



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

(21) PI 0717971-5 A2



(22) Data de Depósito: 30/10/2007
(43) Data da Publicação: 12/11/2013
(RPI 2236)

(51) Int.Cl.:
C07K 16/22

(54) Título: ANTICORPOS RECOMBINANTES
CONTRA O FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL
VASCULAR (VEGF)

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 01/11/2006 CU 2006-0208

(73) Titular(es): Centro de Ingeniería Genética Y Biotecnología

(72) Inventor(es): Gertrudis Rojas Dorantes, Glay Chinae
Santiago, Humberto Lamdan Ordás, Jorge Víctor Gavilondo Cowley,
Marta Ayala Avila, Nelson Francisco Santiago Vispo, Osmany Guirola
Cruz, Yanelys Morera Díaz

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT CU2007000019 de
30/10/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/052489de
08/05/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ANTICORPOS RECOMBINANTES CONTRA O FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)**".

Campo Técnico

5 A presente invenção se refere ao campo de biotecnologia e indústria farmacêutica, em particular com o desenvolvimento e aplicação de moléculas polipeptídicas recombinantes relacionadas a anticorpos que reconhecem especificamente o Fator A de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF-A) humano (Ferrara, N. e colaboradores, 2003. Nature Medicine 9:
10 669-676) e que interferem com seus efeitos estimulatórios *in vitro* e atividade pró-angiogênica *in vivo*. Dentre essas moléculas estão um fragmento de anticorpo Fv com uma única cadeia (scFv), um fragmento de anticorpo Fab e moléculas bivalentes do tipo "anticorpo completo" (scFv₂-Fc).

Antecedentes da Invenção

15 O processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir daqueles pré-existentes é denominado angiogênese e é regulado através do equilíbrio de fatores pró- e anti-angiogênicos. Dentre as doenças que foram relacionadas à indução anômala de fatores pró-angiogênicos e a formação de novos vasos sanguíneos estão: câncer (tumores primários e suas metástases), processos inflamatórios agudos e crônicos tais como asma, dificuldade respiratória, endometriose, aterosclerose e edema tecidual, doenças de origem infecciosa, tais como hepatite de sarcoma de Kaposi, doenças autoimunes, tais como diabetes, psoríase, artrite reumatóide e tiroidite e várias outras doenças e estados, tais como retinopatia diabética, rejeição a transplante de órgãos, degeneração macular relacionada à idade (variante úmida), glaucoma neovascular, hemangioma e angiofibroma (Carmeliet, P. y Jain, RK. 2000. Nature 407: 249-257; Kuwano M. e colaboradores, 2001. Intern Med 40: 565-572).

25 Um procedimento terapêutico atraente para muitas dessas doenças é baseado na inibição da atividade de fatores pró-angiogênicos que estimulam a formação anômala de vasos através da administração de moléculas de neutralização. Na prática médica, o anticorpo humanizado recombi-

30

nante Bevacizumab, conhecido comercialmente como Avastin (Ferrara, N. e colaboradores, 2005. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 328-335), que reconhece e neutraliza o efeito pró-angiogênico do VEGF-A humano, foi aprovado em muitos países para o tratamento de processo tumorais. Foi mostrado que seu efeito depende principalmente da inibição da neo-angiogênese induzida por VEGF-A produzido pelas células tumorais e outras do estroma tumoral, tais como macrófagos e fibroblastos. O anticorpo foi originalmente obtido como um anticorpo monoclonal de murino (Kim, KJ. e colaboradores, 1992. *Growth Factors* 7: 53-64) através da imunização de camundongos com a isoforma 165 de VEGF-A humano obtida de células de mamífero. O anticorpo foi, então, modificado através de engenharia genética para obter sua humanização, que confere à molécula uma melhor tolerância e eficácia terapêutica quando aplicada a seres humanos.

Recentemente, o Ranibizumab (Gaudreault, J. e colaboradores, 2005. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 46: 726-733), um fragmento de anticorpo derivado do Avastin já mencionado e comercialmente conhecido como Lucentis, foi aprovado em vários países para o tratamento de degeneração macular relacionada à idade (variante úmida). O Ranibizumab é um fragmento de anticorpo Fab recombinante originado a partir da manipulação do Bevacizumab usando engenharia genética. A injeção intravítrea de Ranibizuman neutraliza o VEGF-A localmente produzido e contra neo-angiogênese adicional da retina, que é a base da doença.

Os fatores de crescimento endotelial vascular são uma família de moléculas que induzem, de uma maneira direta e específica, à formação de novos vasos sanguíneos (Leung, D. e colaboradores, 1989. *Science* 246: 1306-1309). Essa família compreende o Fator de Permeabilidade Vascular (VPF), também conhecido como Fator de Crescimento Endotelial Vascular, agora denominado VEGF-A, o Fator de Crescimento Placental (PIGF), os Fatores de Crescimento Derivados de Plaqueta (PDGF), PDGF-A e PDGF-B e outras moléculas estrutural e funcionalmente relacionadas ao VEGF-A denominadas VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E (Olofsson, B. e colaboradores, 1996. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2576-2581; Joukov, V. e colabora-

dores, 1996. EMBO J 15: 290-298; Yamada, Y. e colaboradores, 1997. Genomics 42: 483-488; Ogawa, S. e colaboradores, 1998. J Biol Chem 273: 31273-31282).

O VEGF-A é uma glicoproteína homodimérica formada por duas subunidades de 23 kDa (Ferrara, N. e colaboradores, 1989. Biochem Biophys Res Commun 161: 851-858), das quais existem 5 isoformas monoméricas derivadas a partir de *splicing* diferencial de um mesmo ácido ribonucleico (RNA). Essas incluem duas isoformas que permanecem presas à membrana celular (VEGF 189 e VEGF 206) e três de natureza solúvel (VEGF 121, VEGF 145 e VEGF 165). O VEGF 165 é o mais abundante em tecidos de mam, exceção feita ao pulmão e coração, onde o VEGF 189 é maior (Neufeld G. e colaboradores, 1995. Canc Met Rev 15: 153-158) e na placenta, onde o VEGF 121 prevalece (Shibuya, M. 1995. Adv Cancer Res 67: 281-316).

O VEGF-A é a proteína mais estudada e caracterizada dessa família e sua alteração foi descrita em um grande número de doença. Superexpressão do VEGF-A está associada a tumores de diferentes origens e localizações, bem como suas metástases (Grunstein, J. e colaboradores, 1999. Cancer Res 59: 1592-1598), processos inflamatórios crônicos, tais como colite ulcerativa e doença de Chron (Kanazawa, S. e colaboradores, 2001. Am J Gastroenterol 96: 822-828), psoríase (Detmar, M. e colaboradores, 1994. J Exp Med 180: 1141-1146), dificuldade respiratória (Thickett, DR. e colaboradores, 2001. Am J Respir Crit Care Med 164: 1601-1605), aterosclerose (Celletti, FL. e colaboradores, 2001. Nat Med 7: 425-429), endometriose (McLaren, J. 2000. Hum Reprod Update 6: 45-55), asma (Hoshino, M. e colaboradores, 2001. J Allergy Clin Immunol 107: 295-301), artrite reumatóide e osteoartrite (Pufe, T. e colaboradores 2001. J Rheumatol 28: 1482-1485), tireoidite (Nagura, S. e colaboradores 2001. Hum Pathol 32: 10-17), retinopatia diabética e do recém-nascido (Murata, T. e colaboradores, 1996. Lab Invest 74: 819-825; Reynolds, JD. 2001. Paediatr Drugs 3: 263-272), degeneração macular e glaucoma (Wells, JA. e colaboradores, 1996. Br J Ophthalmol 80: 363-366), edema tecidual (Kaner, RJ. e colaboradores, 2000.

Am J Respir Cell Mol Biol 22: 640-641), obesidade (Tonello, C. e colaboradores, 1999. FEBS Lett 442: 167-172), hemangiomas (Wizigmann, S. y Plate, KH. 1996. Histol Histopathol 11: 1049-1061), no líquido sinovial de pacientes com artropatia inflamatória (Bottomley, MJ. e colaboradores, 2000. Clin Exp Immunol 119: 182-188) e associado à rejeição a transplante (Vasir, B. e colaboradores, 2001. Transplantation 71: 924-935). No caso particular de tumores, as células que expressam as três isoformas básicas de VEGF-A (121, 165 e 189) são aquelas que crescem mais rápido *in vivo* (Grunstein, J. 2000. Mol Cell Biol 20: 7282-7291).

10 As alterações na função de células endoteliais induzidas por moléculas da família VEGF são mediadas através de sua ligação a receptores da classe 3 de quinase de tirosina, que até agora incluem VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (KDR/Flk1) e VEGFR3 (Flt4) (Kaipainen, A. 1993. J Exp Med 178: 2077-2088). O segundo domínio N-terminal dos receptores foi identificado
15 como responsável pela ligação de ligante que favorece a fosforilação do domínio citoplásmico e tradução de sinal (Davis-Smyth, T. e colaboradores, 1996. EMBO 15: 4919-4927).

O VEGFR2 (KDR/Flk1) media os efeitos biológicos do VEGF-A e também se liga ao VEGF-C e VEGF-D. Esse receptor é expresso diferenciamente no endotélio ativo e em várias linhagens de célula de origem tumoral, onde loops de estimulação autócrinos-semelhantes podem se estabelecer com o VEGF secretado. Além de estar envolvido nas patologias antes mencionadas, que estão relacionadas à superexpressão de seus ligantes, superexpressão do receptor também foi associada à progressão de: câncer
20 endometrial (Giatromanolaki, A. e colaboradores, 2001. Cancer 92: 2569-2577), mesotelioma maligno (Strizzi, L. e colaboradores, 2001. J Pathol 193: 468-475), tumores astrocíticos (Carroll, RS. e colaboradores, 1999. Cancer 86: 1335-1341), câncer de mama primário (Kranz, A. e colaboradores, 1999. Int J Cancer 84: 293-298), câncer gástrico do tipo intestinal (Takahashi, Y. e
25 colaboradores, 1996. Clin Cancer Res 2: 1679-1684), glioblastoma multiforme, oligodendroglioma anaplástico e ependimoma necrótico (Chan, AS. e
30 colaboradores, 1998. Am J Surg Pathol 22: 816-826). Superexpressão de

KDR também foi associada à doença VHL autonômica e hemangioblastoma (Wizigmann-Voos, S. e colaboradores, 1995. *Cancer Res* 55: 1358-1364), à progressão de retinopatia diabética (Ishibashi, T. 2000. *Jpn J Ophthalmol* 44: 323-324). Junto com Flt-1, o KDR foi associado à reação hiper-sensível retardada (Brown, LF. e colaboradores, 1995. *J Immunol* 154: 2801-2807).

A maioria das novas estratégias terapêuticas envolvendo a inibição de angiogênese, especialmente em câncer, está baseada no bloqueio de VEGF-A e/ou seus receptores. Figurando entre os produtos aprovados ou aqueles em experimentos clínicos nós encontramos os seguintes: (1) anticorpos monoclonais que bloqueiam o VEGF-A ou KDR, (2) inibidores de metaloproteinase, tais como Neovastat e Prinomastat, (3) inibidores de VEGF, tais como Talidomida, Suramin, Troponina I, IFN- α e Neovastat, (4) bloqueadores do receptor de VEGF, tais como SU5416, FTK787 e SU6668, (5) indutores de apoptose do endotélio tumoral, tais como Endostatina CA4-P e (6) ribozimas que diminuem a expressão de VEGF ou aquela de seus receptores (Angiozyme).

De todos os mencionados, anticorpos (e fragmentos de anticorpo) que neutralizam os efeitos pró-angiogênicos do VEGF-A são aqueles que têm a aceitação e aplicação relacionada mais avançada como produtos terapêuticos. Além dos exemplos do Bevacizumab e Ranibizumab que foram mencionados acima e já foram registrados, existem outros relatos que mencionam anticorpos e fragmentos de anticorpo que reconhecem e neutralizam o VEGF humano (Muller, Y. e colaboradores, 1997. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7192-7197; Asano, M. e colaboradores, 1998. *Hybridoma* 17: 185-190; Vitaliti A. e colaboradores, 2000. *Cancer Res* 60: 4311-4314; Brekken, RA. y Thorpe, PE. 2001. *J Controlled Release* 74: 173-181; Jayson, G. e colaboradores, 2002. *JNCI* 94: 1484-1493; Brekken, RA. e colaboradores, 2000. *Cancer Res* 60: 5117-5124; Fuh, G. e colaboradores, 2006. *J Biol Chem* 281: 6625-6631; US 5730977).

30 Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção descreve moléculas polipeptídicas recombinantes relacionadas a anticorpos que compreendem regiões variáveis de

imunoglobulina humana (VRs) codificadas pelas seqüências de nucleotídeo SEQ ID No. 7 e SEQ ID No. 8 - ou seqüências homólogas - que reconhecem um epítipo no VEGF-A humano definido sobre, embora não necessariamente limitado a, os resíduos C102, C57, R56, T31 e L32 e que interferem com o efeito pró-angiogênico do VEGF-A. A capacidade de tais moléculas de neutralizar os efeitos pró-angiogênicos do VEGF-A humano em modelos *in vitro* e *in vivo* relevantes para a neo-angiogênese é demonstrada. Essas moléculas são formadas por um ou mais sítios de ligação de antígeno, tais como sítios constituídos pelos aminoácidos codificados pelas seqüências de DNA das VRs de cadeias pesada e leve de imunoglobulina humana.

Para fins da presente invenção, a seguinte terminologia é definida:

- Anticorpos Recombinantes

Descreve uma imunoglobulina ou partes da mesma produzidas, em parte ou totalmente, através de meios sintéticos (por meio de DNA recombinante ou síntese de gene artificial) com reconhecido específicos de um antígeno através de um ou mais domínios de interação (formados através de combinações particulares de regiões variáveis de cadeias pesada e leve de imunoglobulina que são comumente denominadas sítios de ligação de antígeno) (Gavilondo y Larrick. 2000. Biotechniques 29: 128-136). Exemplos de anticorpos recombinantes são os assim denominados anticorpos quiméricos e humanizados, nos quais as regiões variáveis (ou partes das mesmas) obtidas de uma espécie são associadas, usando engenharia genética, às regiões constantes de imunoglobulina de outra espécie. Dentre os anticorpos recombinantes nós também temos fragmentos de anticorpo produzidos através de engenharia genética que compreendem um ou mais sítios de ligação de antígeno. Exemplos de fragmentos de anticorpo recombinantes são: (i) fragmentos Fab, que incluem a VL, VH, CL e CH1 de uma imunoglobulina; (ii) fragmentos Fd, consistindo dos domínios VH e CH1; (iii) fragmentos Fv, formados pela VL e VH de um anticorpo; (iv) fragmentos scFv, onde os domínios VH e VL de um anticorpo são ligados em diferentes formas (VH-VL ou VL-VH) através de um segmento ligante peptídico que permite a associa-

ção dos dois domínios para formar um sítio de ligação de antígeno (Bird e colaboradores, 1988. Science 242: 423-426; Huston e colaboradores, 1988. PNAS USA 85: 5879-5883); (v) "diacorpos", fragmentos multivalentes ou multi-específicos construídos de uma maneira similar ao scFv, mas onde o pequeno tamanho do ligante não permite que os domínios VH e VL de uma única molécula de scFv se associada umas às outras e os sítios de ligação têm de ser formados através da associação de duas ou mais moléculas de scFv individuais (WO94/13804; Holliger P. e colaboradores, 1993. PNAS USA 90: 6444-6448); (vi) dAb (Ward SE e colaboradores, 1989. Nature 341: 544-546), regiões de determinação de complementaridade (CDR) isoladas, fragmentos F(ab')₂ e dímeros de scFv bi-específicos (PCT/US92/09965; Holliger P y Winter G. 1993. Current Opinion Biotechnol. 4: 446-449; de Haard, H. e colaboradores, 1998. Adv. Drug Delivery Rev. 31: 5-31). Alguns tipos de fragmentos, tais como scFv e Fab, podem também ser obtidos a partir de bibliotecas de anticorpo, onde um amplo repertório de genes de VR (sintéticos ou derivados de fontes naturais) é combinado aleatoriamente para produzir associações particulares de VR de anticorpo que são visualizadas posteriormente na superfície de fagos filamentosos.

Moléculas "do tipo anticorpo", onde fragmentos de anticorpo são artificialmente montados com regiões constantes de anticorpo através de engenharia genética também são consideradas anticorpos recombinantes. Por exemplo, é possível construir uma molécula "do tipo anticorpo" bivalente unindo um scFv a uma região formada pelos domínios de dobradiça, CH2, CH3 e, algumas vezes, CH4 de um Fc de imunoglobulina. Dependendo da disponibilidade de todas ou várias das regiões descritas e da presença de glicosilação, a molécula do tipo anticorpo pode exibir funções efetadoras comumente associadas ao Fc de imunoglobulina.

- Sítio de Ligação de Antígeno. Epítopo

O primeiro termo descreve a porção de um anticorpo que interage especificamente com um antígeno (ou parte do mesmo). Quando o tamanho molecular do antígeno é grande, o anticorpo pode se ligar apenas a uma zona particular do antígeno, zona a qual é denominada epítopo. Um sítio de

ligação de anticorpo é formado principalmente por duas regiões variáveis de anticorpo, a região variável de cadeia leve e a região variável de cadeia pesada. O sítio de ligação de anticorpo é formado através da interação não covalente das regiões variáveis. O sítio de ligação de anticorpo pode ser estabilizado artificialmente através da ligação das duas regiões variáveis com um peptídeo ligante que não interferirá com suas propriedades de reconhecimento específico do antígeno, conforme é o caso de um fragmento scFv. Na natureza, os sítios de ligação de anticorpo são montados através da interação não covalente de regiões variáveis, que é reforçada através da interação não covalente dos domínios CH1 e CL (kappa ou lambda) que seguem nas regiões variáveis de cadeias pesada e leve, respectivamente, da estrutura nativa da molécula. Anticorpos nativos completos possuem dois sítios de ligação de antígeno idênticos. O epítipo reconhecido por um sítio de ligação de antígeno, no caso no qual o antígeno é uma proteína, pode ser formado por uma seqüência linear de aminoácidos ou pode ser conformacional, isto é, os aminoácidos reconhecidos pelo sítio de ligação de anticorpo estão próximos da estrutura terciária da proteína, mas não são necessariamente seqüenciais quanto à sua estrutura primária. No caso de proteínas, o epítipo é naturalmente uma zona distinta, formada por um grupo particular de aminoácidos que interagem com o anticorpo através de uma ligação não covalente.

- Anticorpo Homólogo

Ele é um anticorpo natural ou produzido através de engenharia genética que reconhece especificamente o epítipo de um antígeno que também é especificamente identificado por outro anticorpo diferente. Os dois anticorpos em questão podem ser relacionados em termos das seqüências de suas regiões variáveis (por exemplo, uma deriva da outra em virtude de mutações que podem ser mais ou menos extensas) ou podem ter seqüências de região variável completamente diferentes. O último se deve ao fato de que as interações específicas entre anticorpos e antígeno e, especialmente no caso de proteínas, são feitas através de interações na superfície, isto é, a formação de ligação não covalentes (ligações e hidrogênio, van der Waals e similar) entre resíduos de aminoácido das regiões variáveis (isso

considerando que alguns outros resíduos distintos estruturalmente próximos às regiões variáveis podem, algumas vezes, também participar da interação). Isso produz dois anticorpos diferentes com sítios de ligação distintos em termos de seqüência mas que, todavia, podem ter identidade de interação o bastante com um epítopo particular que se torna específico para os mesmos. Um anticorpo homólogo pode, então, ser capaz de identificar especificamente o epítopo particular reconhecido pelo outro anticorpo. O termo homólogo se estende à outras formas de anticorpos compreendidas nas definições acima feitas para anticorpos recombinantes (fragmentos de anticorpo, moléculas "do tipo anticorpo" e outros).

- Específico

Se refere à situação na qual um anticorpo ou fragmento de anticorpo não mostra uma ligação significativa à outras moléculas diferentes de seu parceiro de ligação específico. Esse termo também é aplicável ao caso onde um sítio de ligação de antígeno é específico para um epítopo particular que aparece em uma série de antígenos relacionados ou não relacionados, caso no qual o sítio de ligação será capaz de ligar vários antígenos que possuem o epítopo mencionado.

Na modalidade da presente invenção, as moléculas polipeptídicas recombinantes relacionadas a anticorpo são: um fragmento de anticorpo humano (scFv 2H1) do tipo Fv com uma única cadeia (scFv), um fragmento de anticorpo Fab (Fab 2H1-32) e moléculas bivalentes scFv₂-Fc do tipo "anticorpo completo" (scFv₂-Fc 2H1 4.1 e scFv₂-Fc 2H1 8.2). Em todos esses, as diferentes VRs se montam espontaneamente para formar sítios de ligação de antígeno. Para a estabilidade dessa montagem contribuem segmentos de ligação artificiais (ligantes) ou outras seqüências relacionadas a anticorpo, tais como domínios constantes de imunoglobulina. As VRs derivam daquelas contidas em um scFv que foi isolado de um biblioteca de fragmentos de anticorpo humano visualizada na superfície de fagos filamentosos, construída usando um repertório de VR de cadeias lambda humanas.

