

C12N 15/13 (2007.10) **C07K 16/28** (2007.10)
C12N 5/20 (2007.10) **A61K 39/395** (2007.10)
A61P 35/00 (2007.10) **A61P 37/00** (2007.10)
A61P 9/00 (2007.10) **A61P 27/00** (2007.10)
A61P 19/02 (2007.10) **C12N 15/63** (2007.10)
A61K 48/00 (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2001.03.30**

(30) Prioridade(s): **2000.03.31 US 540967**

(43) Data de publicação do pedido: **2003.01.02**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.03.23**
090/2009

(73) Titular(es):

IMCLONE LLC

180 VARICK STREET NEW YORK NY 10014 US

(72) Inventor(es):

FANG LIAO

US

DANIEL J. HICKLIN

US

PETER BOHLEN

US

(74) Mandatário:

JOÃO PEREIRA DA CRUZ

RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTAGONISTAS DE VE-CADERINA SEM EFEITOS ADVERSOS
SOBRE A PERMEABILIDADE VASCULAR**

(57) Resumo:

RESUMO**"ANTICORPOS ANTAGONISTAS DE VE-CADERINA SEM EFEITOS
ADVERSOS SOBRE A PERMEABILIDADE VASCULAR"**

A presente invenção diz respeito as anticorpos, ou aos seus fragmentos imunologicamente activos, específicos para os 15 aminoácidos do terminal N de uma VE-caderina de mamífero e que actuam como antagonistas das interacções homofílicas mediadas pela VE-caderina, entre células endoteliais adjacentes, sem afectarem gravemente a vasculatura normal. De acordo com uma variante preferencial, os anticorpos em causa são anticorpos humanizados orientados para reagirem com a VE-caderina humana, para utilização num ser humano. A invenção também proporciona composições farmacêuticos que compreendem estes anticorpos e tais fragmentos de anticorpos, métodos para a preparação dos anticorpos e métodos para a utilização dos anticorpos e dos fragmentos de anticorpos para inibição da angiogénese, para inibir as metástases tumorais ou para tratar doenças proliferativas celulares.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS ANTAGONISTAS DE VE-CADERINA SEM EFEITOS ADVERSOS SOBRE A PERMEABILIDADE VASCULAR"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a antagonistas de anticorpos de VE-caderina que inibem a formação de novas junções aderentes sem destruírem a integridade das junções existentes. Tais anticorpos são úteis para impedir a angiogénese em diversos estados patológicos, incluindo, por exemplo, a prevenção da neovascularização de tumores. Estes anticorpos também são úteis para tratar doenças proliferativas das células endoteliais.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Há muitas doenças associadas à proliferação anormal de vasos sanguíneos. O processo de formação de novos vasos sanguíneos recebe a designação de angiogénese. Em condições normais ou não patológicas a angiogénese ocorre em situações perfeitamente definidas, tais como a cicatrização de ferimentos, em resposta à isquémia e durante o desenvolvimento embrionário e fetal. No entanto, a angiogénese persistente ou descontrolada pode originar diversos estados patológicos ou doenças e, no caso dos tumores sólidos, pode ser uma condição necessária para manter o estado patológico. Por exemplo, a angiogénese ocorre com doenças neoplásicas, em particular com tumores sólidos, em doenças autoimunes, em doenças vasculares colagénicas, tais como a artrite reumatóide, e em determinadas patologias oftalmológicas, tais como a retinopatia diabética, a

fibroplasia retrolenticular e glaucoma neovascular. Uma metodologia terapêutica para o tratamento de tais doenças poderia consistir em restringir, reduzir ou eliminar o fornecimento de sangue às células ou tecidos doentes. Por exemplo, os tumores sólidos com dimensões superiores a alguns milímetros passam por uma neovascularização sem a qual seria impossível o desenvolvimento subsequente do tumor, pelo que a inibição da formação de vasos sanguíneos irá limitar ao tamanho do tumor.

Foram já experimentadas algumas estratégias de tratamento, no sentido de limitar o fornecimento de sangue ao tumor, obstruindo os vasos sanguíneos que alimentam o tumor. Para tal tratamento, o local do tumor tem de ser conhecido e o tumor tem de estar acessível. Assim, um método de tratamento que não dependesse do conhecimento da localização ou da acessibilidade do local relevante poderia ser valioso e poderia permitir o fornecimento sistémico de um agente terapêutico anti-angiogénese, capaz de atingir especificamente um local afectado.

Devido à função que a angiogénese desempenha no desenvolvimento da patologia, há um interesse significativo no desenvolvimento de inibidores da angiogénese, especialmente no caso em que as terapias existentes são insuficientes. Uma vez que as células endoteliais são uma parte integrante da formação de vasos sanguíneos, um inibidor específico de tais células seria vantajoso para inibir a angiogénese, desde que a toxicidade associada a esse inibidor fosse mínima. Um alvo particular com interesse é a caderina específica das células endoteliais, a VE-caderina, que forma junções aderentes intercelulares.

As caderinas constituem uma família de moléculas de adesão celular implicadas na formação de contactos específicos célula a célula (Takeichi, *Ann. Rev. Biochem.* 59: 237-252 (1990); Geiger & Ayalon, *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 302-332 (1992); Uemura, *Cell* 93: 1095-1098 (1998)). Foram já identificados ou caracterizados diversos membros desta família. As caderinas são glicoproteínas transmembranares de cadeia única com pesos moleculares entre 120-140 kD. Os membros desta família manifestam interacções homofílicas dependentes do cálcio e são responsáveis pela adesão e pelo reconhecimento selectivo célula a célula, o que é necessário para fixar diferentes tipos de células nos seus locais adequados durante o desenvolvimento de um órgão. As caderinas também desempenham um papel importante na manutenção da integridade das estruturas multicelulares. Durante a morfogénese embrionária, a expressão de diversos membros da família das caderinas é espacial e temporariamente regulada, facilitando a montagem ordenada de diversos tipos de células em estruturas funcionais (Takeichi, *Ann. Rev. Biochem.* 59: 237-252 (1990)).

Os membros da família das caderinas possuem particularidades estruturais típicas e partilham uma considerável homologia sequencial (43-58%). A sua região extracelular contém, tipicamente, cinco domínios repetitivos que possuem aproximadamente 110 aminoácidos. Demonstrou-se já que o domínio do terminal N é importante na interacção homotípica célula a célula, conforme comprovado por experiências feitas com quimeras moleculares, anticorpos monoclonais e inibidores peptídicos (Nose *et al.*, *Cell* 54: 993-1001 (1988)). Foram já reveladas as estruturas tridimensionais dos domínios do terminal N da caderina N e

da caderina E (Shapiro *et al.*, Nature 374: 327-337 (1995); Overduin *et al.*, Science 267: 386-389 (1995); Nagar *et al.*, Nature 380: 360-364 (1996)). Assim sendo, admite-se que as caderinas formem dímeros suportados por elementos com o aspecto de fechos de correr e possivelmente por pontes dissulfureto. A porção intracelular curta das caderinas é a sua região mais altamente conservada e desempenha um papel essencial na função clássica das caderinas, devido ao facto de fixar as caderinas ao citoesqueleto e por proporcionar funções de sinalização mediante a fosforilação das caderinas (ver a figura 1).

Demonstrou-se que a VE-caderina (ou caderina-5) está localizada nas junções intercelulares (junções aderentes) nos contactos célula a célula (Lampugnani *et al.*, J. Cell. Biol. 118: 1511-1522 (1992); Breviario *et al.*, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 15: 1229-1239 (1995); Breier *et al.*, Blood 87: 630-641 (1996); Lampugnani *et al.*, J Cell Biol. 129: 203-217 (1995)). Diversas observações experimentais sugerem que esta caderina está implicada em diversos aspectos da biologia vascular, relacionados com a angiogénese, incluindo a montagem das células endoteliais em estruturas tubulares (Bach *et al.*, Experimental Cell Research 238: 324-334 (1998)). Por exemplo, demonstrou-se que a permeabilidade vascular induzida pela trombina está associada à desmontagem das junções aderentes endoteliais (Rabiet *et al.*, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16: 488-496 (1996); Dejana, J. Clin Invest. 100: S7-10. (1997); Dejana *et al.*, FASEB J., 9: 910-918 (1995); Dejana *et al.*, Ann N Y Acad Sci. 811: 36-43 (1997); Gotsch *et al.*, J. Cell. Sci. 110: 583-588 (1997); Kevil *et al.*, J. Biol Chem. 273: 15099-15103 (1998); Corada *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci.

96: 9815-9820 (1999)). A VE-caderina e o seu fragmento terminal N inibem o crescimento dependente da densidade (Yap *et al.*, J. Cell Biol. 141: 779-789 (1998); Caveda *et al.*, J. Clin. Invest. 98: 886-893 (1996)) e a migração (Breviario *et al.*, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 15: 1229-1239 (1995)) das células endoteliais. Noutras experiências, demonstrou-se que a VE-caderina confere propriedades de aderência às células transfectadas (Breviario *et al.*, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 15: 1229-1239 (1995); Breier *et al.*, Blood 87: 630-641 (1996); Ali *et al.*, Microcirculation 4: 267-277 (1997)) e demonstrou-se a existência de uma função essencial para a VE-caderina na formação de vasos sanguíneos em murganhos desprovidos de VE-caderina. Nestes murganhos, a montagem gravemente debilitada das estruturas vasculares origina um fenótipo embrionário letal (Vittet *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 6273-6278 (1997); Faure *et al.*, Development 128: 2093-2102 (1999); Carmeliet *et al.*, Cell 98: 147-157 (1999)). Estas conclusões validam bastante bem a VE-caderina enquanto objecto de interesse farmacológico para inibir a neovascularização.

A obra publicada de F. Liao *et al.*: "Identification of antibody-based VE-cadherin antagonist for the application of anti-angiogenesis therapy", proc. Natl. Acad. Sci. USA, 41:645 (2000) descreve dois anticorpos monoclonais anti-VE-caderina que inibem a angiogénese, graças ao facto de bloquearem a formação de novas junções na vasculatura tumoral, sem destruírem as junções existentes no endotélio normal. Este documento não descreve o epítipo na VE-caderina.

O documento US 5 597 725 descreve novas caderinas, designadas por caderinas-4 a -12 e anticorpos monoclonais capazes de se ligarem especificamente a estas caderinas. No

texto está descrito que o anticorpo produzido pelo hibridoma designado por G11F, que foi depositado na ATCC com o número HB 11527 de registo, reage com o domínio 1 extracelular da caderina-5; no entanto, não foi identificada a sua parcela do epítipo.

De igual modo, nos artigos publicados por Brevario *et al.*, e Bach *et al.*, citados *supra*, não foram evidenciados nenhuns locais epitópicos da VE-caderina.

F.R. Haselton e R.L. Heimark descrevem, na sua publicação "Role of cadherins 5 and 13 in the aortic endothelial barrier", Journal of Cellular Physiology, 171:243-251 (1997), um anticorpo monoclonal (Mab 9H7) que se liga ao domínio externo da caderina-5; no entanto, não foram identificados nenhuns locais epitópicos.

Anteriormente à presente invenção, as experiências efectuadas para utilizar antagonistas de anticorpos de VE-caderina para impedir a angiogénese ficaram limitadas pela toxicidade do anticorpo sobre a vasculatura normal. Por exemplo, a administração de determinados anticorpos anti-caderina, em quantidades suficientes para impedirem ou inibirem a angiogénese, tiveram como resultado a alteração da integridade da vasculatura normal com síndromas resultantes de perdas por vazamento vascular, hemorragias e morte. Por exemplo, o anticorpo 19E6 anti-VE-caderina origina um aumento da permeabilidade vascular pulmonar, devido ao facto de esse anticorpo destruir as junções celulares existentes mediadas pela VE-caderina e simultaneamente impedir a formação de novas junções aderentes celulares mediadas pela VE-caderina. A presente invenção tem agora por objecto proporcionar melhores antagonistas de anticorpos de VE-caderina dirigidas para

locais particulares da VE-caderina e que vêm resolver tais problemas

DESCRIÇÃO ABREVIADA DA INVENÇÃO

A presente invenção tem por objecto um anticorpo ou um fragmento de anticorpo que é um antagonista de VE-caderina. O anticorpo e os fragmentos do anticorpo da invenção conseguem ligar-se especificamente a uma molécula seleccionada entre o conjunto constituída por:

- uma VE-caderina num local contido nos primeiros 15 aminoácidos do terminal N de domínio 1 da VE-caderina,
- e um péptido que possui a sequência de aminoácidos designada por SEQ ID NO: 2 (DWIWNOMHIDE EKNE), em que o anticorpo ou o fragmento de anticorpo da invenção é capaz de inibir a formação de junções aderentes mediadas pela VE-caderina *in vitro*, mas não exerce nenhum efeito significativo ou substancial sobre a permeabilidade paracelular *in vitro*.

