes e fragmentos de anticorpos, incluindo clonagem e manipulação de genes de anticorpo, produção de scFv e outros fragmentos de ligação ao antígeno usando as seqüências de nucleotídeos descritas aqui. O protocolo desses métodos está disponível na técnica. Adicionalmente, as sondas que hibridizam especificamente à seqüência de nucleotídeo da presente invenção podem ser usadas para rastrear a expressão dos anticorpos e fragmentos de anticorpo da presente invenção.

[00089] A presente invenção é ainda descrita pelos exemplos seguintes que são fornecidos apenas para fins ilustrativos.

Exemplos

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

1. Imunização de camundongos e fusão

[00090] Anticorpos monoclonais contra PIGF humano foram produzidos essencialmente como descrito por Galfré e Milstein (Galfré F, Milstein C. *Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. Method Enzymol* 1981; 73:3-46). Resumidamente, camundongos *knock-out* para PIGF (Luttun et al., 2002, *Biochem Biophys Res Comm* 295(2): 428-34, Carmeliet et al. (2001), *Nat Med* 7:575-593 ou WO01/85796) foram imunizados por injeção subcutânea de 50 µg de PIGF-2 humano recombinante (produzido em *Pichia*) em adjuvante de Freund Completo, seguido duas semanas mais tarde por injeção subcutânea com 50 µg de PIGF recombinante humano em adjuvante de Freund incompleto. Amostras de sangue (cerca de 100 µl)

foram coletadas das caudas dos camundongos após 10 dias. Os soros foram testados quanto aos anticorpos anti-huPIGF por ELISA usando placas de microtitulação cobertas com PIGF humano como captura, aplicação de soros diluídos (de 1/500 a 1/8000), e IgG de cabra anticamundongo conjugada a peroxidase de rábano silvestre (HRP) para sinalização.

[00091] Após um intervalo de pelo menos 6 semanas, os camundongos (com respostas positivas elevadas) foram estimulados intraperitonealmente com 50 µg de PIGF recombinante humano em solução salina nos dias 4 e 2 antes da fusão celular.

[00092] Células do baço foram isoladas e fundidas com células de mieloma Sp2/0-Ag14. Após seleção em meio com hipoxantina, aminopterina e timidina, clones positivos foram selecionados pela aplicação dos sobrenadantes de cultura em ELISA como descrito acima.

2.Purificação de anticorpos em ProSep vA Ultra

[00093] Anticorpos foram purificados a partir dos sobrenadantes da cultura celular por cromatografia de afinidade em ProSep vA Ultra (Millipore) de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, NaCl 150 mM foi adicionado ao sobrenadante e o sobrenadante foi aplicado em uma coluna ProSep vA Ultra que foi pré-equilibrada com PBS. A coluna foi lavada com PBS e a proteína ligada foi eluída com glicina 0,1M pH 2,8. A proteína eluída foi dialisada ON contra PBS. A pureza da proteína eluída foi checada sob condições redutoras e não redutoras por SDS-PAGE.

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

[00094] Placas de ELISA foram revestidas ON com 1µg/ml de huPIGF-2 (Pichia) em PBS, 100 µL/cavidade, 4°C. Após bloqueio com BSA 1%, uma hora, TA, uma série de diluições de 16D3/hu16D3 foi adicionada, 100 µL/cavidade, o anticorpo foi deixado se ligar por uma

hora, TA. 16D3 ligado foi detectado com IgG-HRP de cabra anti-humano ou de cabra antimurino (Sigma), 100 µL/cavidade, uma hora, TA. O ensaio foi desenvolvido com OPD.

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

[00095] Placas de ELISA foram revestidas ON com 1µg/ml de huFlt-1 (R&D Systems), 200 µL/cavidade, ON, 4°C. Após bloqueio com BSA 1%, uma hora, TA, uma série de diluições de 16D3/hu16D3 foi adicionada, 100 µL/cavidade e um adicional de 100 µL/cavidade de huPIGF-2 foi adicionado. Após uma incubação de duas horas em TA, PIGF ligado foi detectado com anti-huPIGF de cabra (R&D Systems), 180 µL/cavidade, uma hora, TA, seguido por uma incubação com RAG-HRP (DAKO), uma hora, TA. O ensaio foi desenvolvido com OPD.

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

- Inibição: rhuPIGF-2 (Pichia, TX) foi imobilizado sobre um chip CM5 usando química EDC/NHS (*Amine Coupling Kit*, Biacore), dando 412 RU. O 16D3 foi injetado seguido de quimera rhuFlt-1/Fc (R&D Systems). Isso também foi realizado com tampão ao invés do anticorpo de camundongo. Esses também foram injetados em um canal de Fluxo de controle negativo e esses valores também já são subtraídos. Esse ensaio foi realizado em um tampão de fosfato em pH 9,6.

[00096] Em comparação com a ligação máxima de rhuFlt-1 a rhuPIGF-2, o sinal de rhuFlt-1 é reduzido se 16D3 ou 16D3Fab é injetado primeiro (Figura 3).

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

- Isolamento de mRNA: O mRNA de células de hibridoma de 16D3 foi isolado usando o *QuickPrep® Micro mRNA Purification Kit* (Amersham Biosciences). Esse mRNA foi usado para fazer cDNA

usando o *First-Strand cDNA Synthesis Kit* (Amersham Biosciences) com o iniciador pd(N)₆ disponível no kit.

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

[00097] Iniciadores usados para a cadeia pesada do anticorpo 16D3:

MHVR3 5'-ATG GRA TGG AGC TGG ATC WTT HTC- 3' (SEQ ID N°:9)

MHCRI 5'- CAS AYM CAG GGG CCA GTG GAT AGA C- 3' (SEQ ID N°: 10)

[00098] Iniciadores usados para a cadeia leve do anticorpo 16D3:

MKVR3 5'- ATG RAG TCA CAK ACY CAG GTC TTY RTA- 3' (SEQ ID N°: 11)

MKCRI 5'- GCT CAC TGG ATG GTG GGA AGA TGG- 3' (SEQ ID N°: 12)

[00099] Configuração do PCR: desnaturação 10 min. 94°C, desnaturação 30 seg. 94°C, anelamento 30 seg. 55°C, extensão 1 min 72°C, extensão 5 min. 72°C, número de ciclos 30.

[000100] A redundância na seqüência de SEQ ID N°: 9 a 11 é indicada usando as abreviações convencionais R = A ou G, K= G ou T, W= A ou T, H= A ou C ou T, S= C ou G, Y= C ou T, M= A ou C.

•Clonagem e seqüenciamento: Os produtos de PCR foram aplicados em um gel de agarose, as bandas corretas foram selecionadas, purificadas (*QIAquick® Gel Extraction Kit*, Qiagen GmbH) e clonados no vetor pCR®4Blunt-TOPO® fornecido no *Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing* (Invitrogen® life Technologies). O plasmídeo de DNA foi preparado usando o *High Pure Plasmid*

Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH) e os insertos foram seqüenciados usando os iniciadores de sentido reverso T7 e M13 no ABI PRISM® 310 (PE Applied Biosystems).