Em virtude da estratégia empregada, as moléculas polipeptídicas recombinantes relacionadas a anticorpo descritas na presente invenção

têm VRs de imunoglobulina com novas seqüências de DNA e diferentes daquelas reportadas por outros autores, que também obtiveram anticorpos que neutralizam a ação pró-angiogênica do VEGF-A, tais como aquelas derivadas de: hibridomas (Kim, KJ. e colaboradores, 1992. *Growth Factors* 7: 53-64; Muller, Y. e colaboradores, 1997. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7192-7197; Asano, M. e colaboradores, 1998. *Hybridoma* 17: 185-190; Schaeppi, JM. e colaboradores, 1999. *J Cancer Res Clin Oncol* 125: 336-342; Brekken, RA. e colaboradores, 2000. *Cancer Res* 60: 5117-5124; Brekken, RA. y Thorpe, PE. 2001. *J Controlled Release* 74: 173-181), transformação viral de células humanas (US 5730977), modificação de anticorpos pré-existentes através de engenharia genética (Jayson, G. e colaboradores, 2002. *JNCI* 94: 1484-1493; Ferrara, N. e colaboradores, 2005. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 328-335) e bibliotecas de fragmento de anticorpo humano (Vitaliti, A. e colaboradores, 2000. *Cancer Res* 60: 4311-4314; Fuh, G. e colaboradores, 2006. *J Biol Chem* 281: 6625-6631). As moléculas polipeptídicas recombinantes relacionadas a anticorpo descritas na presente invenção também são novas no sentido de que elas reconhecem um epítipo conformacional no VEGF-A humano que é diferente daquele definido por outros anticorpos que neutralizam o VEGF-A humano (Muller, Y. e colaboradores, 1997. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7192-7197; Muller, AY. e colaboradores, 1998. *Structure* 6: 1153-1167; Schaeppi, JM. e colaboradores, 1999. *J Cancer Res Clin Oncol* 125: 336-342; Brekken, RA. e colaboradores, 2000. *Cancer Res* 60: 5117-5124; Fuh, G. e colaboradores, 2006. *J Biol Chem* 281: 6625-6631; WO2005012359).

Os efeitos anti-angiogênicos obtidos com a aplicação das moléculas polipeptídicas recombinantes relacionadas a anticorpo descritas na presente invenção e suas variantes equivalentes são baseados na interferência da interação entre o VEGF-A humano e seus receptores presentes em células endoteliais vasculares ativadas, assim, afetando a capacidade das últimas de proliferar e manter sua estabilidade fisiológica.

No contexto da presente invenção, "variantes equivalentes" são moléculas polipeptídicas derivadas de outras associações e manipulações

das seqüências contidas nas VRs 2H1RVCP (SEQ ID No. 7) e 2H1RVCL (SEQ ID No. 8) e outras VRs homólogas contidas na presente invenção (SEQ ID No. 13) que retêm a capacidade de reconhecer especificamente o VEGF-A humano e interferir com seu efeito biológico de estimulação de crescimento de células endoteliais e pró-angiogênese. Essas moléculas polipeptídicas podem tomar a forma de outros fragmentos de recombinante recombinantes, tal como um scFv, onde o domínio VL está antes do domínio VH na seqüência ou onde outros segmentos de união (ligantes) conhecidos no estado da técnica são usados para unir as VRs ou como fragmentos de anticorpo F(ab')₂, Fabc, Facb, scFv dimérico, scFv trimérico e scFv tetramérico (Winter G, Milstein C. 1991. Nature 349: 293-299; WO94/13804; de Harard, H. e colaboradores, 1998. Adv. Drug Delivery Rev. 31: 5-31). Também, variantes equivalentes são produzidas após a adição de outras seqüências derivadas de imunoglobulinas para formar moléculas multivalentes (Bestagno M. e colaboradores, 2001. Biochemistry 40: 10686-10692). Moléculas "variantes equivalentes" também podem estar na forma de anticorpos bi-específicos, onde uma porção da molécula preserva sua especificidade pelo VEGF-A e a outra tem uma especificidade diferente ou na forma de anticorpos completos, onde as seqüências de VRs são associadas à regiões constantes de imunoglobulina de origem humana ou outra. Todas essas manipulações usando engenharia genética são conhecidas por aqueles habilitados na técnica.

"Variantes equivalentes" também são consideradas aquelas moléculas produzidas através do assim denominado "transplante de CDR", no qual as seqüências de CDR contidas nas VRs 2H1RVCP (SEQ ID No. 7) e 2H1RVCL (SEQ ID No. 8) e outras VRs homólogas, tais como aquelas contidas, por exemplo, em SEQ ID No. 13, são artificialmente flanqueadas por redes de seqüência que não são originais, conforme é revelado, por exemplo, no EP-B-0239400, EP-A-184187, GB 2188638A ou EP-A-239400, de forma que essa manipulação não afete a capacidade de reconhecer especificamente o VEGF-A humano ou interfira com o crescimento de células endoteliais e pró-angiogênese.

A molécula polipeptídica recombinante na forma de um fragmento scFv (denominada scFv 2H1) reconhece especificamente diferentes isoformas do VEGF-A humano. No scFv, as VRs de cadeias pesada e leve de imunoglobulina humana são geneticamente associadas nessa ordem através de um ligante de 16 aminoácidos para formar a seqüência de DNA descrita em SEQ ID No 6. O fragmento scFv 2H1 foi obtido a partir de um scFv homólogo denominado scFv 2H1-F, selecionado de uma biblioteca de fragmentos scFv visualizada em fagos filamentosos, construída através de métodos similares àqueles já descritos (Rojas G. e colaboradores, 2005. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 1207-1213), usando um repertório de VRs de cadeia lambda humana. A propensão intencional introduzida no repertório de VR de cadeia leve foi feita para aumentar a possibilidade de descobrir anticorpos diferentes daqueles reportados por outros autores e que neutralizariam o VEGF-A através de mecanismos diferentes daqueles anteriormente identificados.

No processo de seleção da biblioteca, nós empregamos uma proteína de fusão que contém a isoforma 121 do VEGF-A humano com mutação nos resíduos R82, K84, H86 através de sua substituição por ácido glutâmico e que afeta sua interação com o receptor KDR (Shen, B. e colaboradores, 1998. *J Biol Chem* 273: 29979-29985), conforme mostrado no Exemplo 1. Essa proteína de fusão recombinante (denominada P64_{47aa}-VEGF, SEQ ID No. 3) foi produzida em bactérias e purificada de uma forma similar àquela empregada para espécies moleculares com a atividade biológica *in vitro* do VEGF-A humano. Em consequência, o antígeno usado na presente invenção é diferente dos antígenos ou imunogênios usados por outros autores que obtiveram anticorpos monoclonais ou recombinantes que reconhecem o VEGF humano. O domínio da proteína P64K de *Neisseria meningitidis*, localizado na extremidade N-terminal de P64_{47aa}-VEGF, aumenta a imunogenicidade e permite alto nível de expressão em *E. coli* e a formação de formas diméricas com atividade biológica similar ao VEGF humano. A zona com mutação compreende um epítipo já reconhecido por outros anticorpos, reportado como neutralizando as funções biológicas do VEGF-A (Muller, Y. e

colaboradores, 1997. Proc Natl Acad Sci USA 94: 7192-7197; Muller, AY. e colaboradores, 1998. Structure 6: 1153-1167).

Em concordância com a presente invenção, o uso da proteína de fusão P64_{47aa}-VEGF para a seleção de sítios de ligação para o VEGF humano a partir de uma biblioteca de fragmentos de anticorpo scFv que contém um repertório de VR de cadeias lambda foi um fator determinante na identificação de um fragmento de anticorpo (scFv 2H1-F) que reconhece um epítipo conformacional do VEGF-A humano não descrito anteriormente.

Para produzir a molécula polipeptídica scFv 2H1, a seqüência de DNA do fragmento scFv 2H1-F obtida da biblioteca foi clonada a partir do vetor de fagemídeo correspondente em um vetor de expressão de periplasma. O fragmento de anticorpo scFv 2H1, com um peso molecular aparente um pouco maior do que 29 kDa, é recuperado do meio de cultura e do periplasma das bactérias transformadas e facilmente purificado usando cromatografia de afinidade por metal (IMAC) (Porath J. 1992. Prot. Expr. Purif. 3: 263-281). O vetor de expressão pACR.1 adicionado, ao C-término da molécula scFv 2H1, um domínio peptídico *c-myc* que é usado como "tag" para fins analíticos, seguido por um domínio com seis histidinas para facilitar a purificação usando IMAC.

A molécula polipeptídica recombinante na forma de um fragmento Fab (denominada Fab 2H1-32) reconhece especificamente diferentes isoformas de VEGF-A humano. No Fab, a seqüência de DNA que codifica as VRs de scFv 2H1, denominada 2H1RVCP (SEQ ID No. 7) e 2H1RVCL (SEQ ID No. 8), foram clonadas no vetor pFabHum-1 e geneticamente associadas ao CH1 e C λ de uma imunoglobulina do tipo IgG humana, respectivamente, conforme descrito em SEQ ID No. 10 e SEQ ID No. 9. O plasmídeo pFabHum-1 é um vetor bicistrônico construído para a expressão de fragmentos Fab com regiões constantes humanas C λ e CH1 no periplasma de bactérias. As cadeias polipeptídicas produzidas compreendem as VRs e suas respectivas regiões constantes pesada e leve, que são montadas para formar um fragmento Fab no periplasma bacteriano, onde elas são exportadas para o citoplasma através dos peptídeos sinalizadores fornecidos pelo vetor. A

montagem periplásmica do Fab é baseada em interações não covalentes entre as VRs de cadeias pesada e leve e entre os domínios CH1 e C λ , mas é reforçada através de uma ligação covalente do tipo dissulfeto entre duas cisteínas localizadas próximo do C-término das regiões CH1 e C λ , também
5 fornecidas pelo vetor. O Fab 2H1-32 tem um tamanho molecular aparente de 50 kDa.

As moléculas polipeptídicas bivalentes recombinantes do tipo "anticorpo completo" denominadas scFv₂-Fc 2H1-8.2 e scFv₂-Fc 2H1-4.1 compreendem, respectivamente, as seqüências de VRs de scFv 2H1, segui-
10 do por uma seqüência que codifica dez aminoácidos espaçadores, uma seqüência de nucleotídeo que codifica os domínios de dobradiça, CH2 e CH3 de uma imunoglobulina humana do tipo IgG1 (SEQ ID No. 14) e uma seqüência (SEQ ID No 13) muito similar à anterior, com alterações limitadas em algumas bases de VRs. Essas moléculas foram obtidas após clonagem
15 dos produtos de PCR do gene que codifica scFv 2H1, excluindo seus domínios 3' (que codificam o peptídeo *c-myc* e seis histidinas), no vetor pVSJG-HucFc. O vetor pVSJG-HucFc é criado para a expressão, em células de mamífero, de moléculas do tipo "anticorpo completo" que compreendem dois scFv idênticos associados ao Fc de uma imunoglobulina IgG1 humana. A
20 cadeia polipeptídica que dá origem a essas moléculas bivalentes é transportada para o retículo endoplásmico das células de mamífero via um peptídeo sinalizador de imunoglobulina presente no vetor pVSJG-HucFc. O peptídeo é removido do retículo endoplásmico e duas cadeias polipeptídicas idênticas se associam covalentemente através de ligações de dissulfeto nas regiões
25 de dobradiça, uma ligação que é reforçada por interações não covalentes das regiões CH2 e CH3. As moléculas scFv₂-Fc 2H1-4.1 e scFv₂-Fc 2H1-8.2 têm um tamanho molecular aparente similar entre 100 e 120 kDa. Essas proteínas secretadas têm, em seu amino-término, quatro aminoácidos adicionais (QVLK) fornecidos pelo vetor.

30 Os anticorpos recombinantes da presente invenção, tais como scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 e scFv₂-Fc 2H1-8.2, também podem ser produzidos em outros sistemas eucariotas, conforme é o caso de

plantas transgênicas (Pujol, M. e colaboradores, 2005. Vaccine 23: 1833-1837).

Em outro aspecto da presente invenção, as moléculas polipeptídicas recombinantes descritas acima reconhecem especificamente as isoformas 121 e 165 do VEGF-A humano e não identificam o VEGF de camundongo. As moléculas podem se ligar ao VEGF-A humano solúvel, ao VEGF-A humano adsorvido em superfícies sólidas ou ao VEGF-A humano associado ou próximo de células humanas que o produzem, dentre as últimas aquelas presentes em tumores humanos que crescem em camundongos nus (atímicos).

As moléculas polipeptídicas recombinantes scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 e scFv₂-Fc 2H1-8.2 descritas na presente invenção interagem com o VEGF-A humano ativo de uma forma tal que elas interferem com sua atividade de promoção de crescimento em células endoteliais humanas *in vitro* e em processos de neo-angiogênese *in vivo*, o último medido nos modelos experimentais de pelotas de Matrigel subcutâneas em camundongos e de células tumorais humanas transplantadas em camundongos atímicos singeneicos (camundongos nus). As moléculas polipeptídicas recombinantes descritas na presente invenção não reconhecem o VEGF-A de camundongo e interferem eficazmente na associação entre o VEGF-A humano e uma forma solúvel do receptor KDR. A aplicação das moléculas polipeptídicas scFv 2H1 e scFv₂-Fc 2H1-4.1 impede a neo-vascularização coroidal (CNV) ou melhora sua evolução, em um modelo experimental com primatas não-humanos onde CNV é produzida via foto-coagulação com laser. As moléculas polipeptídicas Fab 2H1-32 e scFv₂-Fc 2H1-8.2 também seriam capazes de produzir tais efeitos sobre a CNV, levando em conta que sua especificidade pelo VEGF humano é similar àquela das moléculas polipeptídicas scFv 2H1 e scFv₂-Fc 2H1 4.1 e têm efeito anti-angiogênico em outros modelos *in vitro* e *in vivo*.

As moléculas polipeptídicas recombinantes descritas na presente invenção podem ser conjugadas a uma enzima ou seus fragmentos, a um modificador de resposta biológica, a uma toxina ou um fármaco ou a isóto-

pos radioativos, que adicionam à molécula original uma característica funcional além daquela de ligação ao VEGF-A humano, sendo essa a capacidade de identificação e/ou afetar a viabilidade de células que estão localizadas em um local anatômico em particular de um organismo multicelular, onde existe uma alta concentração de VEGF-A humano ou em sua proximidade imediata ou através de interação com formas de VEGF-A associadas à membrana celular.

As moléculas polipeptídicas recombinantes objeto da presente invenção, além de possuírem a capacidade de reconhecer e interagir com o VEGF-A humano e interagir com sua atividade pró-angiogênica e a capacidade de estimular a proliferação de células endoteliais, também podem desempenhar outras funções biológicas descritas para o VEGF humano, conforme aquelas nas quais a molécula atua na regulação negativa da resposta imune (Chouaib S. e colaboradores, 1997. *Immunology Today* 18: 493-497).

Uma série de elementos fazem com que as moléculas polipeptídicas objeto da presente invenção sejam novas com relação a outros anticorpos e fragmentos de anticorpo que neutralizam o VEGF-A humano. Dentre esses elementos estão os seguintes:

(a) as seqüências de base que codificam as VRs que foram os sítios de ligação de antígeno das moléculas polipeptídicas objeto da presente invenção não foram reportadas antes e diferem daquelas de outros anticorpos anti-VEGF-A. As seqüências de CDR das VRs e, em particular, aquelas da CDR3 da VR de cadeia pesada, diferem perceptivelmente de outras anteriormente reportadas que são ricas nos aminoácidos aromáticos tirosina e/ou triptofano, um fato que não foi relacionado ao reconhecimento de um epítipo particular (Fellouse F.A. e colaboradores 2004. *PNAS* 101: 12467-12472). No caso das moléculas polipeptídicas descritas na presente invenção, a CDR3 da VR de cadeia pesada não possui tirosinas.

(b) a especificidade imunoquímica das moléculas polipeptídicas objeto da presente invenção pelo VEGF-A humano difere daquela de fragmentos Fab humanos obtidos de outras bibliotecas (Fuh G. e colaboradores, 2006. *J. Biol Chem* 281: 6625-6631) que, adicionalmente, reconhecem tam-

bém o VEGF-A de camundongo.

(c) as molécula polipeptídicas descritas na presente invenção são muito dependentes de seu reconhecimento do VEGF-A humano para sua conformação dimérica biologicamente ativa, conforme mostrado pela
5 perda de reconhecimento detectada após tratamento do VEGF-A com agentes de redução.

(d) as moléculas polipeptídicas descritas na presente invenção reconhecem um epítipo conformacional sobre o VEGF humano não anteriormente descrito quando comparado com os epítipos que reconhecem outros anticorpos e fragmentos de anticorpo que neutralizam as funções biológicas do VEGF-A humano (Muller Y. e colaboradores, 1997. PNAS 94: 7192-7197; Muller AY. e colaboradores, 1998. Structure 6: 1153-1167; Schaep-
10 pi J.-M. e colaboradores, 1999. J Cancer Res Clin Oncol 125: 336-342; Fuh G. e colaboradores, 2006. J Biol Chem 281: 6625-6631; WO2005012359).

Conforme mostrado no Exemplo 9, a análise *in silico* das prováveis associações entre a seqüência peptídica especificamente selecionada pelo fragmento de anticorpo scFv 2H1 de uma biblioteca de peptídeo combi-
natorial de 12 aminoácidos e os dados conhecidos das estruturas primária e terciária do VEGF-A humano sugerem todos que o sítio de ligação de anti-
20 geno do scFv 2H1 está interagindo com um epítipo conformacional na molécula de VEGF-A humano. A zona reconhecida pela estrutura terciária do VEGF não coincide com os epítipos descritos para outros anticorpos e fragmentos de anticorpo que neutralizam o VEGF-A humano e, assim, é nova. Essa definição de epítipo abre também novas possibilidades de conhe-
25 cimento sobre a interação complexa entre o VEGF-A humano e seu receptor KDR, que permanece não solucionada.

As moléculas polipeptídicas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 e scFv₂-Fc 2H1-8.2 descritas na presente invenção e suas variantes equivalentes são capazes de interagir com o VEGF-A humano ativo e inter-
30 ferir com seus efeitos de estimulação de neo-angiogênese. Em virtude disso, essas moléculas são úteis para o desenvolvimento de novos tratamentos para doenças nas quais uma angiogênese anormal ou excessiva está pre-

sente, tais como: (a) câncer (tumores primários e metástases), (b) doenças dos olhos, tais como degeneração macular relacionada à idade (variante úmida), glaucoma neovascular, retinopatia diabética e do recém-nascido, (c) processos inflamatórios agudos e crônicos, tais como asma, dificuldade res-
5 piratória, endometriose, aterosclerose e edema tecidual, (d) doenças de ori-
gem infecciosa, tais como hepatite e sarcoma de Kaposi, (e) doenças autoi-
munes, tais como diabetes, psoríase, artrite reumatóide, tireoidite e (f) outras
de várias doenças e estados, tais como rejeição a transplante de órgãos,
hemangioma e angiofibroma.

10 Outro aspecto da presente invenção é o uso das moléculas des-
critas para produzir composições farmacêuticas para a inibição de angiogê-
nese e o tratamento de condições patológicas associadas. Tal tratamento
compreende a administração de uma quantidade eficaz das moléculas des-
critas na presente invenção a um ser humano.

15 Em uma modalidade da presente invenção, as moléculas poli-
peptídicas recombinantes que reconhecem o VEGF humano são úteis para o
tratamento de processos neoplásicos malignos e suas metástases. Em uma
modalidade preferida, elas são eficazes no tratamento de carcinomas, sar-
comas e tumores vascularizados. No Exemplo 12 nós ilustramos como a a-
20 plicação das moléculas descritas na presente invenção tinham o efeito de
inibição do crescimento de um carcinoma humano, transplantado em ca-
mundongos atímicos nus. Alguns exemplos de tumores que podem ser tra-
tados usando essa estratégia incluem (mas não estão limitados a): tumores
epidermóides, tumores escamosos, tais como aqueles de cabeça e pescoço,
25 tumores cólon-retais, de próstata, mama, pulmão (incluindo tumores de célu-
las pequenas e não-pequenas), pancreático, da tireóide, ovário e fígado. As
moléculas também são eficazes no tratamento de outros tipos de tumores,
tais como sarcoma de Kaposi, neoplasia do sistema nervoso central (neuro-
blastoma, hemangioblastoma capilar, meningioma e metástases cerebrais),
30 melanoma, carcinoma renal, tumores gastrintestinais, rhabdomiosarcoma,
glioblastomas e leiomiosarcomas.

Em virtude do fato de as moléculas polipeptídicas recombinantes

relacionadas a anticorpos descritas na presente invenção exibirem um reconhecimento de epítopo do VEGF-A humano que distingue as mesmas do Bevacizumab, conforme mostrado no Exemplo 5 e, assim, serem diferentes na maneira pela qual elas interferem na ligação do VEGF-A humano e seu receptor, elas podem dar origem a efeitos terapêuticos *in vivo* que são diferentes das outras moléculas que também atuam através de inibição dessa interação. É bem documentado que é possível obter diferentes efeitos terapêuticos *in vivo* e diferentes efeitos colaterais de tratamento com anticorpos produzidos contra o mesmo antígeno, mas que reconhecem diferentes epítopos ou que possuem uma afinidade diferente pelo antígeno (Allan D.G.P. 2005. *The Oncologist* 10: 760-761). Também é sabido por aqueles habilitados na técnica que moléculas que reconhecem o VEGF humano através de regiões diferentes daquelas identificadas pelo anticorpo humanizado Bevacizumab podem produzir efeitos de interferência entre o VEGF e seu receptor (Lee, F-H. e colaboradores, 2005. *PNAS* 102).

Sabe-se que anticorpos e fragmentos de anticorpo, tais como o Bevacizumab e Ranibizumab, têm aplicação em outras doenças que progridem com angiogênese excessiva (Gaudreault, J. e colaboradores, 2005. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 46: 726-733; Costa, RA. e colaboradores, 2006. *Investig Ophthalmol Visual Sci* 47: 4569-4578). Em uma modalidade da presente invenção, as moléculas polipeptídicas recombinantes descritas são úteis para o tratamento de degeneração macular relacionada à idade, em sua variante úmida. Duas das moléculas descritas na presente invenção, especificamente scFv 2H1 e scFv₂-Fc 2H1-4.1, mostraram efeito terapêutico e preventivo (Exemplo 14) sobre a neovascularização coroidal induzida por queima a laser em um modelo experimental com primata não-humano. No que se refere à base de possíveis diferenças no potencial terapêutico das moléculas mencionadas com relação àquelas existentes no estado da técnica, nós devemos destacar as diferenças intrínsecas no reconhecimento de antígeno (um epítopo diferente), bem como o fato de que a scFv 2H1 tem aproximadamente metade do tamanho molecular do fragmento Fab Ranibizumab, um fato que permitiria melhor penetração das camadas retiniais, um

aspecto que foi enfatizado como importante para melhores efeitos terapêuticos. Também, a molécula scFv₂-Fc 2H1-4.1 tem um tamanho molecular menor do que o Bevacizumab, com vantagens potenciais particulares quando comparado, nesse caso, com o primeiro.