Tais anticorpos e fragmentos de anticorpos não exercem nenhum efeito significativo ou substancial sobre a permeabilidade vascular *in vitro* e são praticamente não tóxicos quando administrados a um animal ou a um mamífero.

Além disso, os anticorpos ou os fragmentos de anticorpos conseguem inibir a angiogénese *in vivo* ou *in vitro* e também as metástases tumorais. Os anticorpos e os fragmentos de anticorpos da invenção actuam mediante a inibição da formação de novas junções aderentes, sem destruírem as junções aderentes existentes. Os anticorpos preferenciais da invenção são anticorpos monoclonais. De igual modo, os fragmentos de anticorpos preferenciais são retirados de anticorpos monoclonais. De acordo com uma variante mais preferencial, o anticorpo monoclonal é o

anticorpo monoclonal E4B9 do rato anti-VE-caderina do murino, quando produzido pelo hibridoma depositado na Coleção Americana de Culturas Tipo (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 E.U.A) em 31 de Março de 2000 e ao qual foi atribuído o número PTA-1618 de registo. O mamífero preferencial da invenção é um ser humano.

Os anticorpos e/ou os fragmentos de anticorpos da presente invenção podem ser anticorpos de cadeia singular, humanizados, quimerizados, biespecíficos ou fundidos com um polipeptido heterólogo.

Um outro aspecto da invenção tem por objecto um hibridoma que produz os anticorpos monoclonais da invenção, em particular o hibridoma ATCC PTA-1618.

De acordo com um outro aspecto, a invenção proporciona composições farmacêuticas que compreendem o anticorpo ou o fragmento de anticorpo da invenção, em mistura com um veículo ou um diluente farmacêuticamente aceitáveis.

Ainda de acordo com um outro aspecto da invenção, esta descreve a utilização de anticorpos e de fragmentos de anticorpos para a preparação de composições farmacêuticas para o tratamento de mamíferos durante um período e com uma quantidade eficaz para inibir a angiogénese.

Ainda de acordo com mais um outro aspecto da invenção, esta descreve a utilização de anticorpos e de fragmentos de anticorpos para inibir as metástases tumorais em mamíferos, graças às composições farmacêuticas da invenção administradas aos mamíferos durante um período e numa quantidade eficaz para inibir as metástases de um tumor.

Mais ainda, a invenção diz respeito à utilização supramencionada para tratar patologias de proliferação celular associadas à vascularização em mamíferos, graças às

composições farmacêuticas administradas numa quantidade eficaz para inibir a proliferação de células endoteliais, sem afectar a vasculatura normal. As doenças proliferativas celulares compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, as seleccionadas entre doenças proliferativas dos vasos sanguíneos, doenças fibróticas, angiogénese, crescimento tumoral, metástases tumorais, artrite reumatóide e degeneração muscular associada à idade.

Ainda de acordo com mais uma variante da invenção, esta descreve a utilização de anticorpos e de fragmentos de anticorpos para a preparação de composições farmacêuticas para reduzir ou inibir a vasculatura tumoral em mamíferos. As composições da invenção são administradas a um mamífero numa quantidade eficaz para inibir a formação de vasos sanguíneos, sem afectar prejudicialmente a vasculatura existente, isto é, de modo a eliminar ou praticamente reduzir ou restringir o fluxo sanguíneo para um tumor, sem afectar prejudicialmente a vasculatura existente.

A invenção também descreve um ácido nucleico isolado que compreende uma sequência nucleotídica que codifica uma sequência codificadora para o anticorpo ou fragmento do anticorpo, para uma região variável do referido anticorpo ou para uma região hipervariável do referido anticorpo, em conformidade com a invenção.

A presente invenção permite, por meio de terapia génica, administrar o anticorpo ou o fragmento de anticorpo da invenção a um hospedeiro mamífero. Este método consiste em administrar um ácido nucleico que codifica o anticorpo ou o fragmento de anticorpo desejado a um mamífero numa quantidade e durante um período eficazes para inibir a

angiogénese num local predeterminado ou para inibir a neovascularização tumoral.

DESCRIÇÃO ABREVIADA DAS FIGURAS

Figura 1: dimerização da VE-caderina. São propostas duas formas de VE-caderina com base nas estruturas cristalinas que foram objecto de resolução para as caderinas N e E. O "dímero de ligação" (painéis da esquerda) refere-se a interacções homofílicas entre duas moléculas de VE-caderina sobre a superfície da mesma célula. O "dímero de adesão" (painéis da direita) refere-se a interacções homofílicas entre moléculas de VE-caderina localizadas em células opostas.

Figura 2: alinhamento das sequências do domínio 1 extracelular (ECD1) de quatro caderinas clássicas. Prevê-se que haja quatro regiões do domínio 1 para a VE-caderina, abrangendo a superfície de ligação quer do dímero de ligação quer do dímero de adesão. São sintetizados quatro péptidos (painéis inferiores) que abrangem estas regiões, para gerar inibidores de anticorpos específicos.

Péptidos:

1: DEIWNQMHIDE EKNE-Cys; 2: YYKDQSNXNRQNAKY-Cys; 3: KYVLQGEFAGKIFGVDA-Cys e 4: LIVDKNTNKNLEQP-Cys. Estes péptidos são representados por SEQ ID NOS: 1 e 4-6, respectivamente. O resíduo cisteína foi acrescentado na extremidade carboxilo de cada péptido para acoplamento KLH.

Figura 3: efeitos dos anticorpos peptídicos anti-ECD1 sobre a permeabilidade paracelular das células H5V.

Figura 4: o anticorpo E4B9 não revela nenhum efeito significativo sobre a permeabilidade paracelular. Os

anticorpos E4B9 e 6D10 não exercem nenhum efeito dramático sobre a permeabilidade vascular.

Figuras 5A e 5B: o anticorpo E4B9 revela uma poderosa actividade anti-angiogénese no ensaio da microbolsa da córnea de murganho. Foram experimentados três olhos representativos de cada grupo experimental (6 murganhos/grupo). O anticorpo E4B9 possui uma actividade inibidora >80% sobre a neovascularização da córnea.

Figura 6: o anticorpo E4B9 interactua com a VE-caderina humana.

Figura 7: cartografia epitópica de novos anticorpos monoclonais. Estratégia para cartografar o epítipo dos anticorpos monoclonais (mAb) 19E6 e 6D10.

Figura 8: esquema resumido da informação epitópica para os anticorpos peptídicos anti-ECD1. Foi cartografado o epítipo do anticorpo 10G4 para o domínio 1 da VE-caderina de murganho, recorrendo à mesma estratégia, tal como anteriormente descrito a propósito da figura 7.

Figura 9: região epitópica prevista para os anticorpos 19E6 e 10G4. As regiões sublinhadas são os epítipos dos anticorpos E4B9 e Cad-5, respectivamente.

DESCRIÇÃO MINUCIOSA DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona antagonistas de anticorpos da VE-caderina que inibem as interacções entre VE-caderina e VE-caderina, sem destruírem significativamente as junções aderentes já formadas. Aos proceder deste modo, o antagonista inibe ou impede a formação intercelular de novas junções aderentes, sem destruir praticamente as junções aderentes existentes. Assim, estes anticorpos, e os seus fragmentos que conservam a especificidade antigénica

do anticorpo intacto, conseguem ligar-se especificamente a um local numa VE-caderina de um mamífero nos 15-20 aminoácidos do terminal N do domínio 1 da VE-caderina dos mamíferos, e são capazes de inibir *in vitro* a formação de junções aderentes mediadas pela VE-caderina, mas não conseguem exercer nenhum efeito significativo ou substancial sobre a permeabilidade paracelular *in vitro*. O local de ligação está contido nos primeiros 15 aminoácidos do terminal N da VE-caderina.

De igual modo, a ligação específica pode ser a um péptido que possua uma sequência de aminoácidos identificada por SEQ ID NO: 2 (DWIWNOMHIDE EKNE). Em todos os casos, os antagonistas de anticorpos conservam a aptidão para inibir a formação de novas junções sem destruírem as junções existentes.

Assim sendo, os anticorpos e os fragmentos de anticorpos da presente invenção não exercem nenhum efeito significativo ou substancial sobre a permeabilidade vascular *in vivo*. De modo semelhante, os anticorpos e os fragmentos de anticorpos da invenção são praticamente não tóxicos aquando administrados a um animal ou a um mamífero. De igual modo, os anticorpos e os fragmentos de anticorpos da invenção conseguem inibir a angiogénese *in vivo* ou *in vitro* ou inibir as metástases tumorais. O anticorpo preferencial da invenção é o anticorpo E4B9 monoclonal dos murinos.

Os mamíferos da invenção compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, os animais domésticos (tais como bovinos, suínos, cães e gatos), murganhos, primatas e seres humanos. Os seres humanos são os mamíferos preferidos.

Os anticorpos e os fragmentos de anticorpos da invenção podem ser utilizados em métodos para inibir a angiogénese, em métodos para inibir as metástases tumorais, em métodos para tratar uma doença de proliferação celular associada à vascularização e em métodos para reduzir ou inibir a vasculatura tumoral.

A presente invenção também compreende anticorpos quiméricos, de cadeia singular e humanizados e também diacorpos, triacorpos, fragmentos Fab ou o produto de uma biblioteca de expressão de Fab.

Os anticorpos da invenção podem ser preparados por processos convencionais que são perfeitamente conhecidos na especialidade. De preferência, os anticorpos referidos são anticorpos monoclonais, mas a invenção também prevê a utilização de anticorpos policlonais monoespecíficos. Os anticorpos policlonais monoespecíficos podem ser preparados removendo por adsorção as especificidades indesejadas, retirando-as de uma preparação de anticorpos policlonais preparados com um imunogénio de VE-caderina adequado. Os imunogénios adequados para a preparação dos anticorpos compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, uma VE-caderina de mamífero, fragmentos de uma VE-caderina de mamífero, de preferência os domínios extracelulares de VE-caderina, péptidos retirados do domínio 1 do terminal N de uma VE-caderina de mamífero e proteínas de fusão com quaisquer destas moléculas. Sempre que adequado, as moléculas (v.g., péptidos) podem ser fixadas a moléculas portadoras, tais como BSA, KLH ou quaisquer outros veículos conhecidos na especialidade. O imunogénio preferido é um péptido constituído essencialmente por 15 resíduos aminoácidos do terminal N de uma VE-caderina de mamífero.

As técnicas utilizadas para a preparação de anticorpos monoclonais compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, a técnica do hibridoma (Kohler & Milstein, *Nature*, 256: 495-497 (1975)), as técnicas de exposição a fagos, a técnica do trioma, a técnica do hibridoma das células B humanas (Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4: 72, (1983)) e a técnica do hibridoma EBV para produzir anticorpos monoclonais humanos (Cole, *et al.*, 1985, In *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Um outro aspecto da invenção diz respeito a hibridomas que produzam anticorpos monoclonais da invenção. Um desses hibridomas produz o anticorpo de rato E4B9 anti-VE-caderina de murino, que foi depositado na instituição ATCC com o número PTA-1618 de registo, conforme indicado antes.

As técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia singular (U.S. 4 946 778) são adaptadas para a produção de anticorpos de cadeia singular contra produtos polipeptidos imunogénicos da presente invenção.

Por exemplo, os anticorpos da invenção podem ser desenvolvidos em presença de péptidos de V-caderina e também de fragmentos análogos e derivados de um péptido de VE-caderina. Os termos 'proteína, péptido e polipeptido' são aqui utilizados interpermutavelmente. Os termos "fragmento", "derivado" e "análogo" referem-se a um polipeptido que conserva praticamente a mesma função ou actividade biológica do polipeptido de VE-caderina ou conserva a aptidão para ligar o ligando, mesmo que o polipeptido não funcione como um receptor de quimioquina, por exemplo, uma forma solúvel do polipeptido membranar. O polipeptido da presente invenção compreende, por exemplo,

um polipeptido recombinante, um polipeptido natural ou um polipeptido sintético.