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

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

1. Construção de 16D3 humanizado

Humanização das regiões variáveis

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

Cadeia pesada:I2V

P9A

K40A

T111L

Cadeia leve:S5T

S9D

A15L

K18R

R22N

L89V

- As mutações foram feitas pelo uso do *QuickChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene®). 1 a 5 iniciadores contendo as mutações puderam ser usados em 1 PCR. Após a transformação colônias foram retiradas e o DNA seqüenciado para determinar o clone com a maioria das mutações pontuais. Esse clone foi usado para repetir esse procedimento até que todas as mutações estavam presentes na seqüência.

Ligando as regiões variáveis a uma região constante de IgG

humana:

[000101] Pela realização de um PCR as partes variáveis humanizadas das cadeias pesada e leve foram obtidas, as quais os sítios de restrição apropriados foram adicionados.

[000102] Iniciadores para a parte variável da cadeia leve:

Iniciador 1: 5'-CCACCGGT GAC ATT GTG CTG ACC CAG TCT CC-3' (SEQ ID N°: 13)

Iniciador 2: 5'-CACCGTACG TTT TAT TTC CAA CTT TGT CCC CGA G-3' (SEQ ID N°:14)

[000103] Iniciadores para a região variável da cadeia pesada:

Iniciador 3: 5'-CAG GTC CAG CTG CAG CAG TCT G-3' (SEQ ID N°: 15)

Iniciador 4: 5'-GATGGGCCCTTGGTCGACGC TGA GGA GAC TGT GAG CAG GG-3' (SEQ ID N°: 16)

[000104] Configuração do PCR: desnaturação 5 min. 94°C, desnaturação 30 seg. 94°C, anelamento 30 seg. 60°C, extensão 30 seg. 72°C, extensão 5 min. 72°C, número de ciclos 25.

[000105] Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose, as bandas foram selecionadas e purificadas (*QIAquick® Gel Extraction Kit*, Qiagen GmbH). O produto de PCR da parte variável da cadeia pesada de 16D3 foi digerido com Sall, o vetor pKNEO-MCS50-Hleu-var N° 24 contendo a parte constante completa da cadeia pesada de um anticorpo humano (IgG4), com Eco47III e Sall e ligados. O produto de PCR da parte variável da cadeia leve foi clonado primeiro no vetor pCR®4Blunt-TOPO® fornecido no *Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing* (Invitrogen®/Life Technologies). A parte variável da cadeia leve foi cortada por AgeI e BsiWI e clonada no vetor pKNEO-CM30-L var N° 7 que já continha a parte constante de uma cadeia leve kappa humana. Ambos os vetores foram reunidos para um vetor pela extração do cassete de expressão da cadeia leve do vetor usando PmeI e PacI e

adicionando-o ao vetor que continha a cadeia pesada.

[000106] As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos das partes variáveis das cadeias pesada e leve do anticorpo 16D3 humanizado estão representadas nas SEQ ID N^os. 5, 6, 7 e 8 (veja Figura 12).

2. Expressão transitória de hu16D3

[000107] Hu16D3 IgG4k foi expresso transitoriamente em células HEK 293 usando o *FreeStyle 293 Expression System* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Hu16D3 foi purificado a partir do sobrenadante usando cromatografia de afinidade em proSep vA Ultra. Hu16D3 purificado foi checado quanto à pureza por SDS-PAGE sob condições redutoras e não redutoras. Hu16D3 foi ainda testado quanto a ligação a huPIGF e quanto a inibição da ligação de HuPIGF/huFLT-1 através de ELISA (veja Figura 1 e 2).

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

1. Descrição geral de materiais e métodos

Cultura celular

[000108] As linhagens de células pancreáticas Panc02 de murino e a linhagem de célula pancreática humana DanG são uma gentil doação de S. Rosewicz (Charité-Universitätsmedizin Berlin, Alemanha). As linhagens celulares humanas MDA-MB de mama, LOVO de cólon e Mel2a de melanoma foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA, USA). Todas as células foram cultivadas como recomendado. Anticorpos 16D3 anti-PIGF de murino foram usados para todos os experimentos *in vivo*, para evitar reação imune ao anticorpo.

Experimentos em animais

[000109] Todos os procedimentos em animais foram completamente aprovados pelo comitê institucional para uso e cuidados de animais. Camundongos nu/nu NMRI fêmeas foram abrigadas sob condições semi-estéreis e foram usadas rotineiramente com 8-10 semanas de

idade (peso aproximado, 25 g). Para a preparação da fonte de tumor, células de tumor foram tripsinizadas para preparar uma suspensão de células isoladas, lavadas com PBS. O precipitado centrifugado foi ressuspenso em 200 µl de PBS e injetado subcutaneamente no flanco direito dos camundongos. Para o modelo de tumor pancreático ortotópico, 1×10^6 células tumorais em 30 µl de PBS foram injetadas na cabeça do pâncreas através de laparotomia ventral de camundongos C57B16 fêmeas com idade de 9-10 semanas. Antes dos procedimentos, os camundongos foram anestesiados com quetamina (90 mg/kg de peso corporal) e xilazina (9 mg/kg de peso corporal).

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

[000110] Tratamento com anticorpos ou controle com veículo foi iniciado quando os tumores atingiram um tamanho aproximado de 60 mm³. Anticorpos P15D11D4 (WO01/85796), 16D3, 1C8 ou veículo foram administrados nas doses indicadas intraperitonealmente em dias alternados. Avastin foi injetado nas doses indicadas intraperitonealmente duas vezes por semana.

Medidas dos tumores

[000111] Tumores que cresciam subcutaneamente foram medidos em dias alternados usando um calibrador e os volumes dos tumores calculados usando a fórmula $p/6 (w1 \times w2 \times w2)$, onde 'w1' e 'w2' representam o maior e o menor diâmetro do tumor, respectivamente. Quando os camundongos foram sacrificados o tumores ortotópicos em crescimento do pâncreas foi medido após laparotomia ventral usando o mesmo método.

Análise estatística

[000112] A análise estatística foi realizada pelo teste de t-Student bicaudal para observações pareadas usando um programa estatístico *GraphPad* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Todos os dados são expressos com média $\pm$ SEM, a menos que indicado de outra

maneira. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, a menos que indicado de outra maneira.