5 Em outra modalidade da presente invenção, as moléculas polipeptídicas recombinantes descritas ou suas variantes equivalentes são usadas em procedimentos diagnósticos *in vivo* para cânceres humanos que expressam VEGF tais como, por exemplo, adenocarcinomas de cólon, pulmão ou mama e outros. Para isso, as moléculas polipeptídicas específicas para o

10 VEGF-A humano descrito na presente invenção podem ser radio-rotuladas e injetadas na forma de agentes que permitem a produção de imagens que demonstram a presença e localização de tumores que expressam VEGF-A no homem. Para isso, moléculas polipeptídicas conforme aquelas descritas na presente invenção são associadas a um isótopo radioativo e a ligação

15 dessas ao tumor é avaliada. O método pode compreender a administração da molécula radio-rotulada a um ser humano. Conforme experimentalmente mostrado na invenção, o fragmento scFv 2H1 radio-rotulado com ¹²⁵I se liga ao VEGF-A humano expresso por células tumorais transplantadas a camundongos atímicos nus e se acumula especificamente na área do tumor. A reatividade com os tecidos que expressam quantidades anormalmente altas de

20 VEGF-A humano pode ser detectada com qualquer método apropriado. Quando um radionuclídeo, tal como ¹²⁵I, ¹¹¹In ou ^{99m}Tc é empregado para rotular as moléculas polipeptídicas descritas na presente invenção, essas se localizam, de preferência, no tumor e não em tecidos normais e a presença da radio-rotulação radioativa no tecido tumoral pode ser detectada e quanti-

25 ficada usando uma câmera gama ou um contador gama. A qualidade da imagem do tumor obtida se correlaciona diretamente com a proporção de sinal:ruído (Goldenberg DM. 1992. Int. J. of Biol. Markers, 7; 183-188). O uso experimental de ¹²⁵I é exemplificado na presente invenção, mas não limita o

30 uso potencial de outros diferentes radionuclídeos. Se esses radionuclídeos têm capacidade terapêutica, tais como ¹³¹I, ⁹⁰Y, etc., as moléculas polipeptídicas radio-rotuladas descritas na presente invenção podem conferir um efei-

to terapêutico benéfico ao paciente, em virtude de seu alojamento na área anatômica de um tumor que produz VEGF-A humano e seus efeitos sobre células tumorais, sobre células que formam os vasos sanguíneos do tumor, bem como sobre outros elementos celulares que compõem o estroma do tumor e produzem VEGF-A.

Em concordância com o anterior e conforme sugerido no Exemplo antes mencionado, as moléculas polipeptídicas recombinantes descritas na presente invenção ou suas variantes equivalentes, associadas a outros agentes, podem ser a base de métodos terapêuticos que compreendem sua administração como medicamentos ou composições farmacêuticas. Essas moléculas acopladas quimicamente ou através de métodos de engenharia genética a radionuclídeos terapêuticos, toxinas, fármacos ou modificadores de resposta biológica, podem direcionar o efeito terapêutico dos elementos acoplados à áreas anatômicas com uma concentração anormalmente alta de VEGF-A humano, conforme pode ser aquela de um tumor e sua proximidade imediata, e exercer um efeito terapêutico. A quantidade a administrar, frequência e intervalos de administração dependem todos da natureza e gravidade da doença e essas decisões são a responsabilidade de especialistas e outros médicos, baseado naquilo que já é conhecido nesse campo técnico.

As composições da presente invenção podem ser administradas na forma isolada ou em combinação com outros tratamentos, quer simultânea ou seqüencialmente, todos dependendo da doença a ser tratada. As composições farmacêuticas compreendem, além do ingrediente ativo, um veículo farmacêuticamente aceitável, tampão, um estabilizante ou "carreador" farmacêutico ou outros materiais bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Esses materiais são não tóxicos, não interferem com a eficácia do ingrediente ativo e sua natureza precisa depende da via de administração, sendo essa mucosal, oral ou parenteral (por exemplo, injeção intravenosa).

As moléculas descritas na presente invenção ou suas variantes equivalentes são produzidas através da expressão do ácido nucleico que codifica as mesmas. Em conseqüência, as seqüências de ácido nucleico que

codificam qualquer uma dessas moléculas polipeptídicas descritas e os procedimentos para a expressão de tais ácidos nucleicos também são parte da presente invenção. Em uma modalidade preferida, o ácido nucleico codifica principalmente (embora não exclusivamente) as seqüências de base de DNA que são descritas para as moléculas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 e scFv₂-Fc 2H1-8.2.

Para obter a expressão recombinante das moléculas descritas na presente invenção ou suas variantes equivalentes, vetores apropriados podem ser escolhidos e construídos contendo as seqüências regulatórias que cada caso requer, incluindo seqüências promotoras, terminadoras, intensificadoras, de poliadenilação, genes marcadores e outras pertinentes. Os vetores podem ser plasmídeos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Esquema representando o plasmídeo pACR.1, usado na produção de fragmentos scFv solúveis no periplasma e meio de cultura de *E. coli*. O vetor tem um promotor LacZ, um Sítio de Ligaçã Ribossômica (RBS) e o peptídeo sinalizador (SP) *pelB*.

Figura 2. Seqüência de DNA (SEQ ID No. 6) que codifica o fragmento de anticorpo recombinante scFv 2H1, produzido com o vetor pACR.1 em *E. coli*. As primeiras 354 bases se conformam à região variável (VR) de cadeia pesada de imunoglobulina humana (denominada 2H1RVCP, SEQ ID No. 7), seguido por 48 bases que codificam o segmento de união (ligante), continuando com 333 bases que codificam a VR de cadeia leve de imunoglobulina humana (denominada 2H1RVCL, SEQ ID No. 8), para terminar com 69 bases que codificam os aminoácidos que são produzidos pelo sítio de clonagem, o peptídeo *c-myc* e seis histidinas codificadas pelo vetor em si. As bases sublinhadas representam a anotação das Regiões de Determinação de Complementaridade (CDRs), de acordo com Kabat e colaboradores (Sequences of Immunological Interest, Department of Health and Public Services, Quinta Edição, 1991), na ordem (de cima para baixo): CDR1 de VR de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VR de cadeia leve (VL), CDR2 de VL e CDR3 de VL.

Figura 3. Expressão de scFv 2H1 em células BL-21 de *E. coli* transformadas. Da esquerda para a direita: marcadores de peso molecular (66, 45, 35, 29, 20 e 14,2 kDa; fileira 1); um scFv de controle (scFv M3; fileira 2), sobrenadante de cultura de bactérias transformadas com o plasmídeo pACR.1-scFv 2H1 (fileira 3), onde uma banda reforçada que migra em torno de 29 kDa pode ser observada e sobrenadante de cultura de bactérias transformadas com o plasmídeo vazio pACR.1 (fileira 4).

Figura 4. Resultados de purificação de scFv 2H1 usando IMAC. A Figura 4A é uma Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sódio a 12% (SDS-PAGE) com (da esquerda para a direita): scFv de controle (scFv M3) com um tamanho molecular em torno de 29 kDa (fileira 1), material de iniciação que contém scFv 2H1 (fileira 2) e scFv 2H1 eluído com alta pureza (fileira 3). A Figura 4B representa uma Western blot de uma réplica da SDS-PAGE mostrada na Figura 4A. O anticorpo monoclonal 9E10 contra o domínio *c-myc* presente nessas proteínas foi usado para detecção.

Figura 5. Resultados de um ELISA por competição onde a capacidade do scFv 2H1 purificado de bloquear o acesso de uma molécula receptora de VEGF solúvel (KDR-Fc) ao ligante VEGF-A humano foi avaliada. O VEGF-A foi adsorvido à fase sólida. Diferentes concentrações (até 80 $\mu\text{g/mL}$) de scFv 2H1 foram usadas. Um scFv específico para o antígeno na superfície de Hepatite B (scFv anti-HBsAg) foi usado como controle negativo. Nesse ensaio, a detecção de KDR-Fc ligada ao VEGF-A foi feita usando anticorpos de IgG anti-humanos conjugados à peroxidase (Sigma).

Figura 6. Representação esquemática do plasmídeo pFabHum-1, usado para a produção de fragmentos de anticorpo solúveis do tipo Fab no periplasma e meio de cultura de *E. coli*.

Figura 7. Seqüências de DNA (SEQ ID No. 9 e SEQ ID No. 10) que codificam as duas cadeias que formam a molécula madura do fragmento Fab 2H1-32, que se auto-monta no periplasma bacteriano. Na Figura 7A e no sentido 5'-3', a seqüência que codifica a VR de cadeia leve de imunoglobulina, seguida por aquela que codifica o domínio constante C λ humano, são mostradas. As bases sublinhadas representam as anotações de CDR na

ordem (de cima para baixo): CDR1 da VR de cadeia leve (VL), CDR2 de VL e CDR3 de VL. Na Figura 7B e no sentido 5'-3', a seqüência que codifica a VR de cadeia pesada de imunoglobulina, seguida por aquela que codifica o domínio constante de imunoglobulina CH1, seis histidinas e um peptídeo *c-myc* são mostrados. As bases sublinhadas representam as anotações de CDR na ordem (de cima para baixo): CDR1 da VR de cadeia pesada (VH), CDR2 de VH e CDR3 de VH.

Figura 8. A Figura 8A é o mapa do plasmídeo pVSJG-HucFc, usado para expressar moléculas divalentes do tipo "anticorpo completo", após clonagem de um fragmento scFv entre os sítios de restrição Afl II e Xba I. A Figura 8B é a representação esquemática da molécula produzida por células de mamífero transfectadas com o plasmídeo contendo um determinado inserto de scFv.

Figura 9. Seqüência de DNA (SEQ ID No. 13) que codifica a molécula semelhante a anticorpo madura denominada scFv₂-Fc 2H1-4.1. No sentido 5'-3', podem ser observados: as bases que codificam a região variável de cadeia pesada de imunoglobulina, seguido por um ligante e a região variável de cadeia leve de imunoglobulina, um espaçador que codifica 10 aminoácidos, seguido pelos domínios de dobradiça CH2 e CH3 de uma imunoglobulina IgG1 humana. As bases sublinhadas representam anotações de CDR na ordem (de cima para baixo): CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL e CDR3 de VL.

Figura 10. Seqüência de DNA (SEQ ID No. 14) que codifica a molécula semelhante a anticorpo madura denominada scFv₂-Fc 2H1-8.2. No sentido 5'-3', podem ser observados: as bases que codificam a região variável de cadeia pesada de imunoglobulina, seguido por um ligante e a região variável de cadeia leve de imunoglobulina, um espaçador que codifica 10 aminoácidos, seguido pelos domínios de dobradiça, CH2 e CH3 de uma imunoglobulina IgG1 humana. As bases sublinhadas representam anotações de CDR na ordem (de cima para baixo): CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL e CDR3 de VL.

Figura 11. Reconhecimento específico de peptídeos visualizados

em fago, em relação ao sítio de ligação do fragmento scFv 2H1, conforme determinado em um ensaio ELISA onde a ligação ao fragmento adsorvido a uma fase sólida na presença de VEGF humano em excesso (Peprotech) foi avaliada. A Figura mostra 10 clones de fago que visualizam peptídeos que são representativos do comportamento mostrado por todos os 35 clones estudados. No experimento, as amostras de fago foram incubadas com ou sem (w/o) VEGF em solução.

Figura 12. Mapeamento dos resíduos que identificam principalmente o epítipo reconhecido pelo scFv 2H1 na molécula de VEGF-A, em comparação com outras moléculas relacionadas a anticorpo descritas na literatura. Um diagrama que representa a estrutura terciária do VEGF-A humano em sua conformação dimérica é usado, com alfa hélice, cadeias beta e loops. As duas moléculas diméricas idênticas aparecem em cinza claro e preto. As posições dos resíduos definidos como indicadores principais do epítipo reconhecido pelo scFv 2H1 são marcadas apenas na cadeia cinza clara do dímero e aparecem em preto, representadas como esferas de Van der Waals (VDW). Os resíduos reconhecidos por outros anticorpos são VDW em cinza claro nas Figuras A a D. A Figura 12E mostra a posição de aminoácidos vizinhos (VDW em cinza claro) que são diferentes quando as seqüências de VEGF-A humano e de camundongo são comparadas em relação à posição do epítipo definido pelos principais resíduos indicadores para scFv 2H1 (VDW em preto).

Figura 13. Capacidade das moléculas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1 4.1 e scFv₂-Fc 2H1 8.2 de interferir com o efeito estimulatório de crescimento do VEGF-A humano sobre células endoteliais vasculares de veia do cordão umbilical humano (HuVEC) em cultura. scFv 2H1 purificado, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1 4.1 e scFv₂-Fc 2H1 8.2 foram adicionados em três concentrações diferentes (barra listrada: 2 µg/mL; barra sólida: 1 µg/mL; barra vazia: 0,5 µg/mL) com 10 ng/mL de VEGF-A humano (Peprotech).

Figura 14. Atividade anti-tumor de scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1 4.1 e scFv₂-Fc 2H1 8.2 em doses de: 2,5 mg/kg (Figura 14A) e 25 mg/kg (Figura 14B). Os pontos nas curvas se referem ao volume médio do

tumor estimado para 5 animais por grupo. Controle negativo: anticorpo monoclonal não relacionado CB-Hep.1 (anti-HBsAg) na maior dose.

Figura 15. Percentual da dose injetada, por grama de tecido, 24 horas (primeiras duas barras em cada tecido) e 48 horas (segundas duas barras em cada tecido) após inoculação de camundongos nus trazendo tumores humanos derivados de células A431 com o fragmento scFv 2H1 (barras escuras) ou fragmento scFv Hep.1 (barras vazias) radio-rotulado com ¹²⁵I. Cada barra representa a média das contagens recuperadas dos órgãos/tecido obtidos de 5 camundongos.

10 Descrição Detalhada das Modalidades / Exemplos

Exemplo 1. Clonagem, expressão bacteriana e purificação da isoforma 121 de VEGF humano fundido a P64K

(a) Clonagem da isoforma 121 de VEGF humano

15 Reação em cadeia de Polimerase (PCR) foi usada para o isolamento e clonagem da isoforma 121 de VEGF, empregando DNA Polimerase Taq (Roche) e o procedimento recomendado pelo fabricante. Os oligonucleotídeos sintéticos # 1 (SEQ ID No. 1) e # 2 (SEQ ID No. 2) que aparecem na Tabela 1 foram usados como primers na PCR.

Tabela 1.- Primers usados na PCR da isoforma 121 de VEGF humano

Oligonucleotídeo	Seqüência
# 1 (SEQ ID No. 1)	5'...GATCTGCTAGCCGCACCCATGGCAGAAGGAGGAGGG...3'
# 2 (SEQ ID No. 2)	5'...GGGGGATCCCCGCCTCGGCTTGTAC...3'

20 Nessa técnica, o DNA *template* usado foi o plasmídeo pVEGF (Ojalvo, A. G. e colaboradores, 2003. *Electronic J. Biotechnol.* 6, 208–222), previamente modificado através de PCR para incluir mutações que substituíram os resíduos R82, K84 e H86 do VEGF por ácido glutâmico.

25 A banda correspondendo ao produto da amplificação foi extraída de um gel de agarose a 2%. Após digestão da banda com as endonucleases Nhe I e BamH1, o DNA foi purificado e clonado no vetor pM238 (Yero, D. e colaboradores, 2006. *Biotechnol. Appl. Biochem* 44: 27-34). Com esse vetor, as proteínas expressas em bactérias são proteínas de fusão com um domínio N-terminal de 47 aminoácidos da proteína P64K de *Neisseria meningitidis*.
30 O plasmídeo resultante (P64_{47aa}-VEGF) foi seqüenciado e determinado

como contendo apenas as mutações *exprofeso* descritas acima, conforme mostrado em SEQ ID No. 3, com relação à seqüência de aminoácido reportada para a isoforma de VEGF humano clonada correspondente pelo European Molecular Biology Laboratory (www.embl-heidelberg.de).

5 (b) Expressão da proteína de fusão em *E. coli*

DNA de plasmídeo foi extraído do clone P64_{47aa}-VEGF e usado para transformar BL21 de *E. coli*. Várias colônias resultantes foram inoculadas em 50 mL de meio LB com Ampicilina e Triptofano e crescidas durante 5h a 37°C. Vinte e cinco mL dessas culturas foram inoculados em 250 mL de meio M9 enriquecido com Ampicilina e incubados novamente durante 2h a 37°C. A indução foi feita adicionando 40 µg/mL de ácido 3-β-indola acrílico. As células foram coletadas 8h depois e, após ruptura ultra-sônica, a proteína de interesse permaneceu no precipitado. Solubilização da proteína foi feita com tampão de fosfato de sódio mais uréia a 6M. O sobrenadante foi submetido à IMAC em gel Ni-NTA (QIAGEN).

A fração eluída foi avaliada usando SDS-PAGE mostrando bandas de 26 kDa, 54 kDa e maiores, com as duas primeiras bandas compreendendo mais de 98% da proteína no preparado. O primeiro tamanho corresponde àquele de um monômero, o segundo a uma molécula dimérica e aqueles de peso maior à outra agregação. A fração de eluição foi submetida à diálise em PBS, submetida à cromatografia em Superose F12 (Pharmacia) para selecionar exclusivamente a espécie com maior peso molecular aparente (em torno de 54 kDa) que foi denominada P64_{47aa}-VEGF. Esse preparado foi congelado para uso adicional a -20°C.

25 (c) Ensaio de ligação a receptor da proteína de fusão P64_{47aa}-VEGF.

Uma imuno-lâmina com 96 cavidades Maxisorp (Nunc) foi revestida com a proteína de fusão P64_{47aa}-VEGF purificada ou VEGF-A humano (Peprotech), ambos a 5 µg/mL em PBS durante 16h a 4°C. A lâmina foi bloqueada a 22°C com PBS-leite a 4% durante 1h. O receptor humano solúvel KDR-Fc (Sigma) foi diluído em PBS-leite a 4% em diferentes concentrações, adicionado às lâminas e incubado durante 1 h a 22°C. Após lavagem repetidamente, a ligação do receptor ao revestimento foi desenvolvida usando an-

5 ticorpos IgG anti-humanos de cabra conjugados com peroxidase (Sigma), seguido por uma solução de substrato feita de 0,5 mg/mL de *orto*-fenilendiamina e peróxido de hidrogênio a 0,015% em tampão de citrato, pH de 5,5. As lâminas foram lidas em uma leitora de lâminas ELISA a 492 nm e os valores médios de absorvância estimados a partir de três cavidades repe-

10 A Tabela 1a mostra que a ligação do receptor solúvel estava limitada à fase sólida revestida com VEGF-A humano sem mutação da Peprotech. A proteína de fusão P64_{47aa}-VEGF, na qual três mutações críticas foram introduzidas por nós propositadamente (resíduos R82, K84 e H86 foram substituídos por ácido glutâmico) não foi identificada pelo KDR solúvel, um resultado que coincide com as previsões feitas por Shen e colaboradores (Shen, B. e colaboradores, 1998. J Biol Chem 273: 29979-29985) e torna

15 nosso antígeno diferente dos outros reportados na literatura, conforme usado para o desenvolvimento de anticorpos e fragmentos de anticorpo que neutralizam o VEGF humano.

Tabela 1a. Ensaio de ligação para KDR-Fc, usando VEGF-A ou a proteína de fusão P64_{47aa}-VEGF como revestimento em ELISA

KDR-Fc (µg/mL)	Revestimento de cavidades de lâmina para ELISA	
	Isoforma 121 de VEGF-A humano	Proteína de fusão P64 _{47aa} -VEGF
0 (controle negativo)	0,102	0,115
1,0	1,48	0,120
0,5	1,27	0,118
0,25	1,04	0,122
0,125	0,760	0,109

20 Exemplo 2. Imunização de camundongos BALB/c com a proteína P64_{47aa}-VEGF e avaliação da capacidade dos soros de reconhecer uma isoforma 121 de VEGF humano comercial

25 O potencial da proteína de fusão P64_{47aa}-VEGF de gerar anticorpos de neutralização de VEGF foi avaliado imunizando 10 camundongos BALB/c fêmeas (CENPALAB, Havana) entre 8-10 semanas de idade. Os animais foram imunizados com 100 µg da proteína P64_{47aa}-VEGF por dose,

usando o adjuvante conhecido como VSSP (Estévez F. e colaboradores, 1999. Vaccine 99: 190-197), em um esquema de quatro doses subcutâneas, espaçadas 7 dias. Uma semana após a última imunização, o sangue dos animais foi coletado e o soro separado e armazenado em alíquotas a -20°C.

5 Para determinar se os soros de camundongos imunizados com P64_{47aa}-VEGF tinham anticorpos específicos para o VEGF, um ELISA foi desenvolvido revestindo com a isoforma 121 de VEGF-A humano (Peprotech). A última foi imobilizada em uma imuno-lâmina com 96 cavidades Maxisorp (Nunc) em uma concentração de 1 µg/ml em PBS, durante 16h a 4°C. A
10 lâmina foi bloqueada a 22°C com PBS-leite a 4% durante 1h. Diluições seri-ais de soro em PBS-leite a 4% foram incubadas durante 1h, a lâmina lavada e incubada com um conjugado de peroxidase anti-camundongo (Sigma). A reação foi desenvolvida com uma solução de substrato feita de 0,5 mg/mL de *orto*-fenilendiamina e peróxido de hidrogênio a 0,015% em tampão de
15 citrato; pH de 5,5. O soro dos animais imunizados com a proteína P64_{47aa}-VEGF reconheceu especificamente o VEGF humano comercial com titulações de até 1:32.000.