Um análogo pode ser, por exemplo, uma propoteína que seja activada por clivagem da parcela proproteínica para produzir um polipeptido maduro activo. Os fragmentos do polipeptido de VE-caderina compreendem os péptidos de VE-caderina que possuem um fragmento no terminal N constituído pela sequência de aminoácidos da figura 2, ou um seu fragmento. Os derivados ou análogos do polipeptido da figura 2 possuem uma ou várias sequências seleccionadas entre SEQ ID NOS 1-3 e compreendem, por exemplo, (i) péptidos em que um ou vários resíduos aminoácidos são substituídos por um resíduo aminoácido conservado ou não conservado, (ii) péptidos em que um ou vários resíduos aminoácidos possuem um grupo substituinte, (iii) péptidos em que o polipeptido maduro está fundido com um outro composto, por exemplo, um composto para aumentar o período de semi-vida do polipeptido (por exemplo, polietileno-glicol), (iv) péptidos em que os aminoácidos suplementares são fundidos com o polipeptido maduro para a purificação do polipeptido, (v) péptidos em que um fragmento do polipeptido é solúvel, isto é, não está ligado à membrana, e mesmo assim ainda liga ligandos ao péptido ou receptor ligado à membrana, ou (vi) uma combinação de (i) a (v). Considera-se que tais fragmentos, derivados e análogos ficam, ao alcance de um especialista na matéria à luz dos preceitos aqui explicitado.

Os polipeptidos e polinucleótidos da presente invenção são apresentados, de preferência, numa forma isolada e preferencialmente são purificados até à homogeneidade. No entanto, isto nem sempre é necessário. Além disso, os polipeptidos da invenção possuem pelo menos 70% de

similaridade (de preferência, uma identidade de 70%) com um ou vários péptidos de sequência seleccionada entre SEQ ID NOS 1-3 e mais preferencialmente possuem uma similaridade de 90% (mais preferencialmente uma identidade de 90%) com um ou vários péptidos de sequência seleccionada entre SEQ ID NOS 1-3 e ainda mais preferencialmente uma similaridade de 95% com os péptidos de sequência seleccionada entre SEQ ID NOS 1-3 e com parcelas de tais péptidos.

Conforme se sabe na especialidade, a "similaridade" entre dois polipeptidos é determinada comparando a sequência de aminoácidos e os existentes substitutos de aminoácidos conservados do polipeptido com a sequência de um segundo polipeptido.

De acordo com uma outra variante da invenção, os anticorpos da invenção podem ser preparados por meio de técnicas do ADN recombinante, mediante clonagem e expressão da totalidade ou de uma parte de um anticorpo conhecido. Utilizando tais técnicas, que são conhecidas na especialidade, é possível preparar uma versão humanizada de anticorpos não humanos. Por exemplo, é possível preparar facilmente uma versão humanizada do anticorpo monoclonal E4B9, fazendo a clonagem do gene que codifica este anticorpo num vector de expressão adequado. Os ácidos nucleicos úteis para este efeito são os que codificam uma sequência de aminoácidos em que a referida sequência de aminoácidos compreende a região variável, a região hipervariável ou ambas, de um anticorpo monoclonal que se liga especificamente ao domínio 1 de um domínio extracelular de um péptido de VE-caderina que iniba a formação de novas junções, sem destruir a vasculatura normal.

Mais particularmente, a presente invenção também diz respeito a construções recombinantes que compreendem uma ou várias sequências, conforme genericamente descrito antes. As construções compreendem um vector, tal como um vector plasmídico ou viral, em que tenha sido inserida a sequência da invenção, com uma orientação directa ou inversa. De acordo com um caso preferencial desta variante, a construção compreende também sequências reguladoras, incluindo, por exemplo, um promotor funcionalmente ligado à sequência. Os especialistas na matéria conhecem um grande número de vectores e promotores convenientes e que estão disponíveis nos circuitos comerciais. A título de exemplo apresentamos os vectores a seguir indicados. Bacterianos: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pbs, pD10, phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eucarióticos: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). No entanto, é possível utilizar quaisquer outros plasmídeos ou vectores, desde que sejam replicáveis e viáveis no hospedeiro.

As construções, nas células hospedeiras, são utilizadas de uma maneira convencional para produzirem um produto génico codificado pela sequência recombinante. Os vectores de clonagem e expressão apropriados para utilização com hospedeiros procariotas e eucariotas foram descritos por Sambrook, *et al.*, na obra *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edição, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989).

Utilizando a presente invenção, é possível produzir mamíferos transgénicos em que tenha lugar a expressão de

anticorpos humanizados para os produtos polipeptídicos imunogénicos da presente invenção. Deste modo, é possível produzir novos hospedeiros mamíferos transgénicos, diferentes de primatas, particularmente diferentes de seres humanos, em que o hospedeiro consegue desencadear uma resposta imunitária contra um imunogénio, em que a resposta produz anticorpos que possuem regiões constantes e/ou variáveis de primatas, em particular de seres humanos, ou quaisquer outras sequências de péptidos efectores relevantes.

Os hospedeiros são caracterizados pelo facto de conseguirem produzir anticorpos xenogénicos ou modificados, como resultado da substituição e/ou inactivação da subunidade de imunoglobulina endógena que codifica locais. As modificações conservam pelo menos uma parte da região constante que serve para a montagem do local de ligação da região variável, ligado ao terminal C, num péptido funcional. O péptido funcional assume inúmeras formas ou conformações e funciona, por exemplo, como uma enzima, um factor de crescimento, uma proteína de ligação, um ligando, uma citocina, uma proteína efectora, uma proteína queladora, etc.. Os anticorpos pertencem a qualquer isotipo, isto é, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM ou subtipos contidos no isotipo.

Os hospedeiros transgénicos compreendem os seleccionados entre murinos, lagomorfos, ovinos, porcinos, equinos, caninos e felinos. Na maior parte das vezes, foram utilizados murganhos para a produção de linfócitos B. Faz-se observar que são utilizados facilmente outros animais em vez de murganhos, praticando os mesmos procedimentos.

Os anticorpos humanizados e quiméricos são preparados de acordo com as estratégias a seguir enunciadas. De acordo com uma dessas estratégias, são introduzidos complexos de genes de imunoglobulina humana de cadeias leve e pesada na linhagem embrionária de murganho e, num passo separado, faz-se com que os correspondentes genes de murganho passem a ser não funcionais. Os polinucleótidos que codificam as cadeias pesada e leve humanas são reconstruídos num microrganismo eucariota ou procariota apropriado e os fragmentos polinucleotídicos resultantes são depois introduzidos em pronúcleos de oócitos fertilizados ou células estaminais embrionárias de murganho. A inactivação dos locais da imunoglobulina endógena do murganho é conseguida pela destruição selectiva dos locais apropriados por recombinação homóloga em células estaminais embrionárias do murganho. Em cada caso, são gerados animais quiméricos que derivam, em parte, das células estaminais embrionárias modificadas e que conseguem transmitir as modificações genéticas através da linhagem germinativa. O acasalamento de murganhos que possuem locais de imunoglobulina humana com murganhos que possuem locais com imunoglobulina inactivada gera animais que produzem anticorpos puramente humanos.

De acordo com uma outra estratégia, são utilizados fragmentos dos locais da imunoglobulina humana de cadeias pesada e leve, para substituir directamente os correspondentes locais dos murganhos por recombinação homóloga em células estaminais embrionárias de murganho. A isto segue-se a geração de animais transgénicos quiméricos. Os anticorpos humanos resultantes são isolados, por exemplo, a partir de outras proteínas, recorrendo a uma coluna por afinidade, que possuam um radical de ligação Fc, tais como a proteína A.

A organização, a localização relativa de exões que codificam domínios individuais e a localização de locais de junção e de elementos transcrpcionais em diversos animais são questões conhecidas pelos especialistas na matéria. Por exemplo, nos seres humanos, o local da cadeia pesada de imunoglobulina está situado no cromossoma 14. Na direcção de transcrição 5'-3', o local compreende um agregado grande de genes da região variável (V_H), de genes da região de diversidade (D), seguindo-se os genes da região de junção (J_H) e o agregado dos genes constantes (C_H). Estima-se que o tamanho do local seja de cerca de 2500 quilobases (kb). Durante os desenvolvimento de células B, os segmentos génicos descontínuos do local de IgH da linhagem germinativa são justapostos por meio de um rearranjo físico do ADN.

A produção de um polipeptido de imunoglobulina de cadeia pesada funcional implica que três segmentos de ADN descontínuos, das regiões V_H , D e J_H , sejam unidos de uma maneira sequencial específica que gere as unidades funcionais. Logo que estas unidades se encontram formadas, são produzidas cadeias pesadas específicas a seguir à transcrição do local da imunoglobulina. Há dois locais para as cadeias leves de imunoglobulina (IgL), o local κ no cromossoma 2 humano, e o local λ no cromossoma 22 humano. A estrutura dos locais de IgL é semelhante à dos locais IgH, com excepção de a região D não estar presente

Toda a região V, ou diversos fragmentos da região V, é utilizada para produzir um espectro amplo de anticorpos de elevada afinidade. Por exemplo, utiliza-se um subconjunto de genes conhecidos da região V dos locais de Ig das cadeias pesadas e leves humanas (Berman *et al.*, EMBO J. 7: 727-738 (1988)) para a produção de hospedeiros transgénicos, sendo

esses hospedeiros transgênicos capazes de desencadear uma forte resposta imunitária e produzir anticorpos de elevada afinidade.

As células B produtoras de anticorpos ou de análogos de anticorpos a partir do hospedeiro transgênico são utilizadas, por exemplo, para fusão com células mielóides de murganho para a produção de hibridomas ou imortalização por outros processos convencionais, isto é, transfecção com oncogenes. Depois, estas células imortalizadas ficam a crescer, por exemplo, em cultura contínua ou são introduzidos no peritoneu de um hospedeiro compatível para produção de ascite.

Conforme se disse antes, a presente invenção prevê também a produção de anti-soro policlonal humano ou anticorpos ou análogos de anticorpos monoclonais humanos, desde que conservem as actividades dos anticorpos da invenção. O componente da presente invenção, de ligação epitópica, diz respeito a proteínas constituídas por um ou vários polipeptidos substancialmente codificados por genes da superfamília das imunoglobulinas (ver *The Immunoglobulin Gene Superfamily*, Williams & Barclay In: *Immunoglobulin Genes*, Honjo, Alt, and Rabbits, eds., (1989)). Por exemplo, um componente de ligação epitópica compreende uma parte ou a totalidade de uma cadeia pesada, uma parte ou a totalidade de uma cadeia leve, ou ambas. No entanto, um componente de ligação epitópica tem de conter uma parcela suficiente de um produto génico da superfamília das imunoglobulinas para conservar a aptidão para se ligar a um alvo específico, ou epítipo.

No âmbito da presente invenção também estão compreendidos anticorpos biespecíficos que são formados

pela junção de dois componentes de ligação epitópica que possuam diferentes especificidades de ligação.

Sabe-se perfeitamente que as formas naturais de imunoglobulinas "maduras" variam ligeiramente em termos de comprimento, devido a supressões, substituições, inserções ou adições de um ou vários aminoácidos nas sequências. Assim, as duas regiões, a variável e a constante, são objecto de uma modificação natural significativa, ainda que continuem a ser "praticamente idênticas" e continuem a ser capazes de conservar as suas actividades respectivas.

Os polinucleótidos que codificam as regiões constantes e variáveis humanas são isolados de acordo com procedimentos perfeitamente conhecidos, a partir de inúmeras células humanas, preferencialmente células B imortalizadas. São utilizados métodos semelhantes para isolar sequências de imunoglobulinas não humanas provenientes de fontes não humanas. As células de fontes adequadas para os polinucleótidos e para os seus produtos de expressão e de secreção são obtidas a partir de inúmeras fontes, tais como a Colecção Americana de Culturas Tipo ("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas", 5ª edição (1985) Rockville, Md., E.U.A.).

Para além destas formas de cadeias de imunoglobulinas que ocorrem naturalmente, é possível conceber e produzir cadeias pesadas e leves modificadas "praticamente idênticas", recorrendo a diversas técnicas de ADN recombinante, perfeitamente conhecidas pelos especialistas na matéria. Por exemplo, as cadeias variam a partir da sequência que ocorre naturalmente ao nível da estrutura primária, devido a diversas substituições de aminoácidos, adições e supressões nos terminais e em locais intermédios. Em alternativa, são produzidos fragmentos polipeptídicos que compreendem apenas

uma parcela da estrutura primária, possuindo esses fragmentos uma ou várias actividades das imunoglobulinas (v.g., actividade de ligação).