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

[000113] 1×10^6 células tumorais foram injetadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos fêmeas nu/nu NMRI de 11 semanas de idade. Após os tumores atingirem um tamanho de aproximadamente 60 mm^3 , o tratamento com anti-hPIGF (16D3, 50 mg/kg de peso corporal; $n=10$), anti-mPIGF (PL5D11D4 (obtido como descrito na WO01/85796; 50 mg/kg de peso corporal; $n=10$), IgG de controle (1C8; 50 mg/kg de peso corporal; $n=10$), uma combinação de anti-hPIGF e anti-mPIGF (25 mg/kg de peso corporal de cada; $n=10$) e veículo ($n=10$) foi iniciado. Os anticorpos foram injetados i.p. em dias alternados. (A) Os tumores foram medidos em dias alternados e o volume do tumor foi calculado usando a fórmula $W1 \times W2 \times W2 \times \pi / 2$, onde W1 representa o maior e W2 representa o menor diâmetro. (B) Os camundongos foram sacrificados no dia 18 após a inoculação do tumor, os tumores foram ressecados e pesados. Volume médio do tumor: veículo: $915 \pm 90 \text{ mm}^3$, IgG: $\pm 89 \text{ mm}^3$, PL5D11D4: $832 \pm 118 \text{ mm}^3$, 16D3: $521 \pm 83 \text{ mm}^3$, PL5D11D4 + 16D3: $497 \pm 86 \text{ mm}^3$.

[000114] Os resultados, como mostrado na Figura 4, mostram que a administração de anticorpo 16D3 anti-PIGF humano tem uma clara influência sobre o tamanho e peso do tumor.

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

[000115] 1×10^6 células tumorais foram injetadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos fêmeas nu/nu NMRI de 11 semanas de idade. Após os tumores atingirem um tamanho de aproximadamente 60 mm^3 , o tratamento com anti-hPIGF, IgG (1C8; 50 mg/kg), 16D3 (50

mg/kg, 37,5 mg/kg, 25 mg/kg, 12,5 mg/kg de peso corporal; n=10 para cada concentração) e veículo (n=10). (B) Os camundongos foram sacrificados no dia 18 após a inoculação do tumor.

[000116] Os resultados são mostrados na Figura 5. Volume médio do tumor $\pm$ SEM: 16D3, 50 mg/kg de peso corporal: $450 \pm 37 \text{ mm}^3$; 37,5 mg/kg de peso corporal: $469 \pm 97 \text{ mm}^3$; 25 mg/kg de peso corporal: $493 \pm 107 \text{ mm}^3$; 12,5 mg/kg de peso corporal: $693 \pm 107 \text{ mm}^3$; IC8: $865 \pm 109 \text{ mm}^3$; veículo: $889 \pm 100 \text{ mm}^3$.

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

[000117] 1×10^7 Células tumorais foram injetadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos fêmeas nu/nu NMRI de 11 semanas de idade. Após os tumores atingirem um tamanho de aproximadamente 60 mm^3 , tratamento com anti-hPIGF, 16D3 (50 mg/kg de peso corporal; n=10) e veículo (n=10).

[000118] Os resultados são mostrados na Figura 6 (e Tabela 1 abaixo).

Tabela 1

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

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

[000119] 1×10^7 células tumorais foram injetadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos fêmeas nu/nu NMRI de 11 semanas de idade. Após os tumores atingirem um tamanho de aproximadamente 60 mm^3 , tratamento com anti-hPIGF, 16D3 (50 mg/kg de peso corporal; n=10) e veículo (n=10).

[000120] Os resultados são mostrados na Figura 7 e Tabela 2 abaixo.

Tabela 2

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

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

[000121] 4×10^6 células tumorais foram injetadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos fêmeas nu/nu NMRI de 11 semanas de idade. Após os tumores atingirem um tamanho de aproximadamente 60 mm^3 , tratamento com anti-hPIGF, 16D3 (50 mg/kg de peso corporal; n=10) e veículo (n=10).

[000122] Os resultados são mostrados na Figura 8 e Tabela 3 abaixo.

Tabela 3

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

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

[000123] Materiais e métodos são como descritos no Exemplo 3.

[000124] 1×10^6 células tumorais foram injetadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos fêmeas nu/nu NMRI de 11 semanas de idade. Após os tumores atingirem um tamanho de aproximadamente 60 mm^3 , o tratamento com anti-hPIGF (16D3, 50mg/kg de peso corporal; n=10), anti-mPIGF (PL5D11D4 50 mg/kg de peso corporal; n=10), IgG de controle (1C8; 50 mg/kg de peso corporal; n=10), uma combinação de anti-hPIGF e anti-mPIGF (25 mg/kg de peso corporal de cada; n=10) e veículo (n=10) foi iniciado. Os anticorpos foram injetados i.p. em dias

alternados. O peso corporal dos camundongos foi medido no primeiro e no último dia do tratamento com anticorpo. O peso do tumor foi subtraído do peso corporal antes do cálculo do percentual de perda de peso corporal.

[000125] Os resultados são mostrados na Figura 9. É mostrado que anti-hPIGF evita a perda de peso corporal nesse modelo de xenoenxerto de tumor pancreático humano subcutâneo DanG.

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

[000126] Materiais e métodos são como descritos no Exemplo 3.

[000127] 1×10^6 células tumorais foram injetadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos fêmeas nu/nu NMRI de 11 semanas de idade. Após os tumores atingirem um tamanho de aproximadamente 60 mm³, tratamento com anti-hPIGF (16D3, 50mg/kg, 37,5 mg/kg, 12,5 mg/kg de peso corporal i.p. em dias alternados; n=10 para cada concentração), Avastin (15 mg/kg e 5 mg/kg de peso corporal, i.p. duas vezes por semana, n=10 cada) e uma combinação de anti-PIGF (12,5 mg/kg de peso corporal) e Avastin (5 mg/kg de peso corporal; n=10). Os camundongos foram sacrificados após 20 dias da inoculação do tumor.

[000128] Os resultados são mostrados na Figura 10. Volume tumoral médio $\pm$ SEM: 1C8, 37; 37,5 mg/kg de peso corporal: 954 ± 164 mm³; 12,5 mg/kg de peso corporal: 1398 ± 236 mm³; IgG: 1789 ± 231 mm³; Avastin 15 mg/kg de peso corporal: 828 ± 186 mm³; 5 mg/kg de peso corporal: 926 ± 202 mm³; Avastin + 16D3: 569 ± 94 mm³. É observado que anti-hPIGF e Avastin exercem um efeito adicional sobre a inibição do crescimento tumoral em um DanG pancreático subcutâneo humano.

Exemplo 6: Produção de scFv de 16D3

[000129] As seqüências das partes variáveis das cadeias pesada e leve (SEQ IDs NO: 2 e 4, respectivamente, obtidas como descrito no Exemplo 1) foram amplificadas por PCR usando iniciadores com os

sítios de restrição de ligação e ligantes apropriados. Após um SOE PCR (estrançamento de genes por extensão de super posição) scFv foi clonado em pEE14.4 (sítios de clonagem HindIII-EcoRI) (Figura 12). Esse scFvhp16D3/pEE14.4 foi transfectado para células CHO-K1 após linearização com BamHI usando Eugene 6 (Boehringer Mannheim) e subclonado duas vezes por diluição. Um scFv hp16D3 monoclonal, 6C5D4, foi obtido e produzido. Esse clone também foi transfectado transitoriamente em células 293 por Producell em paralelo com scFv hp16D3/pKANE0-MCS50-dhfr1 (sítios de clonagem NheI-NotI) (Figura 13).