Exemplo 3. Seleção de sítios de ligação de anticorpo contra o VEGF humano

20 Para a seleção de sítios de ligação contra a isoforma 121 de VEGF humano, nós usamos uma biblioteca de visualização da fago filamento-oso de fragmentos de anticorpo Fv humano com uma única cadeia (scFv), construída especificamente para a presente invenção. Nessa biblioteca, as regiões variáveis (VR) de cadeia leve humanas presentes no scFv resultan-
25 tes correspondem ao repertório de VR lambda. No processo de desenvolvi-mento dessa biblioteca propensa à VR lambda (V λ), construída de acordo com procedimentos publicados (Rojas G. e colaboradores, 2005. Biochem Biophys Res Commun 336: 1207-1213), os genes que codificam um repertório de VR de cadeia pesada humana foi recuperado de uma semi-biblioteca e
30 ligado ao DNA de plasmídeo de outra semi-biblioteca de regiões V λ em uma proporção de vetor:inserto de 1:1. Os produtos da ligação foram eletropora-dos em células TG1 para obter a biblioteca final. A presença e o tamanho

dos insetos foram determinados em uma amostra de 30 colônias, com oligonucleotídeos que se associam às regiões de flanqueamento do scFv clonado.

Na seleção usando essa biblioteca recentemente construídas, nós empregamos como antígeno a proteína de fusão recombinante P64_{47aa}-VEGF. A mistura de fago que se conforma à biblioteca foi submetida previamente a um processo de depleção com um excesso (1 mg/mL) de P64k em solução, para eliminar o scFv indesejado que é específico para essa proteína. A mistura com depleção foi usada para hibridização a proteína P64_{47aa}-VEGF imobilizada em imuntubos Maxisorp (Nunc). Para isso, os imuntubos foram revestidos com 10 µg/mL da proteína em PBS, a 4°C durante a noite e, então, bloqueados com PBS-leite desnatado a 4%. Os fagos não ligados foram eliminados através de 20 lavagens com uma solução de PBS-Tween a 0,1%, seguido por 2 lavagens com PBS. Os fagos ligados foram eluídos com uma solução de trietilamina a 100 mmoles/L durante 10 min que foi imediatamente neutralizada com 0,5 moles/L de Tris (pH de 7,5). Os fagos eluídos foram amplificados na cepa TG1 de *E. coli* e usados como material de iniciação para o próximo ciclo de seleção. Esse procedimento foi repetido 3 vezes sob as mesmas condições. Colônias individuais aleatórias de células TG1 infectadas com fagos eluídos dos segundo e terceiro ciclos de seleção foram usadas para produzir fagos em uma escala de 96 cavidades. A capacidade desses clones de fago que mostram fragmentos de anticorpo scFv de se ligar à P64_{47aa}-VEGF foi avaliada usando ELISA. Lâminas com 96 cavidades Maxisorp (Nunc) foram revestidas com 10 µg/mL de P64_{47aa}-VEGF e, então, bloqueadas. Os fagos, diluídos em PBS-leite desnatado a 4% foram incubados nas lâminas durante 1h a 22°C, seguido por várias lavagens. Os fagos lavados foram detectados com anticorpos anti-M13 conjugados à peroxidase (Amersham) durante 1h a 22°C. Após várias lavagens, a reação foi desenvolvida com a adição de solução de substrato. A absorbância foi lida a 492 nm em uma leitora de micro-lâmina. Dos 96 clones de fago avaliados com o ELISA, 87 deram resultados positivos. O DNA que codifica os fragmentos de anticorpo scFv que são visualizados pelos clones de fago

que deram resultados positivos no ELISA foi amplificado através de PCR e submetido a uma análise de restrição com a enzima BstN-I. O produto dessa digestão foi verificado em um gel de agarose a 4%. A partir dessa análise, nós identificamos 7 padrões de restrição diferentes e um clone representativo de cada foi selecionado. Os clones selecionados foram produzidos através de infecção de células bacterianas TG1 que foram crescidas a 8°C durante 16 h. Os fagos contidos nos sobrenadantes de cultura foram precipitados de uma solução de PEG 5000 em NaCl a 2,5 M e armazenados para a caracterização imunoquímica que segue.

10 Exemplo 4. Caracterização imunoquímica do scFv em fagos selecionados da biblioteca

(a) Reconhecimento de diferentes isoformas de VEGF humano e de murino

Para determinar o reconhecimento específico das isoformas 121 e 165 de VEGF humano e a isoforma 120 de VEGF de camundongo, os 7 clones de fago que mostram fragmentos scFv foram submetidos a um ensaio ELISA. As imuno-lâminas foram revestidas com as isoformas 121 e 165 de VEGF-A humano (Peprotech) e a isoforma 120 de VEGF de murino (R&D) em uma concentração de 1 µg/ml em PBS. Após bloqueio das lâminas, os fagos foram purificados conforme descrito acima e diluídos em PBS-leite desnatado a 4% foram adicionados e incubados durante 1h a 22°C. Após várias lavagens, os fagos ligados foram detectados com anticorpos anti-M13 conjugados à peroxidase. A reação foi desenvolvida e quantificada conforme descrito no Exemplo 2. Como controle negativo, uma amostra da mistura de fagos da biblioteca não selecionada foi usada, precipitada conforme descrito acima. Conforme observado na Tabela 2, os 7 clones de fago selecionados identificam especificamente as isoformas 121 e 165 de VEGF humano. Desse, os clones 2H1-F e 3C1 não reconhecem a isoforma 120 do VEGF de murino. A Tabela mostra a capacidade de reconhecimento dos clones, que são classificados como positivos (+) quando os valores de densidade óptica obtidos no ELISA são pelo menos 5 vezes aquele do controle negativo.

Tabela 2. Reconhecimento de diferentes isoformas de VEGF-A humano e de murino por 7 clones de scFv visualizados em fagos filamentosos

Clone de fago	Isoforma 121 de VEGF-A humano	Isoforma 165 de VEGF-A humano	Isoforma 120 de VEGF-A de camundongo
3C1	+	+	-
2B2	+	+	+
2D2	+	+	+
2E1	+	+	+
3E8	+	+	+
2H1-F	+	+	-
2E3	+	+	+

(b) Reconhecimento diferencial de VEGF-A humano nativo e reduzido

A importância da duplicação homodimérica nativa de VEGF-A com relação ao reconhecimento pelos diferentes fragmentos de anticorpo selecionados da biblioteca foi estudada usando um ELISA onde a isoforma 5 121 de VEGF humano (Peprotech) foi revestida em lâminas para ELISA. Após bloqueio das lâminas, metade das cavidades foi tratada com solução de DTT a 50 mM em PBS-leite a 4% durante 1h a 22°C e a outra metade apenas com PBS-leite a 4%. Após várias lavagens, as cavidades onde o VEGF-A tinha sido reduzido com a solução de DTT foram tratadas com iodoacetamida a 100 mM em PBS-leite a 4% e incubadas durante 1h a 22°C. As cavidades restantes foram mantidas com PBS-leite a 4%. Após uma nova lavagem da lâmina, o fago purificado, diluído em PBS-leite a 4%, foi adicionado às cavidades e incubado durante 1h a 22°C. Após várias lavagens, os fagos ligados foram detectados com anticorpos anti-M13 conjugado à peroxidase. 10

Como controle negativo, uma amostra da mistura de fagos da biblioteca não selecionada foi usada. A Tabela 3 mostra 3 padrões: um no qual o reconhecimento não foi afetado pela redução de VEGF (exemplificado pelo clone 3C1), um segundo padrão no qual um efeito parcial da redução foi observado (exemplificado pelos clones 2B2 e 3E8) e um terceiro padrão no qual uma eliminação completa de reconhecimento contra a forma reduzida de VEGF foi notada (exemplificado pelos clones 2D2, 2E1, 2H1-F e 2E3). A capacidade de reconhecimento do VEGF-A pelos clones foi medida em termos de Densidade Óptica média (492 nm) de três cavidades repetidas no experimento tomando, como uma referência mínima, aquela produzida pelo contro- 15 20

le negativo.

Tabela 3. Reconhecimento do VEGF-A humano tratado ou não com DTT pelos 7 clones de scFv visualizados em fago filamentosos

Denominação do clone de fago	VEGF-A humano sem tratamento (nativo)	VEGF-A tratado com DTT (reduzido)
3C1	2,125	2,096
2B2	2,015	0,600
2D2	1,289	0,121
2E1	1,831	0,142
3E8	1,109	0,770
2H1-F	1,250	0,103
2E3	1,803	0,125
Mistura de fago não selecionado	0,122	0,103

(c) ELISA por competição entre uma forma solúvel do receptor KDR (KDR-

5 Fc) e o fago selecionado para VEGF-A humano

Um ELISA de competição foi usado para avaliar a capacidade dos clones de fago de bloquear o acesso de um receptor de VEGF solúvel ao antígeno. Para isso, imuno-lâminas com 96 cavidades Maxisorp (Nunc) foram revestidas com a isoforma 121 de VEGF-A humano (Peprotech). As lâminas foram bloqueadas e ainda incubadas com uma mistura do fago correspondente, diluído em PBS-leite a 4%, com ou sem 2 µg/mL de receptor solúvel (KDR-Fc, Sigma). Os fagos ligados foram detectados usando anticorpos anti-M13 conjugados à peroxidase (Amersham). Conforme mostrado na Tabela 4, o clone que evidenciou um maior bloqueio de ligação de KDR-Fc ao VEGF-A foi aquele denominado 2H1-F. A tabela mostra a capacidade de reconhecimento do VEGF-A pelos clones, medida em termos da Densidade Óptica média (492 nm) de três cavidades repetidas no experimento tomando, como uma referência mínima, aquela produzida pelo controle negativo.

20 Tabela 4. Reconhecimento do VEGF-A humano após mistura individualmente ou não dos 7 clones de scFv visualizados em fago com 2 µg/mL de KDR-Fc

Denominação do clone de fago	Com 2 µg/mL de KDR-Fc	Sem KDR-Fc
3C1	1,269	1,290
2B2	2,261	2,213
2D2	1,161	1,160
2E1	1,293	1,401
3E8	0,828	0,993
2H1-F	0,577	1,149
2E3	0,884	1,088
Mistura de fago não selecionado	0,121	0,115

Exemplo 5. Expressão do fragmento scFv 2H1 em *E. coli*, purificação e caracterização de seu reconhecimento do VEGF-A humano

(a) Clonagem de scFv 2H1 no vetor pACR.1 e sequenciamento

O vetor pACR. é um plasmídeo criado para a expressão de fragmentos de anticorpo no periplasma de *E. coli* (Figura 1). Como principais elementos do vetor, nós temos o promotor LacZ, um peptídeo sinalizador, os sítios de restrição Nco I e Not I para a inserção do gene de fragmento, um domínio para codificação do peptídeo *c-myc* e uma seqüência para codificação de 6 histidinas, a última para purificação dos produtos de expressão usando IMAC. O DNA de fagemídeo que contém o scFv denominado 2H1-F foi usado como *template* para PCR. Esse procedimento foi feito com a enzima ProofStart (Stratagene), sob as instruções do fabricante. Os oligonucleotídeos sintéticos # 3 (SEQ ID No. 4) e # 4 (SEQ ID No. 5) foram usados como primers no procedimento (Tabela 5).

Tabela 5. Oligonucleotídeos sintéticos para a amplificação e modificação do scFv 2H1-F contido no vetor de fagemídeo, para sua clonagem no vetor pACR.1

Oligonucleotídeo	Seqüência
# 3 (SEQ ID No. 4)	5'...CTATTCTCCCATGGCACAG...3'
# 4 (SEQ ID No. 5)	5'...TTCTGTATGAGGTTTTGC...3'

Uma banda do tamanho esperado (700 bp) obtida após amplificação, foi purificada a partir de um gel de agarose a 1% usando o kit de extração de DNA QIAGEN, digerida com Nco I e Not I (Promega) e re-

purificada para ligação. O vetor pACR.1 foi digerido com Nco I e Not I (Promega) e ligado com a banda digerida usando DNA ligase T4 (Promega). O produto da ligação foi usado para transformar células competentes de *E. coli* (cepa XL-1Blue; Stratagene) através de eletroporação. As células transformadas foram colocadas em meio sólido seletivo e crescidas a 37°C. Os métodos empregados são amplamente conhecidos (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Segunda Edição. 1989. Sambrook, Fritsch e Maniatis).

DNA de plasmídeo foi purificado a partir de diferentes colônias (kit QIAGEN MiniPrep) e verificado através de digestão do produto de ligação esperado com as enzimas de restrição já descritas. Vários plasmídeos foram escolhidos para obter a seqüência de DNA de consenso de scFv 2H1, usando sequenciamento automático e primers específicos que se hibridizam externamente às regiões de clonagem do vetor pACR.1. A seqüência de DNA de consenso obtida para o fragmento completo (VH-ligante-VL-*c myc*-histidinas), denominado scFv 2H1 (SEQ ID No. 6), é mostrada na Figura 2. O plasmídeo representativo dessa construção foi denominado pACR.1-scFv 2H1. Essa Figura apresenta as seqüências individuais de VR de cadeia pesada (denominada 2H1RVCP; SEQ ID No. 7) e VR de cadeia leve (denominada 2H1RVCL; SEQ ID No. 8). De acordo com a classificação de Kabat e colaboradores, 2H1RVCP pertence ao Subgrupo I de VR de imunoglobulina humana e 2H1RVCL pode ser classificada em vários grupos de VR do tipo lambda de imunoglobulina humana. Sublinhadas na Figura são as seqüências de CDR, anotadas de acordo com a classificação de Kabat e colaboradores.

25 (b) Expressão de scFv 2H1 em *E. coli*

pACR.1-scFv 2H1 foi usado para transformar células BL21 de *E. coli* competentes. Essa cepa permite a expressão da proteína heteróloga no periplasma e/ou meio de cultura. A transformação foi feita em meio sólido seletivo e deixada crescer a 37°C. Uma colônia representativa de construção foi crescida em meio líquido e, quando uma DO_{530nm} de 1,0 foi obtida, indução foi feita durante 12h usando isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a 1 mM no meio de cultura. As células foram centrifugadas e os con-

teúdos periplásmicos foram isolados através de choque osmótico e rápido ultra-som. A fração periplásmica e o sobrenadante de cultura foram avaliados em SDS-PAGE de desnaturação a 12%. Esse ensaio mostrou a expressão de uma proteína do peso molecular aparente esperado acima de 29 kDa, quando comparado com os marcadores de peso molecular e com um scFv contra um antígeno carcinoembrionário [scFv-M3]; (Pérez L. e colaboradores, 2006. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 43: 39-48) (Figura 3). A maioria do fragmento scFv 2H1 foi encontrado no sobrenadante de cultura.

(c) Purificação do fragmento scFv 2H1 usando IMAC

O domínio com seis histidinas presente na proteína, fornecido pelo vetor pACR.1, foi usado para estabelecer o procedimento de purificação. Essa seqüência confere às proteínas uma afinidade muito alta por íons de metal (Ex. Zn^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2}), que podem ser quelados a diferentes suportes cromatográficos. As bactérias transformadas com o vetor pACR.1-scFv 2H1 foram centrifugadas e o sobrenadante isolado, submetido à diálise durante 72h no tampão de acoplamento (NaH_2PO_4 a 50 mM, NaCl a 300 mM, pH de 7-8) e aplicado diretamente à Agarose-NTA (QIAGEN). A Figura 4A mostra que uma proteína de alta pureza que migra no gel um pouco acima de 29 kDa é obtida após purificação. As frações obtidas foram submetidas à Western Blot usando um anticorpo monoclonal (9E10) específico contra o peptídeo *c-myc* que está presente no scFv e no controle (scFv-M3), seguido por anticorpos de IgG anti-camundongo de coelho conjugados à peroxidase (Sigma). A Figura 4B mostra que o anticorpo monoclonal 9E10 detectou o scFv 2H1 e que nenhuma degradação importante é observada.

(d) Reconhecimento específico do VEGF humano pelo scFv 2H1 em ELISA

Imuno-lâminas com 96 cavidades Maxisorp (Nunc) foram revestidas com as isoformas 121 e 165 de VEGF-A humano (Peprotech) e a isoforma 120 de VEGF de murino (R&D) em uma concentração de 1 μ g/mL em PBS durante 16 h a 4°C. Após bloqueio das lâminas com PBS-leite desnatado a 4%, o scFv 2H1 purificado foi adicionado em diferentes concentrações em PBS-leite desnatado a 4% e incubado durante 1h a 22°C. Após várias lavagens, um anticorpo monoclonal (9E10) específico contra o peptídeo *c-*

myc foi adicionado (1 µg/mL), seguido por anticorpos de IgG anti-camundongo de coelho conjugados à peroxidase de armorácia (Sigma). A ligação do fragmento ao antígeno na fase sólida foi revelada e medida conforme descrito em outros exemplos. Um scFv não relacionado anti-HBsAgA foi usado como controle negativo, obtido e purificado de um modo similar conforme descrito acima para o scFv 2H1. A Tabela 6 mostra que o scFv 2H1 mantém o reconhecimento específico do fago original scFv (2H1-F). A Tabela mostra a capacidade de reconhecimento do fragmento por diferentes VEGF-A, em termos da Densidade Óptica média (492 nm) calculada a partir dos valores reportados a partir de três réplicas no experimento tomando, como uma referência, o valor produzido pelo controle negativo.

Tabela 6. Reconhecimento de diferentes isoformas de VEGF-A humano e de camundongo pelo fragmento scFv 2H1

Fragmento	Isoforma 121 de VEGF-A humano	Isoforma 165 de VEGF-A humano	Isoforma 120 de VEGF-A de camundongo
scFv 2H1 (20 µg/mL)	1,193	1,199	0,110
scFv 2H1 (2 µg/mL)	1,162	1,087	0,091
scFv 2H1 (0,2 µg/mL)	0,753	0,612	0,086
scFv anti-HBsAg (20 µg/mL)	0,091	0,095	0,082

(e) ELISA por competição entre uma forma solúvel do receptor KDR (KDR-Fc) e o fragmento scFv 2H1 pelo VEGF-A

Um ELISA por competição foi usado para avaliar a capacidade do fragmento scFv 2H1 purificado de bloquear o acesso de um receptor VEGF solúvel ao antígeno. O ensaio é baseado na inibição de uma forma de receptor KDR-Fc solúvel ao VEGF-A humano revestida a uma fase sólida, após a adição de concentrações crescentes de scFv 2H1. Para isso, imunolâminas com 96 cavidades Maxisorp (Nunc) foram revestidas com a isoforma 121 de VEGF-A humano (Peprotech) em PBS durante 16h a 4°C. As lâminas foram bloqueadas e ainda incubadas com concentrações crescentes de scFv

2H1 purificado e 0,5 µg/mL de receptor solúvel (KDR-Fc, Sigma) ou o veículo apenas (PBS-leite a 4%). Um fragmento de anticorpo scFv anti-HBsAg foi usado como controle negativo. Os fagos ligados foram detectados usando anticorpos anti-M13 conjugados à peroxidase (Amersham). O KDR-Fc ligado ao VEGF-A humano na fase sólida foi detectado com anticorpos de IgG anti-humanos conjugados à peroxidase (Sigma). Conforme mostrado na Figura 5, o scFv 2H1 é capaz de interferir na ligação do receptor solúvel ao VEGF-A humano na fase sólida, com uma dependência clara da dose usada.

(f) Comparação imunoquímica de scFv 2H1 e Avastina

O scFv 2H1 bacteriano foi comparado com Bevacizumab (Avastin®, Genentech) com relação à sua capacidade de identificação da proteína de fusão P64_{47aa}-VEGF, originalmente usada para o procedimento de seleção de anticorpo em fago descrito no Exemplo 3, que deu origem ao scFv 2H1-F. P64_{47aa}-VEGF ou VEGF-A humano (Peprotech) foi imobilizado em imuno-lâminas com 96 cavidades Maxisorp (Nunc) em uma concentração de 1 µg/ml em PBS, durante 16h a 4°C. A lâmina foi bloqueada a 22°C com PBS-leite a 4% durante 1h. Diluições seriais de scFv 2H1 purificado ou Bevacizumab em PBS-leite a 4% foram incubadas durante 1h, a lâmina lavada e ainda incubada como segue: (i) para scFv 2H1, com o anticorpo monoclonal anti-*c-myc* 9E10, seguido por um conjugado de IgG/peroxidase anti-camundongo (Sigma) e (ii) para Bevacizumab, com anticorpos de IgG anti-humanos de cabra conjugados à peroxidase (Sigma). As reações foram desenvolvidas com uma solução de substrato feita de 0,5 mg/mL de *orto*-fenilendiamina e peróxido de hidrogênio a 0,015% em tampão de citrato, pH de 5,5.

Conforme observado na Tabela 6a, que representa os valores de absorbância médios a 492 nm obtidos em uma leitora de lâminas ELISA, com três cavidades repetidas por amostra estudada, o scFv 2H1 reconheceu P64_{47aa}-VEGF e VEGF-A humano, enquanto que o Bevacizumab foi capaz de reconhecer apenas o VEGF-A humano da Peprotech.

O scFv anti-HBsAg não relacionado e TheraCIM (anticorpo de IgG1 humanizado anti-receptor de EGF; CIMAB SA, Havana) foram usados

como controles negativos.

Tabela 6a. Imuno-reatividades do fragmento scFv 2H1 e Bevacizumab contra P64_{47aa}-VEGF e a isoforma 121 de VEGF-A humano

Molécula relacionada a anti-corpo	Isoforma 121 de VEGF-A humano	P64 _{47aa} -VEGF
scFv 2H1 (20 µg/mL)	1,880	1,678
scFv 2H1 (2 µg/mL)	1,480	1,113
scFv 2H1 (0,2 µg/mL)	0,610	0,490
Bevacizumab (20 µg/mL)	3,201	0,145
Bevacizumab (2 µg/mL)	2,907	0,127
Bevacizumab (0,2 µg/mL)	1,885	0,110
scFv anti-HBsAg (20 µg/mL)	0,067	0,085
TheraCIM (20 µg/mL)	0,097	0,112

Exemplo 6. Expressão de scFv 2H1 em *Pichia pastoris* e demonstração de seu reconhecimento pelo VEGF humano

5

(a) Clonagem do gene de scFv no vetor pPS9

O gene que codifica scFv 2H1 foi digerido com NcoI/XbaI do vetor pACR.1-2H1 para clonagem no vetor de expressão pPS9 de *Pichia pastoris*. O plasmídeo pPS9 é um vetor integrativo que contém um fragmento de 1,15 kb que corresponde ao promotor da enzima oxidase de álcool (AOX.1), seguido pelo gene que codifica o sinal de secreção de invertase de sacarose (sucII) de *Saccharomyces cerevisiae*, um sítio de clonagem múltipla, um fragmento de 960 bp correspondendo à enzima desidrogenase de 3-fosfato de gliceraldeído (Gapt) para término de transcrição e o gene HIS3 de *S. cerevisiae* como marcador de seleção. Esse vetor também contém um fragmento de 2,1 kb que corresponde à seqüência 3' do gene AOX.1. Todos esses elementos são inseridos em um vetor pUC18 (EP0438200 A1).