Em particular, faz-se observar, tal como sucede com muitos genes, que os genes relacionados com as imunoglobulinas contêm regiões funcionais separadas, possuindo cada uma delas uma ou várias actividades biológicas distintas. Em geral, as modificações dos genes que codificam os desejados componentes de ligação epitópica são facilmente realizadas por meio de diversas técnicas perfeitamente conhecidas, tais como a mutagenese dirigida ao local (ver Gillman & Smith, *Gene* 8: 81-97 (1979) e Roberts *et. al.*, *Nature* 328: 731-734 (1987)).

Em variantes preferenciais da invenção, o componente de ligação epitópica do anticorpo da presente invenção é codificado por genes das imunoglobulinas que são "quiméricos" ou "humanizados" (ver, genericamente, Queen (1991) *Nature* 351: 501). Uma vez expressos, os anticorpos de VE-caderina, os componentes de ligação epitópica, os seus dímeros ou as cadeias individuais leves e pesadas são purificados de acordo com processos convencionais praticados na especialidade, por exemplo, a precipitação com sulfato de amónio, a cromatografia em coluna fraccionária ou a electroforese em gel (ver, genericamente, Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N. Y. (1982)). Uma vez purificados, parcialmente ou até à homogeneidade, se desejado, os anticorpos e os seus fragmentos são utilizados então, por exemplo, para fins terapêuticos, de diagnóstico, em técnicas de pesquisa de fármacos ou em processos experimentais de desenvolvimento e execução, tais como as contrastações por imunofluorescência.

Logo que um anticorpo monoclonal elegível anti-VE-caderina tenha sido experimentado e se tenha confirmado que não determina nenhum aumento da permeabilidade vascular *in vivo*, é possível determinar a actividade e/ou a eficácia dos anticorpos e dos fragmentos de anticorpos *in vivo*, mediante inúmeros métodos conhecidos pelos especialistas na matéria. Tais métodos experimentais compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, os ensaios de angiogénese *in vivo*. Há três ensaios de angiogénese *in vivo*, designadamente o da microbolsa corneana, o do tampão de 'Matrigel' e o das células tumorais encapsuladas em alginato, que são particularmente úteis para avaliar a actividade antiangiogénica dos anticorpos monoclonais de VE-caderina. De uma forma típica, os anticorpos (ou os fragmentos dos anticorpos) são testados, em primeiro lugar, no ensaio da microbolsa da córnea, uma vez que este ensaio necessita de menos anticorpos para a experiência e consome menos tempo do que outros ensaios. São utilizadas diversas quantidades de anticorpos, que são incorporadas em dispositivos implantados cirurgicamente, ou então são administradas de uma maneira sistémica. Os anticorpos que possuem uma actividade inibidora significativa sobre a neovascularização da córnea são testados outra vez em ensaios com tampão de 'Matrigel' e do alginato. Os ensaios do tampão de 'Matrigel' e do alginato servem para confirmar as actividades antiangiogénicas dos anticorpos anti-VE-caderina e permitem fazer a quantificação da actividade antiangiogénica entre diversos anticorpos e controlos. Os anticorpos anti-VE-caderina, que revelem inibição da angiogénese *in vivo*, são testados outra vez para se pesquisar a sua actividade antitumoral em modelos de tumores. Para

estes estudos são utilizados o modelo de xenoenxerto de carcinoma epidermóide A431 humano, o modelo do tumor subcutâneo pulmonar de Lewis e o modelo das metástases pulmonares de Lewis.

O exemplo 5 descreve ensaios suplementares e também exemplos pormenorizados em que são aplicados tais ensaios e técnicas para avaliar melhor os anticorpos e/ou os fragmentos de anticorpos da invenção.

As composições farmacêuticas que contenham antagonistas de anticorpos da presente invenção são úteis para serem administradas a pacientes que delas necessitem. A administração é feita por diferentes vias de administração, incluindo a via oral ou parentérica (subcutânea, intramuscular ou intravenosa). As composições para administração parentérica contêm, vulgarmente, uma solução do anticorpo ou uma sua mistura dissolvida num veículo aceitável, de preferência um veículo aquoso. São utilizáveis diversos veículos aquosos, v.g., água, água tamponada, soluto salino a 0,4% ou glicina a 0,3%. Estas soluções são estéreis e normalmente não contêm nenhuns materiais sob a forma de partículas ínfimas. Estas composições são esterilizadas, por exemplo, por meio de técnicas de esterilização convencionais perfeitamente conhecidas.

O veículo ou diluente da composição pode compreender, por exemplo, substâncias auxiliares farmacêuticamente aceitáveis, conforme necessário, para a aproximar das condições fisiológicas, tais como o pH, agentes de ajustamento e de tamponamento, agentes de ajustamento da toxicidade e outros que tais, por exemplo, acetato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, lactato de sódio, etc.. A concentração do agente nestas formulações pode

variar amplamente, *v.g.*, desde menos de cerca de 0,01%, de preferência desde pelo menos cerca de 0,1% até um máximo de cerca de 5% em peso. O intervalo de concentrações escolhido baseia-se fundamentalmente nos volumes dos fluidos, nas viscosidades ou no modo particular de administração escolhido.

Assim sendo, prepara-se uma composição farmacêutica típica para injeção intramuscular de modo a conter, por exemplo, cerca de 1 mL de água tamponada estéril e cerca de 1 mg do agente. Produz-se uma composição típica para infusão intravenosa de modo a conter, por exemplo, cerca de 250 mL de solução de Ringer e 10 mg do agente. Os métodos existentes para a preparação de composições administráveis por via parentérica são conhecidos ou de fácil compreensão pelos especialistas na matéria e estão descritos, de forma mais minuciosa, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Science, 15^a Ed., Mack Publishing Company (1980).

Os anticorpos da presente invenção são, por exemplo, liofilizados para serem guardados e são reconstituídos num veículo conveniente antes da sua utilização. Confirmou-se já que esta metodologia é eficaz quando são utilizadas técnicas convencionais, conhecidas na especialidade, de liofilização e de reconstituição de imunoglobulinas. As composições que contêm os anticorpos da presente invenção ou uma sua mistura são administradas para tratamentos profiláticos e/ou terapêuticos.

Um método para inibir a angiogénese consiste em administrar uma composição que contenha um anticorpo ou um fragmento de anticorpo da invenção a um mamífero durante um período e numa quantidade eficaz para inibir a angiogénese. De igual modo, os anticorpos e os fragmentos de anticorpos podem ser utilizados em métodos para inibir as metástases

tumorais no mamífero, mediante a administração de uma composição que contenha um anticorpo da invenção a um mamífero durante um período e com uma quantidade eficaz para inibir as metástases de um tumor.

Um método para tratar uma patologia de proliferação celular, associada à vascularização num mamífero, consiste em administrar a esse mamífero uma composição que contenha um anticorpo ou um fragmento de anticorpo de uma quantidade eficaz para inibir a proliferação de células endoteliais, sem destruir a vasculatura normal.

Um outro método para reduzir ou inibir a vasculatura tumoral num mamífero consiste em administrar a esse mamífero uma composição que contenha um anticorpo ou um fragmento de anticorpo numa quantidade eficaz para inibir a formação de vasos sanguíneos, sem afectar gravemente a vasculatura existente. Os tumores que podem ser tratados desta maneira são, mas sem que isso constitua qualquer limitação, carcinomas, gliomas, sarcomas, adenocarcinomas, adenossarcomas, adenomas e também os tumores no estado líquido, tais como os tumores leucémicos e linfóides. Estes tumores podem ocorrer em todas as partes do corpo, por exemplo, no cérebro, mama, pulmão, cólon, rim, bexiga, cabeça e pescoço, ovários, próstata, pâncreas, pele, ósseos, medula óssea, sangue, timo, útero, testículos, colo do útero e fígado.

Tal como aqui utilizada, a expressão "doenças proliferativas de células" designa as patologias em que ocorre uma proliferação celular indesejada de um ou vários subconjuntos de células num organismo multicelular, daí resultando prejuízos (v.g., desconforto ou menor esperança de vida) para o organismo multicelular. As doenças proliferativas

celulares ocorrem em diferentes tipos de animais e em seres humanos e compreendem as doenças proliferativas dos vasos sanguíneos, doenças fibróticas, angiogénese, desenvolvimento de tumores, artrite reumatóide e degeneração muscular associada à idade.

Um método de terapia génica consiste em administrar a um mamífero um ácido nucleico codificador de um anticorpo ou de um fragmento de anticorpo da invenção numa quantidade e durante um período eficazes para inibir a angiogénese num local predeterminado ou para inibir a neovascularização do tumor. Este método é aplicável ao tratamento de patologias associadas à angiogénese, tal como aqui mencionado, e também para inibir os tumores enumerados anteriormente.

As aplicações terapêuticas associadas à invenção compreendem o tratamento, a prevenção e a cura. No caso de se pretender fazer um tratamento, a composição é administrada a um paciente já afectado pela doença particular, numa quantidade suficiente para curar ou pelo menos sustentar parcialmente o estado patológico e as suas complicações. Define-se como "dose terapeuticamente eficaz" uma quantidade adequada para tal efeito. As quantidades eficazes para este fim dependem da gravidade da patologia e do estado geral do sistema imunitário do próprio paciente, mas estão compreendidas, geralmente, entre cerca de 0,01 e cerca de 100 mg do anticorpo ou do fragmento de anticorpo por dose, sendo mais vulgarmente utilizadas dosagens compreendidas entre cerca de 1 e cerca de 10 mg por paciente.

Em aplicações profiláticas, as composições que contêm o antagonista do anticorpo ou uma sua mistura, se isso for benéfico, são administradas a um paciente que não padeça ainda da patologia, para reforçar a resistência do paciente. Uma

quantidade dessas recebe a definição de "dose profilaticamente eficaz". Para esta finalidade, a quantidade exacta vai depender, mais uma vez, do estado de saúde do paciente e do nível geral de imunidade, mas irá estar compreendida, geralmente, entre cerca de 0,1 e 100 mg por dose, e de preferência entre cerca de 1 e cerca de 10 mg por paciente. São efectuadas administrações singulares ou múltiplas das composições, sendo os níveis e os padrões de dosificação seleccionados pelo médico assistente. Em qualquer dos casos, as formulações farmacêuticas devem proporcionar a quantidade do agente da presente invenção suficiente para tratar eficazmente o paciente.

Faz-se observar que os casos exemplificativos adiante descritos têm apenas fins ilustrativos e não pretendem limitar a presente invenção.

EXEMPLO 1

Métodos

Preparação de anticorpos monoclonais: foram utilizadas ratas de Lewis (fêmeas com 6-8 semanas de idade) que foram injectadas subcutaneamente (s.c.) com 0,1 mL de proteína ou péptido, misturados com adjuvante completo de Freund, utilizando uma agulha de calibre 25. As ratas foram estimuladas em cada 2-3 semanas com antigénio e foi-lhes retirado sangue da veia caudal em cada semana. Decorridas 3 imunizações de reforço, ou no momento em que as titulações séricas atingiram os níveis máximos, os animais foram sacrificados por inalação de CO₂. Foram retirados os baços dos animais sacrificados para geração de anticorpos monoclonais por meio de técnicas convencionais.

Pesquisa de anticorpos: foram pesquisados os sobrenadantes do hibridoma num ensaio imunossorvente ligado a enzimas (ELISA) para identificar os anticorpos que se haviam ligado a VE-caderina.

Ensaio de formação de junções / comutação de Ca: foi desenvolvido e praticado o ensaio de formação de junções, com base numa modificação do ensaio de comutação do cálcio (Gumbiner, B. e Simons, K., Cell Biol. 102: 457-468 (1986)). Foram utilizadas células de CHO transfectantes ou células endoteliais em que tem lugar a expressão de VE-caderina, as quais foram aplicadas sobre lamelas de vidro, e ficou-se à espera que formassem uma monocamada confluenta. As junções aderentes da monocamada foram artificialmente destruídas pela técnica de esgotamento do cálcio existente no meio de cultura por incubação com EGTA 5 mM durante 30 minutos. Depois efectuou-se a remoção dos meios que continham EGTA e foram acrescentados meios recentes, que continham cálcio, à cultura para permitir a formação das junções aderentes. Mediu-se a inibição da formação de junções por adição de diversas concentrações do anticorpo monoclonal anti-VE-caderina, no momento em que era acrescentado o meio recente contendo cálcio. A cinética dos processos de destruição das junções e de reformação das junções está correlacionada com o desaparecimento e o reaparecimento de VE-caderina nas junções aderentes. A formação de junções aderentes foi visualizada por contrastação imunofluorescente com um anticorpo policlonal específico para a VE-caderina dos murganhos ou dos seres humanos. Neste protocolo inclui-se normalmente uma imuncontrastação feita noutra molécula de adesão juncional (CD31), para se garantir que a monocamada celular tratada não se retrai.