[000130] As seqüências de nucleotídeo e aminoácido do scFv de 16D3 são fornecidas como SEQ ID N°: 23 e SEQ ID N°: 24, respectivamente. A seqüência de aminoácidos que demonstra as regiões variáveis das cadeias pesada e leve, a seqüência ligante e HA-tag e His Tag também é fornecida na Figura 15.

Exemplo 7: Humanização de scFv 16D3

[000131] Humanização das regiões variáveis do scFv foi realizada como descrito no Exemplo 2. As seqüências de nucleotídeo e aminoácido de scFv de 16D3 são fornecidas nas SEQ ID N°: 25 e SEQ ID N°: 26, respectivamente. A seqüência de aminoácidos que demonstra as regiões variáveis das cadeias pesada e leve, a seqüência ligante e HA-Tag e His tag de scFv humanizado também é fornecida na Figura 15.

Exemplo 8: Produção de Fab 16D3 humanizado

1. Amplificação dos fragmentos VH e VL de scFv16D3 humanizado

Iniciadores para amplificação de fragmento VH de scFv16D3 humanizado

16D3Vhbackblunt 5'-CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTG-3' (SEQ ID N°: 27)

16D3VhforSall 5'-

GATGGGCCCTTG**GTCG**ACGCTGAGGAGACTGTGAGCAGGG-3' (SEQ ID

Nº: 28)

Iniciadores para amplificação de fragmento VL de scFv16D3 humanizado

16D3VLBackAgeI 5'-CCACCGGTGACATTGTGCTGACCCAGTCTCC-3'

(SEQ ID Nº: 29)

16D3VLForBsiWI 5'-CACCGTACGTTTTATTTCCAACCTTTGTCCCCGAG-3'

(SEQ ID Nº: 30)

2. Construção de vetores de cadeia pesada e leve

[000132] O produto de PCR da cadeia leve foi clonado primeiro no vetor pCR4blunt-TOPO. Após o seqüenciamento a cadeia leve foi removida por digestão com AgeI e BsiWI e clonada no vetor pKANEO-CM30-LvarNº 7. O produto de PCR da cadeia pesada foi clonado após digestão diretamente em pKANEO-MCS50-FabvarNº 3.

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

[000133] Ambos os vetores (acima descritos), contendo o segmento leve e pesado, foram unidos juntos pela remoção do cassete contendo o segmento leve e adicionando-o ao vetor contendo o segmento pesado pelo uso das enzimas PmeI e PacI, para obter o construto final, hp16D3mutcmplFab/pKANEO-MCS50-FabvarNº 3. (veja Figura 16).

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

1. ELISA de ligação ao antígeno

[000134] Placas de ELISA foram revestidas ON com 1 µg/ml de huPIGF-1 em PBS, 200 µL/cavidade, 4°C. Após bloqueio com BSA 1%, uma hora, TA, uma série de diluições de scFv16D3/ scFv16D3 humanizado foi adicionada, 200 µL/cavidade, o fragmento de anticorpo foi deixado se ligar por uma hora., TA. scFv16D3 ligado foi detectado com anti-HA de murino (180 µL/cavidade, uma hora. TA) seguida pela incubação com IgG- HRP de cabra antimurino (Sigma), 170 µL/cavidade, uma hora, TA. O ensaio foi desenvolvido com OPD.

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

[000135] Placas de ELISA foram revestidas ON com 1 µg/ml de huFlt-1 (R&D Systems), 200 µL/cavidade, ON, 4°C. Após bloqueio com BSA 1%, uma hora, TA, uma série de diluições de scFv16D3/scFv16D3 humanizado foi adicionada, 100 µL/cavidade e um adicional de 100 µL /cavidade de huPIGF-2 foi adicionado. Após uma incubação de duas horas em TA, PIGF ligado foi detectado com anti-huPIGF de cabra (R&D Systems), 180 µL/cavidade, uma hora, TA, seguido por uma incubação com RAG-HRP (DAKO), uma hora, TA. O ensaio foi desenvolvido com OPD.

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

1. ELISA de ligação ao antígeno

[000136] Placas de ELISA foram revestidas ON com 1 µg/ml de huPIGF-1 em PBS, 100 µL/cavidade, 4°C. Após bloqueio com BSA 1%, uma hora, TA, uma série de diluições de Fab16D3 humanizado foi adicionada, 100 µL/cavidade, o fragmento de anticorpo foi deixado se ligar por uma hora, TA. Fab16D3 humanizado ligado foi detectado com anti-huIgG-HRP (Fab específico) (100 µL/cavidade, uma hora TA). O ensaio foi desenvolvido com OPD. Os resultados são fornecidos na Figura 17A.

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

[000137] Placas de ELISA foram cobertas ON com 1 µg/ml de huFlt-1 (R&D Systems), 200 µL/cavidade, ON, 4°C. Após bloquear com BSA 1%, uma hora, TA, uma série de diluições de Fab16D3 humanizado foi adicionada, 100 µL/cavidade e um adicional de 100 µL /cavidade de huPIGF-2 foi adicionado. Após uma incubação de duas horas em TA, PIGF ligado foi detectado com anti-huPIGF de cabra (R&D Systems), 180 µL/cavidade, uma hora, TA, seguido por uma incubação com RAG-HRP (DAKO), uma hora, TA. O ensaio foi desenvolvido com OPD. Os

resultados são fornecidos na Figura 17B.

Exemplo 11: Determinação dos valores de K_D

[000138] Os valores de K_D para 16D3, 16D3 IgG4 humanizado, scFv16D3 humanizado e Fab16D3 humanizado foram determinados por Biacore. Os resultados são fornecidos na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4: Tabela resumida de valores de K_D

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

[000139] Valores de K_D de 16D3, 16D3 IgG4 humanizado, Fab 16D3 humanizado e scFv16D3 humanizado.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ligação ao antígeno capaz de se ligar a PIGF, caracterizada em que ela compreende as regiões de determinação de complementaridade (CDRs) selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID N°: 17 a 22.

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

3. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizada em que ela compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de SEQ ID N°: 2 e em que ela compreende uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de SEQ ID N°: 4.

4. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que é o anticorpo 16D3 como produzido pela linhagem celular depositada como LMBP 6399CB ou um fragmento do mesmo.

5. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que é um anticorpo humanizado ou fragmento de anticorpo.

6. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é um fragmento variável de cadeia única.

7. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 24.

8. Molécula de ligação ao antígeno de acordo com a

reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 26.

9. Linhagem celular de hibridoma, caracterizada pelo fato de que produz uma molécula de ligação ao antígeno como definida na reivindicação 1, em que a linhagem celular de hibridoma é a depositada como LMBP6399CB.

10. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende como um princípio ativo uma molécula de ligação a PIGF como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em mistura com um veículo farmacêuticamente aceitável.

11. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente uma quantidade terapeuticamente eficaz de outro agente anti-angiogênico.

12. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que codifica uma molécula de ligação ao antígeno como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8.

13. Uso da molécula de ligação ao antígeno como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que, em modelos animais não-humanos, é para o rastreamento de compostos com um efeito aditivo à inibição de PIGF no tratamento de câncer.

14. Uso da molécula de ligação ao antígeno como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que é como uma ferramenta de diagnóstico *in vitro*.

15. Uso de uma molécula de ligação ao antígeno como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que é para o rastreamento de moléculas de ligação de antígeno capazes de ligar ao mesmo epítomos de PIGF.

16. Método de seleção de anticorpos monoclonais capazes de ligar ao mesmo epítomos PIGF como anticorpo 16D3 como definido

na reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) fornecer um anticorpo monoclonal que liga PIGF com objetivo de imunização em animais, e

(b) selecionar um anticorpo monoclonal que liga PIGF capaz de ligar ao mesmo epítomos como anticorpo 16D3 com base na reatividade com o referido epítomos ou com base na competição com anticorpo 16D3.

17. Uso de molécula de ligação de antígeno, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, ou um polinucleotídeo como definido na reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que é na preparação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de angiogênese indesejada em uma condição patológica em um mamífero.

18. Uso, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a condição patológica é selecionada do grupo que consiste em câncer, inflamação, formação de adesão, doenças no olho, hipertensão pulmonar e vazamento vascular.

19. Uso, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o referido câncer é selecionado do grupo que consiste em câncer de cólo de útero, câncer de mama, câncer pancreático e melanomas.

20. Uso de uma molécula de ligação de antígeno como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que é na preparação de um medicamento para reduzir efeitos colaterais em um tratamento para inibição de angiogênese indesejada com um inibidor VEGF atuando diretamente sobre VEGF, em que os referidos efeitos colaterais são causados pelo referido inibidor de VEGF e em que a dosagem do referido inibidor de VEGF é diminuída quando comparada com a dosagem em uma terapia para inibição de angiogênese indesejada com o referido inibidor VEGF.

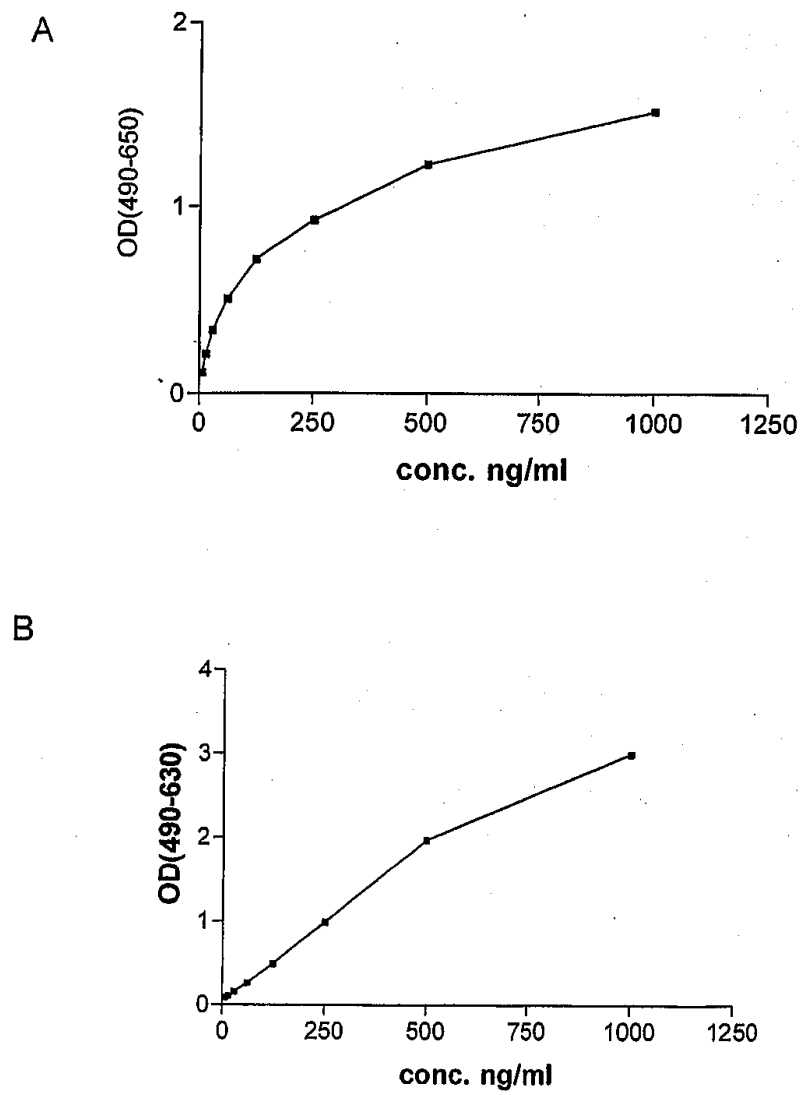
21. Uso de uma molécula de ligação de antígeno como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que é na preparação de um medicamento para inibição de angiogênese indesejada em uma terapia com inibidor VEGF atuando diretamente sobre VEGF, em que a dosagem do referido inibidor de VEGF é diminuída quando comparada com a dosagem em uma terapia para inibição de angiogênese indesejada com o referido inibidor VEGF.

22. Uso de acordo com as reivindicações 20 e 21, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal, fragmento ou derivado do mesmo e o referido inibidor VEGF atuando diretamente sobre VEGF são combinados via administração simultânea ou sequencial.