15

20

Após digestão com NcoI/XbaI do gene de scFv-2H1 e sua purificação a partir de géis de agarose, a seqüência resultante foi ligada ao pPS9, previamente digerido com NcoI/Spel e os produtos de ligação usados para transformar a cepa XL-1 Blue de *E. coli*. Colônias transformadas isoladas foram analisadas usando PCR de colônia com um primer que se hibridiza na região promotora e aquelas que continham o inserto foram selecionadas.

Sequenciamento foi feito conforme reportado em outros exemplos. As seqüências obtidas para os plasmídeos recombinantes, denominados pPS2H1-12 e pPS2H1-13, são idênticas e contêm aquela do scFv 2H1, reportada em SEQ ID No. 6.

5 Cepas recombinantes de *P. pastoris* foram obtidas com esses dois plasmídeos (previamente digeridos com PvuII [Promega]), usando eletroporação e a cepa do tipo silvestre MP36 his 3 (Yong V. e colaboradores, 1992. *Biotechnol. Applic.* 9: 55-61) e meio mínimo deficiente em histidina para seleção. Em virtude dos diferentes mecanismos de recombinação dos
10 plasmídeos com sítios específicos no genoma de *P. pastoris*, nós isolamos dois fenotipos diferentes de células secretórias: (a) cepas onde o gene AOX.1 não foi afetado durante recombinação e são capazes de crescer em metanol e mostram comportamento similar à cepa do tipo silvestre (Mut+) e (b) cepas onde o gene AOX.1 foi substituído pelo cassete de expressão e
15 mostrou crescimento lento na presença de metanol (Mut s).

(b) Estudos de expressão

Os estudos de expressão para o fragmento de anticorpo foram feitos começando a partir de colônias prototróficas His⁺ crescidas em lâminas com meio seletivo. As colônias foram crescidas em 10 mL de meio tamponado rico em tubos de 50 mL, a 28°C e sob 150 rpm. Quando as culturas
20 obtiveram uma D.O a 600 nm de 2, elas foram centrifugadas a 2000 rpm durante 10 min. As pelotas de célula foram re-suspensas em 10 mL de meio rico com metanol ao invés de glicerol como a única fonte de carbono. Desse momento em diante e durante as próximas 96 h, a indução de proteínas de
25 interesse foi feita com adições diárias de metanol puro até 1% à cultura. A cepa MP36his3 transformada com um vetor vazio foi usada como controle negativo.

Quando a indução terminou, as células foram centrifugadas e o meio metabolizado coletado, centrifugado novamente para clarificação final e
30 SDS-PAGE a 15% empregado para detectar scFv 2H1. Esse ensaio revelou a presença, em ambos os casos, de proteínas com o peso molecular aparente esperado (29 kDa), que foram posteriormente avaliadas através de

Western Blot usando o anticorpo monoclonal (Mab) 9E10, como anticorpo primário, seguido por anticorpos de IgG anti-camundongo de coelho conjugados à peroxidase (Sigma). As duas proteínas recombinantes foram identificadas pelo Mab 9E10.

5 (c) Reconhecimento do VEGF-A humano em ELISA pelo scFv 2H1

Um ensaio ELISA similar, com relação à fase sólida, reagentes, revestimento, incubação, desenvolvimento e condições de controle àquele descrito acima para o scFv 2H1 derivado de *E. coli* foi usado. As amostras de cultura de meio metabolizado das cepas de levedo recombinantes induzidas diluídas em PBS-leite a 1% foram adicionadas e incubadas 2h em temperatura ambiente. Como controles negativos, os meios metabolizados da cepa do tipo silvestre MP36 his 3 e o fragmento de scFv anti-HBsAg não relacionado foram usados. Como controle positivo, o fragmento scFv 2H1 purificado bacterianamente derivado foi usado. Valores de absorvância pelo menos 4 vezes maior do que aqueles produzidos pelos controles negativos eram considerados positivos. As amostras do meio metabolizado com o fragmento scFv 2H1, denominadas scFv 2H1-Pp17, produzidas após indução de células de levedo *P. pastoris* transformadas, foram positivas com relação à sua capacidade de reconhecimento do VEGF-A humano ligado a uma fase sólida.

Exemplo 7. Obtenção de fragmentos Fab bacterianos usando as regiões variáveis (VR) de scFv 2H1 e caracterização de seu reconhecimento do VEGF humano

(a) Clonagem da VR de scFv 2H1 no vetor pFabHum-1 e sequenciamento

25 A Figura 6 é um esquema do plasmídeo pFabHum-1, usado para a produção dos fragmentos de anticorpo do tipo Fab no periplasma e meio de cultura de *E. coli*. O vetor tem um promotor LacZ, um RBS, a seqüência para um peptídeo sinalizador (PS), sítios para a clonagem da região variável (VR) de cadeia leve (Sal I e Avr II), a seqüência que codifica um domínio C λ de imunoglobulina humana, seguido por outro RBS e seqüência de PS, sítios para a clonagem da VR de cadeia pesada (Apa LI e Bst EII), seguido pela seqüência que codifica um domínio CH1 de imunoglobulina humana, esten-

dido para incluir a primeira cisteína da região de dobradiça de IgG1 humana. A proteína VR-CH1 é expressa associada a um domínio com seis histidinas para purificação por IMAC e um peptídeo *c-myc* para fins analíticos, ambos em seu C-término e fornecidos pelo vetor.

5 O DNA correspondendo ao fagemídeo que traz o scFv denominado 2H1-F foi primeiro digerido com Sal I e Avr II para obter a VR de cadeia leve. Após verificação de seu tamanho em um gel de agarose a 1,5%, clonagem foi feita no pFabHum-1. Uma vez verificada a clonagem usando en-
10 zimas de restrição, o plasmídeo (denominado pFab-Hum-1 RVL) foi replica- do, purificado e submetido a uma nova digestão com Apa LI e Bst EII. No caso de Bst EII, a digestão foi parcial. Uma vez que o tamanho de banda foi verificado em agarose a 1,5%, clonagem foi feita no pFab Hum-1 RVL. A clonagem foi verificada com enzimas de restrição e o plasmídeo denominado pFab 2H1-32. Esse plasmídeo foi replicado, purificado e submetido a se-
15 quenciamento automático. A seqüência de DNA que codifica a proteína ma- dura Fab 2H1-32 é mostrada na Figura 7. A Figura 7A mostra a combinação de VR de cadeia leve e C λ (SEQ ID No. 9) e a Figura 7B mostra a combina- ção de VR de cadeia pesada e CH1 (SEQ ID No. 10). As CDRs aparecem sublinhadas, anotadas de acordo com a classificação de Kabat e colabora-
20 dores.

(b) Expressão do Fab em *E. coli*

O plasmídeo pFab 2H1-32 foi usado para transformar células competentes BL21 de *E. coli*. A transformação foi feita em meio sólido seleti-
25 vo e crescida para permitir prosseguir a 37°C durante 16h. Uma colônia re- presentativa foi crescida em meio líquido e, após obtenção de uma DO_{530 nm} de 1, a cultura foi induzida durante 12 h com IPTG a 1 mM. As células foram centrifugadas e o conteúdo periplásmico isolado com choque osmótico e rápido ultra-som e a fração periplásmica e o sobrenadante analisados em SDS-PAGE a 12%. Esse ensaio revelou a presença de uma proteína do ta-
30 manho esperado (aprox. 50 kDa), que foi depois avaliada através de Wes- tern Blot usando, como anticorpo primário, um anticorpo monoclonal (9E10) contra o peptídeo *c-myc*, seguido por anticorpos de IgG anti-camundongo de

coelho conjugados com peroxidase (Sigma). Western blot mostrou que o anticorpo 9E10 detectou uma proteína do tamanho esperado, no sobrenadante de cultura e em amostras de periplasma.

(c) Purificação de Fab 2H1-32 usando IMAC e caracterização de seu reconhecimento do VEGF através de ELISA

5

As bactérias recombinantes produzidas através da transformação com pFab 2H1-32 foram centrifugadas e o sobrenadante submetido à diálise durante 72h contra o tampão de acoplamento. Os preparados contendo o Fab foram diretamente aplicados à Agarose-NTA (QIAGEN). Após lavagem para eliminar os contaminantes de *E. coli*, o Fab 2H1-32 foi obtido na fração de eluição com pureza próxima de 85%, estimada usando SDS-PAGE a 12%.

10

O fragmento Fab purificado foi avaliado com relação à sua capacidade de reconhecimento do VEGF humano usando um ensaio ELISA. Lâminas com 96 cavidades Maxisorp (Nunc) foram revestidas com as isoformas 121 e 165 de VEGF-A humano (Peptotech) ou a isoforma 120 de VEGF-A de camundongo (R&D) a 1 µg/mL. O fragmento Fab purificado foi diluído e incubado durante 1h a 22°C. Após lavagem, o anticorpo monoclonal anti-peptídeo *c-myc* foi adicionado (1 µg/mL), seguido por anticorpos de IgG anti-camundongo de coelho conjugados à peroxidase (Sigma). Um scFv anti-HBsAg foi usado como controle negativo e o scFv 2H1 bacteriano purificado usado como controle positivo. Conforme mostrado na Tabela 7, o Fab produzido em *E. coli* reconhece especificamente o VEGF humano em ELISA. A Tabela mostra a capacidade de reconhecimento do fragmento Fab Fab 2H1-32 das diferentes isoformas de VEGF-A, em termos do valor de Densidade Óptica média (a 492 nm) obtido a partir de três cavidades repetidas tomando, como uma referência, os valores produzidos pelo controle negativo.

15

20

25

Tabela 7. Reconhecimento de diferentes isoformas de VEGF-A humano e VEGF-A de camundongo pelo fragmento Fab 2H1-32

Fragmento	Isoforma 121 de VEGF-A humano	Isoforma 165 de VEGF-A humano	Isoforma 120 de VEGF-A de camundongo
Fab 2H1-32 (20 µg/mL)	1,020	1,101	0,089
Fab 2H1-32 (2 µg/mL)	1,087	1,065	0,090
Fab 2H1-32 (0,2 µg/mL)	0,675	0,645	0,070
scFv anti-HBsAg (20 µg/mL)	0,087	0,078	0,083
scFv 2H1 (2 µg/mL)	1,098	1,076	0,082

Exemplo 8. Produção e caracterização de reconhecimento das moléculas diméricas que compreendem 2 unidades de scFv geneticamente fundidas a

5 um Fc de IgG1 humana

(a) Transfectomas que produzem moléculas scFv₂-Fc anti-VEGF

Para obter moléculas do tipo "anticorpo completo" com dois sítios de ligação idênticos, conforme definido pelo scFv 2H1, uma PCR foi feita usando, como *template*, o plasmídeo pACR.1-scFv 2H1 que contém a seqüência gênica de scFv 2H1 e primers # 5 (SEQ ID No. 10) e # 6 (SEQ ID

10 No. 11) que aparecem na Tabela 8, de forma a modificar a seqüência de DNA que codifica o fragmento de anticorpo e o torna compatível para a clonagem que segue. Esse procedimento foi feito com PanoTaq (Panorama Inc.), sob as instruções do fabricante.

15 Tabela 8. Primers de PCR usados para modificar o pACR.1-scFv 2H1 para sua clonagem em pVSJG-HucFc

Oligonucleotídeo sintético	Seqüência
#5 (SEQ ID No. 11)	5'... ACAGGGCTTAAGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG... 3'
#6 (SEQ ID No. 12)	5'... TGTTGTTCTAGAACCTAGGACGGTGACCTTGGTCCC... 3'

O DNA amplificado foi clonado no vetor pVSJG-HucFc. Esse vetor é representado na Figura 8A e foi criado para expressão, em células de mamífero, de uma cadeia polipeptídica que compreende, nessa ordem:

20 uma seqüência líder (peptídeo sinalizador) da cadeia pesada de um anticorpo monoclonal de murino, seguido por um fragmento scFv, um espaçador de

10 aminoácidos e as seqüências de consenso das regiões de dobradiça, CH2 e CH3 de imunoglobulina IgG1 humana. A seqüência líder direciona a cadeia ao retículo endoplásmico, onde ela dimeriza através da formação de ligações de dissulfeto entre as regiões de dobradiça e a associação por complementaridade das regiões CH2 e CH3 de dois polipeptídeos idênticos. Os domínios de dobradiça, CH2 e CH3 dimerizados para um Fc de imunoglobulina humana, ao qual segmentos N-terminais de dois scFv idênticos convertem essa construção bivalente em uma molécula do tipo "anticorpo completo" (Figura 8B). Dentre as principais características desse vetor, nós encontramos um promotor de Citomegalovírus.

A banda correspondendo ao produto da amplificação foi digerida com Afl II e Xba I e clonada no pVSJG-HucFc, previamente digerido com as mesmas enzimas. Das colônias bacterianas resultantes de transformação, duas foram selecionadas para sequenciamento. Sequenciamento automático indicou que as duas colônias produziram plasmídeos recombinantes quase idênticos, que foram denominados scFv₂-Fc 2H1-4.1 e scFv₂-Fc 2H1-8.2. A única diferença na seqüência entre esses dois plasmídeos é que o primeiro tem uma base de VR de cadeia pesada que é diferente e "silenciosa" com relação ao aminoácido codificado e três bases de VR de cadeia leve que são diferentes, com relação às seqüências de VR de scFv 2H1 (SEQ ID No. 7 e SEQ ID No. 8). As seqüências que codificam as proteínas scFv₂-Fc 2H1-4.1 e scFv₂-Fc 2H1-8.2 maduras são mostradas na Figura 9 (SEQ ID No. 13) e Figura 10 (SEQ ID No. 14), respectivamente. Na Figura, as seqüências de CDR são sublinhadas e anotadas de acordo com a classificação de Kabat e colaboradores.

Os dois plasmídeos foram purificados sob condições isentas de endotoxina usando o sistema Pure Yield Plasmid Midiprep (Promega) e empregados para transfectar células de mieloma P3/x63.Ag8.653 usando SuperFect (QIAGEN). Os sobrenadantes dos transfectomas desenvolvidos a partir de células que eram resistentes à G418 foram avaliados através de ELISA. Imuno-lâminas com 96 cavidades Maxisorp (Nunc) foram revestidas com a isoforma 121 de VEGF humano (Peprotech). Os sobrenadantes das

colônias de transfectoma foram diluídos em PBS-leite a 2% e adicionados às lâminas e a presença de molécula anti-VEGF do tipo scFv₂-Fc foram detectadas com anticorpos anti-Fc humano conjugados à peroxidase (Sigma). As colônias de células de transfectoma que secretaram maiores quantidade de moléculas scFv₂-Fc anti-VEGF, conforme detectado através de ELISA, foram repetidamente clonadas através de diluição limitada na presença de G418 e sempre avaliando a capacidade dos clones selecionados para produzir sinais anti-VEGF humano em ELISA. Após duas clonagens independentes e consecutivas, dois clones estáveis foram obtidos, que produziram scFv₂-Fc denominados scFv₂-Fc 2H1-4.1 e scFv₂-Fc 2H1-8.2.

(b) Purificação de scFv₂-Fc 2H1-4.1 e scFv₂-Fc 2H1-8.2 e elevação de sua capacidade de reconhecer o VEGF humano em ELISA

Clones de transfectoma que produzem as moléculas scFv₂-Fc 2H1-4.1 e scFv₂-Fc 2H1-8.2 foram cultivados em frascos de 162 cm² na presença de soro bovino fetal a 10% e o sobrenadante coletado após uma alta densidade celular ser obtida. Os sobrenadantes foram diluídos a 1:1 em tampão de fosfato de sódio a 0,1 M, pH de 7,0 e foram purificados independentemente através de cromatografia por afinidade, usando Protein A Sepharose Fast Flow 4 (Amersham). As moléculas scFv₂-Fc 2H1-4.1 e scFv₂-Fc 2H1-8.2 foram eluídas em tampão de glicina a 0,2 M, pH de 4,0 e submetidas à neutralização rápida com Tris a 1 M, pH de 10,0. Após diálise contra PBS, a concentração foi calculada usando absorvância de UV a 280 nm e a pureza estimada através de SDS-PAGE a 12%. Foi determinado que os preparados eram mais de 85% puros. As moléculas purificadas foram aplicadas a um ELISA conforme descrito acima, em comparação com sobrenadantes não purificados, mostrando que ambos os preparados purificados eram capazes de reconhecer o VEGF-A humano.

Exemplo 9. Identificação do epítipo de VEGF humano pelo scFv 2H1

(a) Seleção de peptídeos que são reconhecidos pelo scFv 2H1 a partir de uma biblioteca de peptídeo combinatorial visualizada em fago filamentososo

Para a identificação do epítipo de VEGF-A humano pelo scFv 2H1, nós seguimos a estratégia de confrontar o scFv 2H1 com uma bibliote-

ca de peptídeo linear de 12 aminoácidos combinatorial visualizada sobre fagos filamentosos (Combinatoria Molecular. Santiago Vispo, N. (Ed.) Elfos Scientiae, 2004, La Havana). A mistura de fago que compõe a biblioteca, diluída em PBS-leite desnatado a 4%, foi adicionada a imunotubos (Nunc, 5 Maxisorp) onde scFv 2H1 purificado tinha sido imobilizado. Os tubos tinham sido revestidos com o scFv e a fase sólida ainda bloqueada com PBS-leite desnatado a 4%. Os fagos que não se ligam ao scFv nos imunotubos foram eliminados com 20 lavagens de uma solução de PBS-Tween a 0,1%, seguido por 2 lavagens com PBS. Os fagos ligados foram eluídos com uma solu- 10 ção de trietilamina a 100 mmoles/L, a qual foi imediatamente neutralizada com Tris a 0,5 moles/L (pH de 7,5). Os fagos eluídos foram amplificados em bactérias TG1 e usados como material de iniciação para um novo ciclo de seleção. Esse procedimento foi repetido 3 vezes sob condições similares. Colônias aleatórias de células TG1 infectadas com fago eluído dos segundo e terceiro ciclos de seleção foram usadas para produzir fago em uma escala 15 de 96 cavidades.

A capacidade desses clones de fago de visualização de peptídeo de se ligar ao scFv 2H1 foi avaliada usando um ELISA de fago. Lâminas com 96 cavidades Maxisorb (Nunc) foram revestidas com scFv 2H1 e, então, 20 bloqueadas. Os fagos produzidos por uma única cavidade foram diluídos em PBS-leite desnatado a 4% e incubados durante 1 h e 22°C em cavidades específicas das lâminas revestidas com scFv 2H1, seguido por várias lavagens com PBS-Tween a 0,1%. Os fagos ligados foram detectados usando anticorpos anti-M13 conjugados à peroxidase (Amersham). Dos 40 clones de 25 fago ensaiados em ELISA, 35 tiveram resultado positivo e foram usados nos métodos que seguem.

(b) Ensaio de ELISA por competição de ligação de scFv 2H1

Para testar se os 35 clones de fagos selecionados que visualizam peptídeos reconhecem especificamente o sítio de ligação do scFv 2H1, 30 um ELISA foi feito por competição dos peptídeos sobre o fago com VEGF-A pela ligação ao scFv 2H1 revestido a uma fase sólida. Lâminas com 96 cavidades Maxisorp (Nunc) foram revestidas com 10 µg por cavidade de scFv

2H1 e, então, bloqueadas. Metade das cavidades foi incubada com 10 µg/mL de VEGF (Pepro-
tech) em PBS-leite desnatado a 4% e, após várias lavagens com PBS-Tween a 0,1%, os preparados de fago foram adicionados
5 diluídos em PBS-leite desnatado a 4% contendo 10 µg/mL de VEGF (Pepro-
tech), que foram incubados em condições similares àquelas já descritas. De
um modo simultâneo, o resto da lâmina foi incubado com PBS-leite desnata-
do e, após várias lavagens com PBS-Tween a 0,1%, os preparados de fago
foram adicionados diluídos em PBS-leite desnatado a 4%. Os fagos ligados
foram detectados usando um anticorpo anti-M13 conjugado com peroxidase
10 (Amersham). Conforme observado na Figura 11 para a amostra dos clones
estudados, a presença de VEGF interfere completamente com a ligação do
peptídeo visualizado em fagos ao scFv 2H1 imobilizado.

(c) Seqüenciamento de peptídeo

Uma amostra de 20 dos 35 clones de fago de peptídeo caracte-
15 rizados no procedimento mencionado acima foi usada para extrair DNA de
fagemídeo para seqüenciamento automático. As seqüências obtidas para os
20 clones estudados eram idênticas, sendo essas CCRTLMLLQYHR (SEQ
ID No 15).