Ensaio de permeabilidade paracelular: efectuou-se o ensaio de permeabilidade celular fazendo uma distribuição de transfectantes de células de CHO, ou células endoteliais em que tenha lugar a expressão de VE-caderina, na câmara superior de transcavidades de 'Costar'. As culturas ficaram a incubar durante 2 dias para permitir a formação de junções aderentes e uma monocamada de células confluentes. Estes anticorpos foram depois acrescentados à câmara superior das células conjuntamente com FITC-dextrano. Mediu-se o efeito do anticorpo anti-VE-caderina sobre a permeabilidade celular (destruição das junções) em função da quantidade de FITC-dextrano que penetra até à câmara do fundo.

O ensaio de permeabilidade pode ser adaptado a um protocolo útil para a pesquisa precoce de anticorpos monoclonais expressos nos sobrenadantes da cultura de hibridoma. Dito de forma abreviada, faz-se uma sementeira de células de hibridoma nas câmaras do fundo de transcavidades (Costar, diâmetro de 6,0 mm/poros com 0,3 μ m), as quais são criadas em co-cultura com uma monocamada de células em que tem lugar a expressão da VE-caderina de murganho no filtro superior. As células utilizadas nesta experiência são quer células de CHO transfectadas em que tem lugar a expressão da molécula de VE-caderina de comprimento completo do murganho, quer provenientes da linhagem de células do endotelioma H5V de murganho. Após um período de co-cultura de 3-5 dias, acrescenta-se FITC-dextrano (1 mg/mL) à câmara superior e mede-se a permeabilidade por fluorimetria, em função do FITC-dextrano que atravessa a monocamada celular e penetra na câmara do fundo. Calcula-se a actividade de permeabilidade (destruição das junções) do anticorpo monoclonal elegível em percentagem do aumento observado na permeabilidade de células

em que tem lugar a expressão de VE-caderina, comparativamente com o que se observa nas cavidades de controlo que contêm um anticorpo monoclonal de rato que serve de controlo sem nenhuma relação. A actividade de permeabilidade é normalizada pelo número de células de hibridoma e pela produção de Ig total de rato para controlar a variação observada na taxa de crescimento e a produção de anticorpos entre diferentes clones de hibridoma. As actividades de destruição de junções respeitantes aos novos anticorpos monoclonais são comparadas com as do anticorpo monoclonal 19E6, sobre o qual se sabe que possui uma elevada actividade destruidora de junções (aumento de permeabilidade > 150%). Apenas os anticorpos que manifestem ausência de actividade de destruição (aumento de permeabilidade aproximadamente igual a 25%) ou uma actividade de destruição modesta (aumento de permeabilidade aproximadamente entre 25-75%) são submetidos a novos ensaios de pesquisa da sua actividade inibitória das junções no ensaio de formação de junções.

Ensaio da bolsa de córnea: foram utilizadas fêmeas de murganho C57/BL (fêmeas com idades de 6-8 semanas) que foram anestesiadas com cetamina e foi criada uma bolsa de córnea em ambos os olhos, utilizando para tal um bisturi de cataratas de modelo 'von Graefe'. Implantou-se em cada bolsa ocular esférulas de 'hydon' contendo FGF básico, contendo ou não contendo o anticorpo experimental, em diversas doses. Em alternativa, foram implantadas esférulas de 'hydon' contendo FGF básico e os animais foram tratados por injeção i.p., com uma agulha de calibre 25, de diversas doses de anticorpo experimental ou de doses de controlo em cada 3 dias. Decorridos 6-7 dias, examinou-se a resposta angiogénica por biomicroscopia com lâmpada de fenda e fotografou-se. Os

animais foram sacrificados por inalação de CO₂ e os seus olhos foram excisados e preparados para posterior análise histológica.

EXEMPLO 2

Anticorpos monoclonais de VE-caderina que inibem a formação de junções aderentes, sem destruição das junções existentes

Foram imunizados dois grupos de ratos de Lewis quer com uma mistura de quatro péptidos acoplados a KLH, os quais tinham sequências do domínio 1 do terminal N da VE-caderina dos murinos (figura 2), quer com VE-caderina de murganho, solúvel e purificada por afinidade (smVEC-Ig), cuja expressão teve lugar em células de CHO. Este imunogénio abrange a totalidade da região extracelular da VE-caderina de murganho, fundida com a cadeia Fc humana. Os clones de hibridoma resultantes foram analisados para se pesquisar a produção de anticorpos com actividade de ligação à VE-caderina, recorrendo ao protocolo convencional de ELISA. Esta pesquisa identificou vinte (20) anticorpos de rato anti-VE-caderina de murganho, sendo 10 de cada um dos grupos de ratos originalmente imunizados.

Foram examinadas diversas propriedades destes anticorpos monoclonais, estando os resultados agrupados nos quadros 1 e 2.

Os 20 anticorpos elegíveis de VE-caderina foram testados nos ensaios de "comutação do cálcio" e de "permeabilidade" para se examinar a sua nova actividade inibidora da formação de junções e a sua actividade de destruição das junções existentes, respectivamente. Entre estes 20 anticorpos, verificou-se que o E4B9 inibe especificamente a formação de junções aderentes, sem afectar gravemente a vasculatura normal

(figuras 3 e 4). Além disso, testou-se também o anticorpo E4B9, de acordo com um ensaio de angiogénese *in vivo*, tendo-se verificado a existência de uma inibição da neovascularização da córnea, superior a 80% (figura 5). Embora também tivesse sido identificado um outro anticorpo (19E6) como um poderoso inibidor da formação de junções aderentes, mediada por VE-caderina, em conformidade com os critérios de ensaio *in vitro*, este anticorpo destrói as junções existentes (figura 3). As actividades biológicas essenciais destes dois anticorpos estão resumidas no Quadro 3 conjuntamente com dados obtidos com outros anticorpos anti-VE-caderina de murinos e de seres humanos.

QUADRO 1

| Anticorpos anti-VE-caderina, preparados contra imunogénios peptídicos | | | | |
|--|---------------------------------|--------------------------|--|---|
| MAb ¹ | mECD1~2 bacteriano (Blot) | VEC natural (Blot) | Ensaio de comutação de Ca ₂₊ (IF) | Permeabilidade celular (% de aumento) |
| 19E6 ² | + | + | + | 120-150 |
| 6D10 | + | + | + | 20 |
| E4B9 (P1) ³ | + | + | + | <20 |
| E4G10 (P1) | + | + | + | <20 |
| E3F2 (P2) | + | - | - | <20 |
| 1F6.1 (P2) | + | - | - | <20 |
| 10E4.1 (P2) | + | + | - | <20 |
| 8D6.1 (P4) | + | + | - | <20 |
| 9C6.1 (p4) | + | - | - | <20 |
| 3F7.1 (p4) | + | + | - | <20 |
| 4F1.1 Sup (mED1~2) | + | + | - | <20 |
| ¹ Abreviaturas: MAb, anticorpo monoclonal; mECD1~2 bacteriano, proteína expressa por via bacteriana contendo os domínios extracelulares 1 e 2 do terminal N da VE-caderina de murinos; IF, imunofluorescência | | | | |
| ² Anticorpo de controlo | | | | |
| ³ Este anticorpo, E4B9, interreage com a VE-caderina humana | | | | |

QUADRO 2

| Anticorpos anti-VE-caderina, preparados contra smVEC-Ig | | | | | |
|---|-------|-----------|--|----------------------------|---------|
| MAb ¹ | ELISA | ?? (Blot) | Ensaio de comutação de Ca ₂₊ (IF) | Permeabilidade paracelular | Domínio |
| 10G4 | +++ | + | + | + | 1 |
| 9D9 | + | - | - | - | 1 |
| 2G7 | + | - | - | - | 1 |
| 13E6 | +++ | + | - | - | 2 |
| 8A7 | +++ | + | - | - | 2 |
| 5H6 | ++ | + | - | - | 2 |
| 3C3 | + | - | - | - | 2 |
| 15F12 | +++ | + | - | - | 2 |
| 1A3 | + | - | - | - | 2-3 |
| 2B11 | +++ | + | - | - | 5 |
| ¹ Ver o quadro 1 | | | | | |

QUADRO 3

Anti-VEC humana

| MAb ¹ | Epítipo | Destruição das junções (permeabilidade vs. inibição de junções/comutação de Ca ₂₊) | | | |
|---------------------------|-------------|--|--|-----|------------|
| Cad5 | Domínio 1 | +++ | | +++ | |
| BV9 | Domínio 3 | +++ | | +++ | |
| BV6 | Domínio 3 | +++ | | +++ | |
| TEA | Domínio 4 | +/- | | +/- | |
| Hec1.2 | Domínio 4 | - | | - | |
| Anti-VEC humana | | | | | |
| | | | | | Toxicidade |
| 19E6 | Domínio 1 | +++ | | +++ | + |
| E4B9 | Domínio 1 | +/- | | +++ | - |
| 10G4 | Domínio 1 | ND | | +++ | ND |
| 6D10 | Domínio 3-4 | +/- | | +/- | - |
| ¹ Ver quadro 1 | | | | | |

EXEMPLO 3

O E4B9 inter-reage com a VE-caderina humana

A sequência epitópica de murinos reconhecida pelo anticorpo E4B9 (péptido 1) partilha 100% de homologia com a VE-caderina humana, pelo que se examinou este anticorpo para determinar se inter-reage com a VE-caderina humana. Uma análise pela metodologia de Western Blot, realizada com diversas células de murinos e de seres humanos em que tem lugar a expressão de VE-caderina, indicou que o anticorpo E4B9 inter-reage realmente com a VE-caderina humana (figura 6). Esta conclusão facilita o desenvolvimento de um anticorpo E4B9 "humanizado" e o seu sucesso no desenvolvimento pré-clínico, uma vez que a sua actividade anti-tumoral pode ser testada exaustivamente em diversos modelos com murganhos.

EXEMPLO 4

Cartografia dos epítomos

Para se definir o domínio específico de VE-caderina visado por cada novo anticorpo monoclonal, gerou-se por via recombinante um conjunto de truncamentos smVE-caderina-Ig. A estratégia de cartografia dos epítomos está ilustrada na figura 7. Utilizou-se a cultura de sobrenadantes de células COS transfectadas com estes plasmídeos portadores dos truncamentos sm-VE-caderina-Ig, conjuntamente com o protocolo de ELISA, para se determinar os domínios epitópicos para cada anticorpo monoclonal. Produziu-se uma cartografia epitópica fina dos três anticorpos monoclonais funcionais de bloqueio (E4B9, 19E6 e 10G4). Os resultados

preliminares revelam que os 19E6 e 10G4 reconhecem regiões diferentes daquelas que são reconhecidas pelo anticorpo monoclonal E4B9 (figuras 7-9).

O anticorpo E4B9 inibe a formação de novas junções sem destruir as junções existentes, ao passo que os outros anticorpos (19E6, 10G4 e Cad-5) destroem as junções existentes. Durante a última fase da angiogénese, as células endoteliais separadas têm de se reunir numa estrutura tubular de tipo capilar, sendo isso mediado pela adesão homofílica das moléculas de VE-caderina, presumivelmente provenientes das mesmas células (dímeros de ligação), em primeiro lugar, e provenientes depois de células opostas (dímeros de adesão). Posto isto, um anticorpo (tal como o E4B9) que reconhece a formação do "dímero de ligação", é suficiente para inibir a formação de novas junções. Pelo contrário, a destruição das junções existentes é um processo invertido, isto é, passa de "dímeros de adesão" para "dímeros de ligação". Assim, os antagonistas de anticorpos que são específicos para os "dímeros de adesão" parecem ser mais destruidores para a vasculatura existente. As provas que fundamentam este modelo são fornecidas pela cartografia fina de epítomos e por uma estrutura cristalina da VE-caderina.