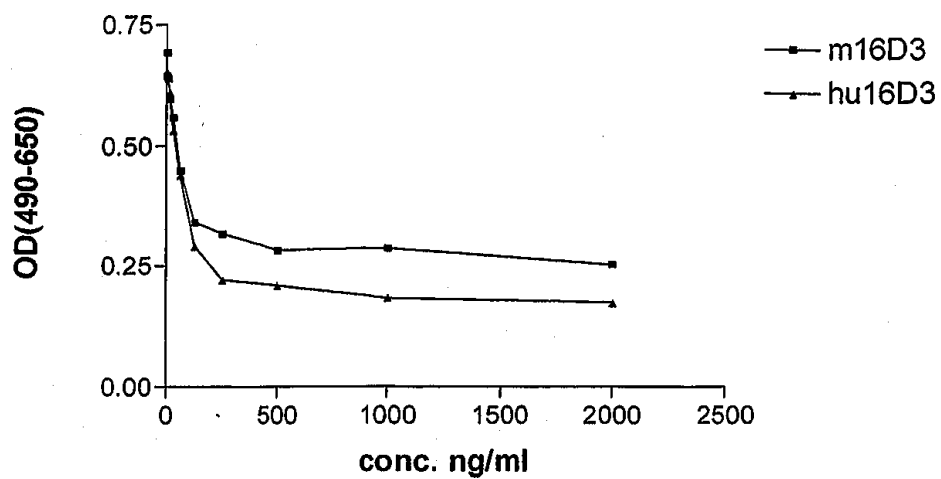
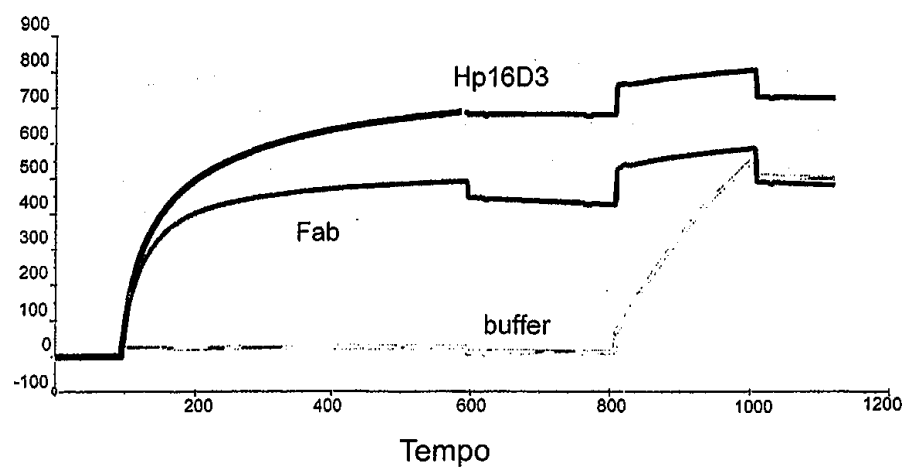
23. Uso de acordo com as reivindicações 20 e 21, caracterizado pelo fato de que a referida angiogênese indesejada é uma condição patológica selecionada do grupo que consiste em câncer, inflamação, formação de adesão, doenças dos olhos, hipertensão pulmonar e vazamento vascular.

24. Uso de acordo com as reivindicações 20 e 21, caracterizado pelo fato de que o referido inibidor de VEGF atuando diretamente sobre VEGF é um anticorpo inibidor contra VEGF.

1/15

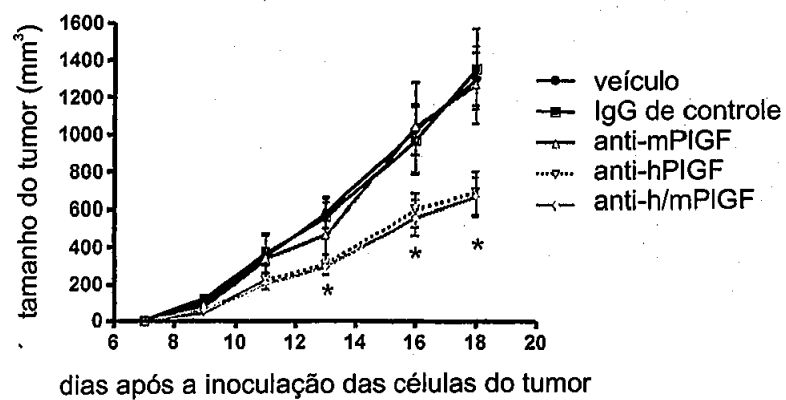
**Fig. 1**

2/15

*Fig. 2**Fig. 3*

3/15

A



B

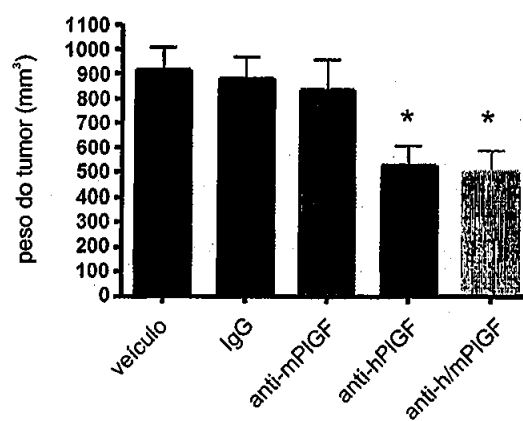
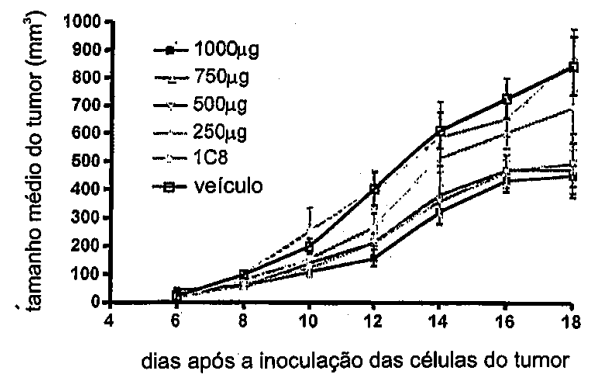


Fig. 4

A



B

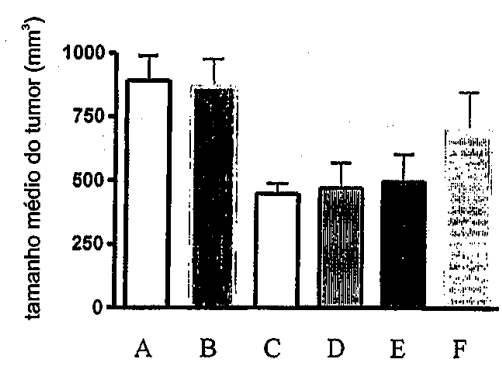
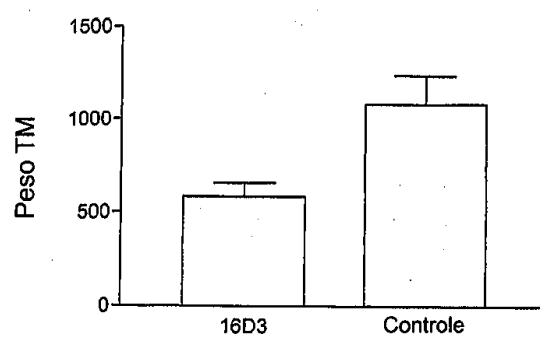