(d) Estudo prognóstico do epítopo reconhecido pelo scFv 2H1

20 A seqüência obtida acima foi analisada usando os programas
FINDEPI (<http://www.biocomp.cigb.edu.cu/findepi>) e 3D Epitope Explorer
(Schreiber A. J. 2005. Comput Chem 26: 879-887), com resultados similares.
Esses são métodos computacionais que prevêm trechos de proteína na
superfície implicados em interações proteína-proteína. Como dados de en-
25 trada, os métodos usam a estrutura 3D de um dos elementos no par de inte-
ração (proteína *template*; em nosso caso, o VEGF-A humano do banco de
dados de proteína PDB, código 1BJ1) e a seqüência de aminoácido do se-
gundo elemento na interação (proteína de ligação; em nosso caso, o peptí-
deo CCRTLMLLQYHR; SEQ ID No. 15). Como um exemplo, o programa
30 FINDEPI gera um banco de dados de mimótopos em potencial de cada tre-
cho de superfície na proteína *template*, aplicando uma série de regras este-
reoquímicas. Esse banco de dados é explorado usando métodos de alinha-

mento de perfil para detectar mimótopos potencialmente similares ao peptídeo selecionado experimentalmente em virtude de sua ligação. Após aplicação de um algoritmo de agrupamento, o programa reporta uma lista de resíduos expostos na superfície da proteína *template*, com possibilidade de estarem localizados na interfase de interação das duas proteínas. A capacidade do método foi avaliada com complexos de proteína-proteína para os quais a estrutura cristalográfica é conhecida e para os quais dados experimentais estão disponíveis sobre a seqüência dos polipeptídeos que são ligados por essas moléculas.

10 Ambos os programas usados definem uma zona de interação similar na molécula de VEGF-A humano que compreende principalmente os resíduos C102, C57, R56, T31 e L32 (anotados de acordo com o banco de dados de proteína PDB, código 1BJ1). Considera-se na presente invenção que esses resíduos são os principais indicadores do epítipo reconhecido pelo scFv 2H1. De acordo com as previsões, outros resíduos poderiam aparecer associados aos principais indicadores mencionados acima, embora com escores menores, sendo esses G59, C68, V69, P70 e H99. O epítipo definido principalmente pelos resíduos C102, C57, R56, T31 e L32 não coincidem com aqueles reportados para outros anticorpos e fragmentos de anticorpo que neutralizam o VEGF humano (Muller AY. e colaboradores, 1997. PNAS 94: 7192-7197; Muller AY. e colaboradores, 1998. Structure 6: 1153-1167; Schaeppi J.-M. e colaboradores, 1999. J Cancer Res Clin Oncol 125: 336-342; Fuh G. e colaboradores, 2006. J Biol Chem 281: 6625-6631; WO2005012359). O epítipo definido principalmente pelos resíduos C102, 25 C57, R56, T31 e L32 pode ser relacionado à conservação da estrutura dimérica do VEGF-A, se nós considerarmos os resultados dos experimentos mostrados no Exemplo 4, que indicam uma perda de reconhecimento de scFv 2H1 pelo VEGF-A humano quando o antígeno é tratado com redução das ligações de dissulfeto, que separam dímeros em monômeros.

30 A Figura 12 mostra o mapeamento dos resíduos que definem principalmente o epítipo reconhecido na molécula de VEGF-A pelo scFv 2H1, em comparação com aqueles descritos para outros anticorpos. Um di-

agrama do tipo *cartoon* representativo da estrutura terciária do VEGF-A humano é usado, em sua conformação dimérica, com alfa hélice, cadeias beta e loops. As duas moléculas idênticas no dímero aparecem como cinza claro e preto. Para simplificar, a posição dos resíduos definidos como principais 5 indicadores do epítipo reconhecido pelo scFv 2H1 é representada apenas na cadeia cinza clara e aparece na representação de Van der Waals em preto (VDW). Os resíduos reconhecidos por outros anticorpos são mostrados como VDW em cinza claro nas Figuras 12A a 12D. As Figuras 12A e 12B mostram que o epítipo definido pelos principais resíduos indicadores para scFv 10 2H1 são contínuos, mas não se sobrepõem àqueles definidos pelo Fab G6 e B20-4 (Fuh G. e colaboradores, 2006. J Biol Chem 281: 6625-6631). A Figura 12C mostra que o epítipo definido pelos principais resíduos indicadores para o scFv 2H1 é muito diferente e está estruturalmente distante daqueles definidos para o anticorpo humanizado Bevacizumab, comercialmente conhecido como Avastina. A Figura 12D mostra que o epítipo definido pelos 15 principais resíduos indicadores para scFv 2H1 não se sobrepõem estruturalmente ao epítipo definido pelo anticorpo 3.2E3.1.1 (Muller AY. e colaboradores, 1997. PNAS 94: 7192-7197).

A Figura 12E mostra a posição dos aminoácidos contínuos 20 (VDW em cinza claro) que são diferentes quando as seqüências do VEGF-A humano e de camundongo são comparadas, em relação ao epítipo definido pelos principais resíduos indicadores C102, C57, R56, T31 e L32 para scFv 2H1 (VDW em preto). Sabe-se no estado da técnica que resíduos contínuos de um determinado epítipo são críticos para sua projeção de estrutura terciária, conseqüentemente, para seu reconhecimento por anticorpos e que a 25 alteração de um único aminoácido é o bastante para determinar a especificidade de um anticorpo por uma molécula de uma determinada espécie, em relação aquela de outra espécie (Fuh G. e colaboradores, 2006. J Biol Chem 281: 6625-6631). Esses resultados podem explicar porque o fragmento scFv 30 2H1 não reconhece o VEGF-A de camundongo.

Todos esses elementos indicam que o sítio de ligação de antígeno definido pela VR que compõe o fragmento scFv 2H1 é diferente daque-

le de outros anticorpos e fragmentos de anticorpo que neutralizam o VEGF humano reportados na literatura, não apenas com relação à seqüência de aminoácido, mas também em termos do epítopo reconhecido no antígeno e, em conseqüência, em seu provável mecanismo de interferência com as funções biológicas do VEGF humano nativo.

Exemplo 10. Avaliação do efeito anti-proliferativo *in vitro* de diferentes moléculas que reconhecem o VEGF humano no modelo de células endoteliais de cordão umbilical humano estimuladas com VEGF humano

Os efeitos anti-proliferativos *in vitro* de moléculas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 e scFv₂-Fc 2H1-8.2 foram determinados em um modelo de células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HuVEC), estimuladas com VEGF humano. resumidamente, 3.000 células HuVEC (PromoCell GmbH) foram colocadas por cavidade de uma lâmina de cultura com 96 cavidades (Costar), previamente revestida com Gelatina a 1% (Sigma), em meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal a 1% (v/v) (Gibco) em crescimento a 37°C em 5% de CO₂ durante 24 h. As células foram estimuladas com meio fresco suplementado com 10 ng/mL de VEGF-A humano (Peprotech) e incubadas com diferentes concentrações das moléculas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 y scFv₂-Fc 2H1-8.2.

A Figura 13 mostra a proliferação de células HuVEC crescidas na presença de 10 ng/mL de VEGF-A humano, arbitrariamente definida como 100% (controle de proliferação sem interferência, barra de VEGF) e quando misturas das moléculas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1 4.1 e scFv₂-Fc 2H1 8.2 purificadas foram adicionadas às células em três concentrações diferentes (barra listrada: 2 µg/mL; barra sólida: 1 µg/mL e barra vazia: 0,5 µg/mL), com 10 ng/mL de VEGF-A humano (Peprotech). Como controle de inibição, a mistura de 0,5 µg/mL de receptor solúvel KDR-Fc (Sigma) foi usada. Como controle negativo, um scFv anti-HBsAg foi empregado na mistura. Após 72 horas de incubação, as células foram coradas com violeta cristal a 0,5% em metanol a 20%. As lâminas foram lavadas com água e secas ao ar. A coloração foi eluída com uma solução a 1:1 de etanol em citrato de sódio a 0,1 M e a absorbância lida em uma leitora de lâminas a 562 nm.

O valor da absorbância de proliferação basal foi subtraído dos valores de todas as lâminas e os dados foram representados como o percentual de inibição versus o controle de proliferação máximo. Conforme mostrado na Figura 13, as moléculas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1 4.1 e scFv₂-Fc 2H1 8.2 inibem a proliferação de células HuVEC de uma maneira dependente da dose, em valores entre 45 e 58%.

Exemplo 11. Avaliação do efeito anti-angiogênico *in vivo* de diferentes moléculas que reconhecem o VEGF humano no modelo de pelotas de Matrigel subcutâneas em camundongos

O efeito anti-angiogênico *in vivo* das moléculas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 e scFv₂-Fc 2H1-8.2 foi estudado no modelo experimental descrito por Passaniti e colaboradores (Passaniti A. e colaboradores, 1992. Lab Invest. 67: 519-28). Nesse modelo, a angiogênese é induzida através da inoculação subcutânea de camundongos C57Bl/6 com um extrato de proteínas da matriz extracelular (Matrigel, Becton Dickinson) na presença de fatores pró-angiogênicos. Os animais foram divididos em grupos de 10 e injetados subcutaneamente na região abdominal com 500 µL de Matrigel contendo 100 ng de VEGF humano (Peprotech) e diferentes concentrações das moléculas a ensaiar, incluindo um anticorpo não relacionado (CB-Hep.1, anti-HBsAg, Heber Biotec, Havana). Após seis dias, os animais foram sacrificados, as pelotas de Matrigel extraídas e os teores de hemoglobina de cada uma determinados através do método de Drabkin usando o kit reagente de Drabkin (Sigma) de acordo com as instruções do fabricante. As moléculas scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 e scFv₂-Fc 2H1-8.2 inibem significativamente ($p < 0,001$) a vascularização induzida pelo VEGF nas pelotas de Matrigel, isso se correlacionando com a diminuição dos teores de hemoglobina.

Exemplo 12. Avaliação do efeito anti-angiogênico *in vivo* de diferentes moléculas que reconhecem o VEGF humano no modelo experimental de camundongos nus xenotransplantados com células tumorais A431 humanas

Em virtude do fato de a angiogênese induzida pelo tumor e algumas células do estroma do tumor serem essenciais para seu crescimento

e disseminação e essa angiogênese ser principalmente em virtude do VEGF produzido por esses elementos celulares, o modelo eficaz para o ensaio de substâncias anti-angiogênicas é aquele da inibição do crescimento de tumor em animais. Em virtude do fato de o scFv 2H1 e todas as outras moléculas derivadas de sua VR identificarem o VEGF humano e não de camundongo, o modelo de crescimento de tumor em camundongos foi estabelecido com células tumorais humanas inoculadas em camundongos atímicos isogênicos (camundongos nus; nu/nu). No experimento, nós usamos 9 grupos de 5 camundongos atímicos nu/nu do gênero BALB/c (CENPALAB, Havana), com 8-10 semanas de idade. Os grupos de tratamento foram organizados para cada uma das quatro moléculas a testar (scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 e scFv₂-Fc 2H1-8.2) considerando dois níveis de dose: 25 mg/kg e 2,5 mg/kg por camundongo em PBS, pH de 7,2. O nono grupo (controle negativo) foi tratado com o veículo (PBS, pH de 7,2). Os camundongos foram injetados subcutaneamente com 5×10^6 células de tumor A431 humano (ATCC, CRL 1555) na zona dorsal direita. Quando os tumores obtiveram volumes de 200 mm^3 , os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em 9 grupos de 5 e o tratamento iniciado conforme indicado para cada grupo experimental. As administrações foram feitas intraperitonealmente, em um volume de $200 \mu\text{L}$, cada 2 dias durante 3 semanas. O controle foi inoculado com o anticorpo monoclonal de murino não relacionado CB-Hep.1 na maior dose. O acompanhamento de crescimento do tumor foi feito com medições do maior (comprimento) e menor (largura) do tumor, usando um calibrador digital. Os volumes do tumor foram calculados como: volume do tumor (mm^3) = $0,52 \times \text{comprimento (mm)} \times \text{largura}^2 \text{ (mm)}$. Os volumes do tumor ao longo do período de observação foram comparados usando o estadigráfico ANOVA de uma via e um pós-teste de Bonferroni. Após o período de tratamento estabelecido, os animais foram sacrificados e os tumores foram cirurgicamente removidos e histologicamente analisados usando Hematoxilina e Eosina.

Conforme mostrado na Figura 14, todos os animais inoculados com scFv 2H1, Fab 2H1-32, scFv₂-Fc 2H1-4.1 e scFv₂-Fc 2H1-8.2 mostra-

ram uma redução estatisticamente significativa do volume do tumor com relação ao controle negativo e uma dependência acentuada da dose. Das quatro moléculas, scFv₂-Fc 2H1 4.1 e scFv₂-Fc 2H1 8.2 proporcionaram os melhores resultados, isso sendo possivelmente relacionado aos maiores tamanhos das moléculas, que aumenta sua biodisponibilidade, mesmo se acredite que, em termos de número de sítios de ligação por unidade de massa, o scFv 2H1 tenha uma ligeira vantagem com relação a essas moléculas. As diferenças encontradas para os fragmentos Fab e scFv 2 H1 não foram estatisticamente significativas, mesmo embora a massa molecular seja quase dupla em favor do Fab. Isso poderia ser em virtude do fato de que, para anticorpos que neutralizariam moléculas solúveis, mais do que afetar diretamente as células tumorais, a penetração do tumor (supostamente melhor com um menor tamanho) não é tão crítica quanto a biodisponibilidade, isto é, favorece apenas as moléculas "do tipo IgG" como scFv₂-Fc 2H1 4.1 e scFv₂-Fc 2H1 8.2 em virtude da presença de um Fc que é compatível para a reciclagem mediada pelo FcRn (Vaccaro C. e colaboradores, 2005. Nature Biotechnol 23: 1283-1288). Para a última propriedade, os fragmentos scFv e Fab não são tão diferentes, uma vez que ambos carecem do Fc. A análise histológica mostrou que os tumores tratados tinham uma redução significativa na densidade vascular, uma redução no diâmetro dos vasos sanguíneos, um aumento na apoptose de células tumorais e uma redução nos quadros mitóticos.

Exemplo 13. Capacidade do fragmento scFv 2H1 radio-rotulado com ¹²⁵I de se alojar seletivamente na área do tumor usando camundongos nus inoculados com células A431

Para determinar a capacidade do fragmento scFv 2H1 de se alojar na área onde células A431 estavam crescendo, esse fragmento e um de controle (um antígeno de scFv na superfície anti-Hepatite B de murino; scFv-Hep.1) foram rotulados com ¹²⁵I (Amersham, Reino Unido) usando o procedimento Iodogen (Fraker PJ, Speck JC Jr. 1978. Biochem Biophys Res Comm 80: 849-857) para atividades específicas finais de 1,3 MBq/5 µg e 1,28 MBq/5 µg, respectivamente.

Os produtos radio-rotulados foram analisados em cromatografia em camada fina para detectar a incorporação na proteína, reportando valores de 93 e 95% de radioatividade, respectivamente. A capacidade dos produtos radio-rotulados de detectar seus antígenos correspondentes (VEGF humano e HBsAg) foi estudada em um sistema onde imuntubos de poliestireno foram revestidos com a isoforma 121 de VEGF recombinante humano (5 µg/mL; Peprotech) ou HBsAg recombinante (5 µg/mL; Heber Biotec, Havana), que foram então bloqueados e colocados em contato com amostras dos fragmentos radio-rotulados da especificidade correspondente, ajustada para as quantidades que poderiam ser teoricamente capturadas pela fase sólida. Após incubações e lavagens, nós determinamos que a fase sólida foi capaz de ligação de 84 e 82% de radioatividade para scFv 2H1 e scFv-Hep.1, respectivamente, mostrando que o procedimento de radio-rotulação não altera de modo importante a atividade biológica dos fragmentos.

Para estudar a biodistribuição, nós usamos 20 camundongos nu/nu. Os animais foram inoculados subcutaneamente com 5×10^6 células de tumor humano da linhagem de cultura A431 na zona dorsal direita. Quando os tumores obtiveram volumes em torno de 300 mm^3 , os animais foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos de 5 animais e o tratamento iniciado. Os camundongos foram injetados através da veia caudal com o produto radio-rotulado (10 com scFv 2H1 e 10 com scFv Hep.1) e sacrificados em grupos de cinco para cada produto após 24 e 48 h. Amostras de tumor, baço, fígado, rim, intestino, músculo, medula óssea e sangue foram removidas através de cirurgia ou amostragem. O acúmulo de radioatividade foi expresso como percentual da dose injetada por grama de tecido. Calibração foi feita usando uma amostra padrão da dose injetada. A radioatividade foi medida usando um contador de cintilação gama.

A Figura 15 mostra o percentual de radioatividade recuperada por tecido estudado, em diferentes momentos, com relação à radioatividade injetada total. Junto com os resultados resumidos na Tabela 9 para o caso específico da proporção de radioatividade no tumor:sangue, o experimento mostrou que de 24 a 48 horas após injeção, o fragmento scFv 2H1 se locali-

za preferencialmente no tecido tumoral, diferente do scFv Hep.1 não específico.

Tabela 9. Proporção de radioatividade no tumor:sangue para camundongos nus transplantados com células de tumor humano A431 que expressam

5 VEGF humano

Molécula	24 h	48 h
scFv 2H1	33,3	30,0
scFv-Hep.1	0,4	1,0

Esses resultados sugerem que o fragmento scFv 2H1 pode se localizar especificamente em zonas anatômicas onde há uma alta concentração local de VEGF humano, como em um tumor A431 e acredita-se que seja útil para a distribuição específica de diferentes produtos terapêuticos a essa zona, tal como um isótopo radioativo ou, eventualmente, uma toxina ou um fármaco. Os valores correspondem a 24 e 48 h após injeção de diferentes moléculas radio-rotuladas com ^{125}I aos animais. Cada proporção foi calculado começando a partir dos valores médios derivados de tecidos recuperados de 5 camundongos.

15 Exemplo 14. Prevenção de neovascularização coroidal experimental (CNV) em primatas não-humanos usando o fragmento scFv 2H1 e a molécula bivalente scFv₂-Fc 2H1-4.1.

Como um modelo para neovascularização coroidal experimental (CNV), nós empregamos aquele reportado por Krzystolik e colaboradores (Krzystolik M.G. e colaboradores, 2006. Acta Ophthalmol, 120: 338-346). Seis macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*, CENPALAB, Havana) foram mantidos e manipulados de acordo com as diretrizes Good Laboratory Animal Practice da instituição. Os animais foram anestesiados para todos os procedimentos com injeções intramusculares de hidroclorato de cetamina, maleato de acepromazina e sulfato de atropina. Anestesia tópica com hidroclorato de proparacaína também foi usada. Anestesia antes de enucleação e eutanásia foi feita com pentobarbital sódico intravenoso. As membranas de CNV foram induzidas na maculo usando queimas a laser de argônio, assegurando que o procedimento produzia uma bolha e uma pequena hemorra-

gia, com um ponto de aplicação entre 50 e 100 μm . Fotografia e angiografia fluorescente foram usadas para detectar e medir a extensão e características das lesões. Os olhos dos animais foram verificados em diferentes dias, antes e após aplicação do fragmento e placebo e do procedimento de quei-
5 ma a laser, bem como no final do experimento, que terminou com enucleação e sacrifício do animal.

Os animais foram divididos em dois grupos de 3, de acordo com a molécula a ser estudada: o fragmento de anticorpo scFv 2H1 ou a molécula bivalente do tipo imunoglobulina scFv₂-Fc 2H1-4.1. O olho direito de cada
10 animal recebeu 500 μg de scFv 2H1 ou scFv₂-Fc 2H1-4.1, de acordo com o grupo, em 50 μL de PBS através de injeção intravítrea, enquanto que o olho esquerdo foi injetado apenas com o veículo. Os olhos receberam 2 injeções antes de tratamento a laser (dias 0 e 14). No dia 21, todos os olhos receberam o tratamento a laser para a indução de CNV. A injeção foi repetida em
15 cada olho no dia 2 com o produto específico ou veículo. Três semanas após indução a laser (dia 42), os animais receberam injeções intravítreas, esse tempo todo com o fragmento scFv 2H1 das molécula scFv₂-Fc 2H1-4.1, de acordo com o grupo, para terminar com uma injeção similar final no dia 56.

Na fase I de tratamento (antes do dia 42), os estudos mostraram
20 uma redução no início de lesões do grau 4 nos olhos onde scFv 2H1 ou scFv₂-Fc 2H1-4.1 foram administrados, em comparação com os respectivos olhos de controle, todos os quais sugerem que a molécula ajuda na prevenção de CNV. Na segunda fase de tratamento, quando todos os olhos receberam scFv 2H1 ou scFv₂-Fc 2H1-4.1, nós detectamos uma redução nas le-
25 sões de grau 4, o que sugere que o fragmento e a molécula bivalente também são benéficos para lesões estabelecidas.

Exemplo 15. Expressão de moléculas diméricas que compreendem duas unidades do fragmento scFv fundidas ao Fc de uma IgG1 humana em plantas de tabaco transgênicas

30 PCR em condições conforme descrito para o Exemplo 8 foi usada para amplificar o gene que codifica scFv₂-Fc 2H1-4.1 e modificar as extremidades com a adição de sítios de restrição apropriados (NcoI e XbaI)

para clonar em vetores de células de planta. Os oligonucleotídeos sintéticos básicos usados em PCR foram criados sobre as seqüências reportadas em SEQ ID No. 13. O fragmento de DNA amplificado foi detectado como uma banda principal de aproximadamente 1,4 kb e purificada sobre um gel de agarose a 1% (Sigma) usando um kit de Extração de Gel QIAquick (QIAGEN, GmbH). O DNA foi digerido com as enzimas antes mencionadas e clonado no vetor pHES74 (López A. e colaboradores, 1996. *Biotecnología Aplicada* 13: 265-270) na forma de uma construção scFv-dobradiça-CH2-CH3, precedida da seqüência sinalizadora para a esporamina de batata doce. Esse vetor tem o promotor 35S de CaMV, uma região líder do vírus mosaico de tabaco Omega que atua como um intensificador traducional da quantidade da proteína produzida e um terminador de sintase de nopalina que também promove a alta expressão de genes estranhos em plantas transgênicas. O "cassete" de expressão de gene de promotor-scFv-Fc-terminator foi introduzido no vetor binário pDE1001 para produzir o plasmídeo final pDEscFv-Fc.70. Os detalhes para as construções usadas nesse exemplo são similares àqueles reportados anteriormente (Ramírez, N. e colaboradores, 2002. *Transgenic Res.* 11: 61-64).