EXEMPLO 5

Diversas avaliações *in vivo*

São analisadas permeabilidades vasculares em tecidos em conformidade com um ensaio do tipo desenvolvido por Miles, com algumas modificações (Corda, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 9815-9820 (1999). Dito de forma abreviada, o

anticorpo que se pretende experimentar ou um seu fragmento é administrado aos murganhos, quer por via intraperitoneal quer por via intravenosa, em diversas doses (50-1000 µg/dose). Determina-se o aumento da permeabilidade vascular injectando o corante azul de Evans (100 microlitros de uma diluição de 1 mg/mL) intravenosamente em momentos diferentes (6h, 12h, 24h e 48h). Após a administração, tipicamente ao fim de 20 minutos, os murganhos são anestesiados com cetamina e realiza-se uma perfusão com aproximadamente 20 mL de PBS. Faz-se a remoção dos órgãos dos murganhos que são homogeneizados em TCA/etanol (1:1 v/v). Quantifica-se o teor em azul de Evans nos homogenados teciduais, por espectrofotometria (DO = 510 nm). Mede-se o efeito do anticorpo sobre a permeabilidade vascular em percentagem do aumento em corante azul de Evans, comparativamente com o anticorpo de controlo.

São avaliados anticorpos monoclonais anti-VE-caderina de murganho, para se pesquisar os seus efeitos antitumorais no modelo de tumor primário subcutâneo de pulmão de Lewis, no modelo das metástases pulmonares de Lewis e no modelo da xenoenxertia subcutânea epidermóide humana (A431). Os tumores pulmonares subcutâneos primários de Lewis são estabelecidos em fêmeas de murganho C57BL/6 (fêmeas com idades de 6-8 semanas) por injeção s.c. de 1×10^5 células tumorais numa suspensão de solução salina equilibrada de Hanks, no flanco direito, utilizando uma agulha de calibre 22. As fêmeas de murganho (10 animais/grupo) são tratadas com um anticorpo de VE-caderina (50-1000 µg) ou com IgG de controlo, de rato, sem nenhuma relação, em cada 3-4 dias durante 3-4 semanas ou até que os animais se encontrem moribundos. Mede-se o volume dos tumores duas vezes por

semana, utilizando compassos de medida, e calcula-se os seus volumes utilizando a fórmula $\pi/6 \times \text{diâmetro}^2$. Remove-se cirurgicamente os tumores das fêmeas de murganho de cada grupo de tratamento para análise histológica e contrastação com anticorpo anti-CD31 para se avaliar a densidade vascular. No modelo de metástases pulmonares de Lewis, os tumores primários são estabelecidos nas almofadas das patas das fêmeas de murganho C57BL/6. Decorridos 28 dias, quando os tumores atingem um volume aproximado de 100 mm^3 , remove-se o tumor primário e decorridas 24 horas administra-se aos animais (10 animais/grupo) por via i.p. o anticorpo de VE-caderina (50-1000 μg) ou IgG de rato de controlo irrelevante, em cada 3 dias. Decorridas 4 semanas de tratamento, os animais são sacrificados e os seus pulmões são examinados para se pesquisar as metástases tumorais. Os pulmões também são examinados por histologia para detecção de micrometástases e são contrastados com anticorpo anti-CD31 para se avaliar a densidade vascular.

Recorre-se à linhagem celular A431 de carcinoma epidermóide humano, que é injectada subcutaneamente no flanco direito de uma fêmea de murganho tímica. Logo que os tumores atingem o volume de 150 mm^3 , os animais são divididos aleatoriamente em grupos de tratamento (10 animais/grupo) e administra-se-lhes anticorpo de VE-caderina (50-1000 μg) ou IgG de rato de controlo, sem nenhuma relação, em cada 3 dias durante 4 semanas. Os tumores são medidos duas vezes por semana e são removidos depois de os animais estarem moribundos ou ao fim de 4 semanas. Os tumores também são examinados por histologia e contrastados com o anticorpo anti-CD31 para se avaliar a densidade vascular. A avaliação da terapia com VE-caderina

baseia-se na taxa de crescimento tumoral, na regressão tumoral e na avaliação histológica da neovascularização dos tumores. A actividade do anticorpo em cada modelo tumoral é comparada com os resultados obtidos com o anticorpo monoclonal 19E6 que serve de controlo positivo. O controlo negativo é um anticorpo monoclonal de rato sem nenhuma relação. Realiza-se uma análise estatística do crescimento tumoral, utilizando o teste T de Student de dois restos, em que um valor $p < 0,05$ é considerado significativo.

No ensaio do tampão de 'Matrigel' são utilizadas fêmeas de murganho C57/BL (fêmeas com idades de 6-8 semanas) que são injectadas por via s.c. com 0,5 mL de factores angiogénicos misturados em Matrigel, utilizando uma agulha de calibre 25. Os animais são depois tratados por injeção por via i.p. com uma agulha de calibre 25, com diversas doses de anticorpos de VE-cadherin ou com controlos em cada 3 dias. Decorridos 10 dias, os animais são sacrificados por inalação de CO₂ e os tampões são retirados dos animais para posterior análise histológica.

No ensaio com células tumorais encapsuladas em 'Agitato' são utilizadas fêmeas de murganho C57BL/6 (fêmeas com idades de 6-8 semanas) que são anestesiadas com cetamina, sendo-lhes depois implantadas cirurgicamente s.c. 4 esférulas no terço superior do dorso e que são empurradas para longe do local de incisão. A incisão é fechada com agrafos cirúrgicos. As fêmeas de murganhos são então tratadas por injeção por via i.p., com uma agulha de calibre 25, com diversas doses de anticorpos de VE-caderina ou substâncias de controlo em cada 3 dias. Decorridos 12 dias, os animais são injectados por via i.p. com 100 µL de uma solução de FITC-dextrano à razão de 100 mg/kg (MW-150 000). Os animais são sacrificados por

inalação de CO₂ e são retiradas as esférulas que são guardadas ao abrigo da luz e objecto de processamento para a quantificação de FITC.

No modelo de xenoenxerto tumoral humano, são utilizadas fêmeas de murganho peladas atímicas (nu/nu) (fêmeas com idades de 6-8 semanas) que são injectadas por via s.c. com 2×10^6 células tumorais epidermóides humanas A431 numa suspensão de solução salina equilibrada de Hanks no flanco direito com uma agulha de calibre 22. No momento em que os tumores atingem um volume de 100-200 mm³, administra-se aos animais anticorpos de VE-caderina ou um anticorpo de controlo, duas vezes por semana por injeção por via i.p., com uma agulha de calibre 25, durante 6 semanas ou até os animais ficarem moribundos. Mede-se os volumes dos tumores duas vezes por semana com compassos de medida. Os animais que ficam livres de tumores durante o estudo são acompanhados durante mais 8 semanas após o tratamento estar completo. Os animais que completem o estudo ou fiquem moribundos são depois sacrificados por inalação de CO₂.

Listagem das Sequências

<110> Liao, Fang

Hicklin, Daniel J.

Bohlen, Peter

<120> Antagonistas de anticorpos de VE-caderina sem efeitos
adversos sobre a permeabilidade vascular

<130> 11245/46976

<140> depositado a 30 de Março de 2001

<141> 2000-03-31

<160> 6

<170> WordPerfect 8.0 para Windows

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 1

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Glu | Ile | Trp | Asn | Gln | Met | His | Ile | Asp | Glu | Glu | Lys | Asn | Glu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 2

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Trp | Ile | Trp | Asn | Gln | Met | His | Ile | Asp | Glu | Glu | Lys | Asn | Glu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 3

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Trp | Ile | Trp | Asn | Gln | Met | His | Ile | Asp | Glu | Glu | Lys | Asn | Thr |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 4

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Val | Lys | Asp | Gln | Ser | Asn | Tyr | Asn | Arg | Gln | Asn | Ala | Lys | Tyr | Cys |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 5

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Tyr | Val | Leu | Gln | Gly | Glu | Phe | Ala | Gly | Lys | Ile | Phe | Gly | Val | Asp |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

| | |
|-----|-----|
| Ala | Cys |
| | 18 |

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 6

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ile | Val | Asp | Lys | Asn | Thr | Asn | Lys | Asn | Leu | Glu | Gln | Pro | Cys |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A presente listagem de referências citadas pelo requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o IEP não assume nenhuma responsabilidade.

Patentes de invenção citadas na descrição

- US 5597725 A [0009]
- US 4946778 A [0033]
- WO 1124546976 A [0089]

Literatura citada na descrição, para além das patentes de invenção

- TAKEICHI. *Ann. Rev. Biochem.*, 1990, vol. 59, 237-252 [0005] [0005]
- GEIGER; AYALON. *Ann Rev. Cell Biol.*, 1992, vol. 8, 302-332 [0005]
- UEMURA. *Cell*, 1998, vol. 93, 1095-1098 [0005]
- NOSE *et al.* *Cell*, 1988, vol. 54, 993-1001 [0006]
- SHAPIRO *et al.* *Nature*, 1995, vol. 374, 327-337 [0006]
- OVERDUIN *et al.* *Science*, 1995, vol. 267, 386-389 [0006]
- NAGAR *et al.* *Nature*, 1996, vol. 380, 360-364 [0006]
- LAMPUGNANI *et al.* *J. Cell. Biol.*, 1992, vol. 118, 1511-1522 [0007]
- BREVIARIO *et al.* *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1995, vol. 15, 1229-1239 [0007] [0007] [0007]
- BREIER *et al.* *Blood*, 1996, vol. 87, 630-641 [0007] [0007]

- **LAMPUGNANI et al.** *J. Cell Biol*, 1995, vol. 129, 203-217 [0007]
- **BACH et al.** *Experimental Cell Research*, 1998, vol. 238, 324-334 [0007]
- **RABIET et al.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1996, vol. 16, 488-496 [0007]
- **DEJANA.** *J. Clin Invest.*, 1997, vol. 100, 7-10 [0007]
- **DEJANA et al.** *FASEB J.*, 1995, vol. 9, 910-918 [0007]
- **DEJANA et al.** *Ann N Y Acad Sci.*, 1997, vol. 811, 36-43 [0007]
- **GOTSCH et al.** *J. Cell. Sci.*, 1997, vol. 110, 583-588 [0007]
- **KEVIL et al.** *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 15099-15103 [0007]
- **CORADA et al.** *Proc. Natl. Acad Sci*, 1999, vol. 96, 9815-9820 [0007]
- **YAP et al.** *J. Cell Biol*, 1998, vol. 141, 779-789 [0007]
- **CAVEDA et al.** *J. Clin. Invest.*, 1996, vol. 98, 886-893 [0007]
- **ALI et al.** *Microcirculation*, 1997, vol. 4, 267-277 [0007]
- **VITTET et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1997, vol. 94, 6273-6278 [0007]
- **FAURE et al.** *Development*, vol. 128, 2093-2102 [0007]
- **CARMELIET et al.** *Cell*, 1999, vol.98, 147-157 [0007]
- **F. LIAO et al.** Identification of antibody-based VE-cadherin antagonists for the application of anti-angiogenesis therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 41, 645 [0008]
- **F.R. HASELTON; R.L. HEIMARK.** Role of cadherins 5 and 13 in the aortic endothelial barrier. *Journal of Cellular Physiology*, 1997, vol. 171, 243-251 [0011]

- **KOHLER; MILSTEIN.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497 [0031]
- **KOZBOR et al.** *Immunology Today*, 1983, vol. 4, 72 [0031]
- **COLE et al.** In *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. Alan R. Liss, Inc, 1985, 77-96 [0031]
- **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, 1989 [0040]
- **BERMAN et al.** *EMBO J.*, 1988, vol. 7, 727-738 [0048]
- The Immunoglobulin Gene Superfamily. **WILLIAMS; BARCLAY.** *Immunoglobulin Genes*. 1989 [0050]
- *Catalogue of Cell Lines and Hybridomas*. 1985 [0053]
- **GILLMAN; SMITH.** *Gene*, 1979, vol.8, 81-97 [0055]
- **ROBERTS et al.** *Nature*, 1987, vol. 328, 731-734 [0055]
- **QUEEN.** *Nature*, 1991, vol. 351, 501 [0056]
- **SCOPES.** *Protein Purification*. Springer-Verlag, 1982 [0056]
- *Remington's Pharmaceutical Science*. Mack Publishing Company, 1980 [0061]
- **GUMBINER, B.; SIMONS, K.** *Cell Biol.*, 1986, vol. 102, 457-468 [0073]
- **CORDA et al.** *Proc. Natl. Acad Sci*, 1999, vol. 96, 9815-9820 [0083]

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo ou fragmento de anticorpo capaz de se ligar especificamente a qualquer elemento do grupo seleccionado entre:

- uma VE-caderina num local contido nos primeiros 15 aminoácidos do terminal N do domínio 1 da VE-caderina e

- um péptido que possua a sequência de aminoácidos designada por SEQ ID NO:2 (DWIWNQMHI DEEKNE),

em que o anticorpo ou o fragmento de anticorpo é capaz de inibir *in vitro* a formação de junções aderentes mediadas pela VE-caderina, mas que não exerce nenhum efeito significativo ou substancial sobre a permeabilidade paracelular *in vitro*.

2. Anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo ou o fragmento de anticorpo não exerce nenhum efeito significativo ou substancial sobre a permeabilidade vascular *in vivo*.

3. Anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, **caracterizado pelo facto** de o anticorpo ou o fragmento de anticorpo ser substancialmente não tóxico quando administrado a um animal ou a um mamífero.

4. Anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado pelo facto** de o anticorpo ou o fragmento de anticorpo inibir a angiogénese *in vivo* ou *in vitro* ou inibir as metástases tumorais.

5. Anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado pelo facto** de o anticorpo ou o fragmento de anticorpo inibir a formação de novas junções aderentes, sem afectar as junções aderentes existentes.

6. Anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado pelo facto** de o anticorpo ser um anticorpo monoclonal ou o fragmento de anticorpo ser proveniente de um anticorpo monoclonal.

7. Anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado pelo facto** de o anticorpo ser o anticorpo monoclonal E4B7 de murino, produzido por um hibridoma depositado na ATCC com o número de registo PTA-1618.

8. Anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado pelo facto** de o anticorpo ou o fragmento de anticorpo ser um anticorpo de cadeia única, ser humanizado, ser quimerizado ou ser biespecífico.

9. Anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado pelo facto** de o anticorpo ou o fragmento de anticorpo estar fundido com um polipéptido heterólogo.

10. Hibridoma que produz o anticorpo monoclonal da reivindicação 6.

11. Hibridoma que produz o anticorpo monoclonal da reivindicação 7, depositado na ATCC com o número de registo PTA-1618.

12. Composição farmacêutica, **caracterizada pelo facto** de compreender o anticorpo ou fragmento de anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 9 e um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável.

13. Anticorpos ou fragmentos de anticorpos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, para utilização como medicamentos para o tratamento de patologias associadas à angiogénese em mamíferos.

14. Anticorpos ou fragmentos de anticorpos de acordo com a reivindicação 13, para utilização como medicamentos para o tratamento de doenças neoplásicas associadas a angiogénese, tumores sólidos, doenças autoimunes, doenças vasculares colagénicas, artrite reumatóide, patologias oftalmológicas, retinopatia diabética, fibroplasia retrolenticular ou glaucoma neovascular de mamíferos

15. Anticorpos ou fragmentos de anticorpos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, para utilização como medicamentos em composições farmacêuticas para o tratamento de mamíferos, para inibir metástases de tumores.

16. Anticorpos ou fragmentos de anticorpos de acordo com a reivindicação 15, para utilização como medicamentos em composições farmacêuticas para o tratamento de mamíferos para inibir metástases de carcinomas, gliomas, sarcomas,

adenocarcinomas, adenosarcomas, adenomas, tumores leucémicos e tumores linfóides.

17. Anticorpos ou fragmentos de anticorpos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9 para utilização como medicamentos em composições farmacêuticas para o tratamento de doenças proliferativas celulares associadas à vascularização em mamíferos, para inibir a proliferação de células endoteliais, sem afectar de forma adversa a vasculatura normal.

18. Anticorpos ou fragmentos de anticorpos de acordo com a reivindicação 17, para utilização como medicamentos em composições farmacêuticas para o tratamento de artrite reumatóide e da degeneração muscular associada à idade.

19. Ácido nucleico isolado, que compreende uma sequência de nucleótidos que contém uma sequência que codifica o anticorpo ou o fragmento de anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 9.

20. Vector de expressão que compreende o ácido nucleico da reivindicação 19, funcionalmente ligado a sequências para regular a expressão da sequência de nucleótidos.

21. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 19, para utilização como medicamento para o tratamento de doenças associadas à angiogénese em mamíferos ou para inibir a neovascularização de tumores.

Lisboa, 4/05/2009

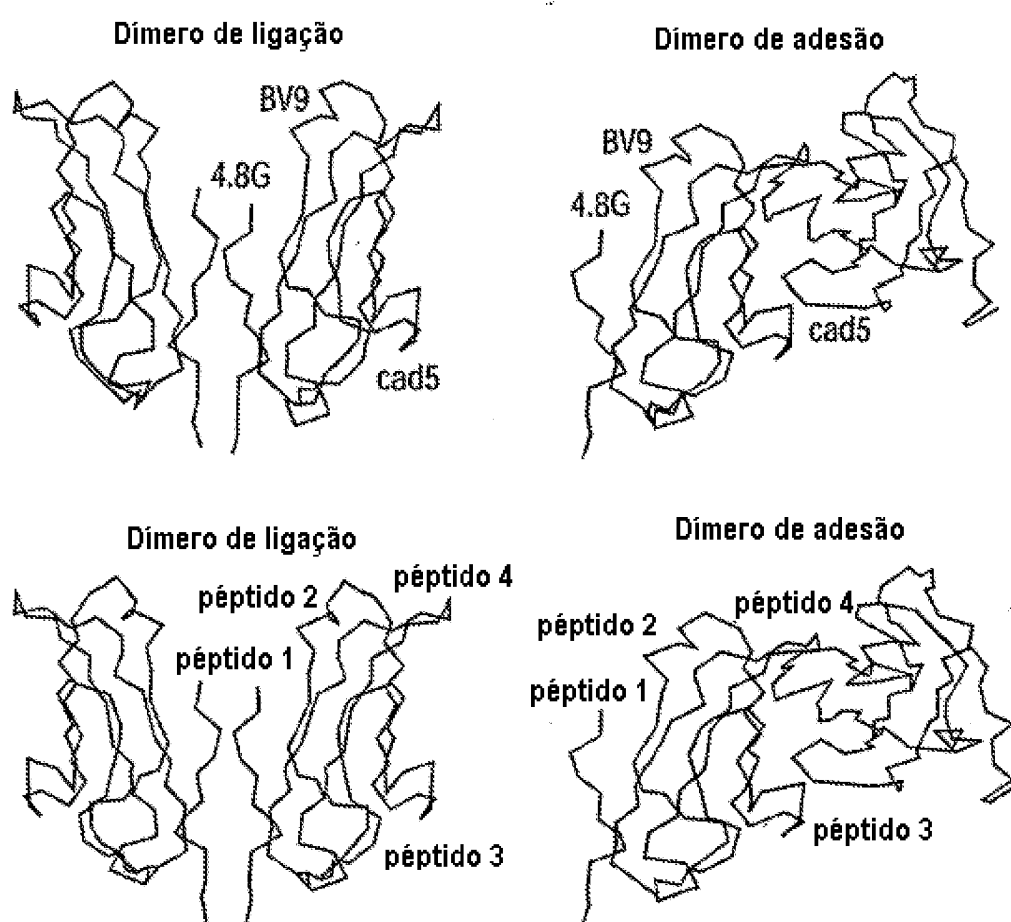


FIG. 1

| | | | |
|---------------------------|---|--|------|
| DWVIPPINLPENS | RGPPQELVRIRSDRDKNLSLRYSVTGPGADQPPTGIFIINP | mNC | |
| DWVIPPISC | PENEKGEFPKNLVQIKSNRDKETKVFYSITGQGADKPPVGVFIER | mEC | |
| 4.8G | BV9 | Cad5 | |
| DWIWNQMHIDE | EKNTE | SPHHVGKIKSSVSRK-NAKYLLKGEYVGK-----VERVDA | hVEC |
| DWIWNQMHIDE | EKNESLPHYV-KDQSNVNRQ-NAKYVLQGEFAGK-----IFGVDA | mVEC | |
| Péptido 1 | Péptido 2 | Péptido 3 | |
| | | | |
| ISGQLSVTKPLDRELIARFHLRAHA | VDIN-GNQVENPIDIVINVIDMNDNRPEF | mNC | |
| ETGWLKVTQPLDREAI | AKYILYSHAVSSN-GEAVEDPMEIVITVTDQNDNRPEF | mEC | |
| ETG | VDFAIERLDRENISEYHLTAVIVDKDTGENLETPSSFTIKVHDVNDNWPVE | hVEC | |
| NTGNVLAYERLDREKVSEYFLT | <u>ALIVDKNTNKNLEQPS</u> SFTVKVHDINDNWPVF | MVEC | |
| Péptido 4 | | | |

FIG. 2

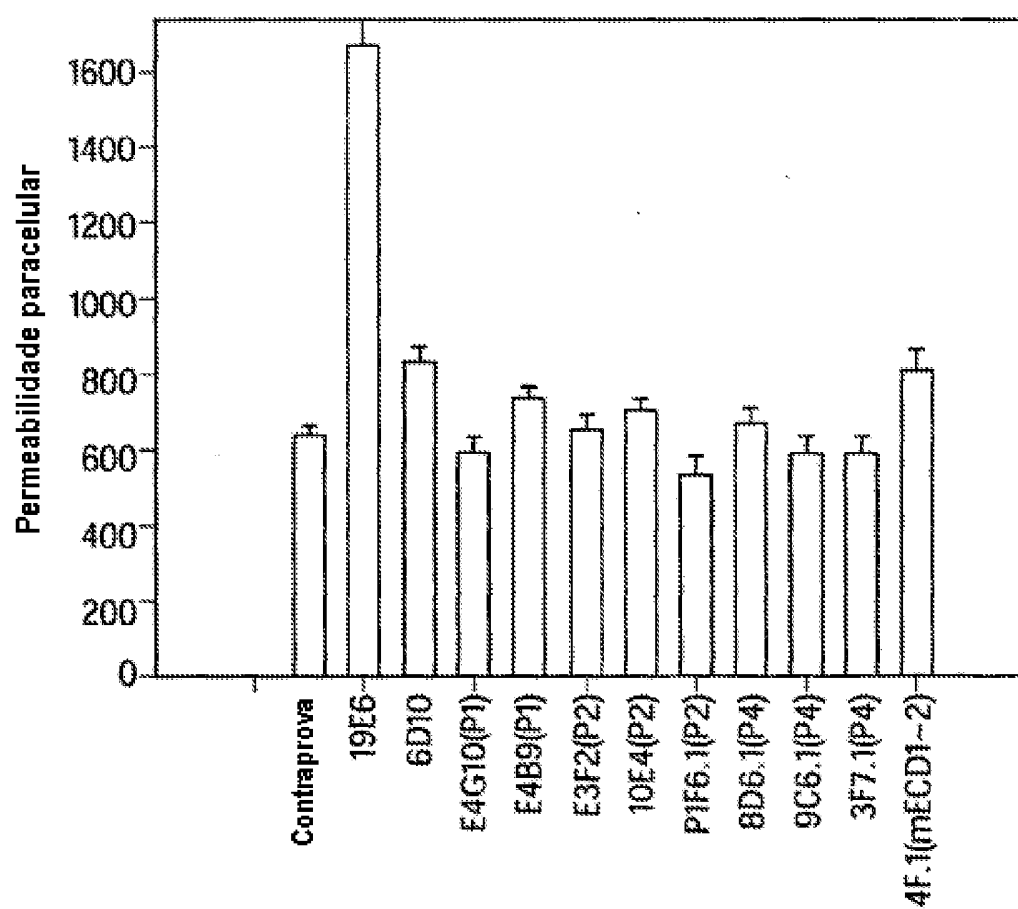


FIG. 3

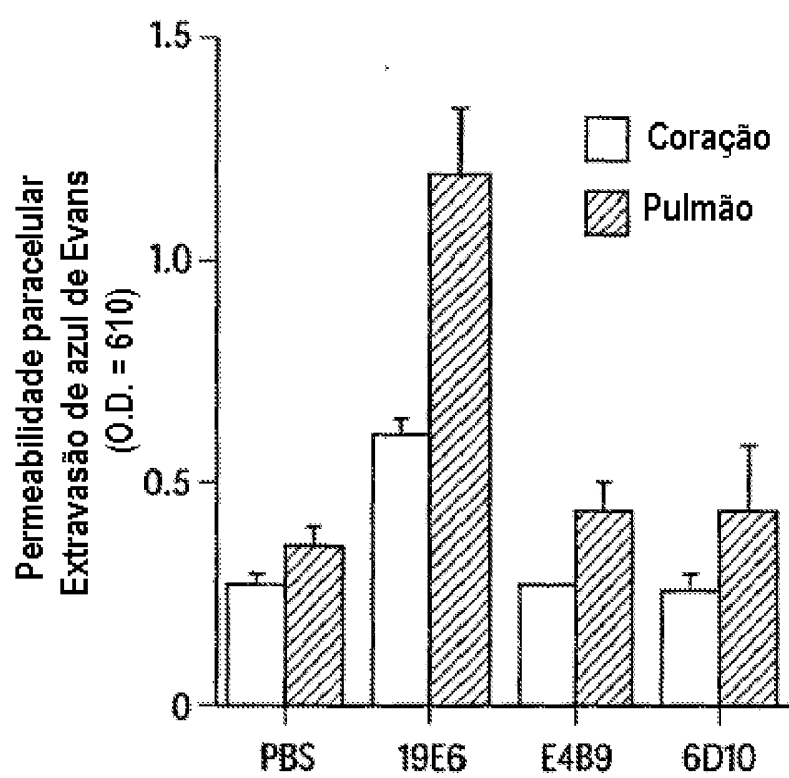
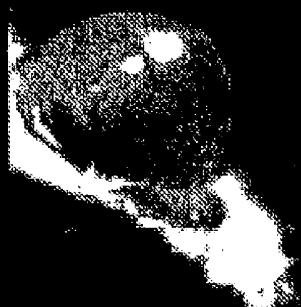