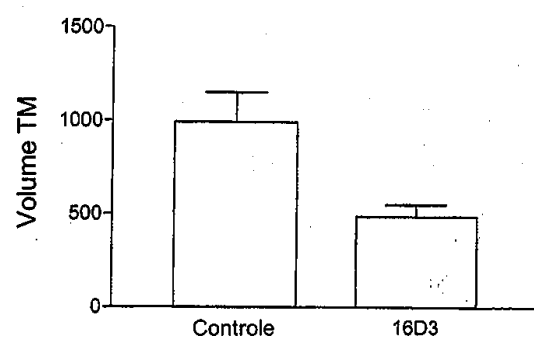
Fig. 5

5/15

A

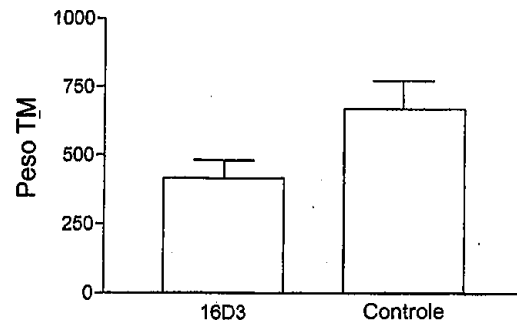


B

**Fig. 6**

6/15

A



B

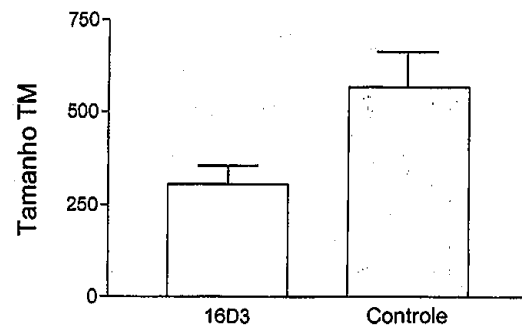
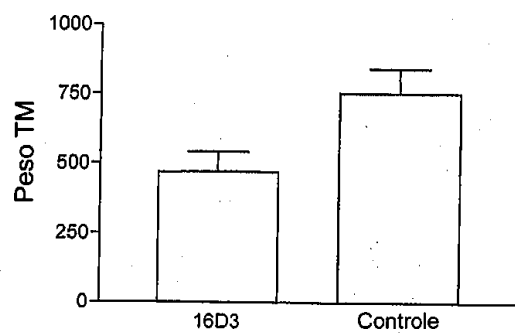
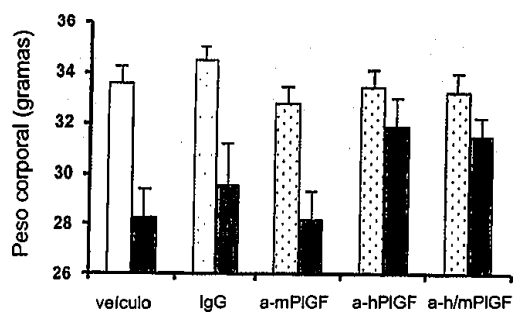
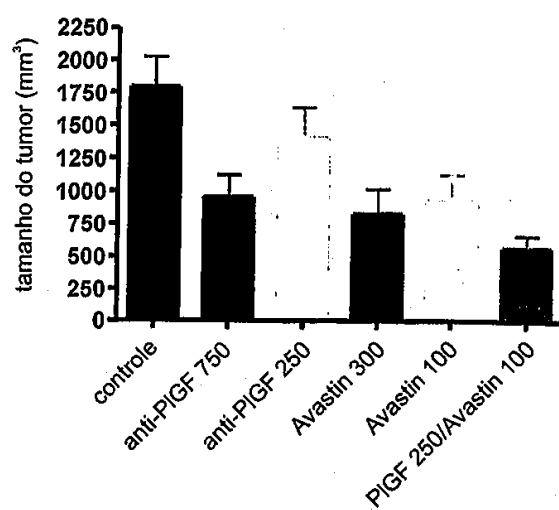


Fig. 7

7/15

**Fig. 8****Fig. 9**

8/15

**Fig. 10**

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

caga_tccagctgcagcagtcctggac_cctgagctggtgaagcctggggccttcagtgaagatatc
ctgcaaggcctctggctacaccttcactgactactatataaaactgggtgaagttgaagcctg
gacagggacttgagtggattggatggatttatcctggaagcggtaataactaagtacaatgag
aagttcaagggcaaggccacattgactatagacacatcctccagcagcagcctacatgcagct
cagcagcctgacatctgaggacactgctgtctat_tttctgtgtaagagacagcctttctttg
actactggggccaaggcaccactctcacagtcctcctca

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

gacattgtgctgtcacagtcctccat_cctccctggctgtgtcagcaggagagaaggtcactat
gogctgcaaattccagtcagagtcctgctcaacagtggaaatgcgaaagagtttcttggccttggt
accagcagaaaccagggcagtcctcctaagctgctgatctactgggcattccactaggggaatct
ggggtccctgatcgcttcacaggcagtggaatctgggacagatttcactctcaccatcagcag
tgtgcaggctgaagac_cctggcagtttattactgcaagcaatcttatcatctattcagcttcg
gctcgggggacaaagttggaaataaaa

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

QIQIQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLKPGQGLEWIGWIYPGSGN
TKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYMQLSSLTSEDVAVYFCVRDSPFFDYWGQGTTLTV
SS

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

DIVLSQSPSSLAVSAGEKVTMRCKSSQSLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWA
STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIK

Fig. 11

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

cagggtccagctgcagcagctctggagccgagctggtgaagcctggggccttcagtgaagatatc
ctgcaaggcctctggctacaccttcactgactactatataaaactgggtgaagttggccctg
gacagggacttgagtggattggatggattttatcctggaagcggtaataactaagtacaatgag
aagttcaagggcaaggccacattgactatagacacatcctccagcacagcctacatgcagct
cagcagcctgacatctgaggacactgctgtctattttctgtgtaagagacagccctttctttg
actactggggccaaggcaccctgctcacagtctcctca

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

gacattgtgctgaccagctctccagactccctggctgtgtcactgggagagcgggtcactat
gaactgcaaataccagtcagagctctgctcaacagtggaatgcgaaagagttttcttggttggt
accagcagaaaccagggcagctctcctaagctgctgatctactgggcatccactagggaaatct
ggggtccctgatcgcttcacaggcagtggtctctgggacagatttcactctcaccatcagcag
tgtgcaggctgaagacgtcgagctttattactgcaagcaatcttatcattctattcacgttcg
gctcggggacaaaagttggaaataaaa

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

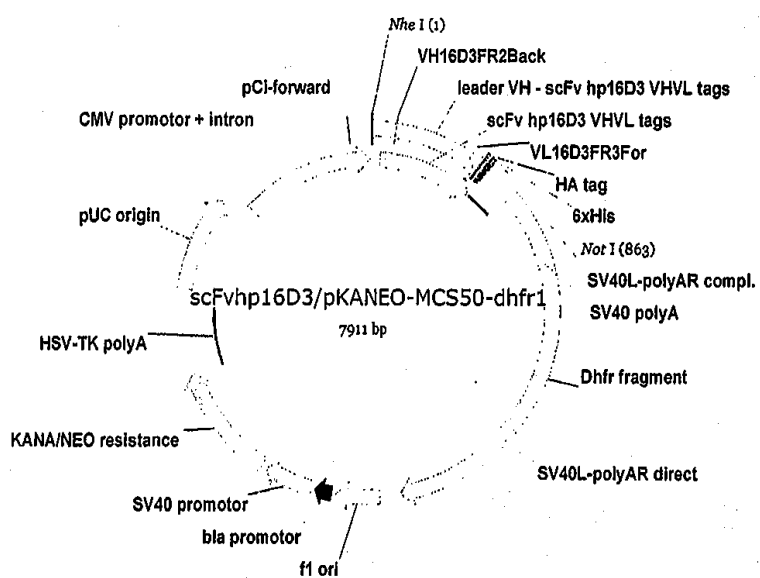
QVQLQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYINWVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGN
TKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYMQLSSLTSEDVAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTV
SS