O plasmídeo final pDEscFv-Fc.70 foi usado para transformar células SR1 de *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana através de transferência de gene mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. As plantas F0 e F1 foram obtidas através de procedimentos convencionais previamente descritos e a expressão das moléculas scFv-Fc ativas foi detectada usando um ensaio ELISA similar àquele descrito no Exemplo 8.

As moléculas de scFv-Fc biologicamente ativas são preparadas na forma de proteínas de planta solúveis totais (TSP), extraídas através de trituração de 0,4 g de folhas de planta de tabaco transformadas ou controles não transformados em nitrogênio líquido até um pó fino ser obtido, conforme descrito em alguma parte. O pó é transferido para um tubo de reação e misturado a 1:2 (peso/v) com tampão de extração (Tris-HCl a 61 mM, pH de 6,9; SDS a 2%; glicerol a 12,5%) e incubado em gelo durante 5 min. O material insolúvel é removido através de centrifugação a 13.000 rpm e a fração solú-

vel ensaiada em ELISA em diferentes diluições usando anticorpos anti-Fc humano conjugados à fosfatase alcalina (Sigma) para detectar a expressão. Nós detectamos que a TSP proveniente de plantas transgênicas continha moléculas capazes de reconhecer o VEGF humano revestido sobre uma superfície sólida, que nós não identificamos pela TSP originária das plantas de controle.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
 <120> Anticorpos Recombinantes Contra o Fator de Crescimento Endoteli-
 al Vascular (VEGF)
5 <130> anti-angio CIGB
 <140>
 <141>
 <150> CU 2006- 0208
 <151> 2006-11-01
10 <160> 15
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 36
 <212> ADN
15 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de sequência Artificial: OLIGONUCLEOTÍDEO SINTÉTICO
 <400> 1
 gatctgctag ccgcacccat ggcagaagga ggaggg 36
20 <210> 2
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial
 <220>
25 <223> Descrição de sequência Artificial: OLIGONUCLEOTÍDEO SINTÉTICO
 <400> 2
 ggggatccc cgcctcggct tgtcac 26
 <210> 3
 <211> 558
30 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

atggcttttag ttgaattgaa agtgcccgcac attggcggac acgaaaatgt agatattatc 60
 gcggttgaag taaacgtggg cgacactatt gctgtggacg ataccctgat tactttggat 120
 ctagatcacg atgacgatga cgataaagct tcagatctgc tagccgcacc catggcagaa 180
 ggaggagggc agaatcatca cgaagtgtg aagttcatgg atgtctatca gcgagctac 240
5 tgccatcaa tcgagaccct ggtggacatc ttccaggagt accctgatga gatcgagtac 300
 atcttcaagc catcctgtgt gccctgatg cgatgcgggg gctgctgcaa tgacgagggc 360
 ctggagtgtg tgcccactga ggagtccaac atcacatgc agattatgga gatcgaacct 420
 gagcaaggcc agcacatagg agagatgagc ttcctacagc acaacaaatg tgaatgcaga 480
 ccaaagaaag atagagcaag acaagaaaaa tgtgacaagc cgaggcgggg atcccgggca 540
10 caccatcacc atcaccat 558
 <210> 4
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial
15 <220>
 <223> Descrição de sequência Artificial: OLIGONUCLEOTÍDEO SINTÉTICO
 <400> 4
 ctattctccc atggcacag 19
 <210> 5
20 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de sequência Artificial: OLIGONUCLEOTÍDEO SINTÉTICO
25 <400> 5
 ttctgtatga ggttttgc 18
 <210> 6
 <211> 804
 <212> ADN
30 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de sequência Artificial: FRAGMENTO DE ANTICORPO RECOM-

BINANTE

<400> 6

cagcaggtcc agctggtgca gtctggagca gaggtgaaaa agccggggga gtctctgaag 60
atctcctgta agggttcttg atacagcttt accagctact ggatcggctg ggtgcgtcag 120
5 atgcccggga aaggcctgga gtggatgggg atcatctatc ctggtgactc tgataccaga 180
tacagcccgt ccttccaagg ccaggtcacc atctcagccg acaagtccat cagcaccgcc 240
tacctgcagt ggagcagcct gaaggcctcg gacaccgcca tgtattactg tgcgagactc 300
gtggttaggg atacagaaat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ttcggcccct 360
caggccaaat cctcaggatc aggctccgaa tccaaagtcg accaggctgt ggtgactcag 420
10 gagccctcac tgactgtgtc cccaggaggg acagtcactc tcacctgtgc ttccagcatt 480
ggagcagtca ccagtggtaa ctatccaaac tggttccagc agagacctgg acagccacc 540
agggcactga tttatagtac aagcaacaaa cactcctgga cccctgcccc gttctcaggc 600
tccctccttg ggggcaaagc tgcctgacc ctttcgggtg cgcagcctga ggatgaggct 660
gagtattact gcttctctc ctatagtggg gctcggccgg tgttcggcgg agggaccaag 720
15 ctgaccgtcc taggtgcggc cgctggatcc gaacaaaagc tgatctcaga agaagacct 780
aactcacatc accatcacca tcac 804

<210> 7

<211> 354

<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<400> 7

cagcaggtcc agctggtgca gtctggagca gaggtgaaaa agccggggga gtctctgaag 60
atctcctgta agggttcttg atacagcttt accagctact ggatcggctg ggtgcgtcag 120
atgcccggga aaggcctgga gtggatgggg atcatctatc ctggtgactc tgataccaga 180
25 tacagcccgt ccttccaagg ccaggtcacc atctcagccg acaagtccat cagcaccgcc 240
tacctgcagt ggagcagcct gaaggcctcg gacaccgcca tgtattactg tgcgagactc 300
gtggttaggg atacagaaat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ttcg 354

<210> 8

<211> 333

30 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 8

caggctgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggagggac agtcactctc 60
 acctgtgctt ccagcattgg agcagtcacc agtggtaact atccaaactg gttccagcag 120
 agacctggac agccaccag ggcactgatt tatagtacaa gcaacaaaca ctctggacc 180
 cctgcccggg tctcaggctc cctccttggg ggcaaagctg ccctgaccct ttcgggtgcg 240
5 cagcctgagg atgaggctga gtattactgc ttgctctcct atagtgggtgc tcggccgggtg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggt 333
 <210> 9
 <211> 657
 <212> ADN
10 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de sequência Artificial: CADEIA LEVE DE FRAGMENTO FAB
 RECOMBINANTE
 <400> 9
15 caggctgtgg tgactcagga gccctcactg actgtgtccc caggagggac agtcactctc 60
 acctgtgctt ccagcattgg agcagtcacc agtggtaact atccaaactg gttccagcag 120
 agacctggac agccaccag ggcactgatt tatagtacaa gcaacaaaca ctctggacc 180
 cctgcccggg tctcaggctc cctccttggg ggcaaagctg ccctgaccct ttcgggtgcg 240
 cagcctgagg atgaggctga gtattactgc ttgctctcct atagtgggtgc tcggccgggtg 300
20 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtgtcctag gtcagcccaa ggctgcccc 360
 tcggtcactc tgttcccacc ctctctgag gagcttcaag ccaacaaggc cactggtg 420
 tgtctcataa gtgacttota cccgggagcc gtgacagtgg cctggaaggc agatagcagc 480
 cccgtcaagg cgggagtgga gaccaccaca ccctccaaac aaagcaaca caagtacgcg 540
 gccagcagct acctgagcct gacgcctgag cagtggaagt ccacaaaag ctacagctgc 600
25 caggtcacgc atgaaggag caccgtggag aagacagtgg ccctacaga atgttca 657
 <210> 10
 <211> 732
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial
30 <220>
 <223> Descrição de sequência Artificial: CADEIA PESADA DE FRAGMENTO
 FAB RECOMBINANTE

<400> 10
 cagcaggtcc agctggtgca gtctggagca gaggtgaaaa agccggggga gtctctgaag 60
 atctcctgta agggttctgg atacagcttt accagctact ggatcggctg ggtgcgtcag 120
 atgcccggga aaggcctgga gtggatgggg atcatctatc ctggtgactc tgataccaga 180
5 tacagcccgt ccttccaagg ccaggtcacc atctcagccg acaagtccat cagcaccgcc 240
 tacctgcagt ggagcagcct gaaggcctcg gacaccgcca tgtattactg tgcgagactc 300
 gtggttaggg atacagaaat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc aagcgcctcc 360
 accaagggcc catcgggtctt cccctgga ccctctcca agagcacctc tgggggcaca 420
 gcgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
10 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtccacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtagt gaccgtgcc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagtga gcccaaatct 660
 tgtgcgccg cacatcacca tcaccatcac ggggccgag aacaaaaact catctcagaa 720
 gaggatctga at 732

15 <210> 11
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial
 <220>

20 <223> Descrição de sequência Artificial: OLIGONUCLEOTÍDEO SINTÉTICO
 <400> 11
 acagggctta aggagtgca gctggtgcag tctgg 35
 <210> 12
 <211> 36

25 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial
 <220>

<223> Descrição de sequência Artificial: OLIGONUCLEOTÍDEO SINTÉTICO
 <400> 12

30 tgtttgttcta gaacctagga cggtgacctt ggcccc 36
 <210> 13
 <211> 1467

<212> ADN
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de sequência Artificial: ANTICORPO RECOMBINANTE
5 <400> 13
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc cgggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
10 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactcgtg 300
 gttagggata cagaaatctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcttc ggcccctcag 360
 gccaaatcct caggatcagg ctccgaatcc aaagtcgacc aggctgtggt gactcaggag 420
 ccctcactga ctgtgtcccc aggagggaca gtcactctca cctgtgcttc cagcactgga 480
 gcagtcacca gtggtaacta tccaaactgg ttccagcaga gacctggaca gccaccagg 540
15 gcactgattt atagtacaag caacaaacac tcttggacct ctgcccgggt ctcaggctcc 600
 ctccttgggg gcaaagctgc cctgaccctt tcgggtgcgc agcctgagga tgaggctgag 660
 tattactgct tgctctccta tagtggtgct cggccgggtg tcggcggagg gaccaaggct 720
 accgtcctag gttctagagg cggaggtgga tcgggcggag gtggatcggc agagcccaaa 780
 tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 840
20 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 900
 gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 960
 gtggacggcg tgaaggtgca taatgccaaag acaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1020
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacgctc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1080
 tacaagtgca aggtctocaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1140
25 gccaaagggc agccccgaga accacagtg taccacctgc ccccatcccg ggatgagctg 1200
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1260
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccagcc tcccgtgctg 1320
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1380
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggetc tgcacaacca ctacacgcag 1440
30 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1467
 <210> 14
 <211> 1467

<212> ADN
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de sequência Artificial: ANTICORPO RECOMBINANTE
5 <400> 14
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc cgggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgtcagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
10 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactcgtg 300
 gttagggata cagaaatctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcttc ggcccctcag 360
 gccaaatcct caggatcagg ctccgaatcc aaagtcgacc aggctgtggt gactcaggag 420
 ccctcactga ctgtgtcccc aggagggaca gtcactctca cctgtgcttc cagcattgga 480
 gcagtcacca gtgtaacta tccaaactgg ttccagcaga gacctggaca gccaccagg 540
15 gcactgattt atagtacaag caacaaacac tcttggaacc ctgcccgggt ctcaggctcc 600
 ctccttgggg gcaaagctgc cctgaccctt tcgggtgctc agcctgagga tgaggctgag 660
 tattactgct tgctctccta tagtggtgct cggccggtgt tcggcggagg gaccaagctg 720
 accgtcctag gttctagagg cggaggtgga tcgggcggag gtggatcggc agagcccaaa 780
 tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 840
20 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 900
 gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 960
 gtggacggcg tgaagtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1020
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1080
 tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1140
25 gccaaagggc agccccgaga accacagtg taccacctgc ccccatcccg ggatgagctg 1200
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1260
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccagcc tcccgtgctg 1320
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1380
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1440
30 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1467
 <210> 15
 <211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de sequência Artificial: PEPTÍDEO SINTÉTICO

5 <400> 15

Cys Cys Arg Thr Leu Met Leu Leu Gln Tyr His Arg

1

5

10

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpos recombinantes que interferem com o efeito pró-angiogênico do VEGF-A humano e que são caracterizados pelo fato de que eles compreendem regiões variáveis de imunoglobulina humana codificadas pelas seqüências de nucleotídeo SEQ ID No. 7 e SEQ ID No. 8 ou seqüências homólogas e reconhecem um epítopo no VEGF-A humano definido pelos resíduos antigênicos C102, C57, R56, T31 e L32.

2. Anticorpo recombinante de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que as seqüências SEQ ID No. 7 e SEQ ID No. 8 ou seqüências homólogas estão compreendidas dentro da seqüência que codifica um fragmento de anticorpo Fv com uma única cadeia (scFv) onde as regiões variáveis de cadeias pesada e leve originárias de anticorpo humano são separadas por um segmento ligante.

3. Anticorpo recombinante de acordo com a reivindicação 2 onde a seqüência de codificação de scFv é SEQ ID No. 6.

4. Anticorpo recombinante de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que as seqüências SEQ ID No. 7 e SEQ ID No. 8 ou seqüências homólogas estão compreendidas dentro da seqüência que codifica um fragmento de anticorpo do tipo Fab, com domínios constantes de uma imunoglobulina IgG humana de consenso.

5. Anticorpo recombinante de acordo com a reivindicação 4 caracterizado pelo fato de que as seqüências de codificação para o fragmento do tipo Fab são SEQ ID No. 9 e SEQ ID No. 10.

6. Anticorpo recombinante de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que as seqüências SEQ ID No. 7 e SEQ ID No. 8 ou seqüências homólogas estão compreendidas dentro da seqüência que codifica uma cadeia polipeptídica constituída por um fragmento scFv ligado, através de um espaçador, aos domínios constantes de dobradiça, CH2 e CH3 de imunoglobulina humana, pelo fato de que sua forma de proteína se associa covalentemente à outra cadeia polipeptídica idêntica para formar uma molécula dimérica.

7. Anticorpo recombinante de acordo com a reivindicação 6 ca-

racterizado pelo fato de que os domínios constantes de imunoglobulina humana são dos tipos IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4.

5 8. Anticorpo recombinante de acordo com as reivindicações 6 e 7 caracterizado pelo fato de que as seqüências que codificam a cadeia polipeptídica, constituídas por um fragmento scFv ligado através de um espaçador aos domínios constantes de dobradiça, CH2 e CH3, são SEQ ID No. 13 ou SEQ ID No. 14.

10 9. Anticorpo recombinante de acordo com as reivindicações 1 a 8 caracterizado pelo fato de que ele contém, adicionalmente, um isótopo radioativo ou um agente químico ou biológico que possui potencial anti-tumor ou anti-angiogênico.

10. Anticorpo recombinante de acordo com as reivindicações 1 a 8 caracterizado pelo fato de que ele contém, adicionalmente, um isótopo radioativo que confere potencial para diagnóstico de tumor *in vivo*.

15 11. Anticorpo recombinante de acordo com as reivindicações 1 a 8 caracterizado pelo fato de que ele é produzido por bactérias ou levedos recombinantes ou em células de mamífero ou outros sistemas eucariotas.

20 12. Vetores que codificam anticorpos recombinantes de acordo com as reivindicações 1 a 8 obtidos através de manipulação genética via DNA recombinante, esses vetores sendo plasmídeos ou seqüências capazes de integração em células hospedeiras.

13. Composição farmacêutica que compreende o anticorpo recombinante de acordo com as reivindicações 1 a 9.

25 14. Uso dos anticorpos recombinantes de acordo com as reivindicações 1 a 9 para a fabricação de um medicamento para o tratamento de entidades que desenvolvem um aumento na angiogênese, tais como entidades oculares, processos neoplásicos, processos inflamatórios agudos e crônicos e processos autoimunes, através de imunoterapia passiva.

30 15. Uso dos anticorpos recombinantes de acordo com as reivindicações 1 a 9 para a fabricação de um medicamento para o tratamento de tumores malignos e metástases através de imunoterapia passiva.

16. Uso dos anticorpos recombinantes de acordo com as reivin-

dicações 1 a 9 para a fabricação de um medicamento para o tratamento de degeneração macular relacionada à idade através de imunoterapia passiva.

17. Uso do anticorpo recombinante de acordo com a reivindicação 10 para a fabricação de um produto radio-farmacêutico para o diagnóstico *in vivo* de tumores malignos e suas metástases empregando técnicas de formação de imagem.

Fig. 1

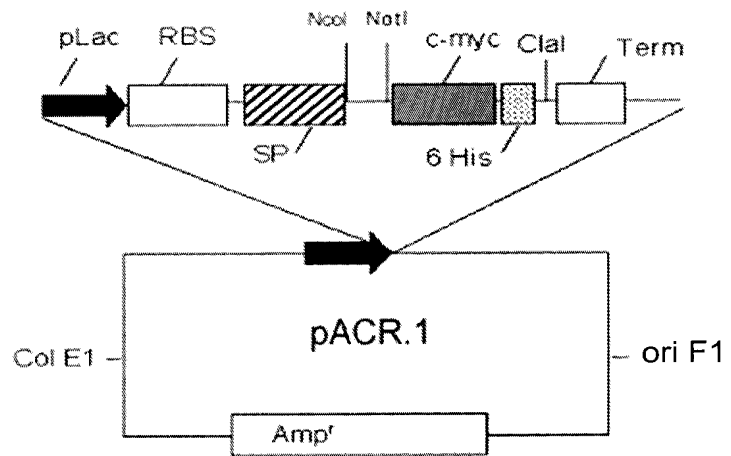


Fig. 2**Região variável de cadeia pesada**

CAGCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCGGGGGAGTCTCTGA
 AGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGT
 CAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCTGATAC
CAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCA
 CCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGC
 GAGACTCGTGGTTAGGGATACAGAAATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTT
 CG

Ligante

GCCCCTCAGGCCAAATCCTCAGGATCAGGCTCCGAATCCAAAGTCGAC

Região variável de cadeia leve

CAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCCCAGGAGGGACAGTCACTC
 TCACCTGTGCTTCCAGCATTGGAGCAGTCACCAGTGGTAACTATCCAAACTGGTTCCAG
 CAGAGACCTGGACAGCCACCCAGGGCACTGATTTATAGTACAAGCAACAAACACTCCTG
 GACCCCTGCCCGTTCTCAGGCTCCCTCCTTGGGGGCAAAGCTGCCCTGACCCTTTTCG
 GGTGCGCAGCCTGAGGATGAGGCTGAGTATTACTGCTTGCTCTCCTATAGTGGTGCTCG
GCCGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

Sítio de clonagem-união c-myc-união-histidinas

GCGGCCGCTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACATCACCA
 TCACCATCAC

Fig. 3

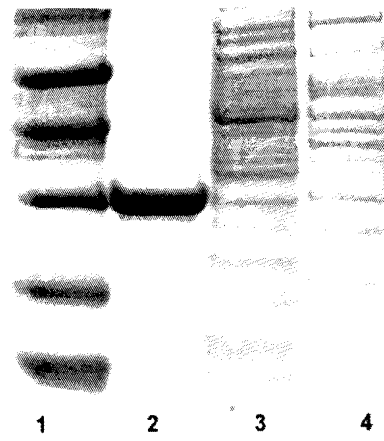


Fig. 4

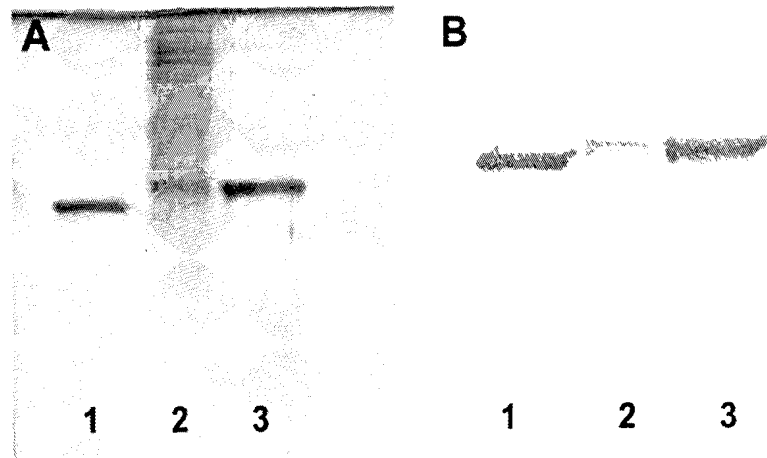


Fig. 5

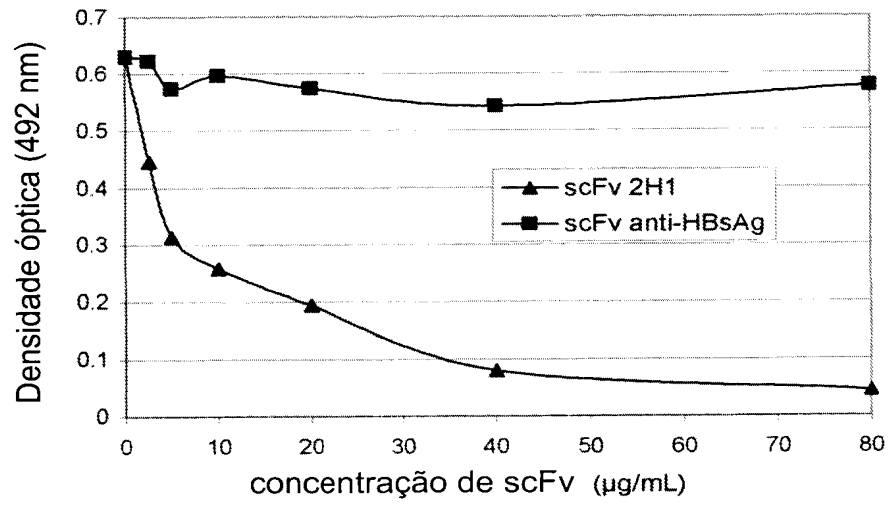


Fig. 6

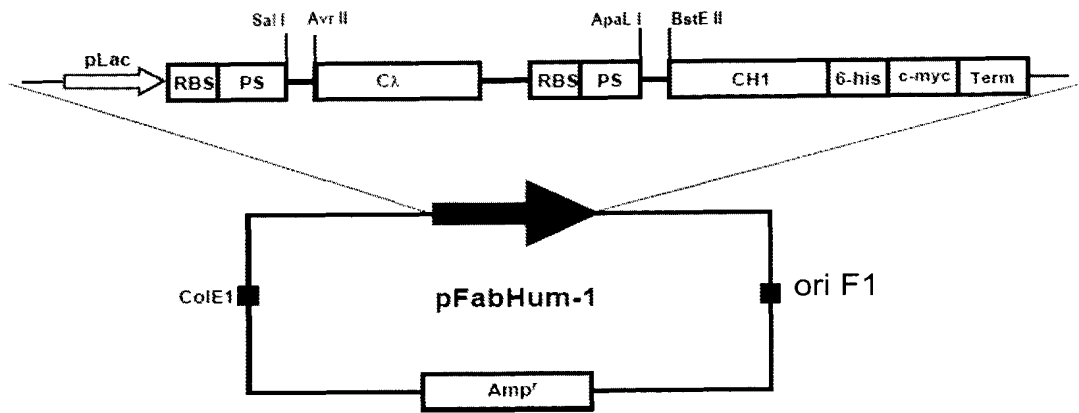


Fig. 7

A

Região variável de cadeia leve e domínio C λ

GTCGACCAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCCCAGGAGGGACAG
 TCACTCTCACCTGTGCTTCCAGCATTGGAGCAGTCACCAGTGGTAACTATCCAAACTGGT
 TCCAGCAGAGACCTGGACAGCCACCCAGGGCACTGATTTATAGTACAAGCAACAAACAC
TCCTGGACCCCTGCCCGGTTCTCAGGCTCCCTCCTTGGGGGCAAAGCTGCCCTGACCC
 TTTTCGGGTGCGCAGCCTGAGGATGAGGCTGAGTATTACTGCTTGCTCTCCTATAGTGGT
GCTCGGCCGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTGTCCTAGGTGAGC
 CCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCACCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAAC
 AAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTG
 GAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGAGACCACCACACCCTCCAAACAA
 AGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGT
 CCCACAAAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGT
 GGCCCTACAGAATGTTCA