FIG. 4

**Efeito do mAb 19E6 anti-VE-caderina sobre a
neovascularização induzida por b-FGF no ensaio das
microbolsas da córnea dos murganhos**



IgG1 do rato



19E6

FIG. 5 A

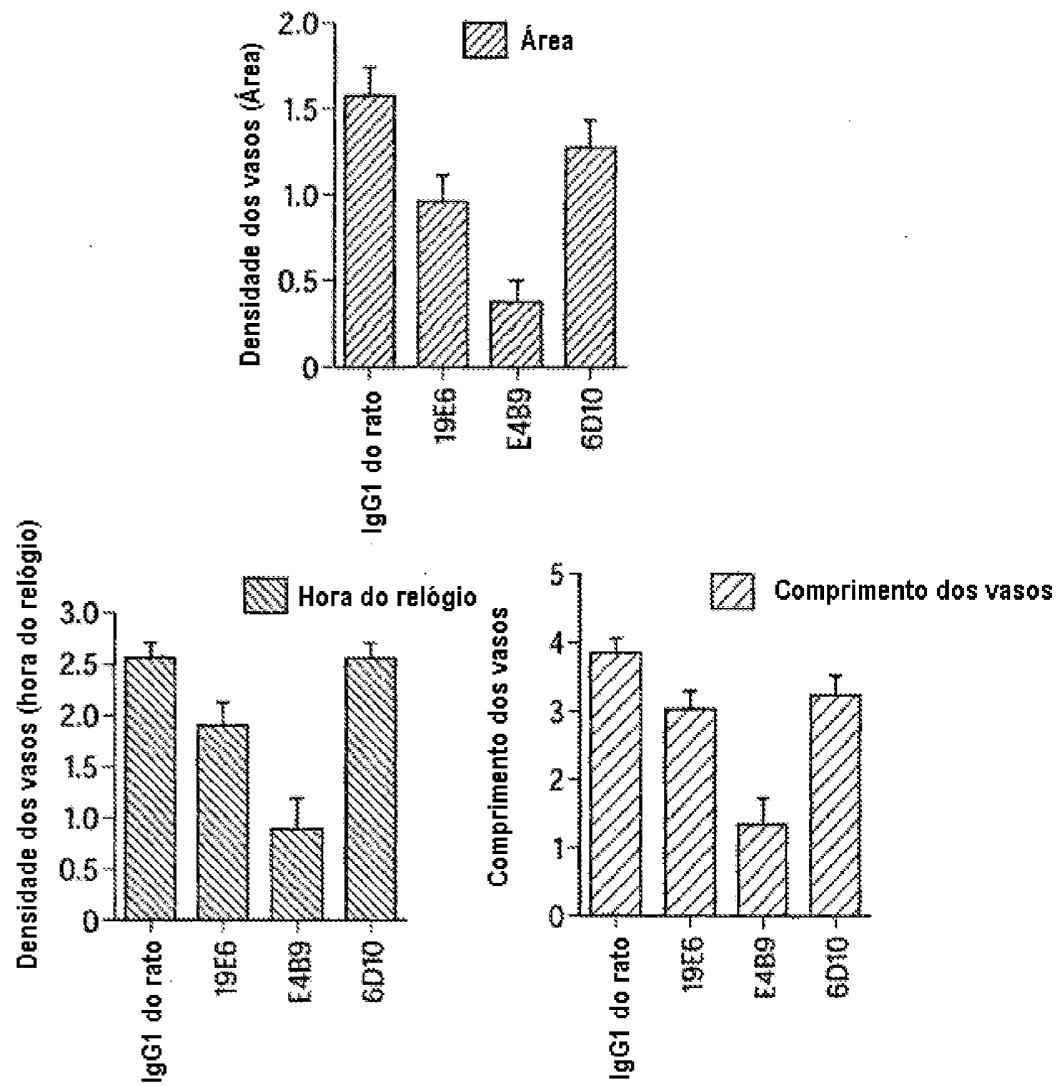


FIG. 5B

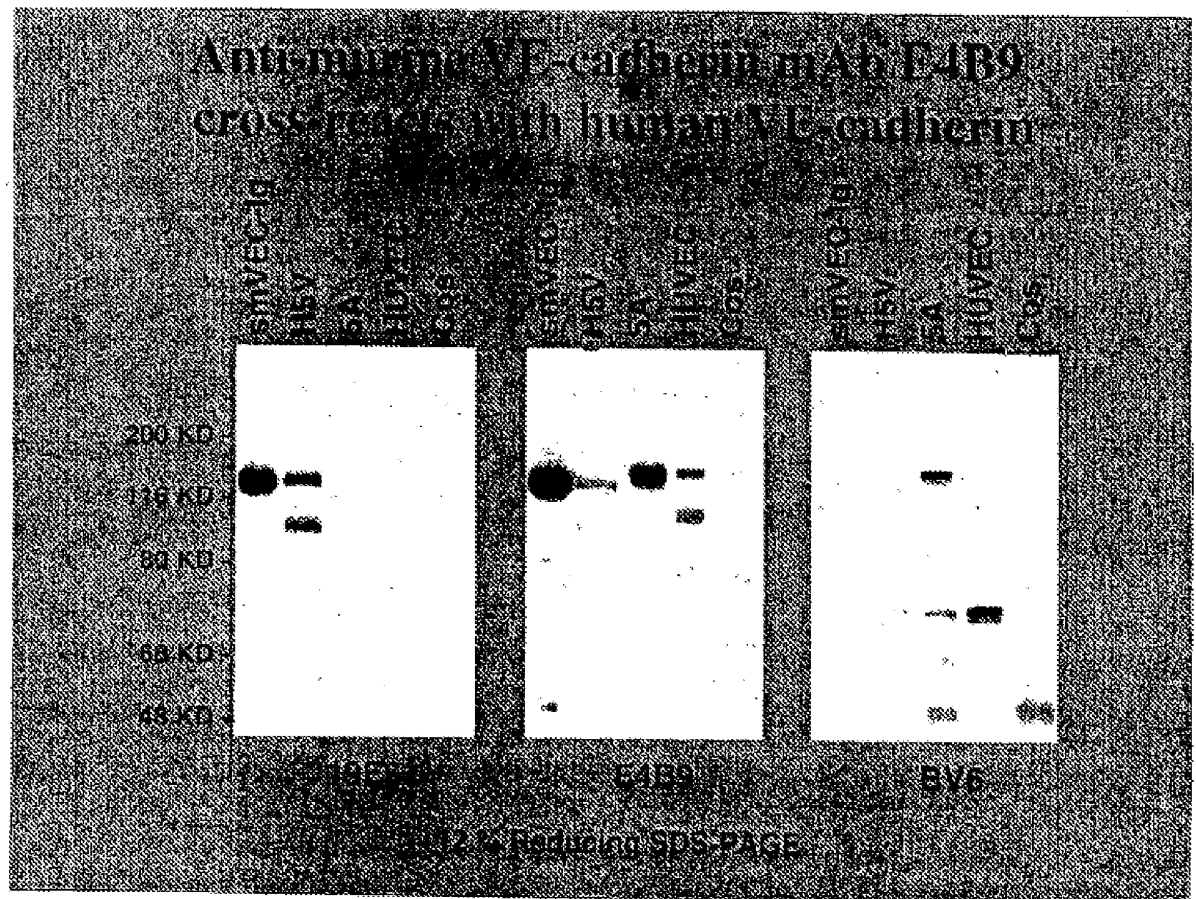


Fig 6

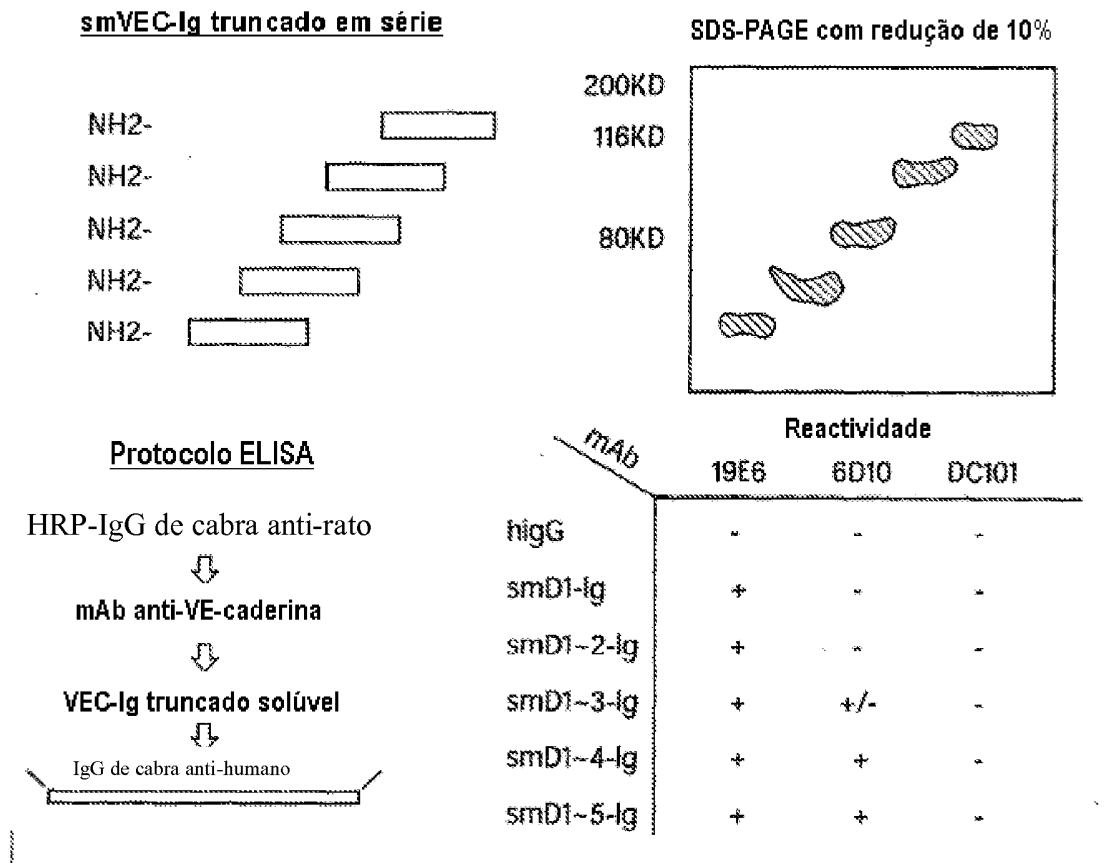


Fig.7

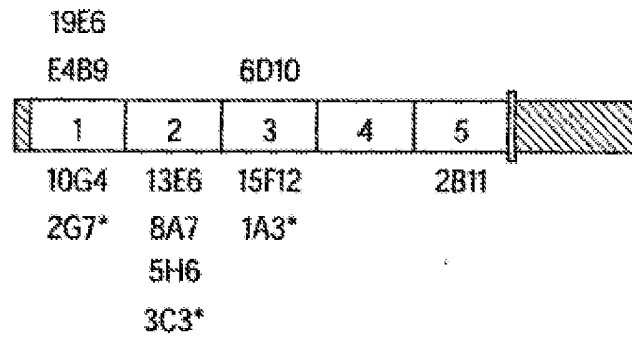


FIG. 8

DWIIWNQMHI DEEKNESLPHYVKDQSNVNRQNAKYVLOGEFAGKIFGVDAN
 E4B9 19E6, 10G4 (Cad5)

TGNVLAYERLDREKVSEYFLTALIVDKNTNKNLEQPSSFTVKVHDINDNWPVF

ECD1 dos murinos

FIG. 9