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

DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSLLSGMRKSF~~LA~~WYQQKPGQSPKLLIYWA
STRESGV~~PDR~~FTGSGSGTDFTLTIS~~SVQ~~AEDVAVYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIK

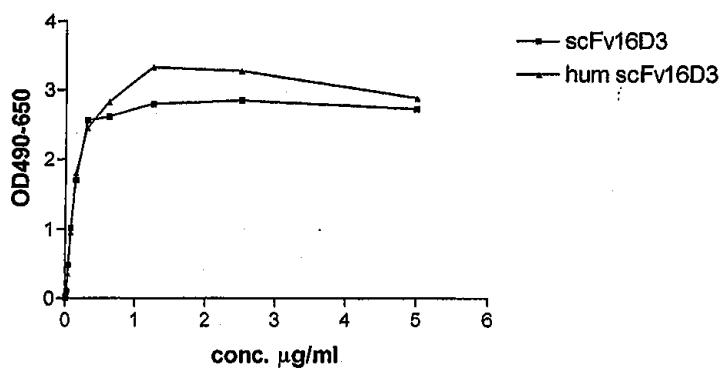
Fig. 12

11/15

**Fig. 13**

12/15

A



B

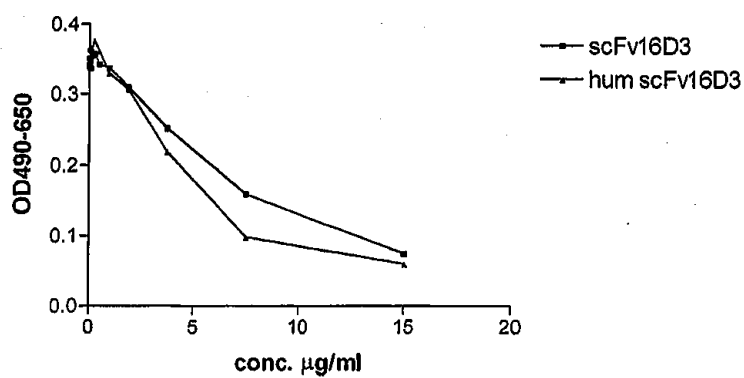


Fig. 14

A

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

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

[SEQ ID No:24]

B

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

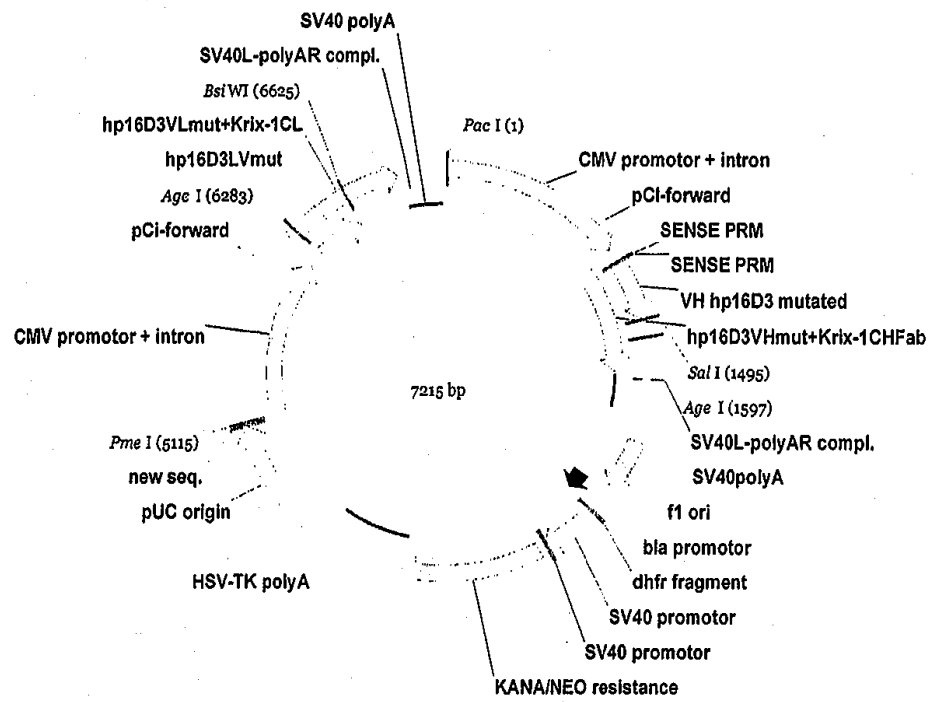
Cadeia pesada :AA 1-116
 Sequência ligante :AA 117-131
 Cadeia leve :AA 132-243
 HA-tag :AA 246-254
 His Tag :AA 256-262

[SEQ ID NO: 26]

Fig. 15

93

14/15

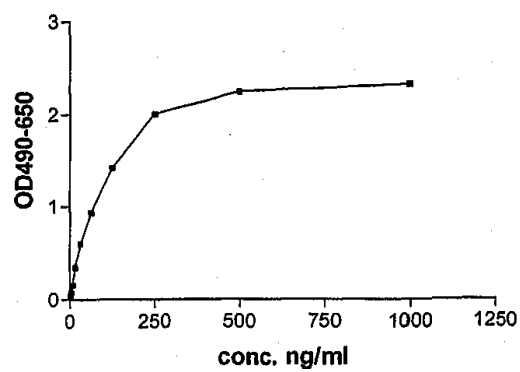


hp16D3mutcomplFab/pKNEO-MCS50-Fabvar #3 new seq

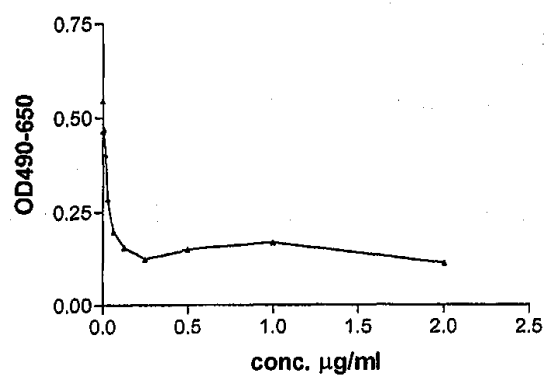
Fig. 16

15/15

A



B

**Fig. 17**