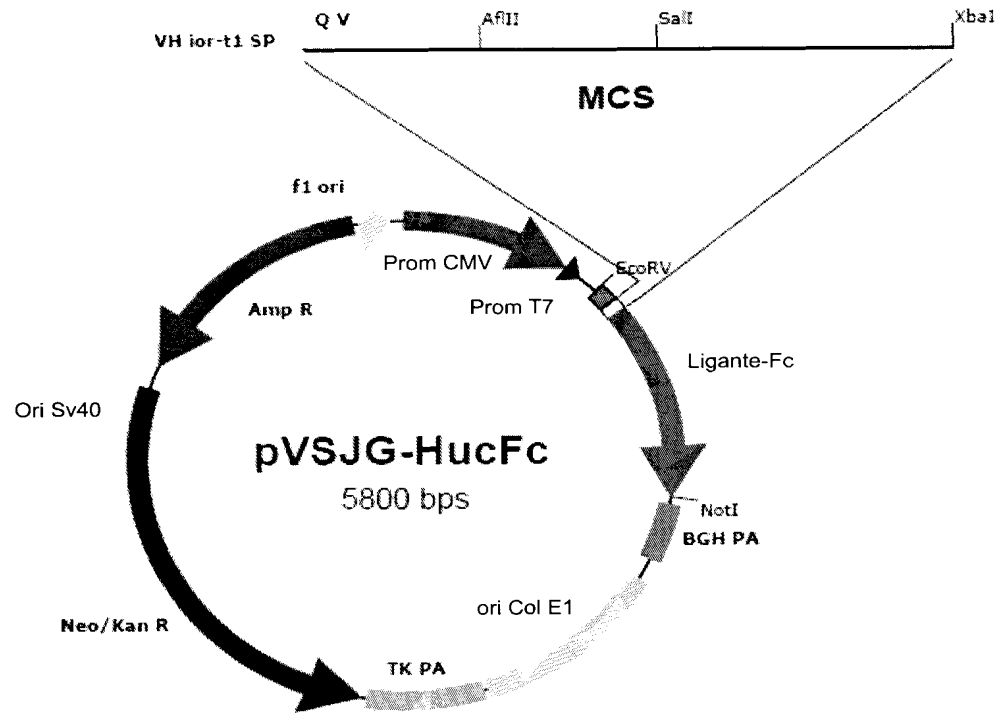
B

Região variável de cadeia pesada, domínio CH1, união, histidinas, união e c-myc

CAGCAGGTCCAGCTGGTGAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCGGGGGAGTCTCTGA
 AGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGT
 CAGATGCCCGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCTGATAC
CAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCA
 CCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGC
 GAGACTCGTGGTTAGGGATACAGAAATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCAA
 GCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTC
 TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG
 GTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTCCACACCTTCCCGGCTGTCCTAC
 AGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC
 ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA
 AGTTGAGCCCAAATCTTGTGCGGCCGCACATCACCATCACCATCACGGGGCCGCAGAAC
 AAAAATCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT

Fig. 8

A



B

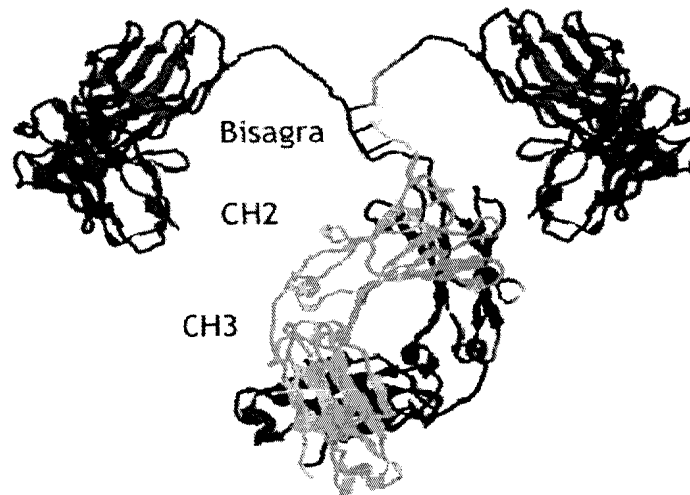


Fig. 9

Região variável de cadeia pesada

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCGGGGGAGTCTC
 TGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCT
 GGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCT
GGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCA
 GCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTC
 GGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACTCGTGGTTAGGGATACAGAAATCTG
 GGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCG

Ligante

GCCCCTCAGGCCAAATCCTCAGGATCAGGCTCCGAATCCAAAGTCGAC

Região variável de cadeia leve

CAGGCTGTGGTGA CT CAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCCCAGGAGGGACAGT
 CACTCTCACCTGTGCTTCCAGCACTGGAGCAGTCACCAGTGGTAACTATCCAAA
CTGGTTCCAGCAGAGACCTGGACAGCCACCCAGGGCACTGATTTATAGTACAA
GCAACAAACTCCTGGACCCCTGCCCGTTCTCAGGCTCCCTCCTTGGGGGC
 AAAGCTGCCCTGACCCTTTCGGGTGCGCAGCCTGAGGATGAGGCTGAGTATTA
 CTGCTTGCTCTCCTATAGTGGTGCTCGGCCGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGG
 TCACCGTCCTAGGT

Espaçador

TCTAGAGGCGGAGGTGGATCGGGCGGAGGTGGATCG

Dobradiça-CH2-CH3

GCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCT
 GAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACAC
 CCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
 ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT
 CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT
 GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG
 CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAT
 GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
 CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC
 AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAA
 GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
 TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
 CGGGTAAA

Fig. 10**Região variável de cadeia pesada**

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCGGGGGAGTCTC
 TGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCT
 GGGTGCCTCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCT
GGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCA
 GCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTC
 GGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACTCGTGGTTAGGGATACAGAAATCTG
 GGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCG

Ligante

GCCCCTCAGGCCAAATCCTCAGGATCAGGCTCCGAATCCAAAGTCGAC

Região variável de cadeia leve

CAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCCTCACTGACTGTGTCCCCAGGAGGGACAGT
 CACTCTCACCTGTGCTTCCAGCATTGGAGCAGTCACCAGTGGTAACTATCCAAA
CTGGTTCCAGCAGAGACCTGGACAGCCACCCAGGGCACTGATTTATAGTACAA
GCAACAAACTCCTGGACCCCTGCCCGTTCTCAGGCTCCCTCCTTGGGGGC
 AAAGCTGCCCTGACCCTTTCGGGTGCGCAGCCTGAGGATGAGGCTGAGTATTA
 CTGCTTGCTCTCCTATAGTGGTGCTCGGCCGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGC
 TGACCGTCCTAGGT

Espaçador

TCTAGAGGCGGAGGTGGATCGGGCGGAGGTGGATCG

Dobradiça-CH2-CH3

GCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCT
 GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGACAC
 CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
 ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT
 CAGCGTCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT
 GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAG
 CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAT
 GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
 CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC
 AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAA
 GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
 TGATGCATGAGGCTCTGCACACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
 CGGGTAAA

Fig. 11

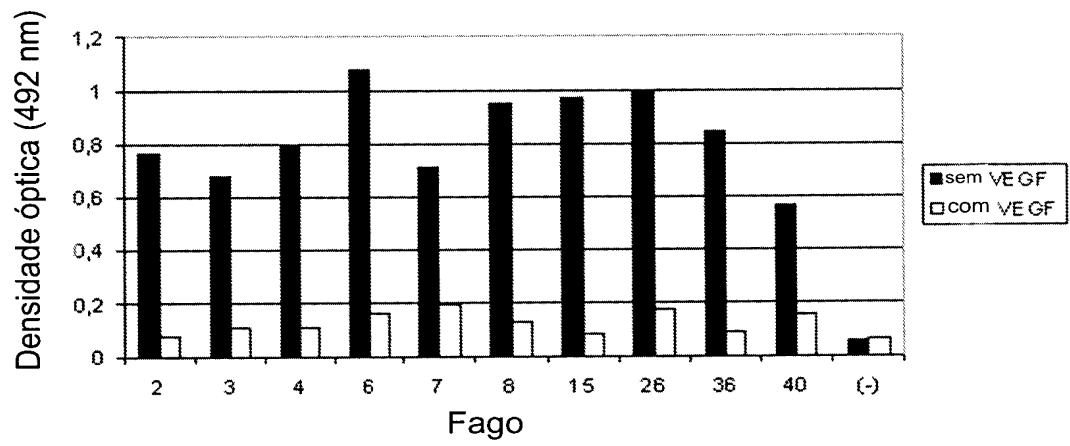
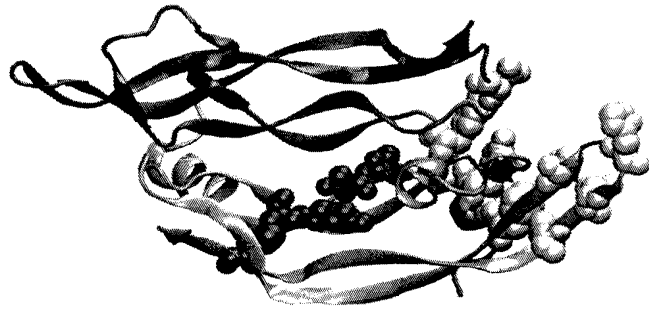


Fig. 12

A



B

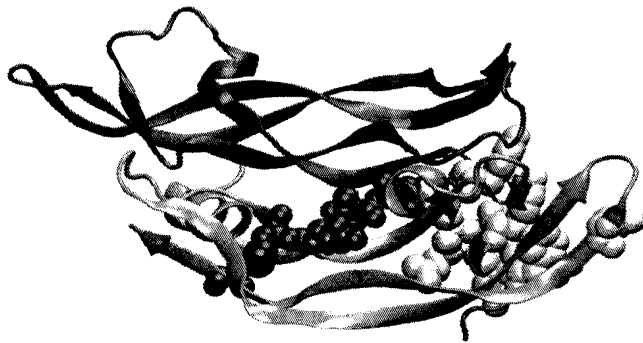
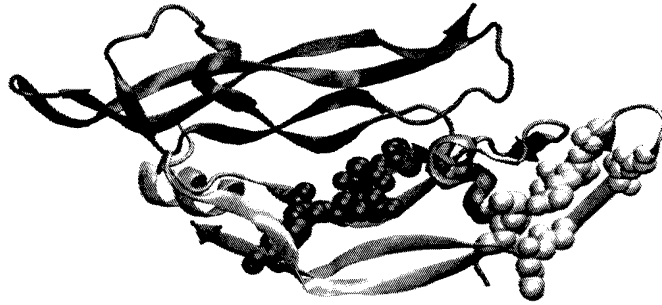


Fig. 12

C



D



E

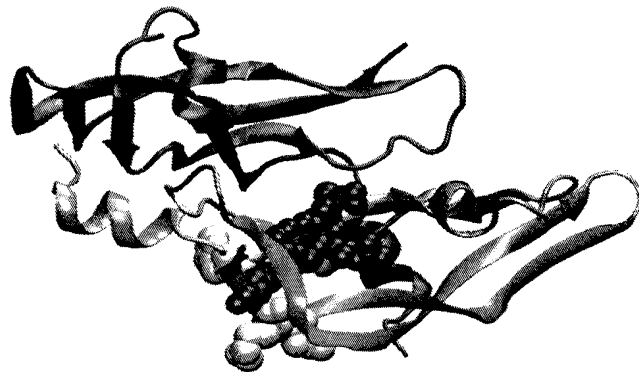


Fig. 13

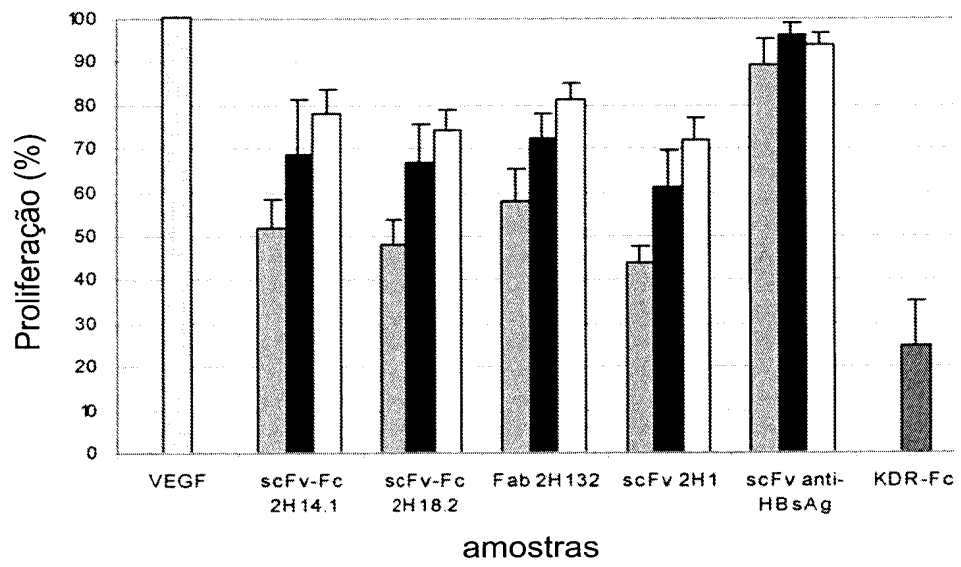
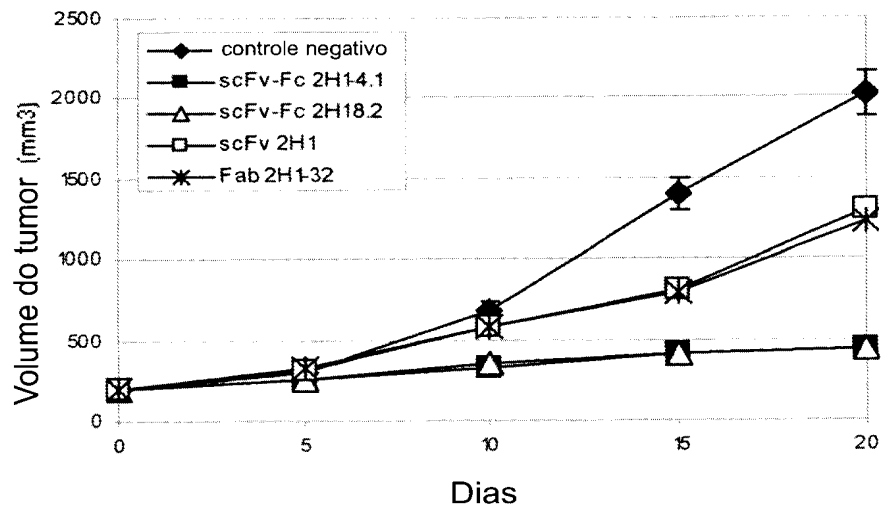


Fig. 14

A



B

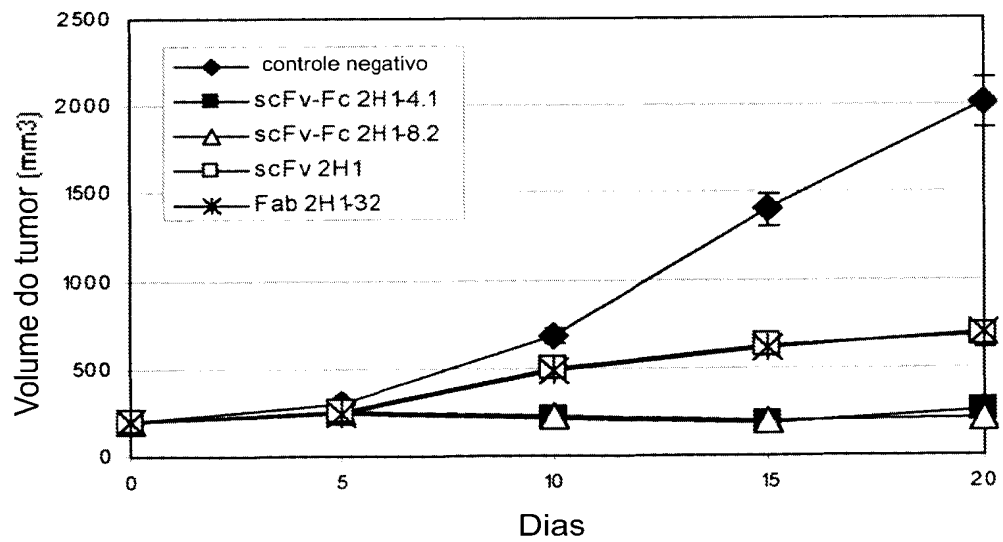
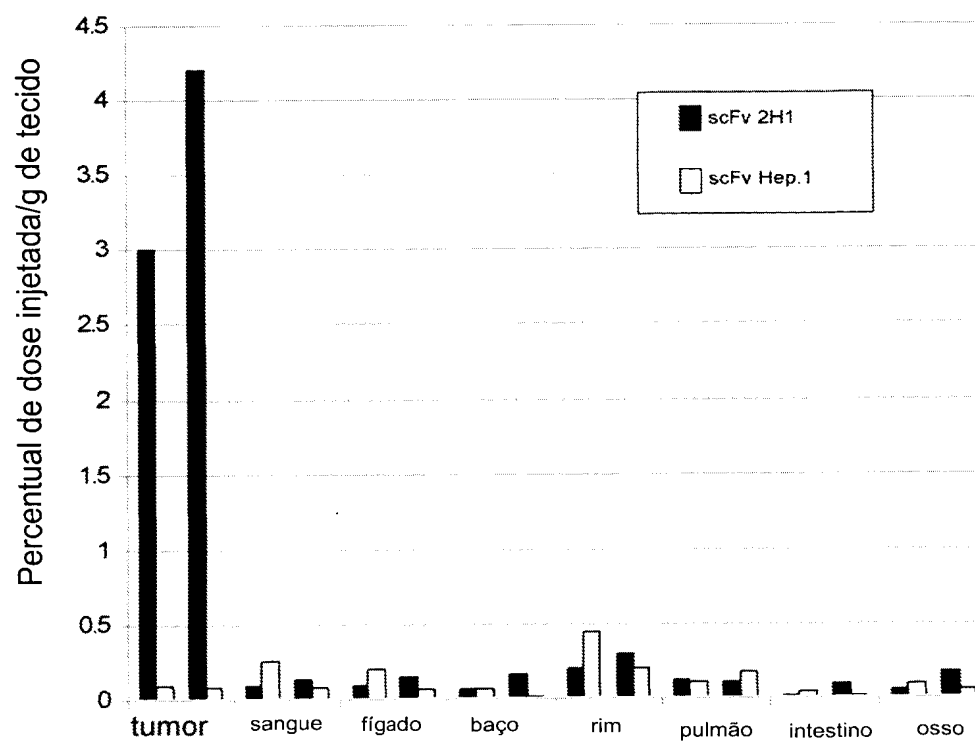


Fig. 15



RESUMO

Patente de Invenção: "**ANTICORPOS RECOMBINANTES CONTRA O FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)**".

5 A presente invenção lida com moléculas polipeptídicas recombinantes relacionadas a anticorpo que reconhecem especificamente o Fator A de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF-A) humano e interferem com seus efeitos estimulatórios *in vitro* e atividade pró-angiogênica *in vivo*. Essas moléculas polipeptídicas recombinantes afetam a proliferação de células endoteliais humanas *in vitro*, angiogênese subcutânea em camundongos induzida por pelotas de Matrigel que contêm VEGF-A e o crescimento de tumores humanos transplantados em camundongos atímicos nus. Várias dessas moléculas impedem a neovascularização coroidal em um modelo experimental com primata não-humano. Essas moléculas podem ser empregadas para imunoterapia passiva em entidades patológicas as quais têm, em sua base, 10 um aumento anormal nos vasos sanguíneos, tais como: degeneração macular relacionada à idade (variante úmida), câncer e suas metástases, glaucoma neovascular, retinopatia diabética e do recém-nascido, processos inflamatórios agudos e crônicos, doenças infecciosas, doenças autoimunes, rejeição a transplante de órgãos, hemangioma, angiofibroma e outras. 15